

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年1月19日 (19.01.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/284869 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 401/12 (2006.01) C07D 413/14 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01) C07D 417/12 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01) C07D 417/14 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/106053

(22) 国际申请日: 2022年7月15日 (15.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110801875.1 2021年7月15日 (15.07.2021) CN
202110875486.3 2021年7月30日 (30.07.2021) CN
202111162655.5 2021年9月30日 (30.09.2021) CN
202111273381.7 2021年10月29日 (29.10.2021) CN
202210039225.2 2022年1月13日 (13.01.2022) CN
202210260637.9 2022年3月16日 (16.03.2022) CN
202210731484.1 2022年6月24日 (24.06.2022) CN

(71) 申请人: 南京明德新药研发有限公司 (MEDSHINE DISCOVERY INC.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江北新区高新路9号商务办公楼218室, Jiangsu 210032 (CN)。

(72) 发明人: 王建非 (WANG, Jianfei); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 杨广文 (YANG, Guangwen); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 奥志华 (AO, Zhihua); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 孙继奎 (SUN, Jikui); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 张杨 (ZHANG, Yang); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 陈曙辉 (CHEN, Shuhui); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

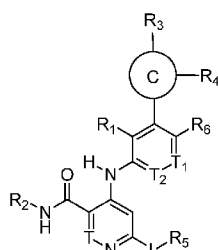
- 关于申请人有权申请并被授予专利 (细则4.17(ii))
- 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

(54) Title: SULFUR/PHOSPHORUS-CONTAINING ARYL COMPOUND AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 含硫/磷的芳基类化合物及其应用



(V)

(57) Abstract: Provided are a sulfur/phosphorus-containing aryl compound and an application thereof, and specifically disclosed are a compound represented by formula (V) and a pharmaceutically acceptable salt thereof.

(57) 摘要: 提供了含硫/磷的芳基类化合物及其应用, 具体公开了式(V)所示化合物及其药学上可接受的盐。



WO 2023/284869 A1

含硫/磷的芳基类化合物及其应用

本申请主张如下优先权：

CN202110801875.1，申请日：2021年07月15日；

CN202110875486.3，申请日：2021年07月30日；

CN202111162655.5，申请日：2021年09月30日；

CN202111273381.7，申请日：2021年10月29日；

CN202210039225.2，申请日：2022年01月13日；

CN202210260637.9，申请日：2022年03月16日；

CN202210731484.1，申请日：2022年06月24日。

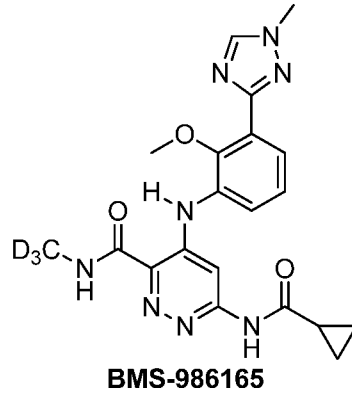
技术领域

本发明涉及新的含硫/磷的芳基类化合物及其应用，具体涉及式(V)所示化合物及其药学上可接受的盐。

背景技术

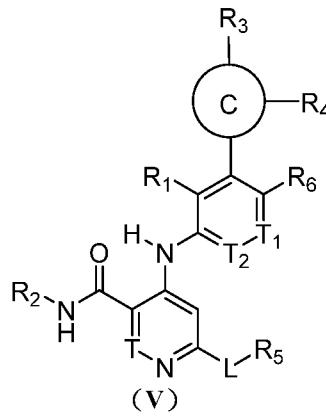
JAK是一类非受体酪氨酸激酶，共有JAK1、JAK2、JAK3、TYK2四种亚型，它们介导的JAK-STAT信号通路与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节有关。JAK-STAT是免疫反应所必需的通路，而在炎症发生时，JAK被过度激活又会反过来促进疾病进展。随着对JAK-STAT通路在各类自身免疫疾病中作用机制的研究加深，JAK抑制剂作为最新类型的自身免疫靶向药物，目前逐渐在类风湿性关节炎(RA)、银屑病关节炎(PsA)、特应性皮炎获得上市批准，并且还有更多适应症处于临床晚期在研状态，包括强直性脊柱炎(AS)、溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩病等。研究发现TYK2能介导IL-6、IL-10、IL-12、IL-23和I型干扰素等信号的传导，涵盖了目前认为的银屑病疾病进展的关键细胞因子IL-12和IL-23。因此TYK2抑制剂被认为是治疗另一自身免疫疾病中庞大的适应症人群—银屑病的重要靶点，但到目前为止还没有TYK2抑制剂获批。

BMS-986165(TYK2选择性别构抑制剂)是该领域进展最快的候选化合物，三期展现了接近一线生物药的优秀临床药效，显著优于口服标准疗法阿普斯特(PED4抑制剂)，并且不良反应发生率低，其中不良事件导致的停药率低于阿普斯特组和安慰剂组。BMS-986165作用机制独特，与其它JAK抑制剂不一样的是，它作用于TYK2 JH2假激酶区域，但是和正构抑制剂一样的会抑制TYK2激酶活性，从而发挥作用；特别的是，它实现了激酶高选择性(>1000倍)。这体现了高选择性TYK2抑制剂在治疗银屑病等靶点方面具有巨大的临床应用潜力，具有重大的临床应用价值。



发明内容

本发明提供了式 (V) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



其中，

L 选自 -NH-、-NHC(=O)-、-NHC(=O)O- 和 -NHC(=O)NH-；

T、T₁ 和 T₂ 分别独立地选自 N 和 CH，所述 CH 任选被 1 个卤素取代；

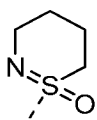
R₁ 选自 C₁₋₃ 烷氧基，所述 C₁₋₃ 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

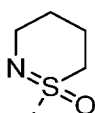
R₂ 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

环 C 选自苯基和 6 元杂芳基；

R₃ 选自 -P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₄ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基、-S(=O)_n-4-5 元杂环

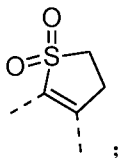
烷基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₄ 烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷基、-S(=O)(=NR)C₃₋₅ 环烷基、 和

，所述 -P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₄ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基、-S(=O)_n-4-5 元杂环烷基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₄ 烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷基、-S(=O)(=NR)C₃₋₅ 环烷基、

 和  分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代；

R₅选自 C₁₋₃ 烷基、C₃₋₅ 环烷基和 5-6 元杂芳基，所述 C₁₋₃ 烷基、C₃₋₅ 环烷基和 5-6 元杂芳基分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

R₄ 和 R₆ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br 和 I；



或者，R₃ 和 R₄ 与它们相连的碳原子共同构成

R_a 和 R_b 分别独立地选自 H、D、F、Cl、Br 和 I；

R_c 选自 F、Cl、Br、I 和 C₁₋₃ 烷基；

R 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基；

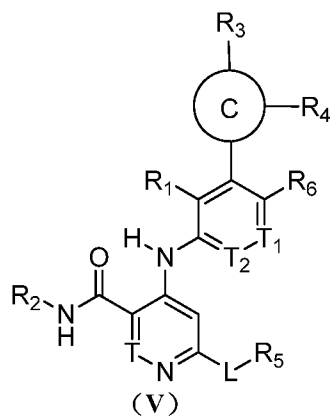
n 为 1 或 2；

条件是：

T 为 N 时，R₃ 不为-S(=O)_nC₁₋₄ 烷基；

所述 4-5 元杂环烷基和 5-6 元杂芳基的“杂”选自 1、2 或 3 个独立选自-O-、-NH-、-S-和-N-的杂原子或杂原子团。

本发明提供了式 (V) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



其中，

L 选自-NH-、-NHC(=O)-、-NHC(=O)O-和-NHC(=O)NH-；

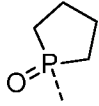
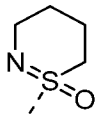
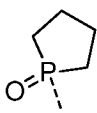
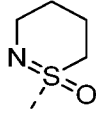
T、T₁ 和 T₂ 分别独立地选自 N 和 CH，所述 CH 任选被 1 个卤素取代；

R₁ 选自 C₁₋₃ 烷氧基，所述 C₁₋₃ 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R₂ 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

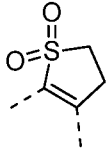
环 C 选自 5-6 元杂芳基；

R₃ 选自-P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₄ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基氨基、-S(=O)_n-4-5 元杂环

烷基、 $-S(=O)_nNH_2$ 、 $-S(=O)(=NR)C_{1-4}$ 烷基、 $-S(=O)(=NR)C_{1-3}$ 烷氨基、 $-S(=O)(=NR)C_{3-5}$ 环烷基、 和 , 所述 $-P(=O)(C_{1-3}$ 烷基)₂、 $-P(=O)(C_{3-5}$ 环烷基)₂、 $-S(=O)_nC_{1-4}$ 烷基、 $-S(=O)_nC_{1-3}$ 烷氨基、 $-S(=O)_{n-4-5}$ 元杂环烷基、 $-S(=O)_nNH_2$ 、 $-S(=O)(=NR)C_{1-4}$ 烷基、 $-S(=O)(=NR)C_{1-3}$ 烷氨基、 $-S(=O)(=NR)C_{3-5}$ 环烷基、 和  分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代；

R_5 选自 C_{1-3} 烷基、 C_{3-5} 环烷基和 5-6 元杂芳基，所述 C_{1-3} 烷基、 C_{3-5} 环烷基和 5-6 元杂芳基分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

R_4 和 R_6 分别独立地选自 H、F、Cl、Br 和 I；

或者， R_3 和 R_4 与它们相连的碳原子共同构成 ；
 R_a 和 R_b 分别独立地选自 H、D、F、Cl、Br 和 I；

R_c 选自 F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基；

R 选自 H 和 C_{1-3} 烷基；

n 为 1 或 2；

条件是：

T 为 N 时， R_3 不为 $-S(=O)_nC_{1-4}$ 烷基；

所述 4-5 元杂环烷基和 5-6 元杂芳基的“杂”选自 1、2 或 3 个独立选自 -O-、-NH-、-S- 和 -N- 的杂原子或杂原子团。

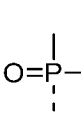
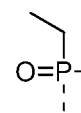
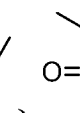
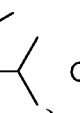
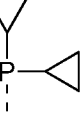
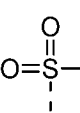
在本发明的一些方案中，上述 L 选自 -NH- 和 -NHC(=O)-，其他变量如本发明所定义。在本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 OCH_3 ，所述 OCH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代，其他变量如本发明所定义。

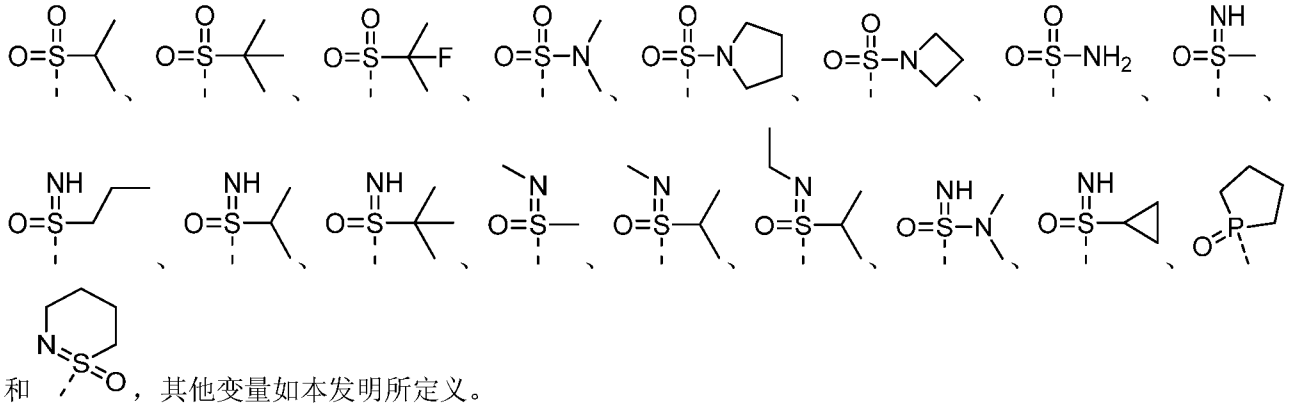
在本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 OCH_3 和 OCF_3 ，其他变量如本发明所定义。

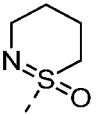
在本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 OCH_3 ，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自 H 和 CH_3 ，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。

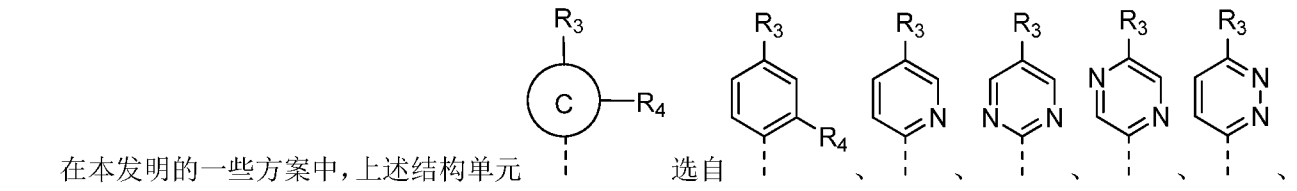
在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自 H、 CH_3 和 CD_3 ，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_3 选自 、、、、、、



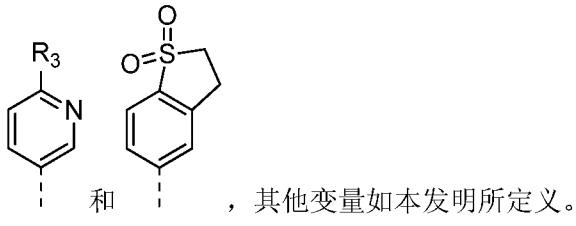
和 , 其他变量如本发明所定义。

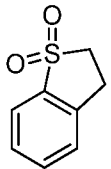
在本发明的一些方案中, 上述环C选自苯基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基和吡嗪基, 其他变量如本发明所定义。

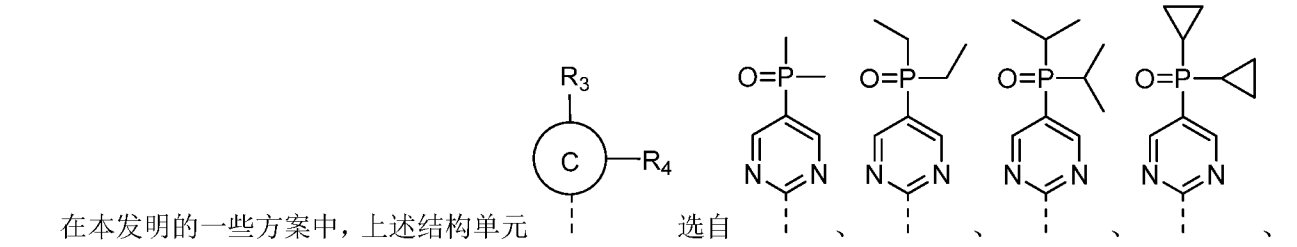


在本发明的一些方案中, 上述结构单元

选自

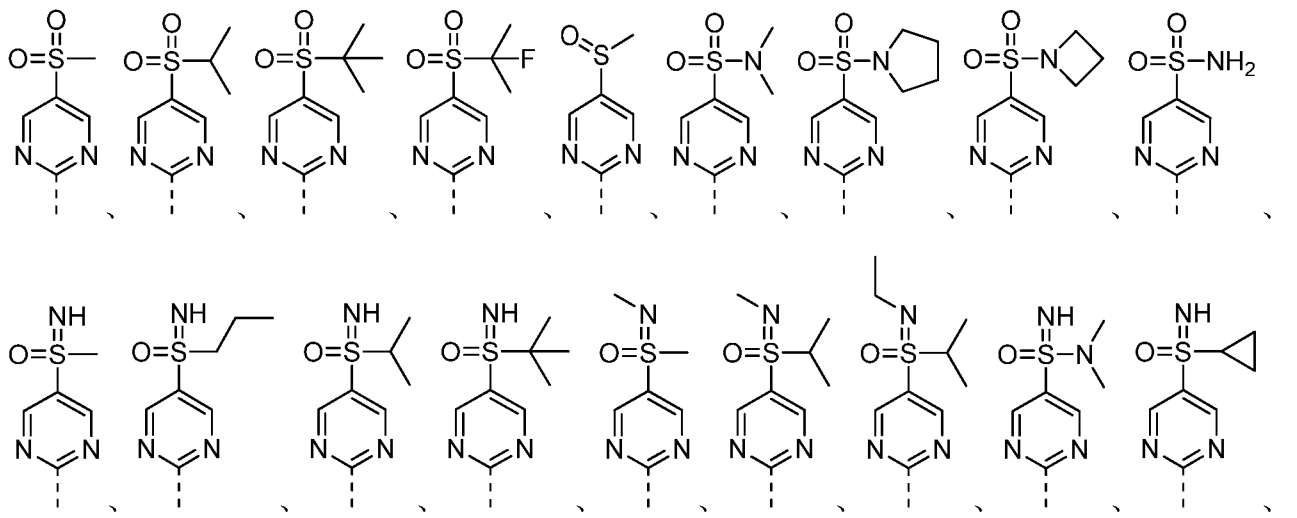


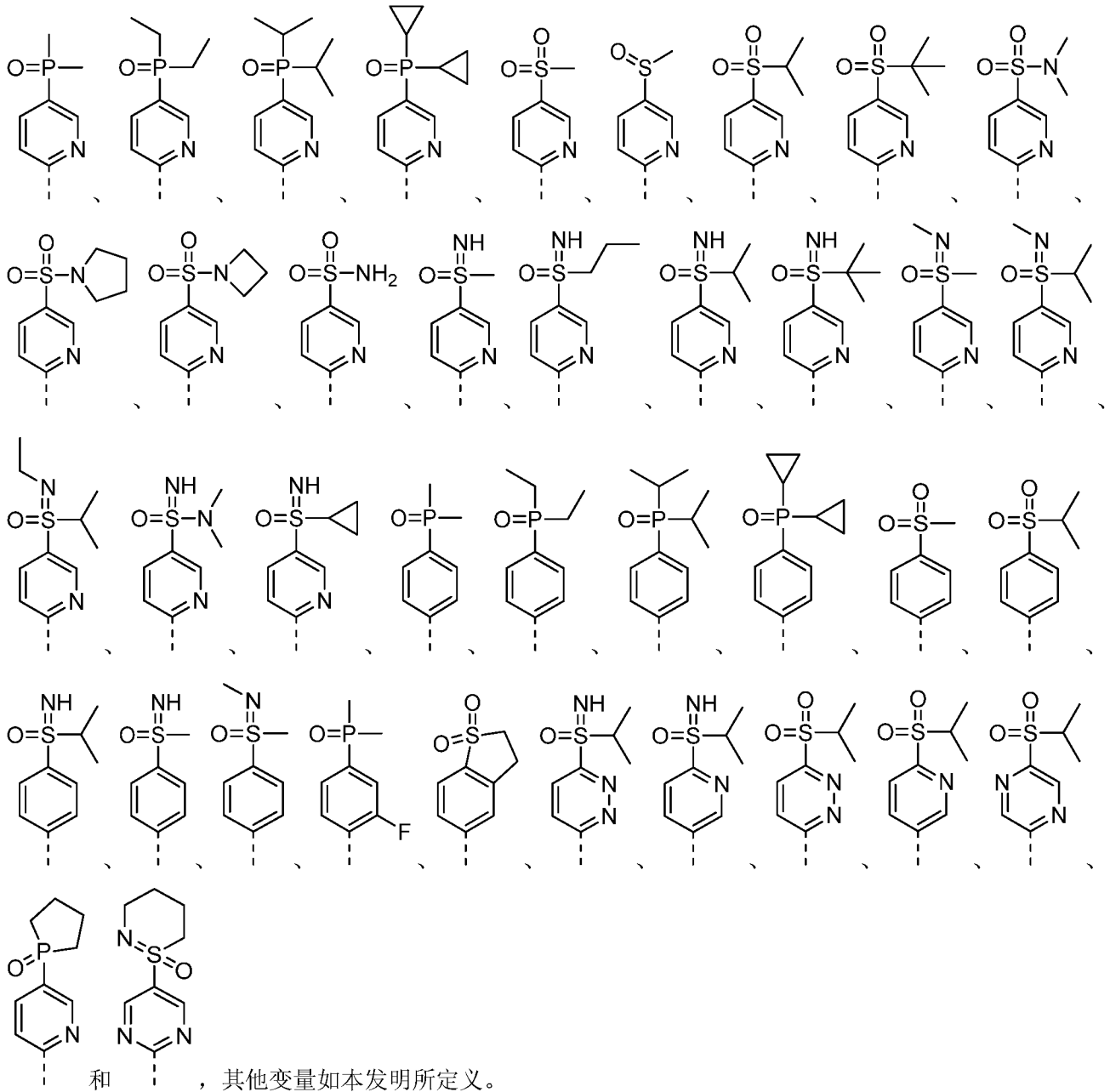
和 , 其他变量如本发明所定义。



在本发明的一些方案中, 上述结构单元







选自

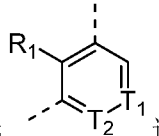
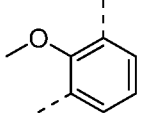
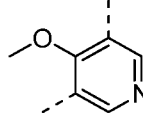
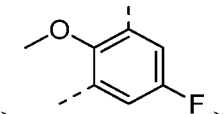


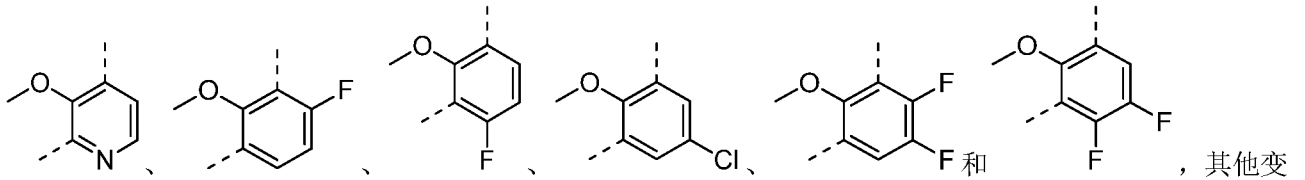


在本发明的一些方案中，上述R₆选自F和CH₃，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述R₅选自CH₃、环丙基、咪唑基、吡唑基和吡啶基，所述CH₃、环丙基、咪唑基、吡唑基和吡啶基分别独立地任选被1、2或3个R₆取代，其他变量如本发明所定义。

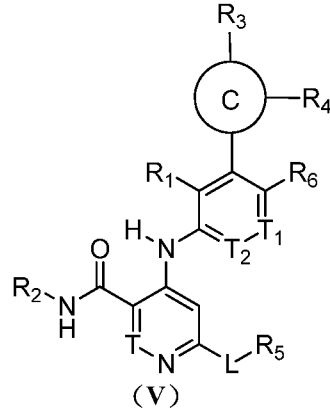
在本发明的一些方案中，上述R₅选自CH₃、、、、、 和 ，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述结构单元  选自 、、、



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，其化合物选自：



其中，

L 选自 -NH-、-NHC(=O)-、-NHC(=O)O- 和 -NHC(=O)NH-；

T、T₁ 和 T₂ 分别独立地选自 N 和 CH，所述 CH 任选被 1 个卤素取代；

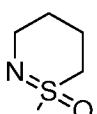
R₁ 选自 C₁₋₃ 烷氧基，所述 C₁₋₃ 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R₂ 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

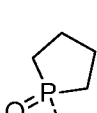
环 C 选自苯基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基和吡嗪基；

R₃ 选自 -P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)_{n-4-5} 元杂环

烷基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)(=NR)C₃₋₅ 环烷基、 和

，所述 -P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)_{n-4-}

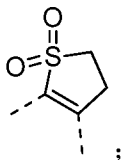
5 元杂环烷基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)(=NR)C₃₋₅ 环烷基、

 和  分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代；

R₅ 选自 C₁₋₃ 烷基、C₃₋₅ 环烷基和 5-6 元杂芳基，所述 C₁₋₃ 烷基、C₃₋₅ 环烷基和 5-6 元杂芳基分别独立地任选

被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

R₄ 和 R₆ 分别独立地选自 H、F、Cl 和 Br；



或者，R₃ 和 R₄ 与它们相连的碳原子共同构成

R_a 和 R_b 分别独立地选自 H、D、F、Cl、Br 和 I；

R_c 选自 F、Cl、Br、I 和 C₁₋₃ 烷基；

R 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基；

n 为 1 或 2；

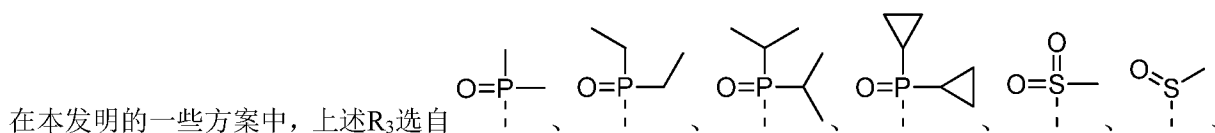
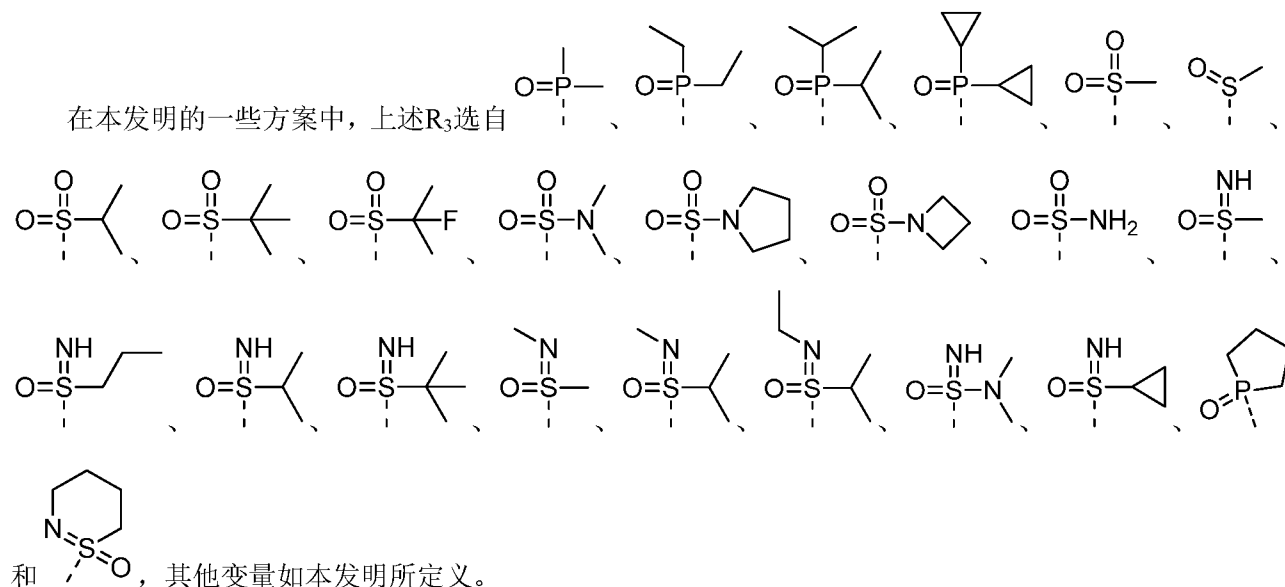
所述 4-5 元杂环烷基和 5-6 元杂芳基的“杂”选自 1、2 或 3 个独立选自 -O-、-NH-、-S- 和 -N- 的杂原子或杂原子团。

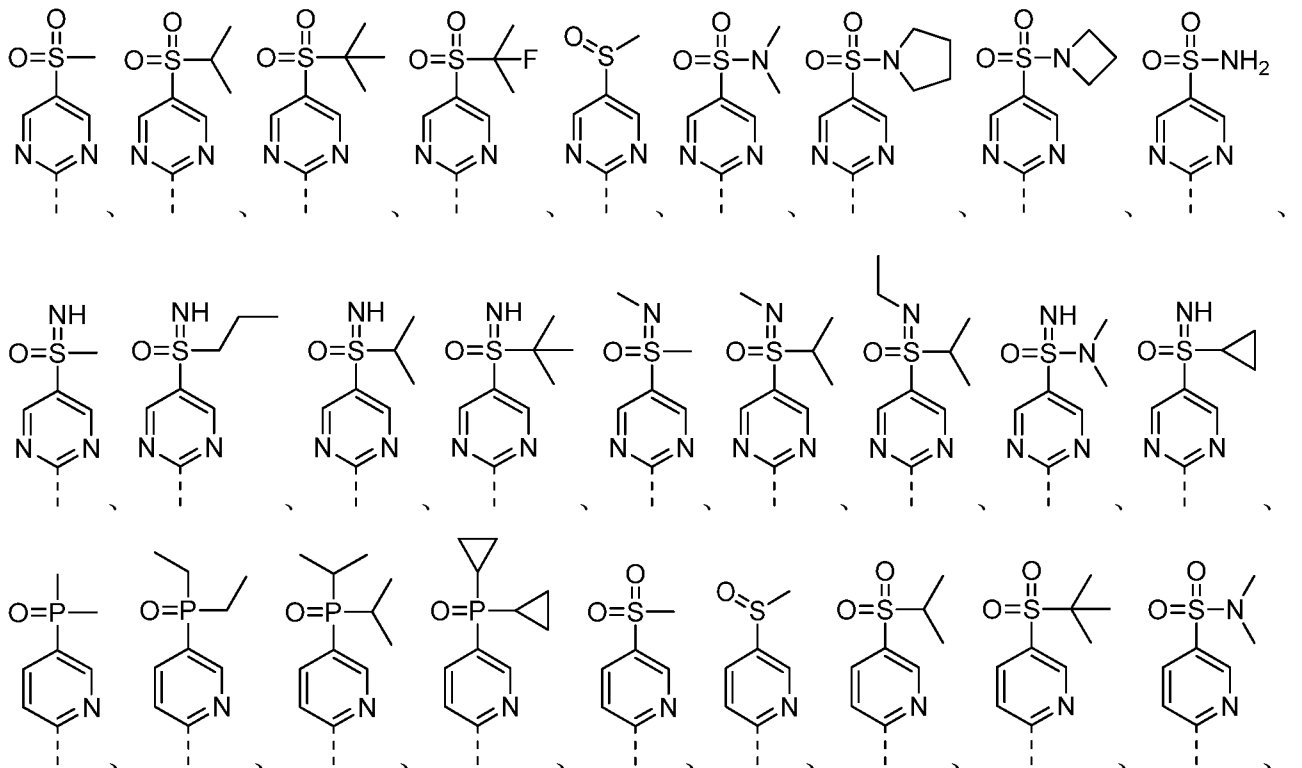
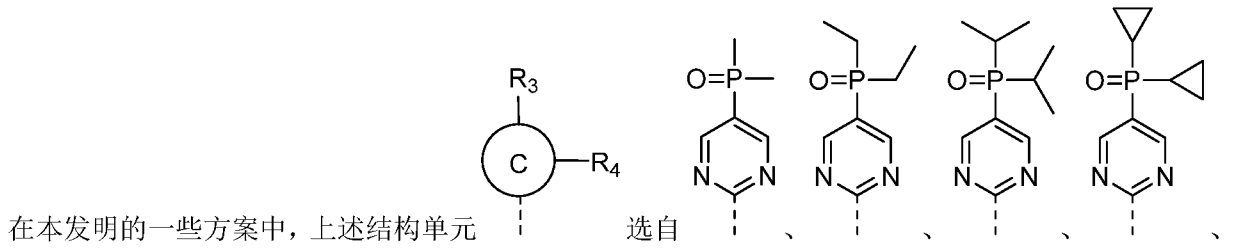
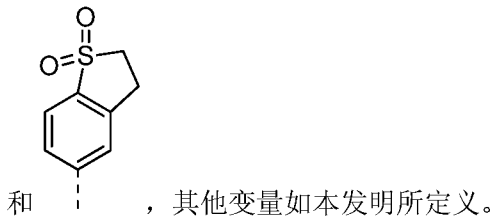
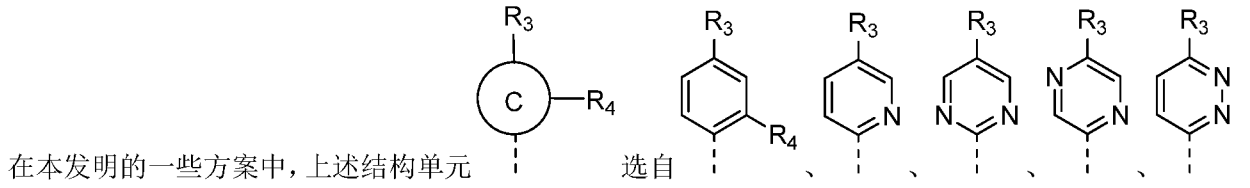
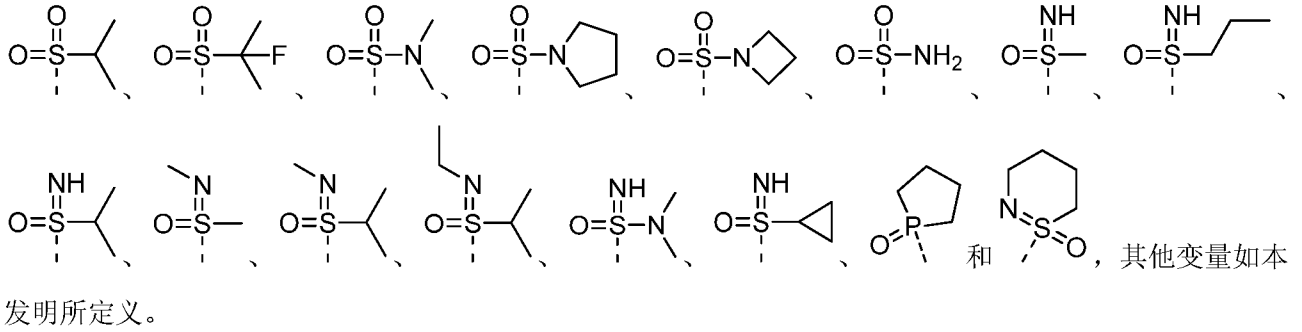
在本发明的一些方案中，上述 R₁ 选自 OCH₃，所述 OCH₃ 任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代，其他变量如本发明所定义。

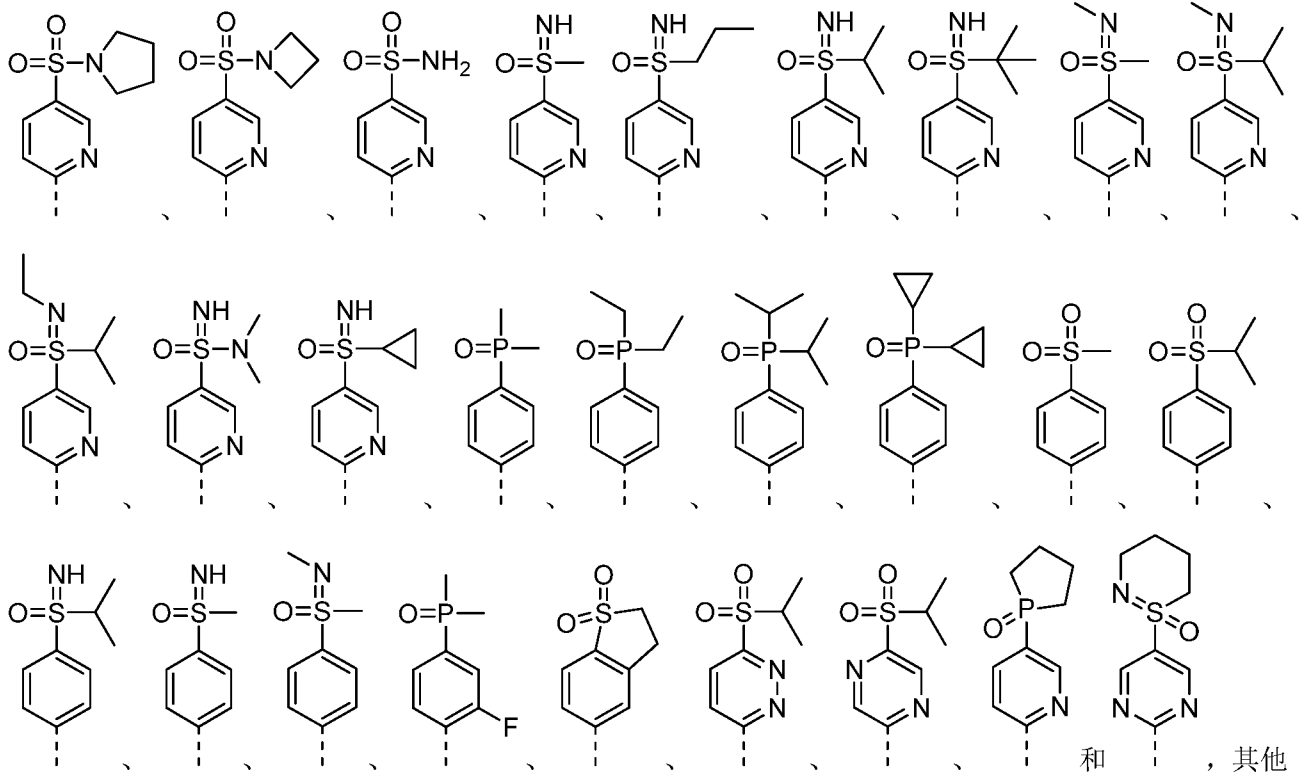
在本发明的一些方案中，上述 R₁ 选自 OCH₃ 和 OCF₃，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R₂ 选自 H 和 CH₃，所述 CH₃ 任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代，其他变量如本发明所定义。

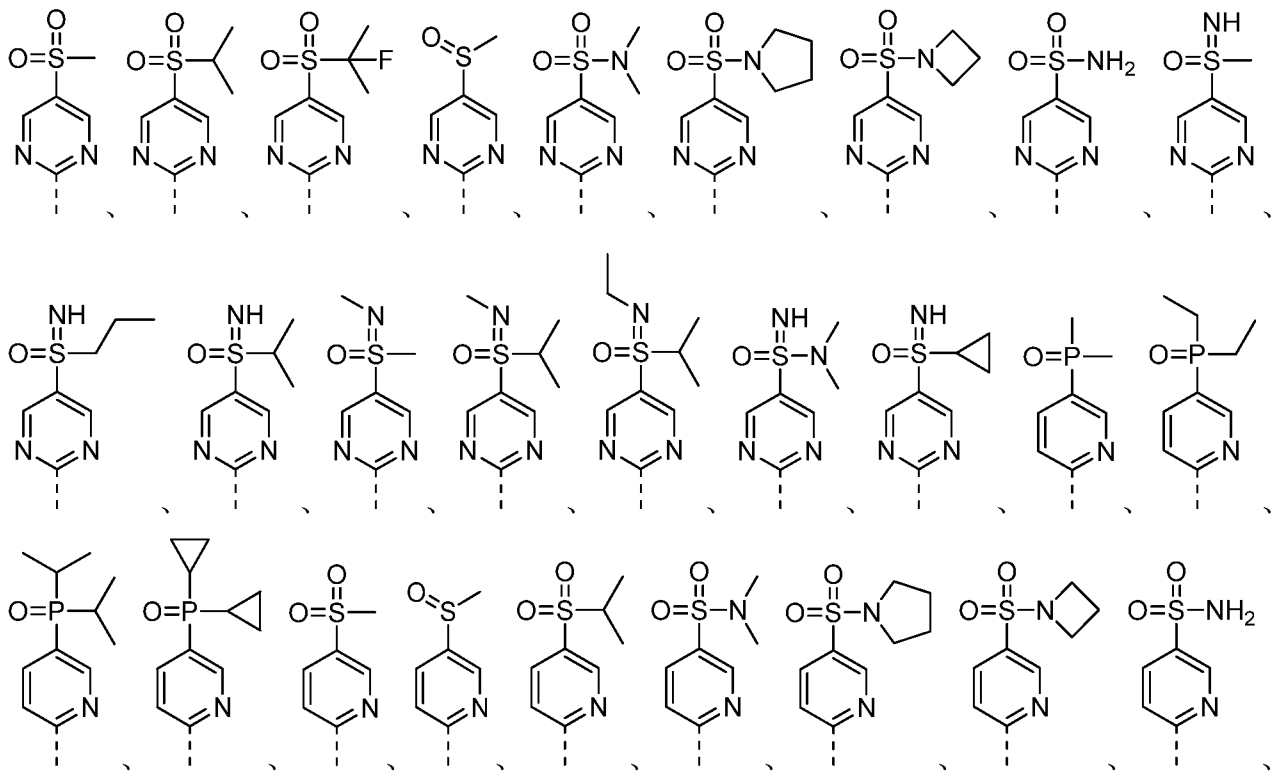
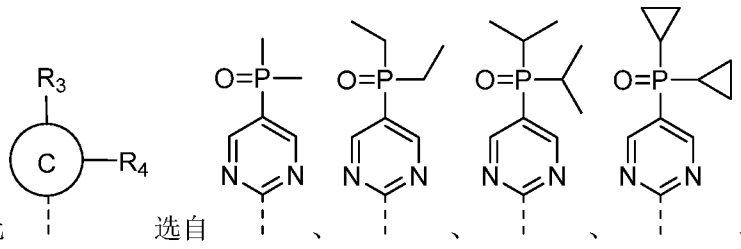
在本发明的一些方案中，上述 R₂ 选自 H、CH₃ 和 CD₃，其他变量如本发明所定义。

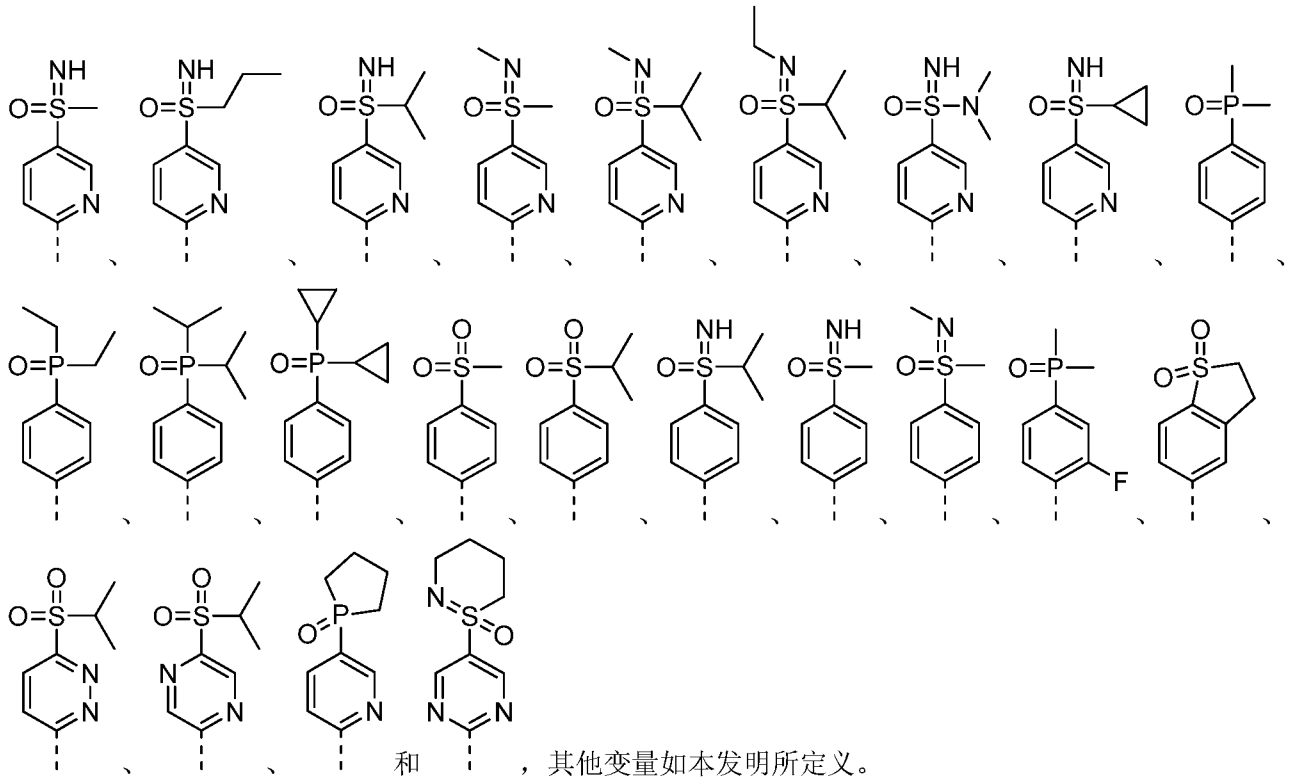




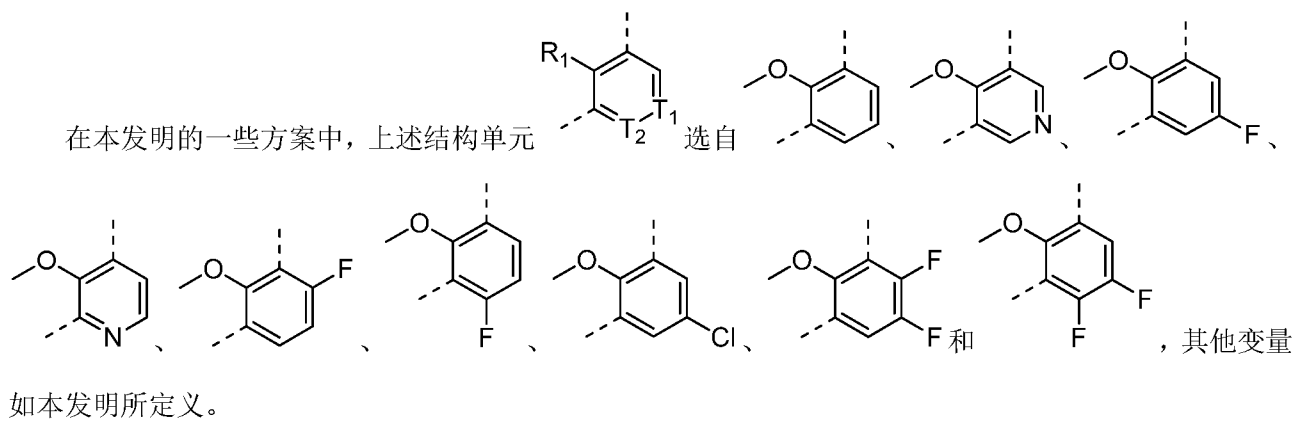
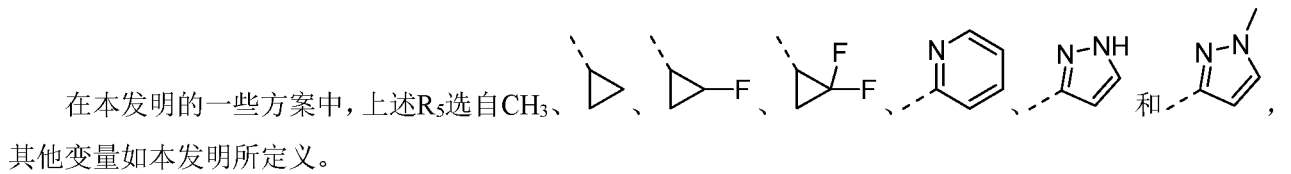


变量如本发明所定义。

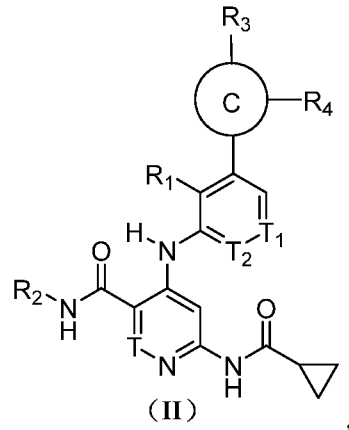




在本发明的一些方案中，上述R₅选自CH₃、环丙基、咪唑基、吡唑基和吡啶基，所述CH₃、环丙基、咪唑基、吡唑基和吡啶基分别独立地任选被1、2或3个R_c取代，其他变量如本发明所定义。



在本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其化合物选自：



其中，

T、T₁ 和 T₂ 分别独立地选自 N 和 CH，所述 CH 任选被 1 个卤素取代；

R₁ 选自 C₁₋₃ 烷氧基，所述 C₁₋₃ 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

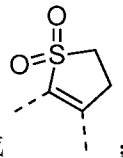
R₂ 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

环 C 选自苯基、吡啶和噻啶；

R₃ 选自 -P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基、-S(=O)_n-4-5 元杂环

基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷基、-S(=O)(=NR)C₃₋₅ 环烷基、 和 ；

R₄ 选自 H、F、Cl 和 Br；



或者，R₃ 和 R₄ 与它们相连的碳原子共同构成

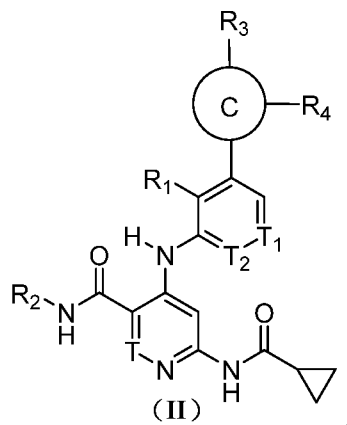
R_a 和 R_b 分别独立地选自 H、D、F、Cl、Br 和 I；

R 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基；

n 为 1 或 2；

所述 4-5 元杂环基的“杂”选自 1、2 或 3 个独立选自 -O-、-NH-、-S- 和 -N- 的杂原子或杂原子团。

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，其化合物选自：



其中,

T、T₁和T₂分别独立地选自N和CH,所述CH任选被1个卤素取代;

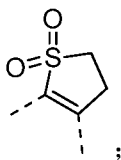
R₁选自C₁₋₃烷氧基,所述C₁₋₃烷氧基任选被1、2或3个R_a取代;

R₂选自C₁₋₃烷基,所述C₁₋₃烷基任选被1、2或3个R_b取代;

环C选自苯基、吡啶和噻啶;

R₃选自-P(=O)(C₁₋₃烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₃烷基、-S(=O)_nC₁₋₃烷基氨基、-S(=O)_n-4-5元杂环基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₃烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃烷基氨基和-S(=O)(=NR)C₃₋₅环烷基;

R₄选自H、F、Cl和Br;



或者, R₃和R₄与它们相连的碳原子共同构成

R_a和R_b分别独立地选自H、D、F、Cl、Br和I;

R选自H和C₁₋₃烷基;

n为1或2。

在本发明的一些方案中,上述R₁选自OCH₃,所述OCH₃任选被1、2或3个R_a取代,其他变量如本发明所定义。

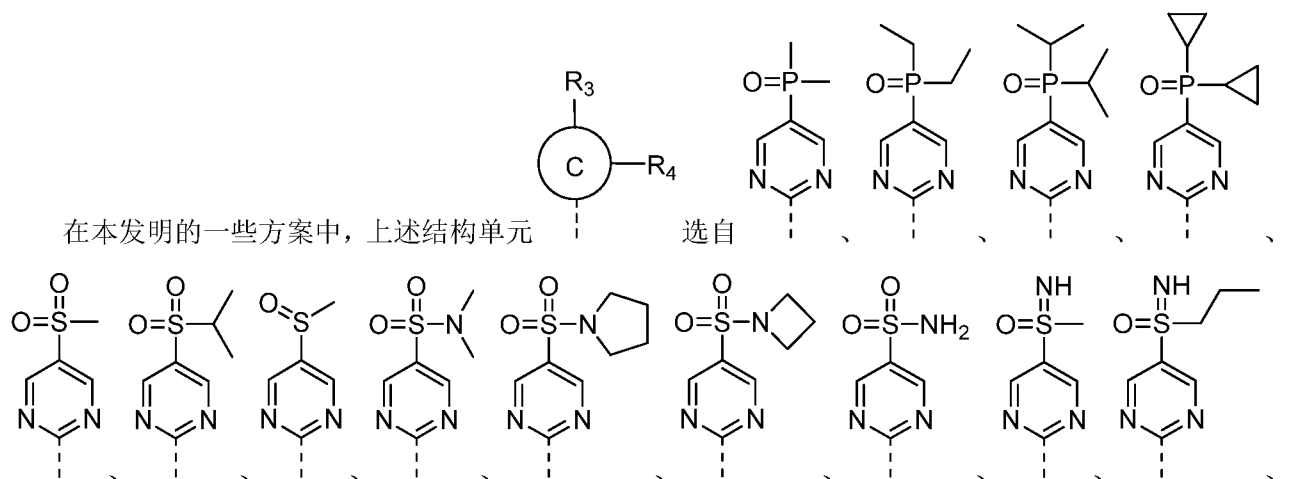
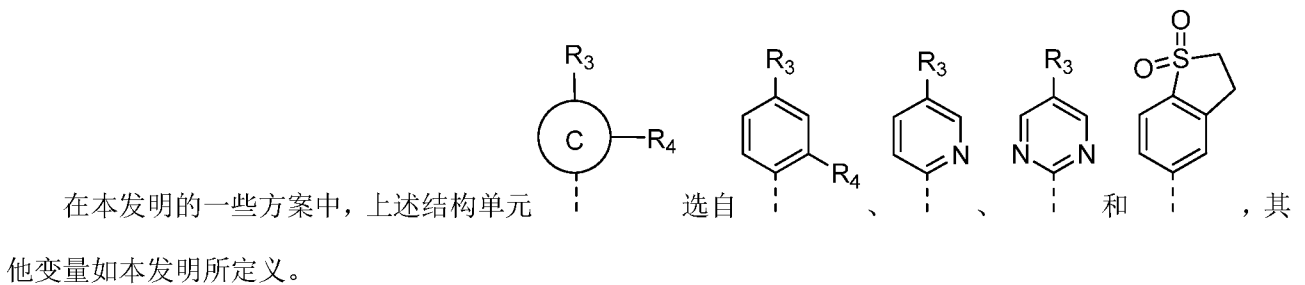
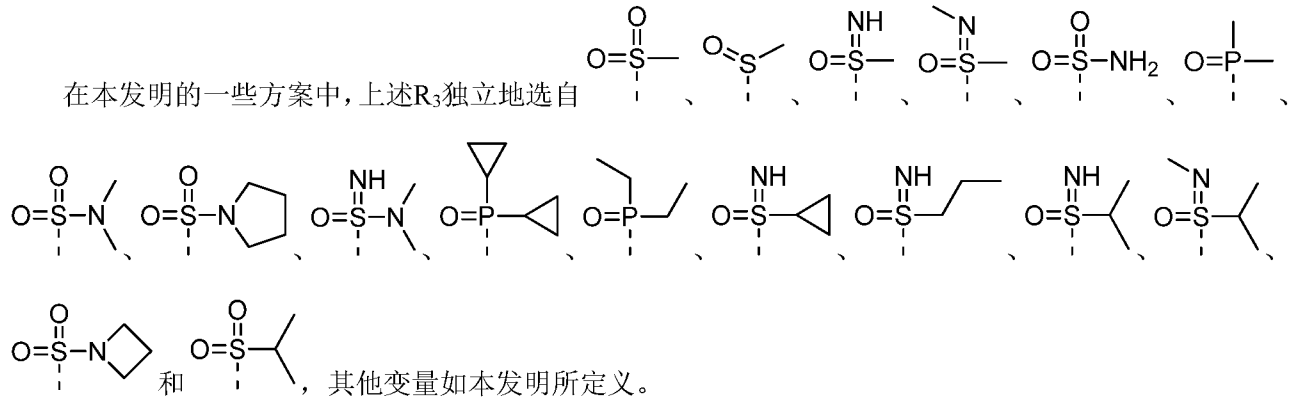
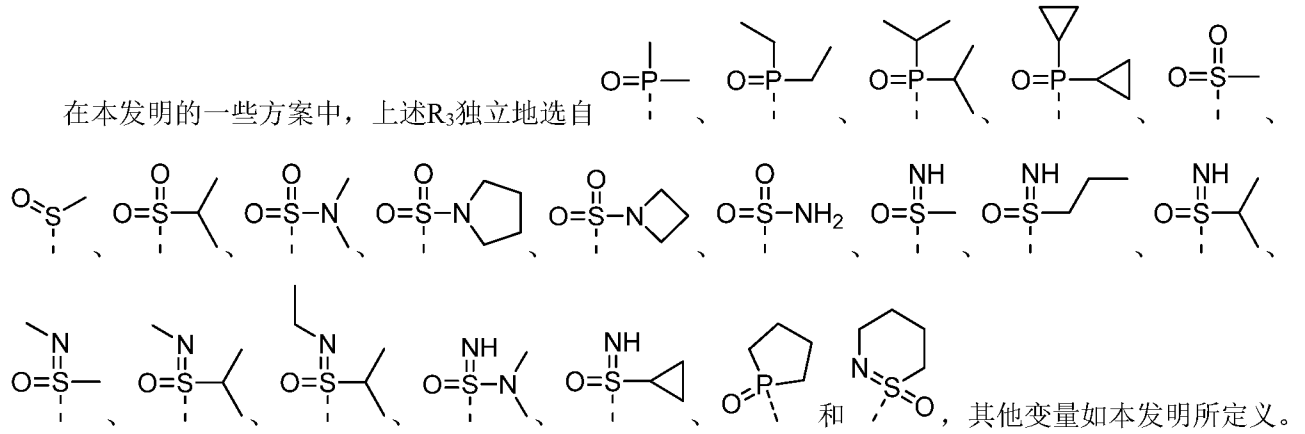
在本发明的一些方案中,上述R₁选自OCH₃和OCF₃,其他变量如本发明所定义。

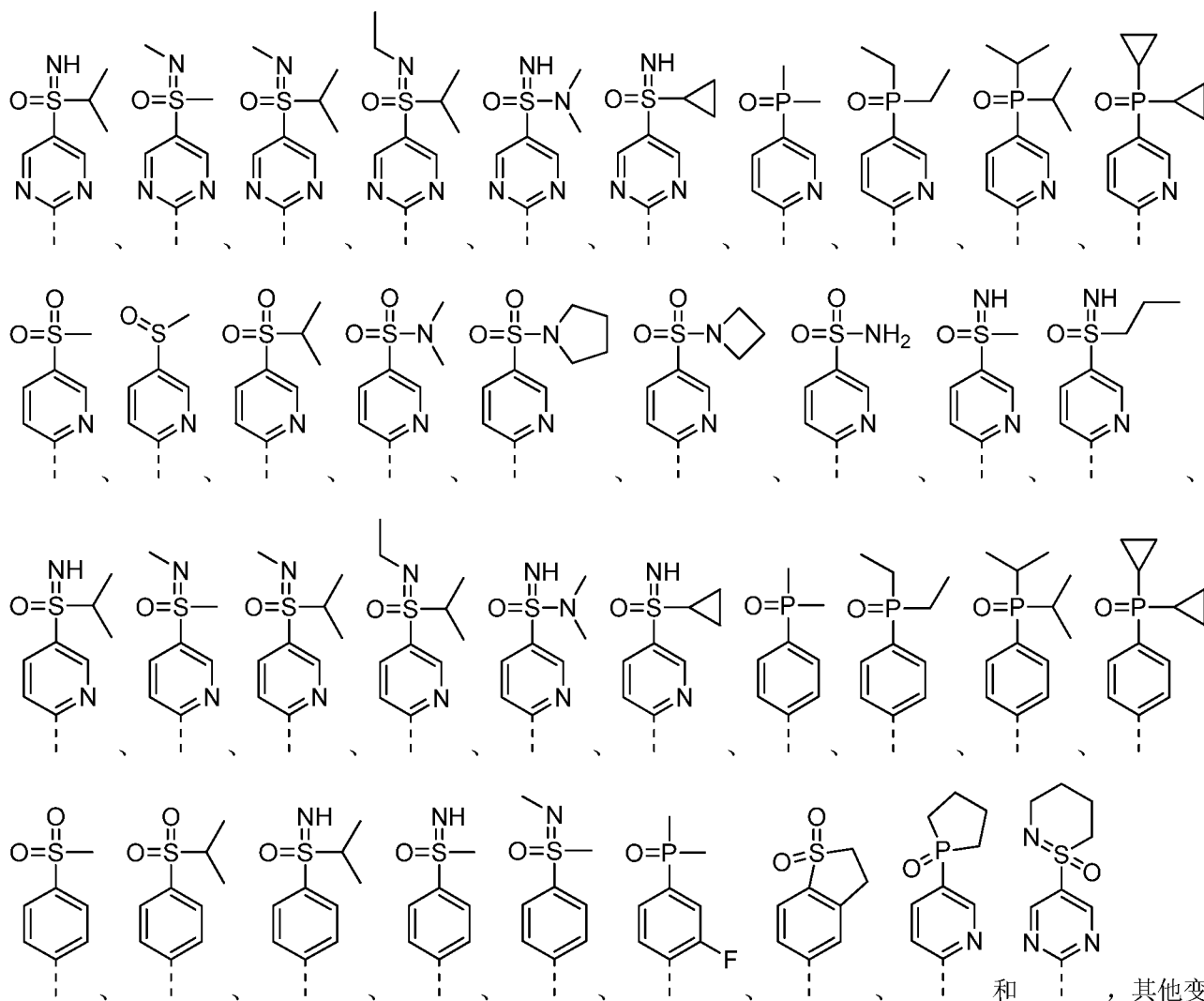
在本发明的一些方案中,上述R₂选自H和CH₃,所述CH₃任选被1、2或3个R_b取代,其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中,上述R₂选自CH₃,所述CH₃任选被1、2或3个R_b取代,其他变量如本发明所定义。

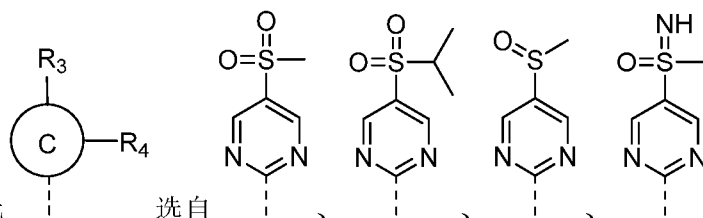
在本发明的一些方案中,上述R₂选自H、CH₃和CD₃,其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中,上述R₂选自CH₃和CD₃,其他变量如本发明所定义。



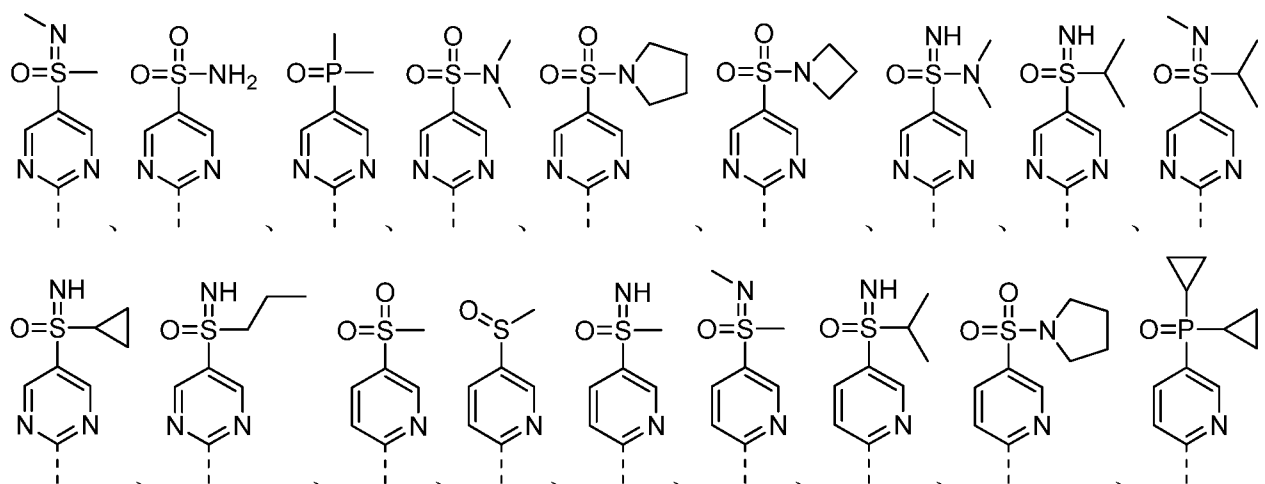


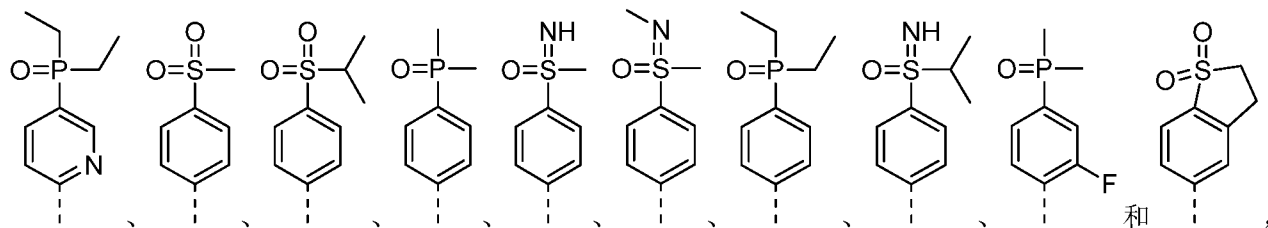
量如本发明所定义。



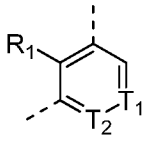
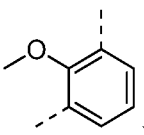
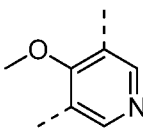
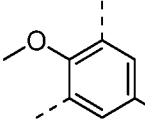
在本发明的一些方案中, 上述结构单元

选自

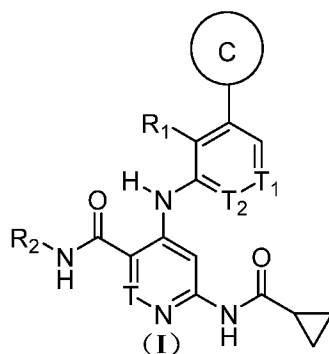




其他变量如本发明所定义。

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

本发明提供了式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



其中，

T、T₁ 和 T₂ 分别独立地选自 N 和 CH，所述 CH 任选被 1 个卤素取代；

R₁ 选自 C₁₋₃ 烷氧基，所述 C₁₋₃ 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R₂ 选自 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

环 C 选自苯基、吡啶、嘧啶和 2,3-二氢苯并[b]噻吩 1,1-二氧化物，所述苯基、吡啶、嘧啶和苯并[b]噻吩 1,1-二氧化物分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

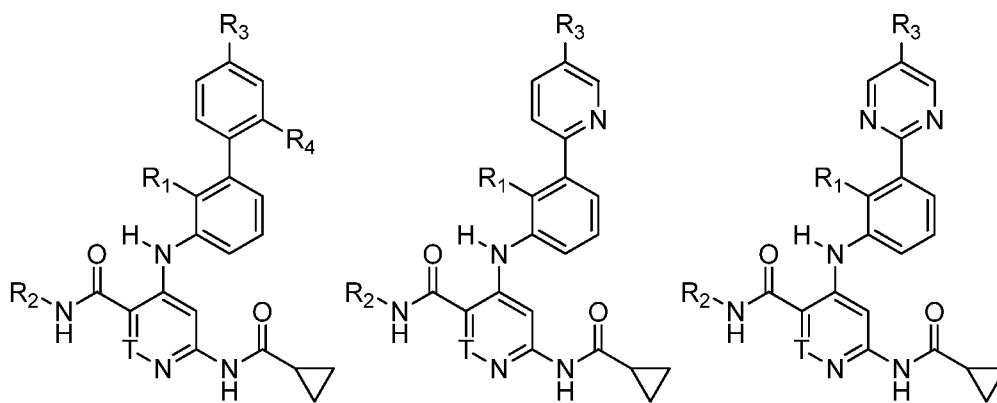
R_a 和 R_b 分别独立地选自 H、D、F、Cl、Br 和 I；

各 R_c 独立地选自 -P(=O)(CH₃)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷基氨基、-S(=O)_n-5 元杂环基、-S(=O)_nNH₂ 和 -S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷基；

R 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基；

n 为 1 或 2。

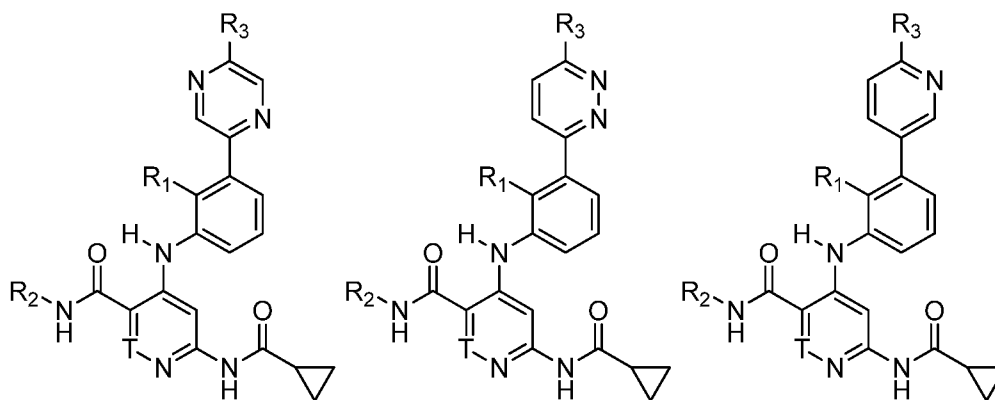
在本发明的一些方案中，上述 R₁ 选自 OCH₃，所述 OCH₃ 任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代，其他变量如本发明所定义。



(VII-1)

(VII-2)

(VII-3)



(VII-4)

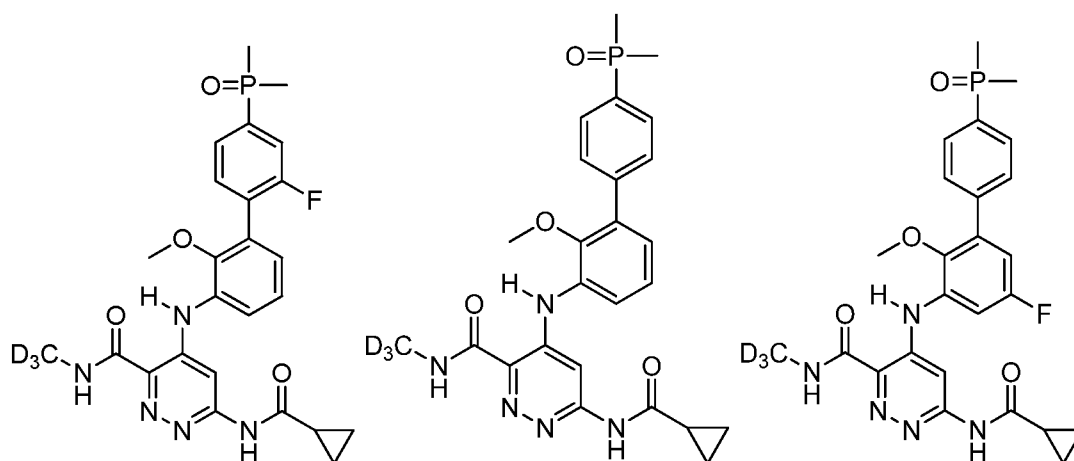
(VII-5)

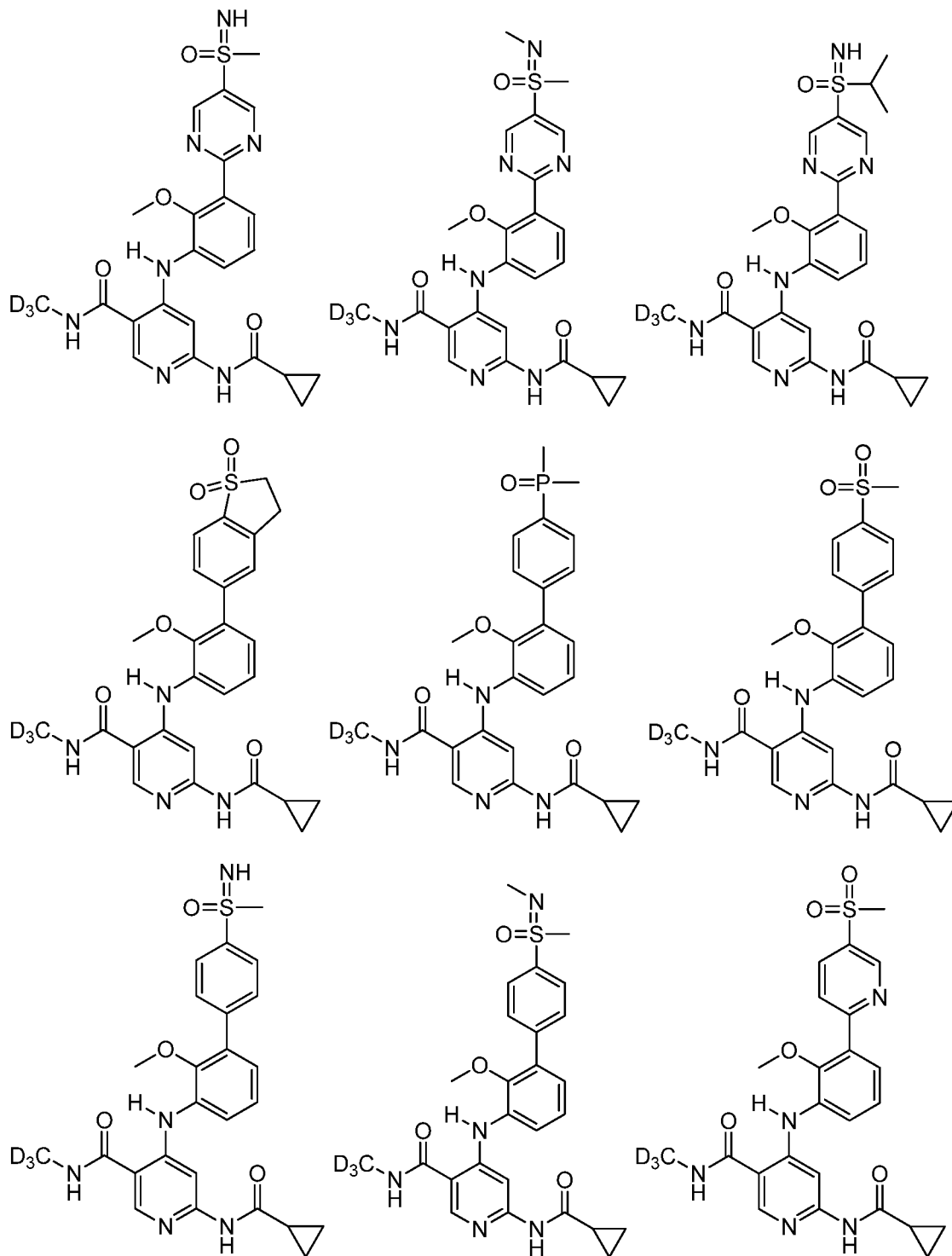
(VII-6)

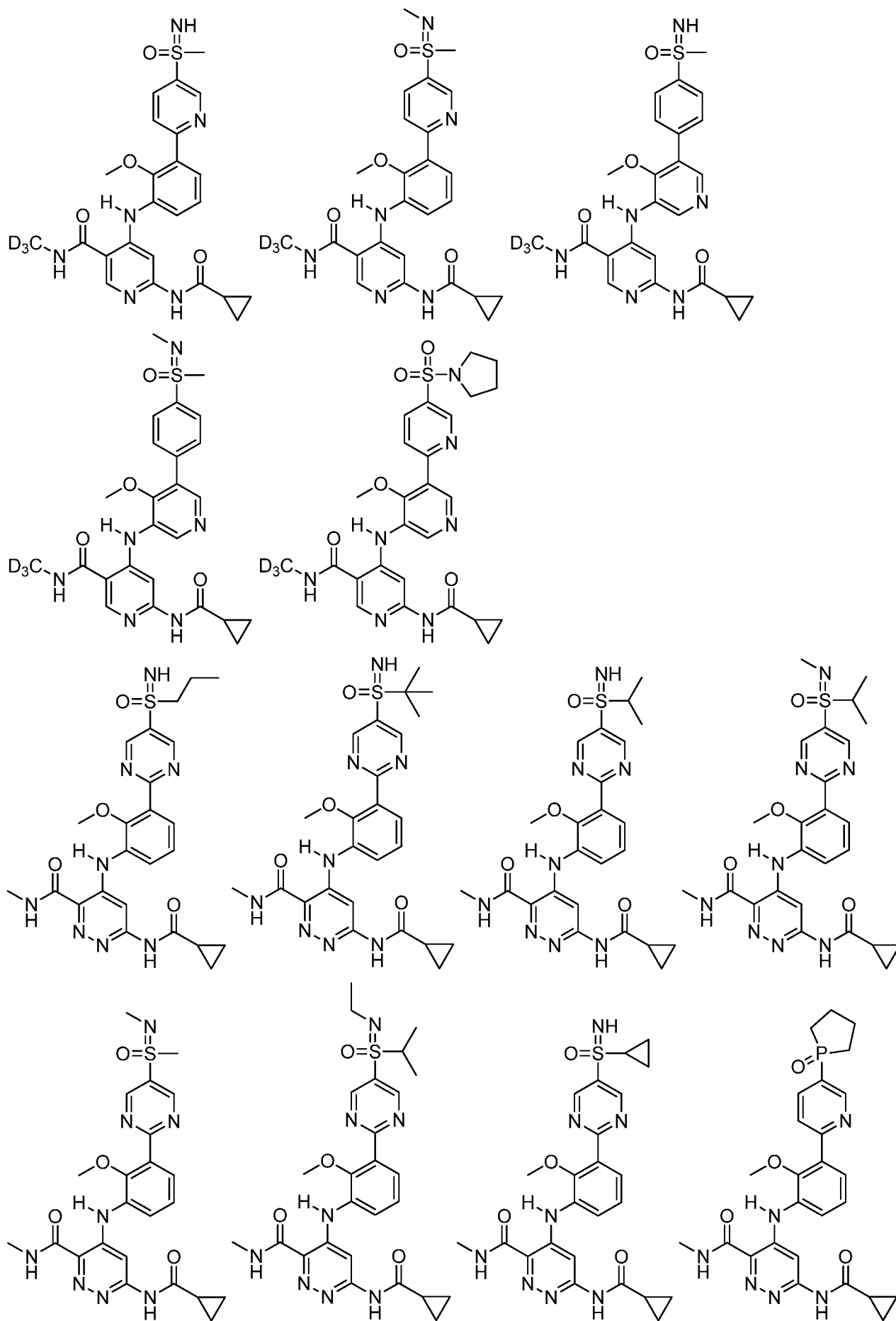
其中，

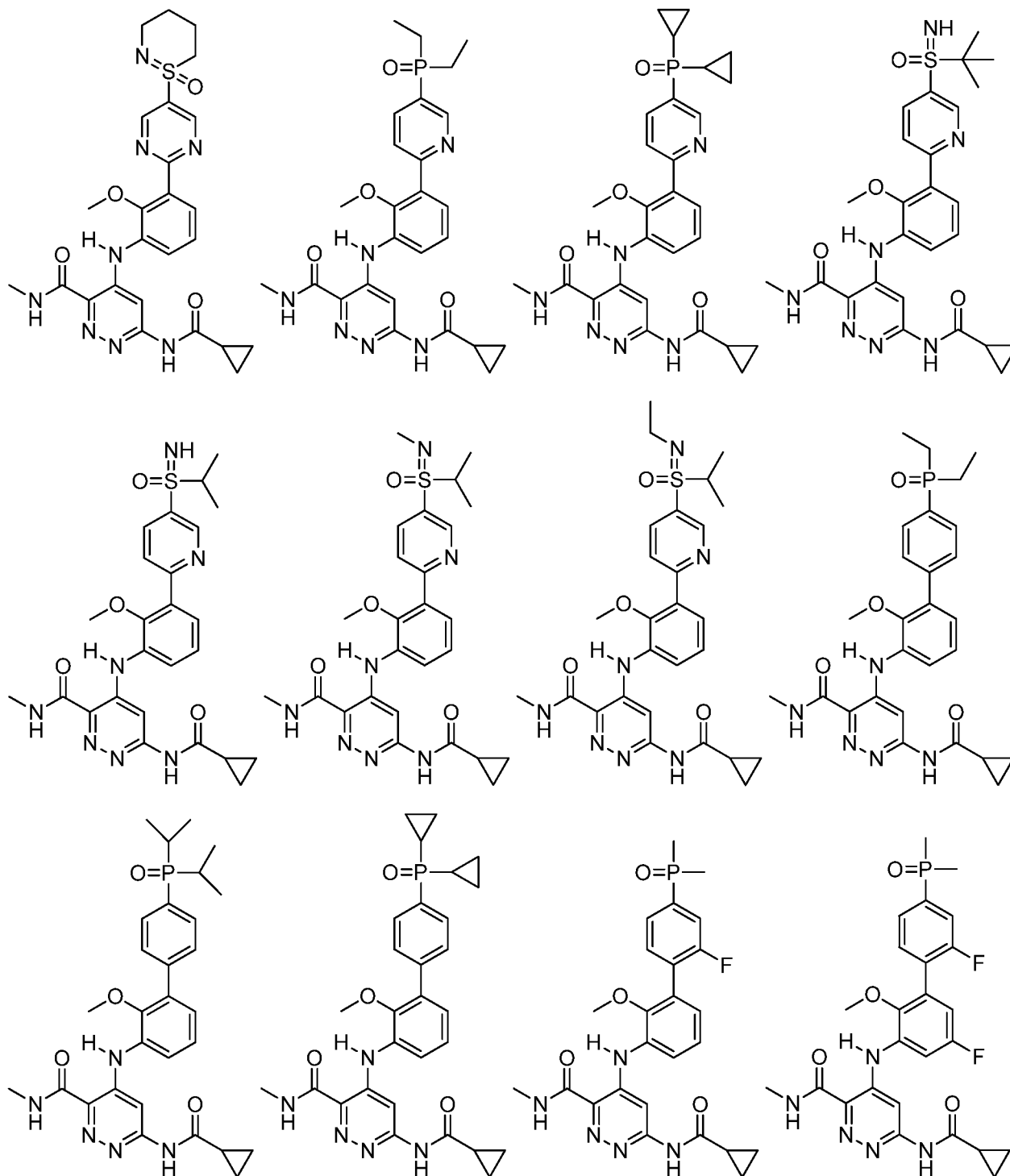
R₁、R₂、R₃、R₄和T如本发明所定义。

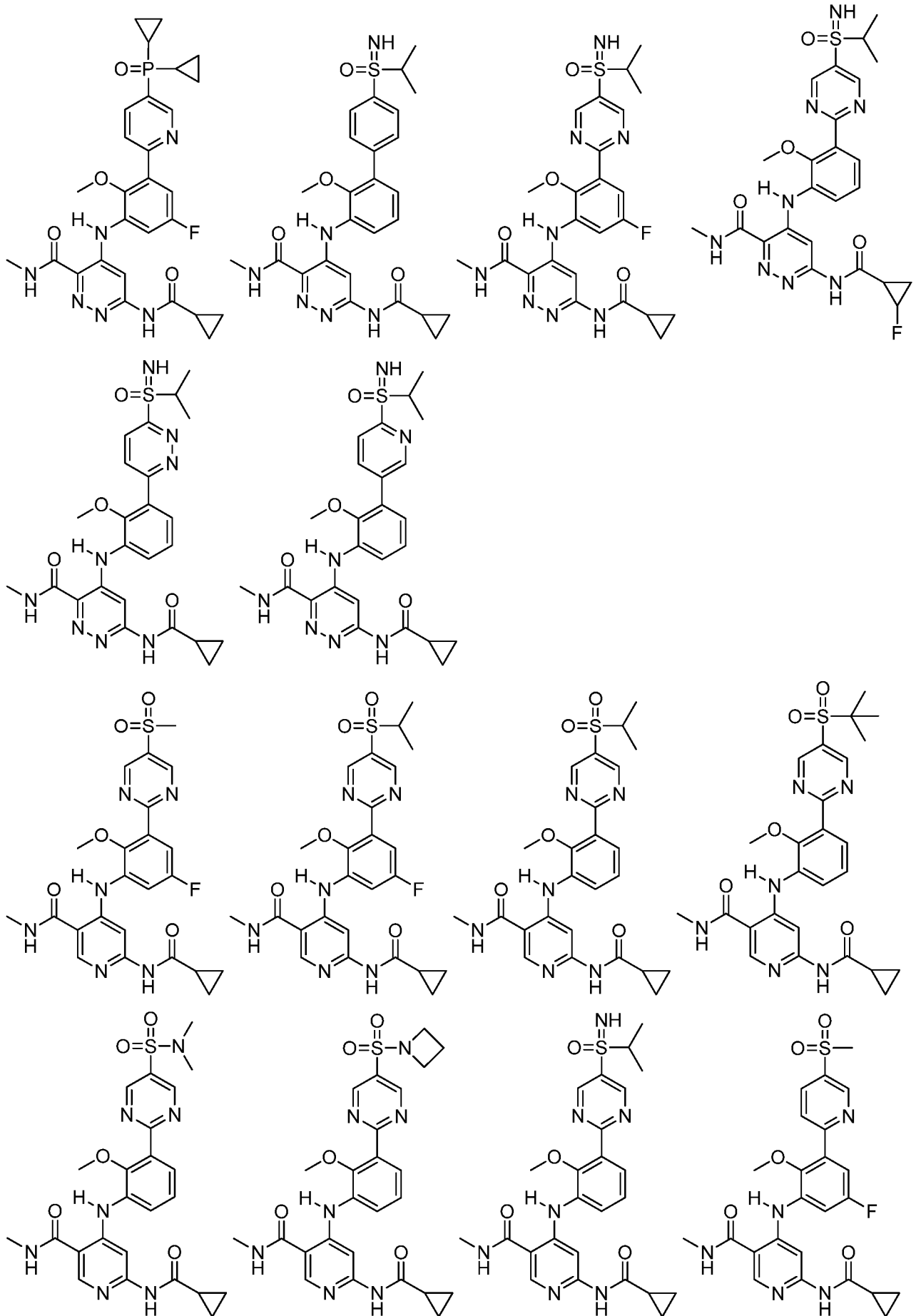
本发明提供了下式所示化合物或其药学上可接受的盐，

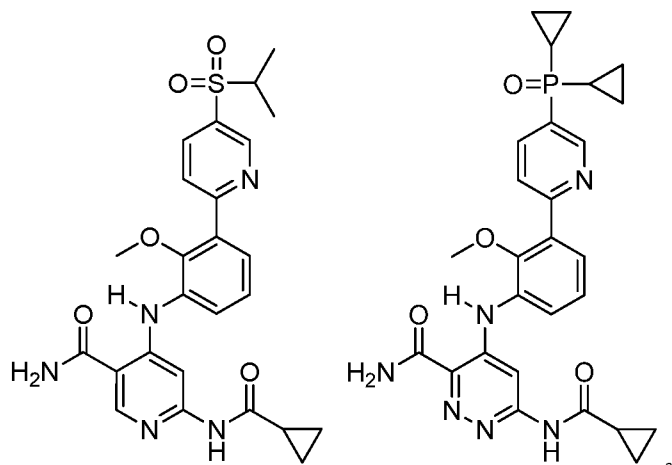




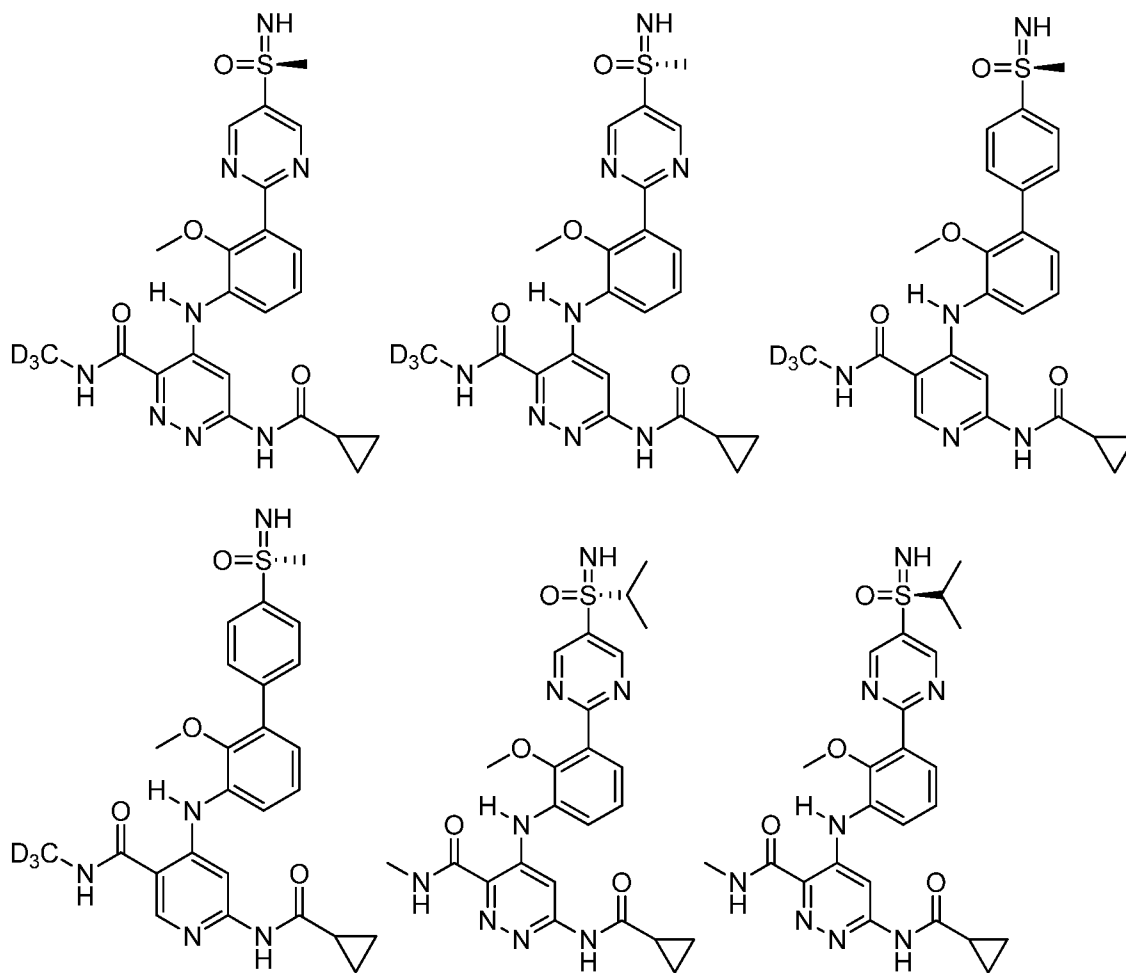


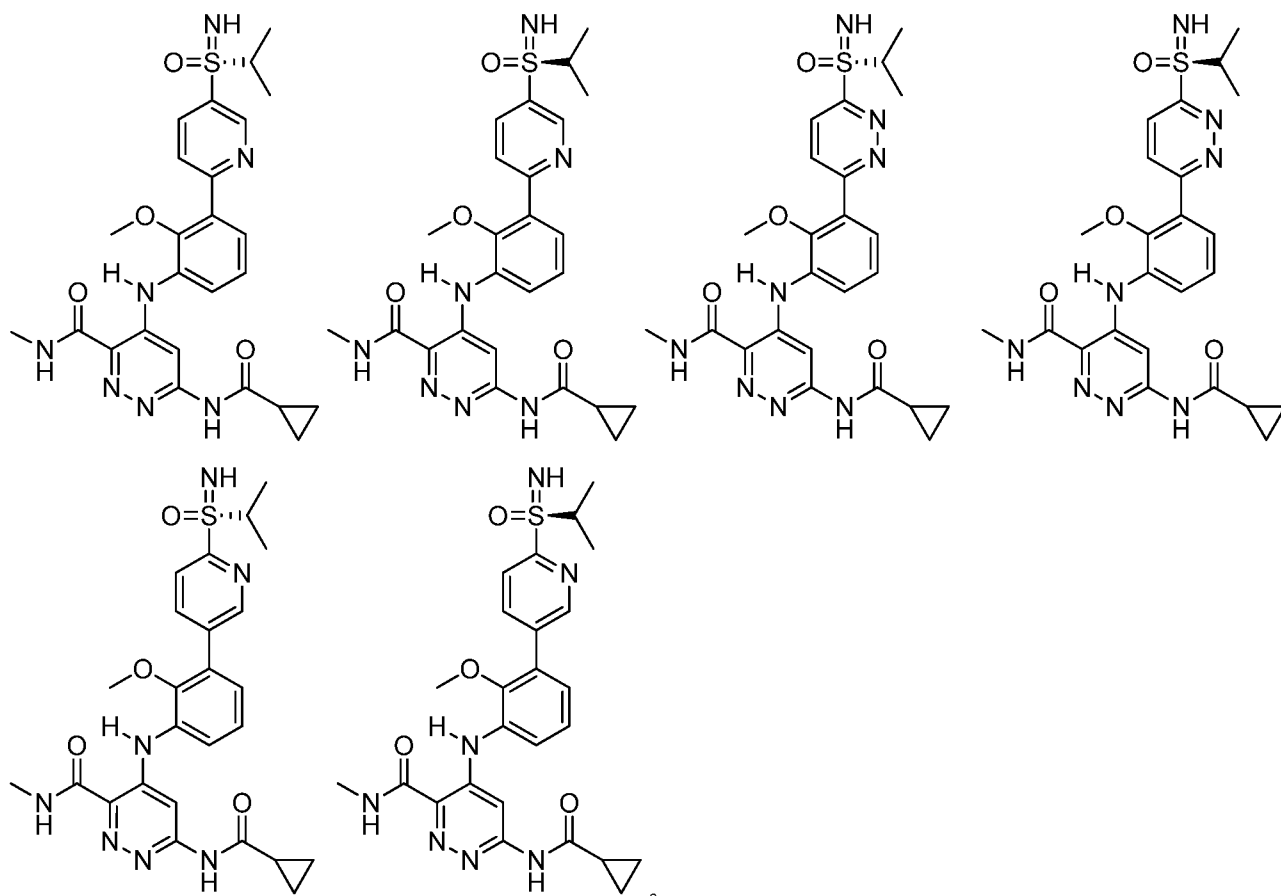






在本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自：





技术效果

本发明化合物作用于TYK2 JH2假激酶区，对TYK2激酶具有良好的抑制作用；本发明化合物对TYK2基因点突变的细胞株Ba/F3-FL-TYK2-E957D展现了较高的细胞增殖抑制活性；本发明化合物在人PBMC细胞中，对IFN- α 刺激激活的TYK2信号通路展现了较高的抑制活性；同时对IL-6刺激激活的JAK1/2信号通路、GM-CSF刺激激活的JAK2/2信号通路、IL-2刺激激活的JAK1/3信号通路展现了较弱的抑制活性，展现了较高的选择性；本发明化合物具有优异的药代动力学特性；本发明化合物对IL-12/IL-18诱导的小鼠IFN γ 的释放具有显著的剂量依赖性抑制作用；本发明化合物对肠炎和银屑病具有显著的缓解作用。

定义和说明

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

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

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

毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物接触的方式获得碱加成盐。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。

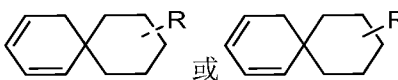
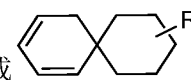
当任何变量（例如 R）在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被 0-2 个 R 所取代，则所述基团可以任选地至多被两个 R 所取代，并且每种情况下的 R 都有独立的选项。此外，取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

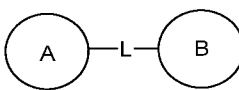
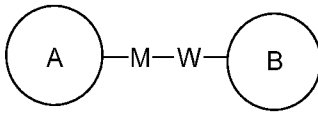
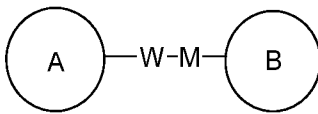
当一个连接基团的数量为 0 时，比如 $-(\text{CRR})_0-$ ，表示该连接基团为单键。





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

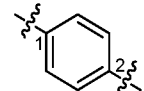
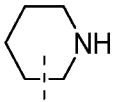
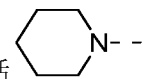
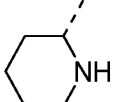
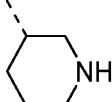

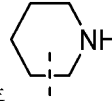
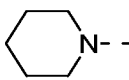
当一个取代基为空缺时，表示该取代基是不存在的，比如 $\text{A}-\text{X}$ 中 X 为空缺时表示该结构实际上是 A。

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

当一个取代基的键可以交叉连接到一个环上的两个以上原子时，这种取代基可以与这个环上的任意原子相键合，例如，结构单元  或  表示其取代基 R 可在环己基或者环己二烯上的任意一个位置发生取代。当所列举的取代基中没有指明其通过哪一个原子连接到被取代的基团上时，这种取代基可以通过其任何原子相键合，例如，吡啶基作为取代基可以通过吡啶环上任意一个碳原子连接到被取代的基团上。

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

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

两端与其他基团相连； 中的波浪线表示通过该苯基基团中的 1 和 2 位碳原子与其他基团相连； 表示该哌啶基上的任意可连接位点可以通过 1 个化学键与其他基团相连，至少包括 、、、 这 4 种连接方式，即使 -N- 上画出了 H 原子，但是  仍包括  这种连接方式的基团，只是在连接 1 个化学键时，该位点的 H 会对应减少 1 个变成相应的一价哌啶基。

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

“环”。

除非另有规定，术语“C₁₋₄ 烷基”用于表示直链或支链的由 1 至 4 个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述 C₁₋₄ 烷基包括 C₁₋₂、C₁₋₃ 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）。C₁₋₄ 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）、丁基（包括 *n*-丁基，异丁基，*s*-丁基和 *t*-丁基）等。

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“C₁₋₃ 烷基氨基”表示通过氨基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 烷基氨基包括 C₁₋₂、C₃ 和 C₂ 烷基氨基等。C₁₋₃ 烷基氨基的实例包括但不限于 -NHCH₃、-N(CH₃)₂、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)CH₂CH₃、-NHCH₂CH₂CH₃、-NHCH₂(CH₃)₂ 等。

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

除非另有规定，术语“4-5 元杂环烷基”本身或者与其他术语联合分别表示由 4 至 5 个环原子组成的饱和单环基团，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）。此外，就该“4-5 元杂环烷基”而言，杂原子可以占据杂环烷基与分子其余部分的连接位置。所述 4-5 元杂环烷基包括 4 元和 5 元杂环烷基。4-5 元杂环烷基的实例包括但不限于氮杂环丁基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、吡咯烷基、吡唑烷基、咪唑烷基、四氢噻吩基（包括四氢噻吩-2-基和四氢噻吩-3-基等）或四氢呋喃基（包括四氢呋喃-2-基等）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

4H-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)、咪唑基 (包括 2-咪唑基和 3-咪唑基等)、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)。

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。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。

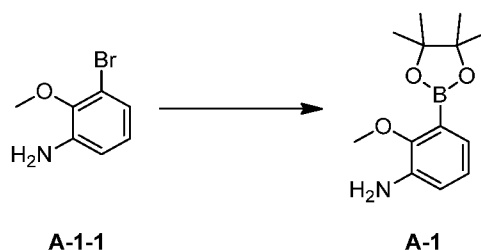
本发明采用下述缩略词: aq 代表水; eq 代表当量、等量; DCM 代表二氯甲烷; PE 代表石油醚; DMSO 代表二甲亚砜; EtOAc 代表乙酸乙酯; EtOH 代表乙醇; MeOH 代表甲醇; DMF 代表 N,N-二甲基甲酰胺; Cbz 代表苄氧羰基, 是一种胺保护基团; Boc 代表叔丁氧羰基是一种胺保护基团; r.t.代表室温; O/N 代表过夜; THF 代表四氢呋喃; Boc₂O 代表二叔丁基二碳酸酯; TFA 代表三氟乙酸; HCl 代表盐酸; mp 代表熔点; Pd(dppf)Cl₂ 代表[1,1'-双(二苯膦基)二茂铁]二氯化钯; Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ 代表[1,1'-双(二苯膦基)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷复合物; TEA 代表三乙胺; Xantphos 代表 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽; Pd₂(dba)₃ 代表三(二亚苄基丙酮)二钯; EDCI 代表 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐; HOBt 代表 1-羟基苯并三唑; NMP 代表 N-甲基吡咯烷酮; DIPEA 代表 N,N-二异丙基乙胺; LiHMDS 代表双(三甲基硅基)胺基锂; Pd₂(dba)₃.CHCl₃ 代表三(二亚苄基丙酮)二钯-氯仿加合物。

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。

具体实施方式

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

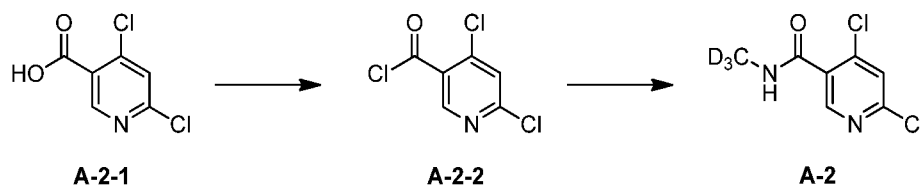
参考例1



步骤 1: 化合物 A-1 的合成

将化合物 A-1-1 (10 g, 49.49 mmol, 1 eq), 双联频哪醇硼酸酯 (18.85 g, 74.24 mmol, 1.5 eq), 乙酸钾 (14.57 g, 148.48 mmol, 3 eq) 溶于 1,4-二氧六环(200 mL) 中, 置换氮气三次后加入 Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ (2.02 g, 2.47 mmol, 0.05 eq), 在 100°C 搅拌 2 hr。向反应液中加入水 (200 mL), 用乙酸乙酯 (100 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (V/V, 乙酸乙酯/石油醚 = 0~25%), 得到化合物 A-1。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.13 - 7.11 (m, 1H), 6.93 (t, *J* = 15.2, 7.6 Hz, 1H), 6.88 - 6.85 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 1.36 (s, 12H); LCMS *m/z* = 250.1 [M+H]⁺。

参考例 2



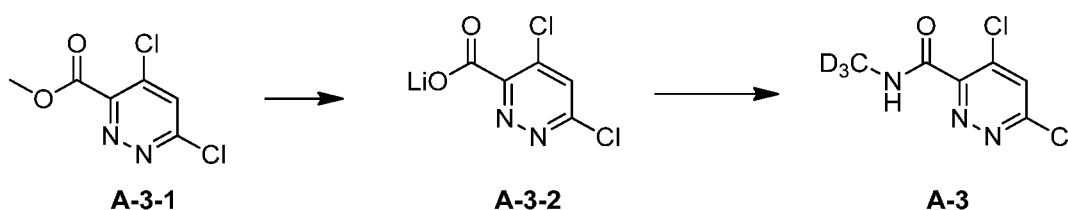
步骤 1: 化合物 A-2-2 的合成

将化合物 A-2-1 (18.5 g, 96.35 mmol, 1 eq) 溶于 DCM (200 mL) 中, 然后加入草酰氯 (15.90 g, 125.26 mmol, 10.96 mL, 1.3 eq), 然后加入 DMF (352.15 mg, 4.82 mmol, 370.68 μL, 0.05 eq), 在 25°C 下反应 16 hr。然后将反应体系浓缩, 再加入二氯甲烷 (50 mL), 再次浓缩, 直接用于下一步, 得到化合物 A-2-2。

步骤 2: 化合物 A-2 的合成

将化合物 A-2-2 (20 g, 95.04 mmol, 1 eq), 然后加入 DCM (300 mL) 中, 加入氘代甲胺盐酸盐 (5.36 g, 76.03 mmol, 0.8 eq), 然后降温至 0°C 后, 加入 DIPEA (36.85 g, 285.11 mmol, 49.66 mL, 3 eq), 在 20°C 下反应 16 hr。反应完成后, 向体系中加入饱和氯化铵水溶液 (100 mL), 萃取分液, 然后水相再用二氯甲烷 (60 mL) 萃取一次, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得粗品。向粗品中加入甲基叔丁基醚 (100 mL), 搅拌 2 hr 后, 过滤, 滤饼减压浓缩得到化合物 A-2。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.59 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.91 (s, 1H); LCMS *m/z* = 208.1 [M+1]⁺。

参考例 3



步骤 1: 化合物 A-3-2 的合成

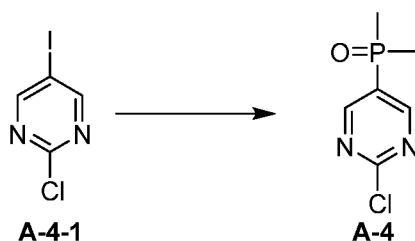
将化合物 A-3-1 (20 g, 96.61 mmol, 1 eq) 溶于乙腈 (100 mL) 和水 (15 mL) 中, 加入溴化锂 (25.17 g, 289.84 mmol, 7.28 mL, 3 eq) 和 DIPEA (37.46 g, 289.84 mmol, 50.48 mL, 3 eq), 在 20°C 搅拌反应 3 hr。将体系

过滤，滤饼用乙腈（50 mL）淋洗，收集滤饼，得到化合物**A-3-2**。LCMS $m/z = 192.9[\text{COOH}+1]^+$ 。

步骤 2：化合物 **A-3** 的合成

将化合物**A-3-2** (10 g, 50.27 mmol, 1 eq)溶于DCM (150 mL) 中，然后加入草酰氯 (8.93 g, 70.38 mmol, 6.16 mL, 1.4 eq)，然后加入DMF(183.72 mg, 2.51 mmol, 193.39 μL , 0.05 eq)，在20°C下反应4 hr。然后将反应体系浓缩，再加入二氯甲烷 (30 mL)，再浓缩，然后加入二氯甲烷 (150 mL) 中，加入氘代甲胺盐酸盐 (3.37 g, 47.76 mmol, 0.95 eq)，然后降温至0°C后，加入DIPEA(19.49 g, 150.83 mmol, 26.27 mL, 3 eq)，在20°C下反应16 hr。反应完成后，向体系中加入水 (150 mL)，萃取分液，然后水相再用二氯甲烷 (150 mL) 萃取一次，合并有机相，用饱和食盐水洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化（乙酸乙酯/石油醚=0~20%），得到化合物**A-3**。LCMS $m/z = 209.0[\text{M}+1]^+$ 。

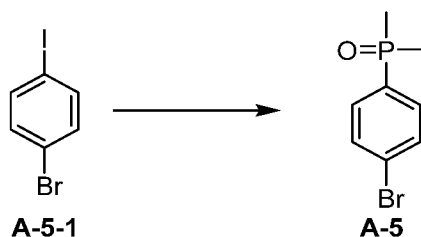
参考例4



步骤 1：化合物 **A-4** 的合成

将化合物**A-4-1** (3 g, 12.48 mmol, 1 eq)，二甲基氧化磷 (1.02 g, 13.10 mmol, 1.05 eq)，磷酸钾 (3.97 g, 18.72 mmol, 1.5 eq)，Xantphos (721.98 mg, 1.25 mmol, 0.1 eq) 溶于1,4-二氧六环 (30 mL) 中，氮气置换三次后，加入醋酸钯 (280.13 mg, 1.25 mmol, 0.1 eq)，在120°C搅拌2 hr。将反应液过滤，滤饼用乙酸乙酯 (30 mL*2) 淋洗，向滤液中加入水 (30 mL) 萃取，有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩。粗品经硅胶柱层析纯化（甲醇/二氯甲烷=0~20%），得到化合物**A-4**。LCMS $m/z = 191.0 [\text{M}+ \text{H}]^+$ 。

参考例5



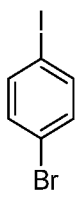
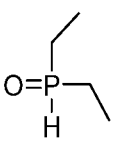
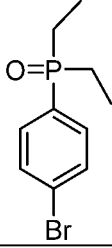
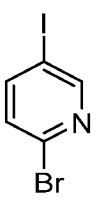
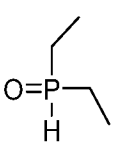
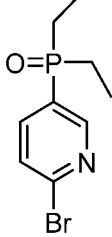
步骤 1：化合物 **A-5** 的合成

将化合物 **A-5-1**(10 g, 35.35 mmol, 1 eq)，二甲基氧化磷 (2.76 g, 35.35 mmol, 1 eq)，三乙胺 (4.18 g, 41.36 mmol, 5.76 mL, 1.17 eq)，Xantphos (204.53 mg, 353.48 μmol , 0.01 eq) 溶于 1,4-二氧六环 (50 mL) 和 THF (50 mL) 中，氮气置换三次后加入三（二亚苄基丙酮）二钯 (161.84 mg, 176.74 μmol , 0.005 eq)，在 15°C搅拌 2 hr。向反应液中加入水 (50 mL)，用乙酸乙酯 (100 mL*2) 萃取，有机相用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液

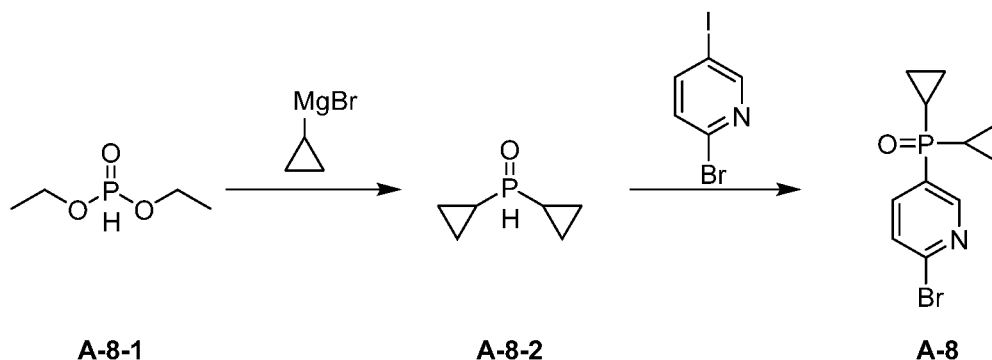
减压浓缩得到粗品。粗品通过硅胶柱层析纯化（甲醇/二氯甲烷=0~9%），得到化合物 **A-5**。LCMS $m/z=232.8[M+H]^+$ 。

按照参考例 5 的合成步骤，将步骤 1 中二甲基氧化膦替换为片段 2、**A-5-1** 替换为片段 1，合成表 1 中的参考例 6 和参考例 7。

表 1

参考例	化合物	片段 1	片段 2	结构式	谱图
6	A-6				LCMS $m/z = 260.8[M+1]^+$ 。
7	A-7				LCMS $m/z = 262.0 [M+1]^+$ 。

参考例8



步骤 1: 化合物 **A-8-2** 的合成

将**A-8-1** (1.38 g, 10.00 mmol, 1.29 mL, 1 eq) 溶于TH F(30 mL)，冷却至-70°C，滴加环丙基溴化镁的四氢呋喃溶液 (0.5 M, 3.09 g, 30 mmol, 60 mL, 3 eq)搅拌2小时，然后缓慢升温至25°C搅拌3小时。随后冷却至0°C，加0.5 M盐酸水溶液 (40 mL) 淬灭反应，用乙酸乙酯 (30 mL*3) 萃取，合并有机相，饱和氯化钠溶液 (20 mL) 洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，减压浓缩得到化合物**A-8-2**。LCMS $m/z=131.2 [M+H]^+$ 。


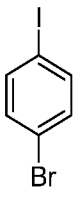
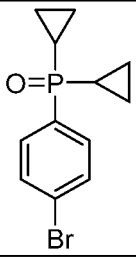

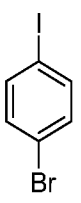
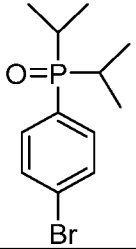
步骤 2: 化合物 **A-8** 的合成

将化合物 2-溴-5-碘吡啶 (800 mg, 2.82 mmol, 1 eq)，**A-8-2** (366.69 mg, 2.82 mmol, 1 eq)，Xantphos (163.05 mg, 281.80 μ mol, 0.1 eq) 溶于 1,4-二氧六环(14 mL) 中，加入三乙胺 (5.64 mmol, 5.64 mL, 2 eq)，氮气置换，最后加入催化剂 $Pd_2(dba)_3$ (258.05 mg, 281.80 μ mol, 0.1 eq)，氮气置换。逐渐升温到 75°C 搅拌 12 小时。反

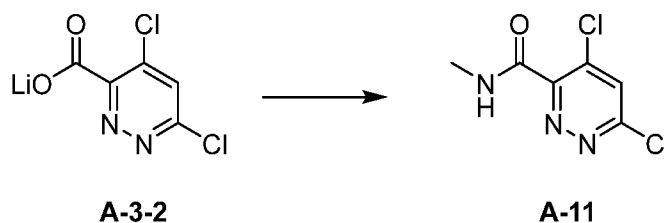
应结束冷却后向反应液中加入水 20 mL, 二氯甲烷(30mL*2)萃取, 合并后有机相用饱和氯化钠溶液洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化(二氯甲烷: 甲醇=100:0~50:1), 得到化合物 **A-8**。LCMS $m/z = 285.9[M+1]^+$ 。

按照参考例 8 的合成步骤, 将步骤 1 中环丙基溴化镁替换为片段 1、将步骤 2 的 2-溴-5-碘吡啶替换为片段 2, 合成表 2 中的参考例 9 和参考例 10。

表 2

参考例	化合物	片段 1	片段 2	结构式	谱图
9	A-9	MgBr 			LCMS $m/z = 285.1 [M+H]^+$ 。
10	A-10	MgBr 			LCMS $m/z = 290.7 [M+H]^+$ 。

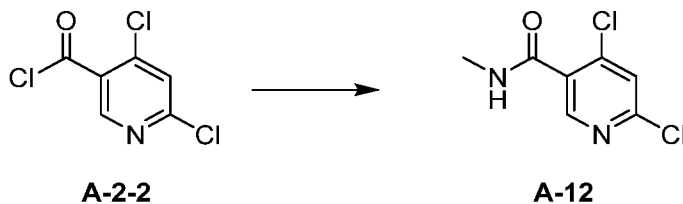
参考例11



步骤 1: 化合物 **A-11** 的合成

将化合物 **A-3-2** (7 g, 35.19 mmol, 1 eq) 溶于 DCM (105 mL) 中, 然后加入草酰氯 (6.25 g, 49.27 mmol, 4.31 mL, 1.4 eq), 然后加入 DMF (128.60 mg, 1.76 mmol, 135.37 μ L, 0.05 eq), 在 20°C 下反应 3 hr。然后将反应体系浓缩, 再加入二氯甲烷 (80 mL), 再浓缩, 然后加入二氯甲烷 (150 mL) 中, 加入甲胺盐酸盐 (2.26 g, 33.43 mmol, 0.95 eq), 然后降温至 -60°C 后, 加入 DIPEA (13.64 g, 105.57 mmol, 18.39 mL, 3 eq), 在 20°C 下反应 10 hr。反应完成后, 向体系中加入水 (80 mL), 萃取分液, 水相再用二氯甲烷 (100 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。粗品经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯/石油醚=0~20%), 得到化合物 **A-11**。LCMS $m/z = 206.0 [M+1]^+$ 。

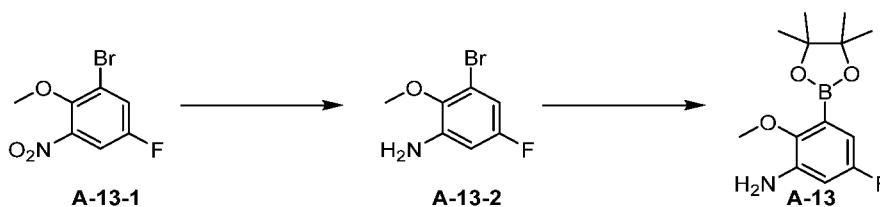
参考例12



步骤 1: 化合物 A-12 的合成

将化合物A-2-2(8.77 g, 41.67 mmol, 1 eq)溶于DCM(100 mL)中, 加入甲胺盐酸盐(2.81 g, 41.67 mmol, 1 eq), 然后降温至0°C, 加入DIPEA(16.16 g, 125.01 mmol, 21.78 mL, 3 eq), 在20°C下反应12 hr。反应完成后, 向体系中加入水(50 mL), 萃取分液, 水相用二氯甲烷(50 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, 浓缩得到化合物A-12。LCMS $m/z = 205.0 [M+1]^+$ 。

参考例13



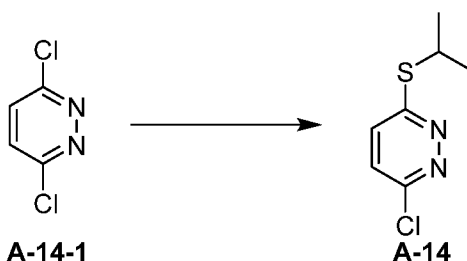
步骤 1: 化合物 A-13-2 的合成

将化合物 A-13-1 (6 g, 24.00 mmol, 1 eq), 二氯化锡二水合物 (21.66 g, 95.99 mmol, 4 eq) 溶于乙酸乙酯 (200 mL) 中, 在 70°C 搅拌 1hr。冷却至室温后, 向反应液中加入水 (200 mL), 用乙酸乙酯 (100 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (V/V, 乙酸乙酯/石油醚=0~10%), 得到化合物 A-13-2。LCMS $m/z = 219.7 [M+H]^+$ 。

步骤 2: 化合物 A-13 的合成

将化合物 A-13-2 (2 g, 9.09 mmol, 1 eq), 双联频哪醇硼酸酯 (3.46 g, 13.63 mmol, 1.5 eq), 乙酸钾 (2.68 g, 27.27 mmol, 3 eq) 溶于 1,4-二氧六环 (20 mL) 中, 置换氮气三次后加入 Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ (371.13 mg, 0.45 mmol, 0.05 eq), 在 100°C 搅拌 18 hr。冷却至室温后, 向反应液中加入水 (200 mL), 用乙酸乙酯 (100 mL*2) 萃取。合并后有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (V/V, 乙酸乙酯/石油醚=0~25%), 得到化合物 A-13。LCMS $m/z = 267.9 [M+H]^+$ 。

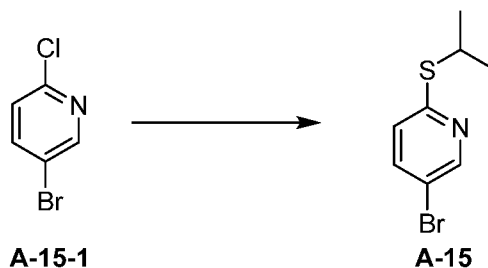
参考例14



步骤 1: 化合物 **A-14** 的合成

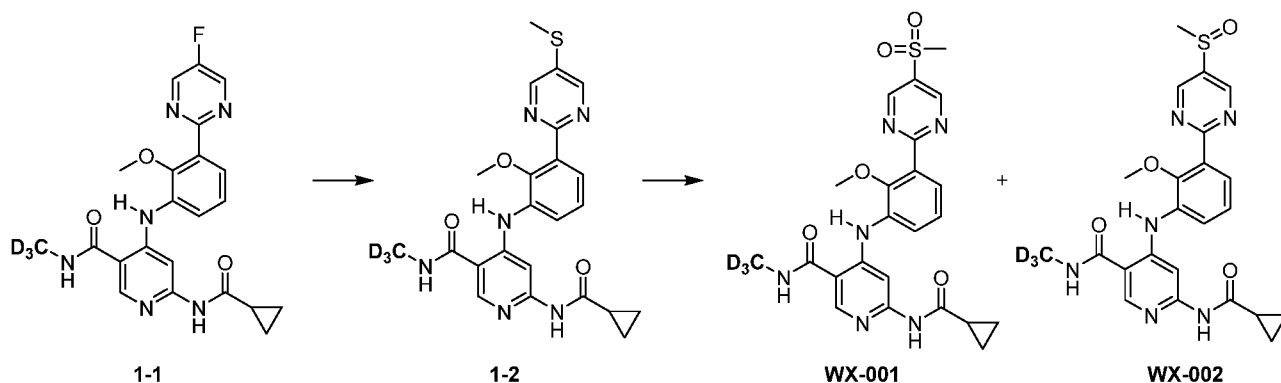
将化合物 **A-14-1** (1 g, 6.71 mmol, 1 eq) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺(10 mL) 中, 然后加入异丙硫醇钠(724.39 mg, 7.38 mmol, 1.1 eq), 在 15°C 下搅拌 1 hr。向反应液中加入水 (10 mL), 用乙酸乙酯 (10 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 **A-14**。LCMS $m/z=189.2$ $[M+H]^+$ 。

参考例 15

步骤 1: 化合物 **A-15** 的合成

将化合物 **A-15-1** (1 g, 5.20 mmol, 1 eq) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (20 mL) 中, 然后加入异丙硫醇钠 (2.91 g, 29.62 mmol, 5.7 eq), 在 15°C 下搅拌 1 hr。向反应液中加入水 (20 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 **A-15**。LCMS $m/z=232.0$ $[M+H]^+$ 。

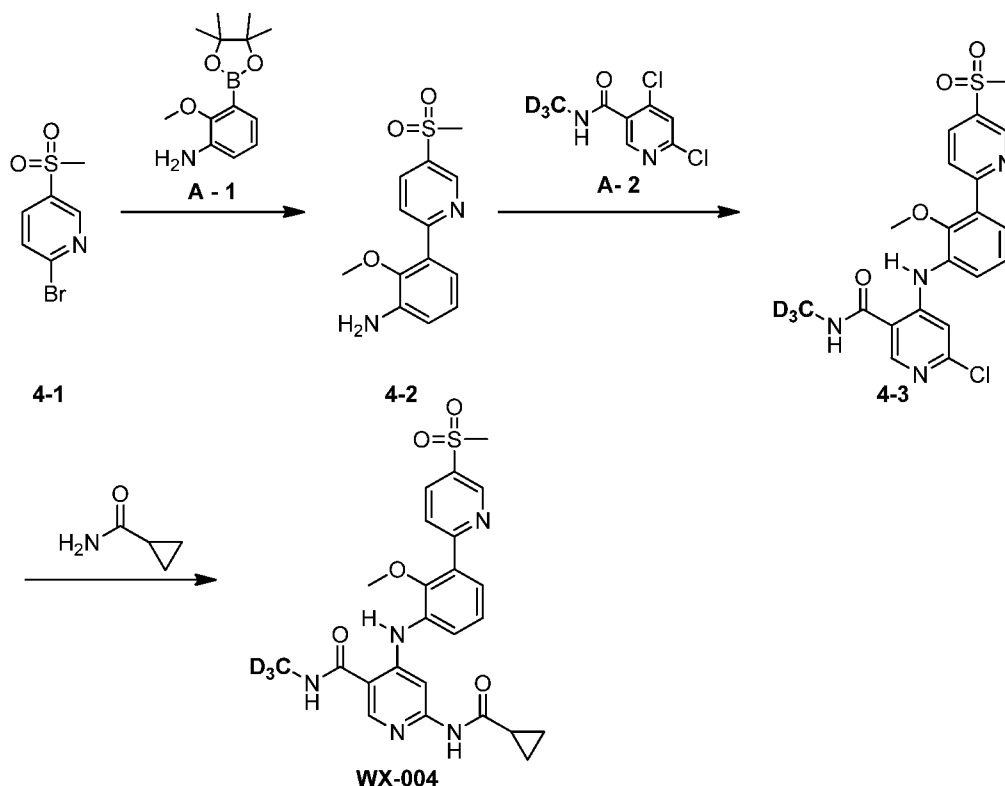
实施例 1 和 实施例 2

步骤 1: 化合物 **1-2** 的合成

将化合物 **1-1** (280 mg, 637.15 μmol , 1 eq) 溶于 DMF (7 mL) 中, 然后加入甲硫醇钠 (178.63 mg, 2.55 mmol, 162.39 μL , 4 eq), 在 40°C 下反应 2 hr。向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 **1-2**。LCMS $m/z=468.1$ $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 化合物 **WX-001** 盐酸盐和 **WX-002** 盐酸盐的合成

将化合物 **1-2** (40 mg, 85.55 μmol , 1 eq) 溶于 DCM (2 mL) 中, 然后降温至 0°C 加入 3-氯过氧苯甲酸 (26.05 mg, 128.33 μmol , 85% 纯度, 1.5 eq), 在 20°C 下反应 2 hr, 然后补加 3-氯过氧苯甲酸 (8.68 mg, 42.78



步骤 1: 化合物 4-2 的合成

将化合物 4-1 (200 mg, 847.15 μmol , 1 *eq*), 化合物 A-1 (211.04 mg, 847.15 μmol , 1 *eq*), 碳酸钠 (269.37 mg, 2.54 mmol, 3 *eq*) 溶于 DMF (4 mL) 和水 (0.8 mL) 中, 置换氮气三次后加入 Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ (69.18 mg, 84.71 μmol , 0.1 *eq*), 在 80°C 下反应 12 hr。加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得化合物 4-2。LCMS $m/z=279.0$ [M+H]⁺。

步骤 2: 化合物 4-3 的合成

将化合物 4-2 (180 mg, 646.72 μmol , 1 *eq*) 和化合物 A-2 (161.47 mg, 776.07 μmol , 1.2 *eq*) 加入到 THF (4.5 mL) 中, 降温至 0°C 后加入 LiHMDS (1 M, 1.94 mL, 3.0 *eq*), 在 20°C 下反应 2 hr。反应完成后, 加入水 (20 mL) 和乙酸乙酯 (20 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (20 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得化合物 4-3。LCMS $m/z=450.1$ [M+H]⁺。

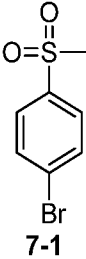
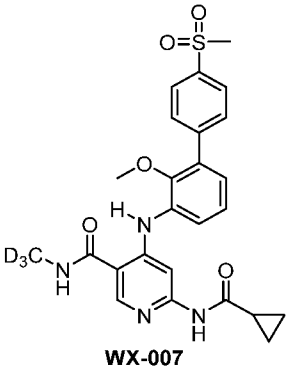
步骤 3: 化合物 WX-004 的合成

将化合物 4-3 (270 mg, 600.10 μmol , 1 *eq*) 和环丙基甲酰胺 (1.28 g, 15.00 mmol, 25 *eq*) 加入到 1,4-二氧六环 (20 mL) 和 NMP (4 mL) 中, 然后加入碳酸铯 (586.57 mg, 1.80 mmol, 3 *eq*), Xantphos (52.08 mg, 90.01 μmol , 0.15 *eq*), 氮气置换三次后加入 Pd₂(dba)₃ (82.43 mg, 90.01 μmol , 0.15 *eq*), 在 120°C 反应 18 hr。反应完成后, 加入水 (30 mL) 和乙酸乙酯 (30 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (30 mL) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品, 粗品经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙

酯/石油醚=0~100%), 得到化合物 **WX-004**。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 10.55 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.23 - 8.18 (m, 2H), 8.10 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 1.59 - 1.55 (m, 1H), 1.09 - 1.05 (m, 2H), 0.91 - 0.86 (m, 2H); LCMS *m/z*= 499.1 [M+H]⁺。

按照**实施例 4**的合成步骤, 将步骤 1 中 **4-1** 替换为下表中的片段 **7-1**, 合成表 3 中**实施例 7**。

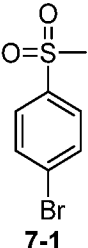
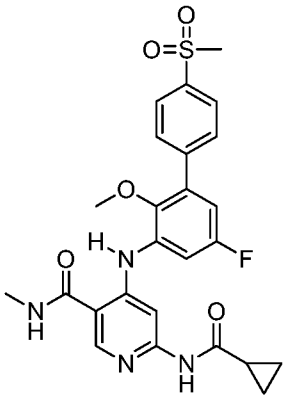
表 3

实 施 例	化合物	片段	结构式	谱图
7	WX-007 盐 酸盐			¹ H NMR (400MHz, MeOD) δ: 8.34 (s, 1H), 8.06 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.88 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.56 - 7.53 (m, 1H), 7.49 - 7.46 (m, 1H), 7.41 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 1.80 - 1.76 (m, 1H), 1.12 - 1.09 (m, 2H), 1.06 - 1.02 (m, 2H); LCMS <i>m/z</i> = 498.1 [M+H] ⁺ 。 纯化方法: 制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex luna C18 80*40mm*3 μm; 流动相: A (水, 含 0.04%盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 23%-42%, 6 min)

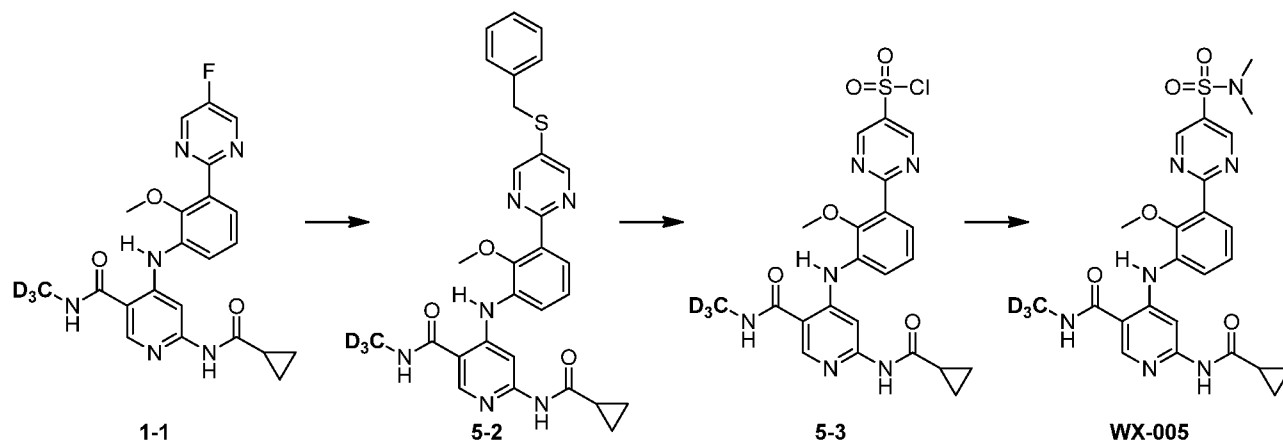
按照**实施例 4**的合成步骤, 将步骤 1 中 **4-1** 替换为下表中的片段 **7-1**, 将 **A-1** 替换为 **A-13**, 将步骤 2 中 **A-2** 替换为 **A-12**, 合成表 4 中**实施例 26**。

表 4

实 施 例	化合物	片段	结构式	谱图

26	WX-026 三氟乙酸盐	 <p>7-1</p>	 <p>WX-026</p>	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.45 (s, 1H), 11.32 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.17 (dd, $J = 3.0, 8.6$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 3.0, 8.4$ Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 3.06 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 1.91 - 1.87 (m, 1H), 1.06 - 0.99 (m, 2H), 0.96 - 0.89 (m, 2H); LCMS $m/z = 513.1$ $[\text{M}+1]^+$. 纯化方法: 制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Welch Xtimate C18 100*40mm*3 μm ; 流动相: A (水, 含 0.075% 三氟乙酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 26%-56%, 8 min)
----	--------------	--	---	---

实施例5



步骤 1: 化合物 5-2 的合成

将化合物 1-1 (0.45 g, 1.02 mmol, 1 eq) 溶于 DMF (5 mL) 中, 加入碳酸铯 (500.45 mg, 1.54 mmol, 1.5eq), 苯硫醇 (254.37 mg, 2.05 mmol, 239.97 μL , 2 eq), 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 1hr。向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 5-2。LCMS $m/z = 544.3$ $[\text{M}+ \text{H}]^+$ 。

步骤 2: 化合物 5-3 的合成

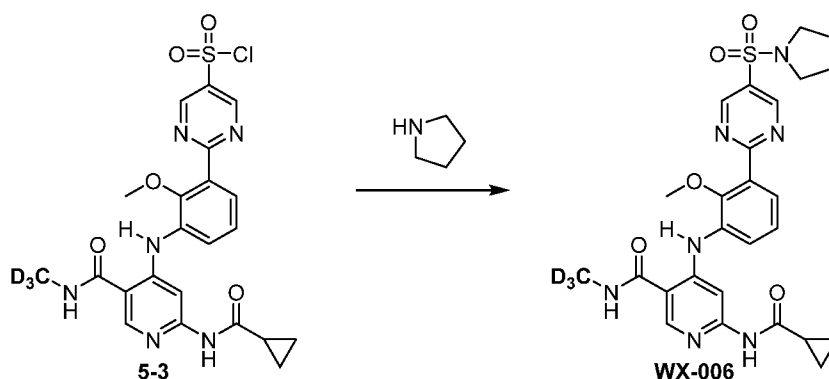
将化合物 5-2 (200 mg, 367.88 μmol , 1 eq) 溶于醋酸 (2 mL) 和水 (0.6 mL) 中, 然后降温至 0 $^{\circ}\text{C}$, 加入 *N*-氯代丁二酰亚胺 (221.06 mg, 1.66 mmol, 4.5 eq), 在 20 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 2 hr。向体系中加入硫酸钠干燥, 体系直接

用于下一步。得到化合物 **5-3**。LCMS $m/z=520.0$ $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 化合物 **WX-005** 的合成

将化合物 **5-3** (50 mg, 96.16 μmol , 1 *eq*) 溶于 THF (2 mL) 中, 然后降温至 -20°C , 加入二甲胺盐酸盐 (392.06 mg, 4.81 mmol, 440.52 μL , 50 *eq*) 和三乙胺 (1.46 g, 14.42 mmol, 2.01 mL, 150 *eq*), 在 20°C 下反应 2 hr。反应完成后, 加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Waters Xbridge BEH C18 100*30mm*10 μm ; 流动相: A (水, 含 10 mM 碳酸氢铵) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 30%-65%, 10 min), 得到化合物 **WX-005**。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.44 (s, 1H), 9.18 (s, 2H), 8.30 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.75 - 7.69 (m, 2H), 7.33 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.87 (s, 6H), 1.54 - 1.51 (m, 1H), 1.11 - 1.08 (m, 2H), 0.92 - 0.87 (m, 2H); LCMS $m/z=529.2$ $[M+H]^+$ 。

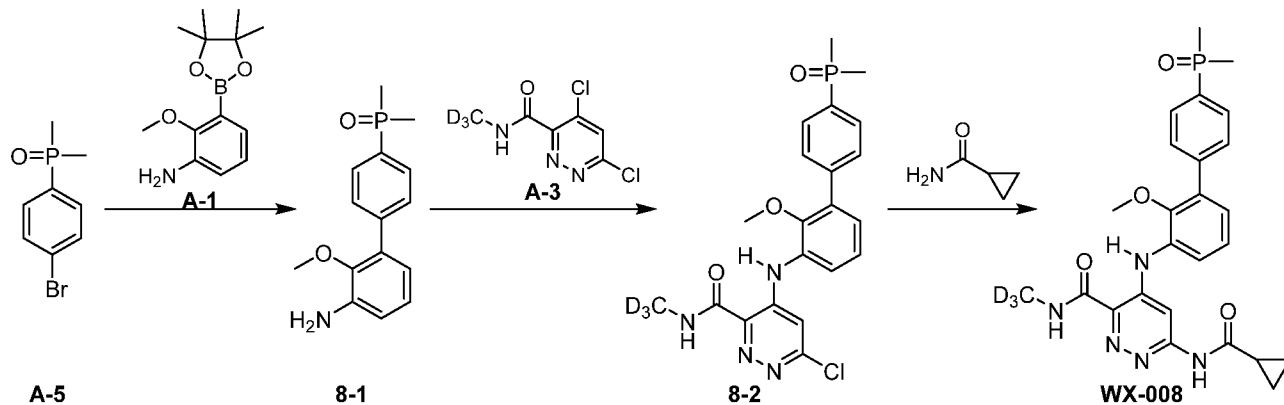
实施例 6



步骤 1: 化合物 **WX-006** 盐酸盐的合成

将化合物 **5-3** (95.6 mg, 183.85 μmol , 1 *eq*) 溶于 THF (2 mL), 然后降温至 -20°C , 加入四氢吡咯 (13.08 mg, 183.85 μmol , 15.35 μL , 1 *eq*) 和三乙胺 (2.79 g, 27.58 mmol, 3.84 mL, 150 *eq*), 在 20°C 下反应 2 hr。反应完成后, 加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*30mm*3 μm ; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 15%-45%, 8 min), 得到化合物 **WX-006** 盐酸盐。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 9.30 (s, 2H), 8.35 (s, 1H), 7.98 - 7.95 (m, 1H), 7.68 - 7.65 (m, 1H), 7.47 - 7.43 (m, 1H), 6.58 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.39 - 3.32 (m, 4H), 1.88 - 1.86 (m, 4H), 1.85 - 1.70 (m, 1H), 1.12 - 1.08 (m, 2H), 1.04 - 1.02 (m, 2H); LCMS $m/z=555.2$ $[M+H]^+$ 。

实施例 8



步骤 1: 化合物 8-1 的合成

将化合物 A-5 (1 g, 4.29 mmol, 1 eq), 化合物 A-1 (1.07 g, 4.29 mmol, 1 eq), 磷酸钾(1.82 g, 8.58 mmol, 2 eq)溶于水(4 mL)和 1,4-二氧六环(20 mL)中, 氮气置换三次后加入 Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (350.43 mg, 429.11 μmol, 0.1 eq), 在 80°C 搅拌 2 hr。向反应液中加入水 (10 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品通过硅胶柱层析纯化 (甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得到化合物 8-1。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.81 - 7.71 (m, 4H), 7.02 - 6.98 (m, 1H), 6.81 - 6.72 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.40 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.78 (s, 3H); LCMS *m/z*=276.1 [M+ H]⁺。

步骤 2: 化合物 8-2 的合成

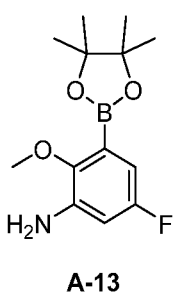
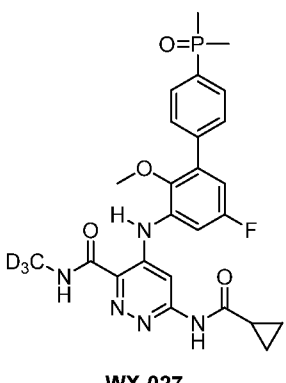
将化合物 8-1 (200 mg, 726.53 μmol, 1 eq), 化合物 A-3 (151.88 mg, 726.53 μmol, 1 eq)溶于 THF(10 mL)中, 加入 LiHMDS (1 M, 2.91 mL, 4 eq), 在 15°C 搅拌 1 hr。向反应液中加入水 (10 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品通过硅胶柱层析纯化 (甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得到化合物 8-2。LCMS *m/z*=448.1[M+ H]⁺。

步骤 3: 化合物 WX-008 盐酸盐的合成

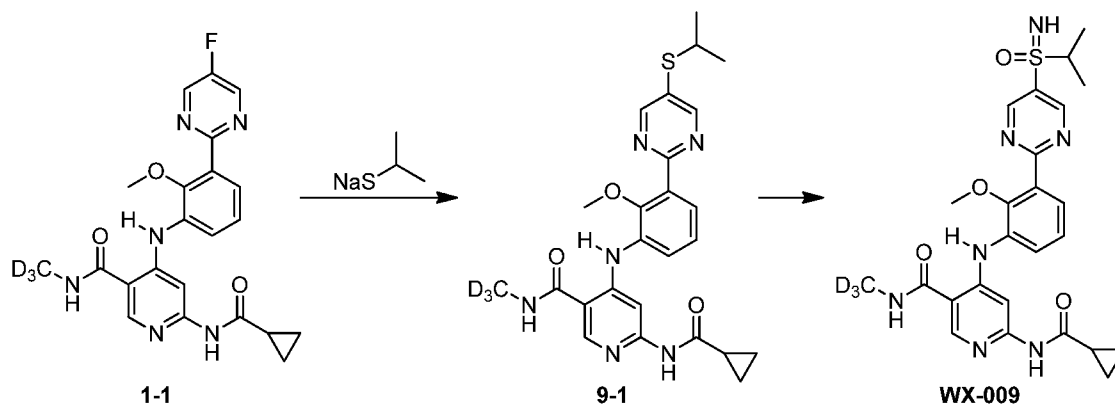
将化合物 8-2 (0.1 g, 223.28 μmol, 1 eq), 环丙甲酰胺 (475.05 mg, 5.58 mmol, 25 eq), 碳酸铯 (218.25 mg, 669.84 μmol, 3 eq), Xantphos (12.92 mg, 22.33 μmol, 0.1 eq)溶于二氧六环 (5 mL) 中, 氮气置换三次后加入 Pd₂(dba)₃ (20.45 mg, 22.33 μmol, 0.1 eq), 在 120°C 搅拌 4 hr。向反应液中加入水 (5 mL), 用乙酸乙酯 (10 mL*3) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*40mm*3 μm; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 24%-46%, 7 min), 得到化合物 WX-008 盐酸盐。¹HNMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7.94 - 7.88 (m, 2H), 7.84 - 7.81 (m, 2H), 7.58 - 7.55 (m, 1H), 7.51 - 7.48 (m, 1H), 7.43 - 7.39 (m, 1H), 6.95 (s, 1H), 3.47 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.68 - 1.61 (m, 1H), 1.18 - 1.06 (m, 4H); LCMS *m/z*=497.1[M+ H]⁺。

按照实施例 8 的合成步骤, 将步骤 1 中 A-1 替换为 A-13, 合成表 5 中实施例 27。

表 5

实施例	化合物	片段	结构式	谱图
27	WX-027 盐酸盐	 <p>A-13</p>	 <p>WX-027</p>	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ: 11.20 (s, 1H), 8.91 (br s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.77 - 7.65 (m, 4H), 7.16 (dd, <i>J</i> =2.9, 9.2 Hz, 1H), 6.80 (dd, <i>J</i> =2.9, 8.7 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 1.73 (d, <i>J</i> =12.8 Hz, 6H), 1.66- 1.60 (m, 1H), 1.11 - 1.02 (m, 2H), 0.93 - 0.87 (m, 2H); LCMS <i>m/z</i> =537.1 [M+ Na] ⁺ . 纯化方法: 制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*40mm*3 μm; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 24%-46%, 7 min)。

实施例 9



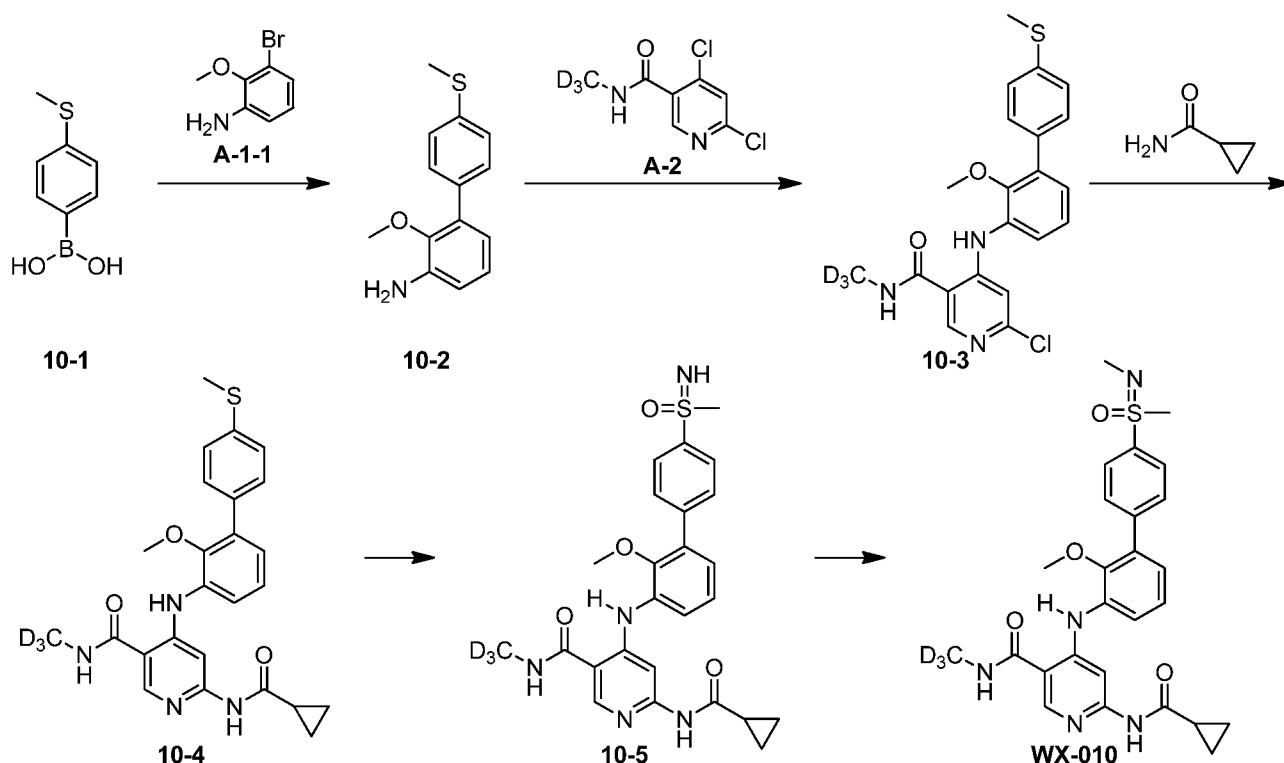
步骤 1: 化合物 9-1 的合成

将化合物 1-1 (50 mg, 113.78 μmol, 1 eq) 溶于 DMF (1 mL) 中, 然后加入异丙基硫醇钠 (44.67 mg, 455.11 μmol, 4 eq), 在 40°C 下反应 2 hr。向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯: 石油醚 = 10%-30%) 分离纯化得到化合物 9-1。LCMS *m/z*= 496.2 [M+ H]⁺。

步骤 2: 化合物 WX-009 三氟乙酸盐的合成

将化合物 **9-1** (56 mg, 112.99 μmol , 1 eq) 加入到 MeOH (1 mL) 中, 然后加入二乙酰氧基碘苯 (109.18 mg, 338.98 μmol , 3 eq) 和醋酸铵 (34.84 mg, 451.97 μmol , 4 eq), 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 hr。向体系中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经过制备高效液相色谱分离纯化 (柱子: Welch Xtimate C18 100*40mm*3 μm ; 流动相: A(水, 含 0.075% 三氟乙酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 23%-63%, 8 min) 得到化合物 **WX-009** 三氟乙酸盐。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 11.97 - 11.77 (m, 1H), 11.60 - 11.42 (m, 1H), 9.33 (s, 2H), 8.73 - 8.65 (m, 1H), 8.73 - 8.65 (m, 1H), 8.01 - 7.93 (m, 1H), 7.67 - 7.62 (m, 1H), 7.46 - 7.40 (m, 1H), 3.90 - 3.83 (m, 3H), 3.52 - 3.41 (m, 3H), 1.93-1.83 (m, 1H), 1.52 - 1.38 (m, 6H), 1.13 - 1.07 (m, 2H), 1.05 - 0.95 (m, 2H); LCMS m/z = 527.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

实施例 10



步骤1: 化合物**10-2**的合成

将化合物 **10-1** (997.91 mg, 5.94 mmol, 2 eq)、化合物 **A-1-1** (600 mg, 2.97 mmol, 1 eq) 和磷酸钾 (1.89 g, 8.91 mmol, 3 eq) 加入到 1,4-二氧六环 (24 mL) 中, 然后置换 N_2 , 加入 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (242.51 mg, 296.96 μmol , 0.1 eq), 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 3 hr。加入水 (40 mL) 和乙酸乙酯 (40 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (40 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤两次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯/石油醚=0~20%), 得化合物 **10-2**。LCMS m/z = 246.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

步骤 2: 化合物 **10-3** 的合成

将化合物 **10-2** (300 mg, 1.22 mmol, 1 *eq*)和化合物 **A-2** (279.86 mg, 1.35 mmol, 1.1 *eq*)加入到 THF (6 mL) 中, 降温至 0°C 后加入 LiHMDS (1 M, 4.89 mL, 4 *eq*), 在 20°C 下反应 2 hr。反应完成后, 用甲醇淬灭后, 加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得化合物 **10-3**。LCMS $m/z=417.1$ $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 化合物 **10-4** 的合成

将化合物 **10-3** (300 mg, 719.53 μmol , 1 *eq*)和环丙基甲酰胺(1.53 g, 17.99 mmol, 25 *eq*)加入到 1,4-二氧六环(2 mL)、NMP(0.4 mL) 和水(0.4 mL) 中, 然后加入碳酸铯 (703.31 mg, 2.16 mmol, 3 *eq*) 和 Xantphos (62.45 mg, 107.93 μmol , 0.15 *eq*), 置换 N_2 后, 加入 $Pd_2(dba)_3$ (98.83 mg, 107.93 μmol , 0.15 *eq*), 置换 N_2 后, 在 120°C 反应 3 hr。反应完成后, 加入水(10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤两次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯/石油醚=0~100%), 得化合物 **10-4**。LCMS $m/z=466.1$ $[M+H]^+$ 。

步骤 4: 化合物 **10-5** 的合成

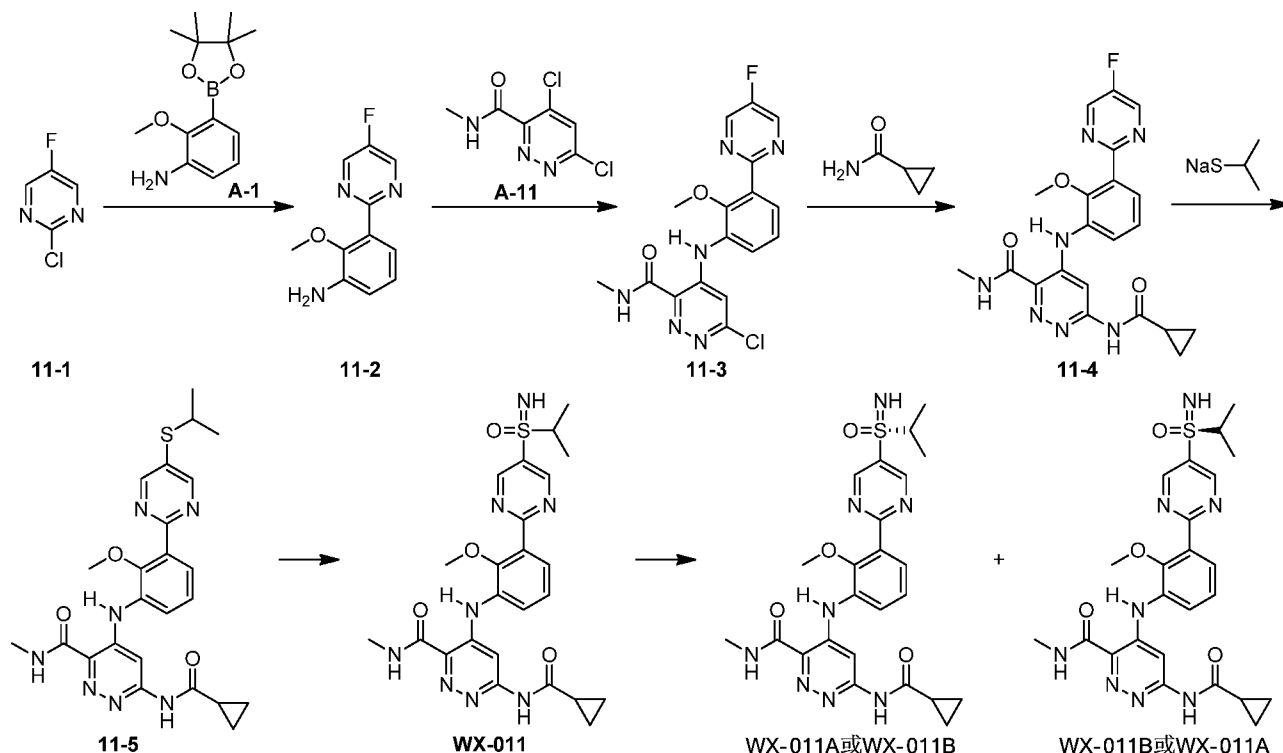
将化合物 **10-4** (200 mg, 429.57 μmol , 1 *eq*)加入到甲醇(4 mL) 中, 然后加入二乙酰氧基碘苯(415.09 mg, 1.29 mmol, 3 *eq*)和醋酸铵(132.45 mg, 1.72 mmol, 4 *eq*), 在 25°C 下反应 3 hr。向体系加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备硅胶薄层层析板分离纯化 (乙酸乙酯: 二氯甲烷: 甲醇=5:5:1) 纯化得到化合物 **10-5**。 1H NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ : 10.47 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.18 (s, 2H), 8.06 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.81 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.11 - 7.08 (m, 1H), 6.20 (s, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 2.76 (s, 1H), 1.57 - 1.52 (m, 1H), 1.11 - 1.08 (m, 2H), 0.92 - 0.87 (m, 2H); LCMS $m/z=497.2$ $[M+H]^+$ 。

步骤 5: 化合物 **WX-010 盐酸盐** 的合成

将化合物 **10-5** (40 mg, 80.55 μmol , 1 *eq*)溶于 1,4-二氧六环(3 mL), 然后加入 $Cu(OAc)_2$ (21.95 mg, 120.82 μmol , 1.5 *eq*)和吡啶(15.29 mg, 193.32 μmol , 15.60 μL , 2.4 *eq*), 敞口搅拌 10 min, 然后加入甲基硼酸(9.64 mg, 161.10 μmol , 2 *eq*), 在 100°C 下反应 12 hr。反应完成后, 加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*30mm*3 μm ; 流动相:A(水, 含 0.04% 盐酸) 和 B(乙腈); 梯度: B%: 10%-30%, 8 min) 得到化合物 **WX-010 盐酸盐**。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ : 10.47 (s, 1H), 8.27 - 8.24 (m, 2H), 8.19 (s, 1H), 7.94 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.57 - 7.55 (m, 1H), 7.28 - 7.24 (m, 1H), 7.12 - 7.10 (m, 1H), 6.19 (s, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 2.72 (s, 3H), 1.56 - 1.53 (m,

1H), 1.12 - 1.08 (m, 2H), 0.92 - 0.87 (m, 2H); LCMS m/z = 511.2 [M+ H]⁺.

实施例 11



步骤 1: 化合物 11-2 的合成

将化合物 11-1 (3.83 g, 28.90 mmol, 3.58 mL, 0.9 eq)、化合物 A-1 (8 g, 32.11 mmol, 1 eq) 和磷酸钾 (20.45 g, 96.34 mmol, 3 eq) 加入到 1,4-二氧六环 (120 mL) 和水 (24 mL) 中, 然后氮气置换, 加入 Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (1.57 g, 1.93 mmol, 0.06 eq), 在 100°C 下反应 6 hr。加入水 (100 mL) 和乙酸乙酯 (100 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (100 mL) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (乙酸乙酯/石油醚=0~20%), 得化合物 11-2。LCMS m/z = 220.0 [M+ H]⁺。

步骤 2: 化合物 11-3 的合成

将化合物 11-2 (3.0 g, 13.69 mmol, 1 eq) 和化合物 A-11 (3.67 g, 17.79 mmol, 1.3 eq) 加入到 THF (30 mL) 中, 降温至 -60°C 后加入 LiHMDS (1 M, 41.06 mL, 3 eq), 在 20°C 下反应 2 hr。反应完成后, 用甲醇 (10 mL) 淬灭后, 加入水 (50 mL) 和乙酸乙酯 (50 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (50 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得化合物 11-3。LCMS m/z = 389.0 [M+ H]⁺。

步骤 3: 化合物 11-4 的合成

将化合物 11-3 (4.2 g, 10.80 mmol, 1 eq) 和环丙基甲酰胺 (9.19 g, 108.03 mmol, 10 eq) 加入到 NMP (80 mL) 中, 然后加入碳酸铯 (10.56 g, 32.41 mmol, 3 eq) 和 Xantphos (937.62 mg, 1.62 mmol, 0.15 eq), 氮气置换后, 加入 Pd₂(dba)₃ (1.48 g, 1.62 mmol, 0.15 eq), 氮气置换后, 在 140°C 反应 2 hr。反应完成后, 加入水

(100 mL) 和乙酸乙酯 (100 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(100 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤两次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得化合物 **11-4**。LCMS $m/z=438.1$ $[M+H]^+$ 。

步骤 4: 化合物 **11-5** 的合成

将化合物 **11-4** (300 mg, 685.83 μmol , 1 *eq*)溶于 DMF (5 mL) 中, 然后加入异丙基硫醇钠(100.96 mg, 1.03 mmol, 1.5 *eq*), 在 60°C下反应 2 hr。向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL)萃取, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 **11-5**。LCMS $m/z=494.1$ $[M+H]^+$ 。

步骤 5: 化合物 **WX-011** 的合成

将化合物 **11-5** (400 mg, 810.41 μmol , 1 *eq*)加入到 MeOH (30 mL) 中, 然后加入二乙酰氧基碘苯(783.08 mg, 2.43 mmol, 3 *eq*)和醋酸铵(249.86 mg, 3.24 mmol, 4 *eq*), 在 25°C下反应 2 hr。向体系加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离(色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*30mm*3 μm ; 流动相:A(水, 含 0.04%盐酸)和 B(乙腈); 梯度: B%: 45%-45%, 8 min), 将所得到的溶液 40°C真空浓缩除去乙腈, 然后用饱和碳酸氢钠调碱性 (pH=8), 用二氯甲烷 (30 mL*3) 萃取。将合并后的有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩, 干燥后得到化合物 **WX-011**。LCMS $m/z=525.2$ $[M+H]^+$ 。

步骤 6: 化合物 **WX-011A** 和 **WX-011B** 的合成

WX-011 经过 SFC 进行拆分(柱子: DAICEL CHIRALCEL OD-H(250mm*30mm,5 μm); 流动相: A (CO₂) 和 B (乙醇, 含 0.1%氨水); 梯度: B%=65%-65%, 15 min, 得到 **WX-011A** 和 **WX-011B**。

WX-011A: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 11.07 (s, 1H), 10.05 (s, 1H), 9.28 (s, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.13 - 8.12 (m, 1H), 7.80 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.38 - 3.33 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 1.91 - 1.88 (m, 1H), 1.41 (t, $J=8.0$ Hz, 6H), 1.10 - 1.08 (m, 2H), 0.92 - 0.89 (m, 2H); LCMS $m/z=525.2$ $[M+H]^+$ 。SFC 检测方法 (柱子: Chiralpak AD-3, 3 μm , 0.46 cm id \times 5 cm L; 流动相: A (CO₂) 和 B (EtOH, 含 0.1%异丙胺); 梯度: B%=50~50%, 5 min; 流速: 4.0 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 100 bar), Rt=2.538 min, 手性异构体过量 100%。

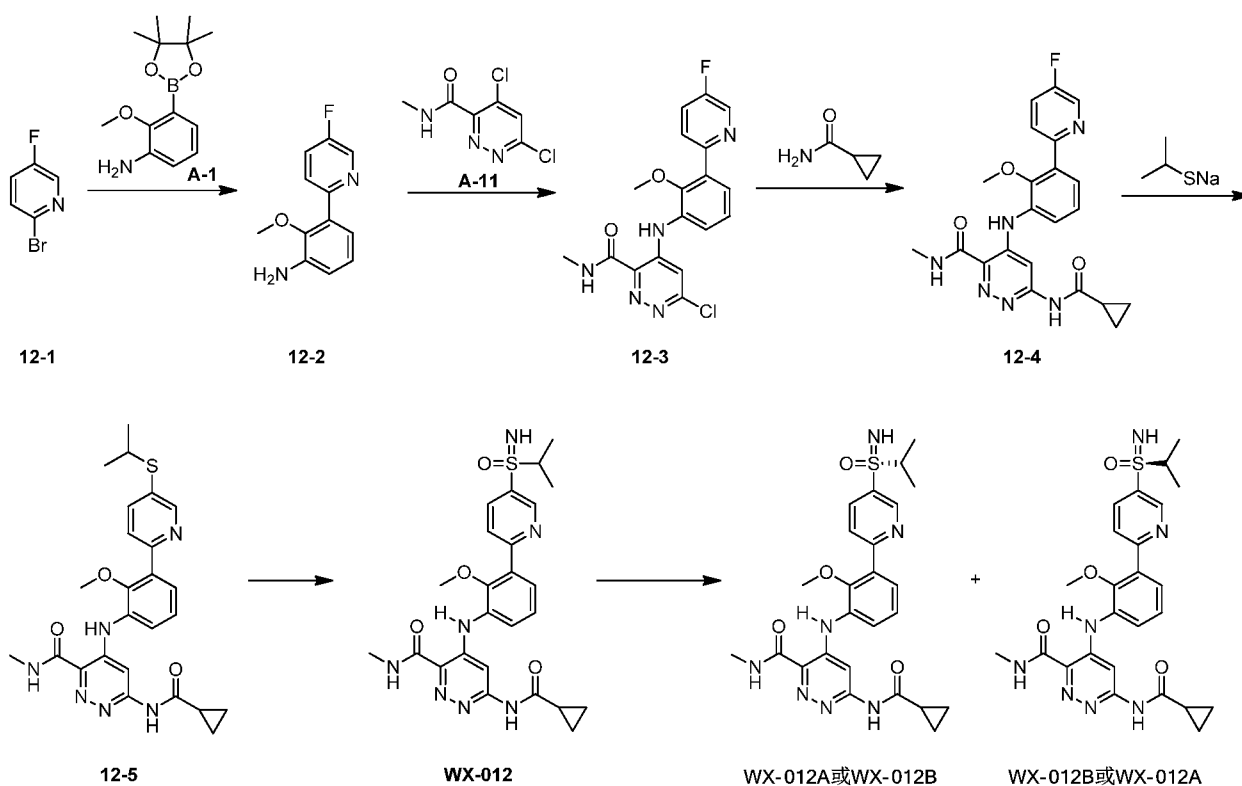
WX-011B: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 11.07 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 9.28 (s, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.10 - 8.09 (m, 1H), 7.80 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.36 - 3.33 (m, 1H), 3.03 (s, 3H), 1.85 - 1.82 (m, 1H), 1.41 (t, $J=8.0$ Hz, 6H), 1.11 - 1.09 (m, 2H), 0.93 - 0.91 (m, 2H); LCMS $m/z=525.2$ $[M+H]^+$ 。SFC 检测方法 (柱子: Chiralpak AD-3, 3 μm , 0.46 cm id \times 5 cm L; 流动相: A (CO₂) 和 B (EtOH,

含 0.1% 异丙胺)；梯度：B%=50~50%，5 min；流速：4.0 mL/min；波长：220nm；压力：100 bar)，Rt= 3.011 min，手性异构体过量 98.60%。

步骤 7：化合物 **WX-011A 盐酸盐** 的合成

将化合物 **WX-011A** (790 mg, 1.51 mmol, 1 eq) 溶于 MeCN (6 mL)，加 HCl/EtOAc (4 M, 1.13 mL, 3 eq)，搅拌至澄清。往体系中加入水 (50 mL)，得到化合物 **WX-011A 盐酸盐**。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 9.42 (s, 2H), 8.08 (dd, *J*=1.6, 8.0 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.51 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.86 - 3.77 (m, 1H), 3.02 (s, 3H), 1.91 - 1.78 (m, 1H), 1.47 (dd, *J*=6.8, 12.4 Hz, 6H), 1.19 - 1.04 (m, 4H)；LCMS *m/z*=525.0 [M+H]⁺。

实施例 12



步骤 1：化合物 **12-2** 的合成

将化合物 **12-1** (3 g, 17.05 mmol, 4.97 mL, 1 eq)，**A-1** (5.10 g, 20.46 mmol, 1.2 eq)，碳酸钾 (4.71 g, 34.09 mmol, 2 eq) 溶于 1,4-二氧六环 (50 mL) 和水 (10 mL) 中，置换氮气三次后加入 Pd(dppf)Cl₂ (1.25 g, 1.70 mmol, 0.1 eq)，再置换氮气一次，升温到 80°C 搅拌 4 hr。向反应液中加入水 (50 mL) 后，用乙酸乙酯 (50 mL*2) 萃取。合并后有机相用饱和食盐水 (30 mL*2) 洗涤。有机相用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=0~30%) 分离纯化，得到化合物 **12-2**。LCMS *m/z*=219.1 [M+1]⁺。

步骤 2：化合物 **12-3** 的合成

在氮气保护下，将化合物 **12-2** (2 g, 9.16 mmol, 1 eq) 加入 THF (5 mL)，加入 **A-11** (1.89 g, 9.16 mmol, 1 eq)，室温 25°C 搅拌溶解，缓慢滴加加入 LiHMDS (1 M, 22.91 mL, 2.5 eq)，然后室温 25 °C 继续搅拌 1 hr。向反应液中加入饱和氯化铵水溶液 (20 mL) 和水 (50 mL) 后，用乙酸乙酯 (50 mL*2) 萃取。合并后有机相用饱和食盐水 (50 mL*2) 洗涤。有机相用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=0~50%) 分离纯化，得到化合物 **12-3**。LCMS m/z =387.9 [M+1]⁺。

步骤 3: 化合物 **12-4** 的合成

将化合物 **12-3** (800 mg, 2.06 mmol, 1 eq) 和环丙基甲酰胺 (1.76 g, 20.63 mmol, 10 eq) 加入到 1,4-二氧六环 (3 mL) 和 NMP (0.3 mL) 中，然后加入碳酸铯 (2.69 g, 8.25 mmol, 4 eq) 和 Xantphos (358.10 mg, 618.88 μmol, 0.15 eq)，氮气置换三次后加入 Pd₂(dba)₃ (320.30 mg, 309.44 μmol, 0.15 eq) 在 130 °C 反应 18 hr。冷却至室温后，加入水 (30 mL) 和乙酸乙酯 (30 mL) 萃取分液，水相再用乙酸乙酯 (30 mL) 萃取，合并有机相，有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=0~50%) 分离纯化，得到化合物 **12-4**。LCMS m/z =437.3 [M+1]⁺。

步骤 4: 化合物 **12-5** 的合成

将化合物 **12-4** (600 mg, 1.37 mmol, 1 eq) 溶于 DMF (1 mL) 中，然后加入异丙基硫醇钠 (539.69 mg, 5.50 mmol, 4 eq)，在 40 °C 下反应 2 hr。向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液，水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取，合并有机相，有机相用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液减压浓缩。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=0~50%) 分离纯化，得到化合物 **12-5**。粗品未经纯化直接用于下一步反应。LCMS m/z =493.2 [M+1]⁺。

步骤 5: 化合物 **WX-012** 的合成

将 **12-5** (350 mg, 710.53 μmol, 1 eq) 加入到 MeOH (20 mL) 中，然后加入二乙酰氧基碘苯 (686.57 mg, 2.13 mmol, 3 eq) 和醋酸铵 (219.08 mg, 2.84 mmol, 4 eq)，在 25 °C 下反应 2 hr。加入水 (20 mL) 和乙酸乙酯 (20 mL) 萃取分液，水相继续用乙酸乙酯 (20 mL) 萃取。合并有机相，用饱和氯化钠水溶液 (20 mL) 洗涤，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩得粗品。所得到的粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷=0~3%) 分离纯化得到化合物 **WX-012**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 11.16 (s, 1H), 9.21 (d, J =2.4 Hz, 1H), 8.53 (br dd, J =2.5, 6.5 Hz, 1H), 8.29 - 8.14 (m, 4H), 7.69 (dd, J =1.5, 7.8 Hz, 1H), 7.57 (dd, J =1.4, 7.9 Hz, 1H), 7.38 - 7.32 (m, 1H), 3.59 - 3.52 (m, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.39 - 3.29 (m, 1H), 3.07 (d, J =5.0 Hz, 3H), 2.82 (br s, 1H), 1.69 - 1.61 (m, 1H), 1.39 (dd, J =6.8, 13.3 Hz, 6H), 1.18 - 1.07 (m, 2H), 1.00 - 0.93 (m, 2H); LCMS m/z =524.1 [M+1]⁺。

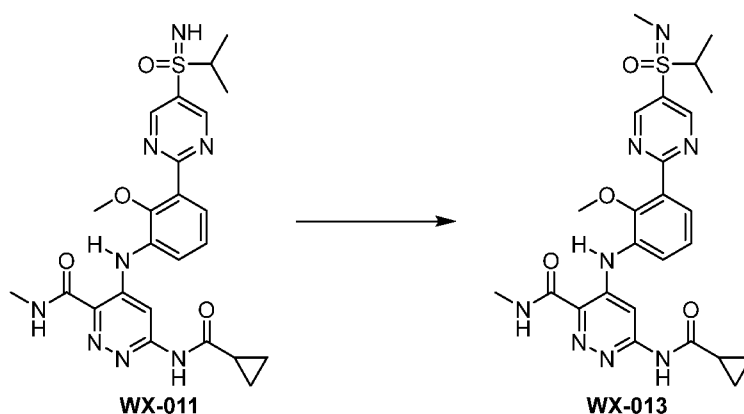
步骤 6: 化合物 **WX-012A** 和 **WX-012B** 的合成

WX-012 经过 SFC 进行拆分 (柱子: DAICEL CHIRALPAK AD (250mm*30mm, 10 μm); 流动相: A (CO₂) 和 B (异丙醇, 含 0.1% 氨水); 梯度: B%=50%-50%, 15 min), 得到 **WX-012A** 和 **WX-012B**。

WX-012A: $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 11.16 (s, 1H), 9.22 (d, 2.4 Hz, 1H), 8.54 (br s, 1H), 8.30 - 8.15 (m, 4H), 7.70 (dd, $J=1.5, 7.8$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J=1.5, 8.0$ Hz, 1H), 7.42 - 7.32 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.40 - 3.30 (m, 1H), 3.08 (d, $J=5.2$ Hz, 3H), 2.84 (br s, 1H), 1.70 - 1.62 (m, 1H), 1.40 (dd, $J=6.8, 13.3$ Hz, 6H), 1.17 - 1.12 (m, 2H), 1.02 - 0.95 (m, 2H); LCMS $m/z=524.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。SFC 检测方法 (柱子: Chiralpak AD-3, $3\ \mu\text{m}$, $0.46\ \text{cm id} \times 15\ \text{cm L}$; 流动相: A(CO_2) 和 B(异丙醇, 含 0.05%二乙胺); 梯度: $\text{B}\%=40\%$, 8 min; 流速: 2.5 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 100 bar), $\text{Rt}=4.941\ \text{min}$, 手性异构体过量 99.66%。

WX-012B: $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 11.15 (s, 1H), 9.22 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.28 - 8.19 (m, 2H), 8.21 - 8.13 (m, 2H), 7.70 (dd, $J=1.4, 7.7$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J=1.6, 7.9$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.39 - 3.29 (m, 1H), 3.08 (d, $J=5.0$ Hz, 3H), 2.84 (br s, 1H), 1.66 (br d, $J=4.0$ Hz, 1H), 1.40 (dd, $J=6.8, 13.3$ Hz, 6H), 1.17 - 1.11 (m, 2H), 1.01 - 0.94 (m, 2H); LCMS $m/z=524.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。SFC 检测方法 (柱子: Chiralpak AD-3, $3\ \mu\text{m}$, $0.46\ \text{cm id} \times 15\ \text{cm L}$; 流动相: A (CO_2) 和 B (异丙醇, 含 0.05%二乙胺); 梯度: $\text{B}\%=40\%$, 8 min; 流速: 2.5 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 100 bar), $\text{Rt}=6.054\ \text{min}$, 手性异构体过量 98.66%。

实施例 13



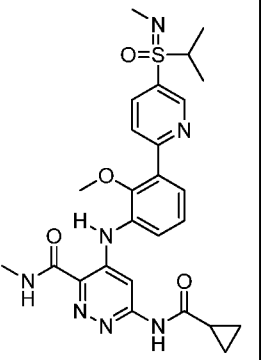
步骤 1: 化合物 **WX-013** 的合成

将化合物 **WX-011** (20 mg, 38.12 μmol , 1 eq) 加入到 1,4-二氧六环(2 mL) 中, 然后加入 $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (20.77 mg, 114.37 μmol , 3 eq) 和吡啶(7.24 mg, 91.50 μmol , 7.39 μL , 2.4 eq), 开口搅拌 10 min, 然后加入甲基硼酸(6.85 mg, 114.37 μmol , 3 eq), 在 100°C 下反应 3 hr。向体系加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离(色谱柱: Phenomenex Luna C18 $80 \times 30\text{mm} \times 3\ \mu\text{m}$; 流动相: A(水, 含 0.04% 盐酸)和 B (乙腈); 梯度: $\text{B}\%: 15\%-30\%$, 8 min), 得到粗品。粗品继续经制备硅胶薄层层析板分离纯化(乙酸乙酯: 二氯甲烷: 甲醇=5:5:1) 得到化合物 **WX-013**。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CD_3OD) δ : 9.31 (s, 2H), 8.10 - 8.06 (m, 1H), 7.79 - 7.73 (m, 1H), 7.50 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 2.92 - 2.90 (m, 1H), 2.81 (s, 3H), 1.83 - 1.82 (m, 1H), 1.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H), 1.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H), 1.14 - 1.08 (m, 4H); LCMS $m/z=539.2$

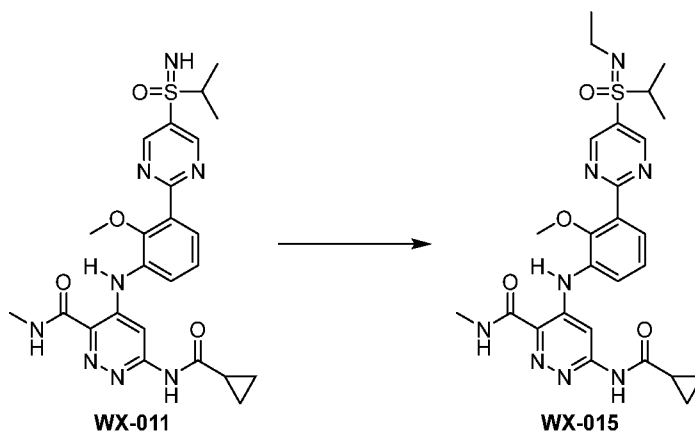
[M+H]⁺。

按照**实施例 13**的合成步骤，将步骤 1 中 **WX-011** 替换为 **WX-012**，合成表 6 中**实施例 14**。

表 6

实 施 例	化 合 物	结 构 式	谱 图
14	WX-014 三氟 乙酸盐	 <p style="text-align: center;">WX-014</p>	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ: 13.31 (br s, 1H), 11.90 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.58 - 8.39 (m, 2H), 8.31 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.92 (dd, <i>J</i> = 1.4, 7.9 Hz, 1H), 7.88 - 7.81 (m, 1H), 7.58 (dd, <i>J</i> = 1.3, 7.8 Hz, 1H), 7.49 - 7.42 (m, 1H), 4.31 - 4.19 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.08 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 3H), 2.82 (s, 3H), 2.11 - 2.01 (m, 1H), 1.62 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 3H), 1.33 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 3H), 1.15 - 1.09 (m, 2H), 1.08 - 1.02 (m, 2H); LCMS <i>m/z</i> = 538.1 [M+1] ⁺ . 纯化方法: 制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Welch Xtimate C18 100*40mm*3μm; 流动相: A (水, 含 0.04%三氟乙酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 13%-43%, 8min)

实施例 15



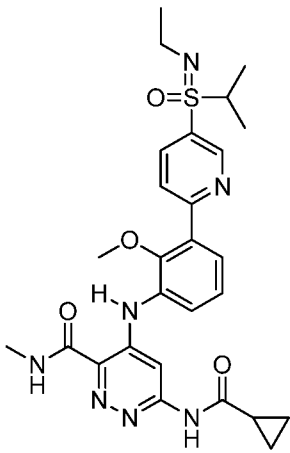
步骤 1: 化合物 **WX-015** 盐酸盐的合成

将化合物 **WX-011** (100 mg, 190.62 μmol, 1 eq) 加入到 1,4-二氧六环 (2 mL) 中, 然后加入 Cu(OAc)₂ (103.87 mg, 571.87 μmol, 3 eq) 和吡啶 (36.19 mg, 457.50 μmol, 36.93 μL, 2.4 eq), 开口搅拌 10 min, 然后加入乙基硼酸 (21.13 mg, 285.94 μmol, 1.5 eq), 在 100°C 下反应 4 hr。向体系加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*30mm*3 μm; 流动相: A (水,

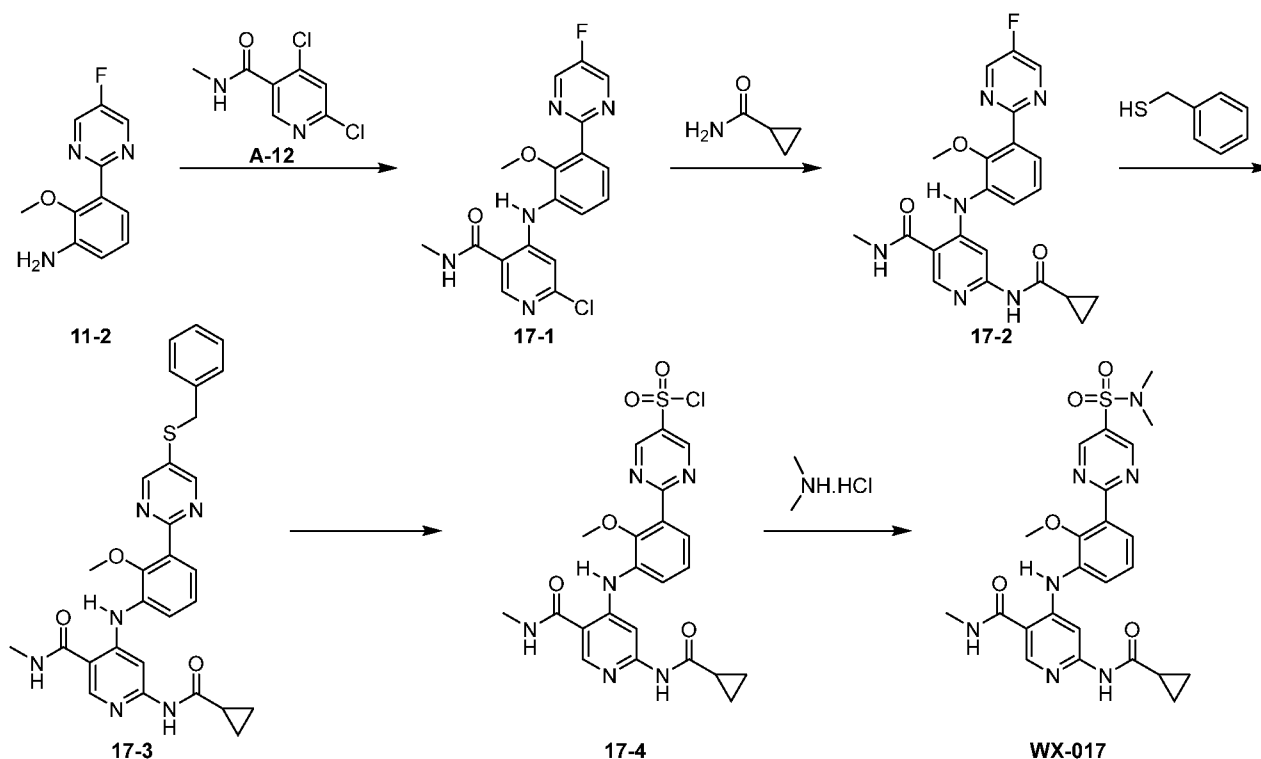
含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 20%-40%, 8 min), 得到化合物 **WX-015** 盐酸盐。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 11.07 (s, 1H), 9.16 (s, 2H), 9.04 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.14 - 8.12 (m, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.48 - 3.14 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 1.57 - 1.54 (m, 1H), 1.44 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 1.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H), 1.26 - 1.24 (m, 3H), 1.10 - 0.93 (m, 4H); LCMS *m/z* = 553.2 [M+H]⁺。

按照 **实施例 15** 的合成步骤, 将步骤 1 中 **WX-011** 替换为 **WX-012**, 合成表 7 中 **实施例 16**。

表 7

实施例	化合物	结构式	谱图
16	WX-016 盐酸盐	 <p style="text-align: center;">WX-016</p>	<p>LCMS <i>m/z</i> = 552.2 [M+H]⁺。</p> <p>纯化方法: 制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Xtimate C18 150*40mm*5μm; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 20%-40%, 10 min)。</p>

实施例 17



步骤 1: 化合物 17-1 的合成

将化合物 11-2 (2.0 g, 9.12 mmol, 1 eq) 和化合物 A-12 (2.06 g, 10.04 mmol, 1.1 eq) 加入到 THF (20 mL) 中, 降温至 -60°C 后加入 LiHMDS (1 M, 27.37 mL, 3 eq), 在 20°C 下反应 2 hr。反应完成后, 用甲醇 (10 mL) 淬灭后, 加入水 (50 mL) 和乙酸乙酯 (50 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (50 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得化合物 17-1。LCMS $m/z=388.0$ $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 。

步骤 2: 化合物 17-2 的合成

将化合物 17-1 (0.52 g, 1.34 mmol, 1 eq) 和环丙基甲酰胺 (1.14 g, 13.41 mmol, 10 eq) 加入到 NMP (7 mL) 中, 然后加入碳酸铯 (1.31 g, 4.02 mmol, 3 eq) 和 Xantphos (116.38 mg, 201.14 μmol , 0.15 eq), 氮气置换后, 加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (184.19 mg, 201.14 μmol , 0.15 eq), 氮气置换后, 在 140°C 反应 2 hr。反应完成后, 加入水 (30 mL) 和乙酸乙酯 (30 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (30 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤两次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (甲醇/二氯甲烷 = 0~10%), 得化合物 17-2。LCMS $m/z=437.1$ $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 。

步骤 3: 化合物 17-3 的合成

将化合物 17-2 (500 mg, 1.15 mmol, 1 eq) 溶于 DMF (5 mL) 中, 加入碳酸铯 (559.91 mg, 1.72 mmol, 1.5 eq), 苄硫醇 (284.58 mg, 2.29 mmol, 2 eq), 在 40°C 下搅拌 2hr。向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 17-3。LCMS $m/z=541.2$ $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 。

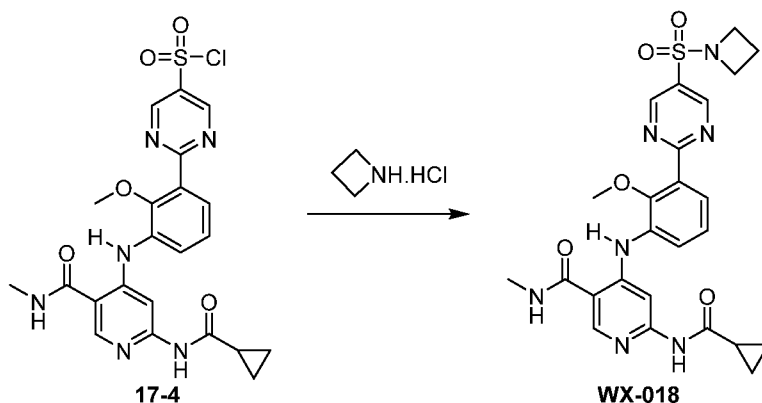
步骤 4: 化合物 17-4 的合成

将化合物 17-3 (400 mg, 739.87 μmol , 1 *eq*) 溶于醋酸 (4 mL) 和水 (0.5 mL) 中, 然后降温至 0°C, 加入 *N*-氯代丁二酰亚胺 (395.18 mg, 2.96 mmol, 4 *eq*), 在 25°C 搅拌 4 hr。向体系中加入硫酸钠干燥, 体系直接用于下一步。得到化合物 17-4。LCMS $m/z=517.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 5: 化合物 WX-017 盐酸盐的合成

将化合物 17-4 (190 mg, 367.54 μmol , 1 *eq*) 加入到 THF (2 mL) 中, 然后降温至 -60°C, 加入二甲胺盐酸盐 (1.50 g, 18.38 mmol, 50 *eq*), 和三乙胺 (5.58 g, 55.13 mmol, 7.67 mL, 150 *eq*), 在 20°C 下反应 12 hr。向体系加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*30mm*3 μm ; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 17%-37%, 7 min), 得到化合物 WX-017 盐酸盐。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.35 (s, 1H), 9.17 (s, 2H), 8.27 (s, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.72 - 7.68 (m, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.03 (s, 3H), 2.86 (s, 6H), 1.68 - 1.53 (m, 1H), 1.20 - 1.18 (m, 2H), 0.90 - 0.86 (m, 2H); LCMS $m/z=526.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

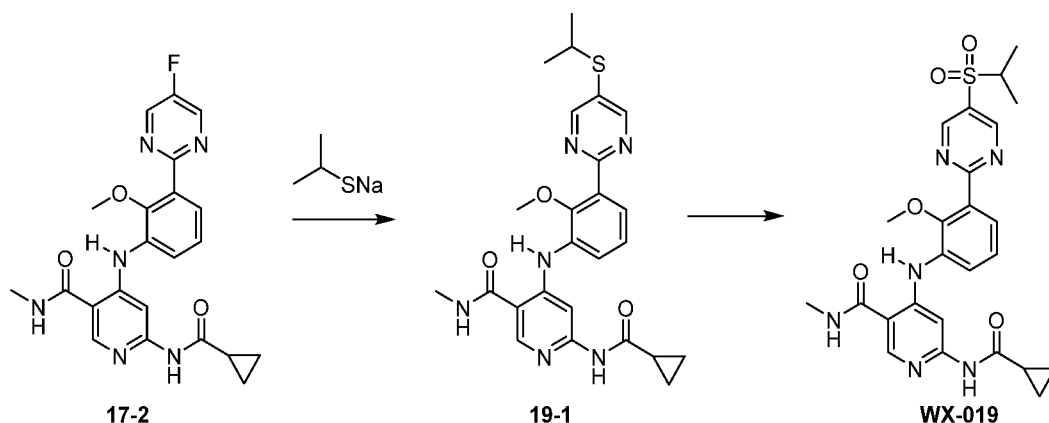
实施例 18



步骤 1: 化合物 WX-018 盐酸盐的合成

将化合物 17-4 (190 mg, 367.54 μmol , 1 *eq*) 加入到 THF (2 mL) 中, 然后降温至 -60°C, 加入氮杂环丁烷盐酸盐 (1.72 g, 18.38 mmol, 50 *eq*) 和三乙胺 (5.58 g, 55.13 mmol, 7.67 mL, 150 *eq*), 在 20°C 下反应 12 hr。向体系加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna C18 80*30mm*3 μm ; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 17%-37%, 7 min), 得到化合物 WX-018 盐酸盐。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 10.35 (s, 1H), 9.19 (s, 2H), 8.27 (s, 2H), 8.09 (s, 1H), 7.71 - 7.67 (m, 2H), 7.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.93 - 3.91 (m, 4H), 3.85 (s, 3H), 2.98 (s, 3H), 2.22 - 2.19 (s, 2H), 1.51 - 1.49 (m, 1H), 1.05 - 1.03 (m, 2H), 0.90 - 0.86 (m, 2H); LCMS $m/z=538.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 19



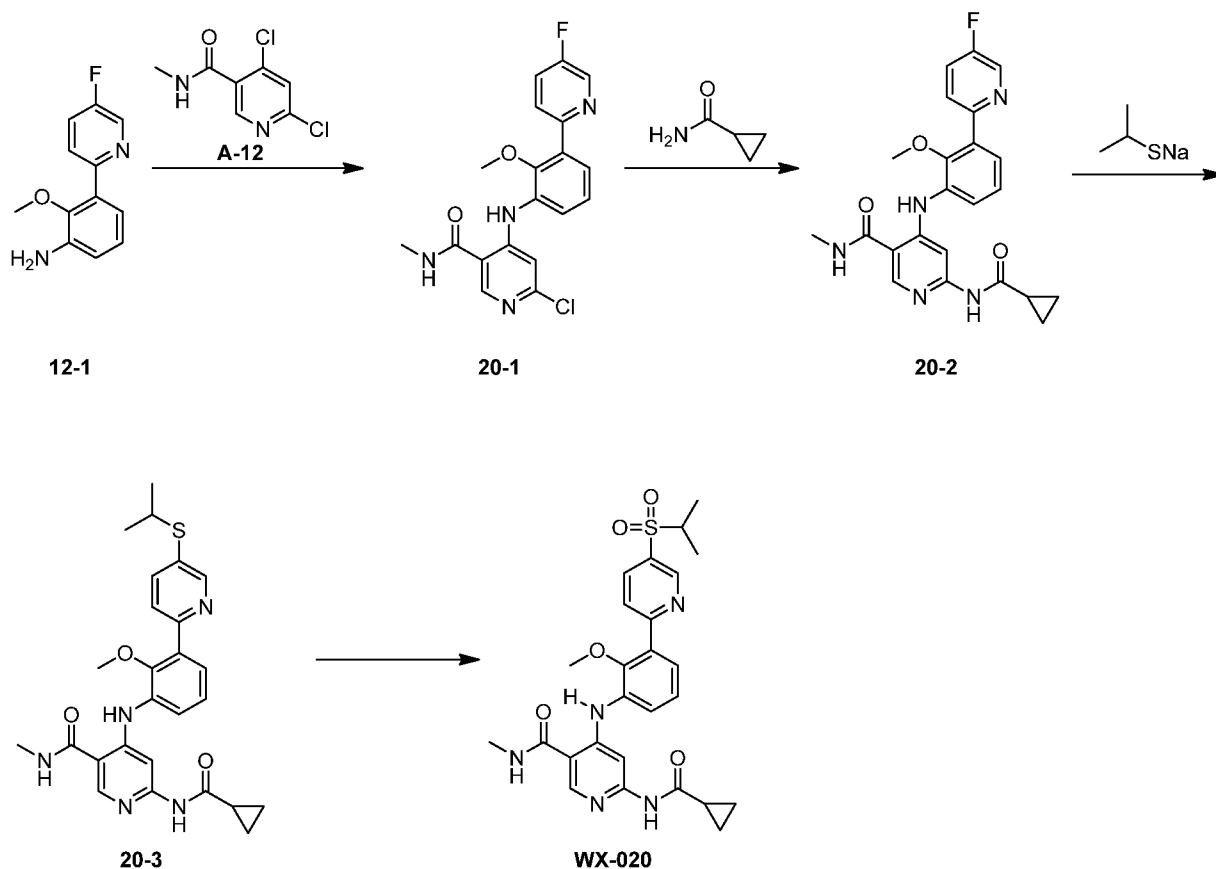
步骤 1: 化合物 19-1 的合成

将化合物 17-2 (200 mg, 458.26 μmol , 1 eq)溶于 DMF (7 mL) 中, 然后加入异丙基硫醇钠 (179.90 mg, 1.83 mmol, 4 eq), 在 40°C下反应 16 hr。冷却至室温后, 向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL)萃取, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品化合物 19-1。粗品未经纯化直接用于下一步反应。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 10.30 (s, 1H), 8.85 (s, 2H), 8.36 - 8.25 (m, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.63 (dd, $J=7.8, 15.6$ Hz, 2H), 6.24 (br s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.44 (quin, $J=6.7$ Hz, 1H), 3.01 (d, $J=4.4$ Hz, 3H), 1.58 - 1.50 (m, 1H), 1.38 (d, $J=6.5$ Hz, 6H), 1.13 - 1.05 (m, 2H), 0.92 - 0.82 (m, 2H); LCMS $m/z=493.1$ [M+H]⁺。

步骤 2: 化合物 WX-019 的合成

将化合物 19-1 (100 mg, 203.01 μmol , 1 eq) 溶于 DCM (2 mL) 中, 然后降温至 0°C加入 3-氯过氧苯甲酸 (52.55 mg, 304.51 μmol , 85% 纯度, 1.5 eq), 在 20°C下反应 16 hr。向体系中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna 80*40mm*3 μm ;流动相: 流动相:A(水, 含 0.04%盐酸) 和 B(乙腈); 梯度: B%: 5%-35%, 8min)。将所得到的溶液 40°C真空浓缩除去乙腈, 然后用饱和碳酸氢钠调碱性 (pH=8), 用二氯甲烷 (30 mL*3) 萃取。将合并后的有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩, 干燥后得到化合物 WX-019。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 10.39 (s, 1H), 9.26 (s, 2H), 8.31 - 8.24 (m, 1H), 8.17 - 8.11 (m, 1H), 7.80 - 7.70 (m, 2H), 7.39 - 7.31 (m, 1H), 6.14 - 6.07 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.37 - 3.25 (m, 1H), 3.04 (d, $J=4.8$ Hz, 2H), 1.59 - 1.52 (m, 1H), 1.43 (d, 6H), 1.32 - 1.27 (m, 2H), 1.12 - 1.07 (m, 2H)。LCMS $m/z=525.1$ [M+H]⁺。

实施例 20



步骤 1: 化合物 **20-1** 的合成

在氮气保护下, 将化合物 **12-1** (1 g, 4.58 mmol, 1.35 *eq*)和化合物 **A-12** (695.62 mg, 3.39 mmol, 1 *eq*)溶于 THF (5 mL)中, 室温 25°C搅拌, 缓慢滴加 LiHMDS (1 M, 8.48 mL, 2.5 *eq*), 室温 25 °C 继续搅拌 1 hr。向反应液中加入饱和氯化铵水溶液 (20 mL) 和水 (50 mL) 后, 用乙酸乙酯 (50 mL*2) 萃取。合并后有机相用饱和食盐水 (50 mL*2) 洗涤。有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=0~50%) 分离纯化, 得到化合物 **20-1**。LCMS m/z =387.0[M+1]⁺。

步骤 2: 化合物 **20-2** 的合成

将化合物 **20-1** (1.27 g, 3.28 mmol, 1 *eq*)和环丙基甲酰胺(2.79 g, 32.83 mmol, 10 *eq*) 加入到 1,4-二氧六环 (2 mL) 和 NMP (0.5 mL) 的混合溶剂中, 然后加入碳酸铯(3.21 g, 9.85 mmol, 3 *eq*)和 Xantphos (284.97 mg, 492.49 μmol , 0.15 *eq*)氮气置换三次后加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (450.99 mg, 492.49 μmol , 0.15 *eq*), 在 130 °C 反应 18 hr。冷却至室温后, 加入水(30 mL)和乙酸乙酯(30 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(30 mL)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=0~50%) 分离纯化, 得到化合物 **20-2**。LCMS m/z =436.1[M+1]⁺。

步骤 3: 化合物 **20-3** 的合成

将化合物 **20-2** (500 mg, 1.15 mmol, 1 *eq*)溶于 DMF (5 mL)中, 然后加入异丙基硫醇钠 (450.76 mg, 4.59 mmol, 4 *eq*), 在 40 °C下反应 2 hr。向反应液中加入水(10 mL), 用乙酸乙酯 (10 mL*2) 萃取。合并有机

相，有机相用无水硫酸钠干燥后过滤，滤液真空浓缩。粗品经硅胶柱层析（乙酸乙酯/石油醚=0~50%）分离纯化，得到化合物 **20-3**。LCMS $m/z=492.1[M+1]^+$ 。

步骤 4：化合物 **WX-020** 盐酸盐的合成

将化合物 **20-3** (100.20 mg, 203.83 μmol , 1 *eq*)溶于 DCM (10 mL)中，然后降温至 0°C加入 3-氯过氧苯甲酸(82.76 mg, 407.65 μmol , 85% 纯度, 2 *eq*)，在 25 °C下反应 2 hr。反应完成后，加入水(30 mL)和乙酸乙酯(30 mL)萃取分液，水相再用乙酸乙酯(30 mL)萃取，合并有机相，有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤，有机相用无水硫酸钠干燥，真空浓缩得粗品。粗品制备高效液相色谱分离（色谱柱：Phenomenex C18 150*40mm*5 μm ；流动相：A (水，含 0.04%盐酸) 和 B (乙腈)；梯度：B%: 15%-45%，10min) 得到化合物 **WX-020** 盐酸盐。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.85 (br s, 1H), 11.03 (s, 1H), 9.12 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 9.06 (br s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.36 (dd, $J=2.3, 8.4$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.73 (br d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.62 (br d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.41 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.31 (br s, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.46 - 3.30 (m, 1H), 2.82 (d, $J=4.4$ Hz, 3H), 1.99 - 1.89 (m, 1H), 1.24 (d, $J=6.8$ Hz, 6H), 0.99 - 0.85 (m, 4H); LCMS $m/z=524.1[M+1]^+$ 。

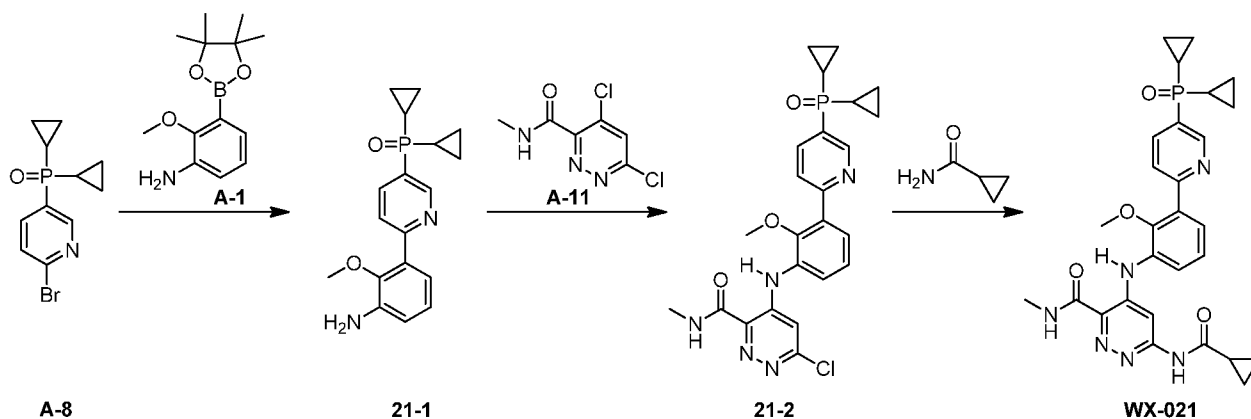
步骤 5：化合物 **WX-020** 的合成

将化合物 **20-3** (1.8 g, 3.66 mmol, 1 *eq*)溶于乙醇 (18 mL) 中，0°C下加入单过硫酸氢钾(3.38 g, 5.49 mmol, 1.5 *eq*)的水(18 mL)溶液，然后逐渐恢复至 25°C搅拌反应 16 hr。反应结束后，往反应液中加入饱和碳酸氢钠 (15 mL) 和亚硫酸钠溶液 (15 mL) 进行淬灭，加入乙酸乙酯 (30 mL*2) 萃取，合并后的有机相用饱和氯化钠溶液洗涤，过滤，滤液无水硫酸钠干燥。粗品经硅胶柱层析分离纯化(二氯甲烷: 甲醇=100:0~100:2) 得到粗品。粗品用甲醇 (5 mL) 在 60°C搅拌 1hr，过滤，滤饼用丙酮 (5 mL) 在 60°C继续搅拌 1hr，过滤，滤饼真空干燥得到化合物 **WX-020**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.79 (brs, 1H), 10.73 (brs, 1H), 9.09 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 8.64 (br d, $J=4.5$ Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.33 (dd, $J=2.4, 8.4$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.60 - 7.51 (m, 2H), 7.38 - 7.21 (m, 1H), 3.69 - 3.57 (m, 1H), 3.51 (s, 3H), 2.80 (d, $J=4.4$ Hz, 3H), 2.03 - 1.93 (m, 1H), 1.23 (d, $J=6.8$ Hz, 6H), 0.83 - 0.74 (m, 4H); LCMS $m/z=524.0[M+1]^+$ 。

步骤 6：化合物 **WX-020** 硫酸盐的合成

将化合物 **WX-020** (0.4 g, 763.94 μmol , 1 *eq*)加入到丙酮 (4 mL) 中，搅拌，然后加入稀硫酸水溶液(0.25M, 7.64 mL, 2.5*eq*)，将反应液加热至 55°C，继续搅拌 30 分钟，然后自然冷却至室温。将反应液过滤，滤饼用少量乙酸乙酯 (10 mL) 洗涤，真空干燥得到 **WX-020** 硫酸盐。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.33 (brs, 1H), 10.93 (brs, 1H), 9.11 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 8.87 (brs, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.36 (dd, $J=2.4, 8.4$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.70 (br d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J=1.2, 8.0$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 3.61 (quin, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.54 (s, 3H), 2.82 (d, $J=4.4$ Hz, 3H), 1.93 - 1.87 (m, 1H), 1.24 (d, $J=6.8$ Hz, 6H), 0.92 - 0.86 (m, 4H); LCMS $m/z=523.9[M+1]^+$ 。

实施例 21



步骤 1: 化合物 21-1 的合成

将化合物 A-8 (300 mg, 1.05 mmol, 1 eq), A-1(261.21 mg, 1.05 mmol, 1 eq)溶于 1,4-二氧六环(16 mL)和水(1mL)的混合溶剂中, 加入碳酸钾(434.76 mg, 3.15 mmol, 3 eq), 氮气置换, 最后加入 Pd(dppf)Cl₂ (76.72 mg, 104.86 μmol, 0.1 eq), 氮气气氛下, 90°C搅拌 6 小时。冷却至室温后, 向反应液中加入水 (25 mL), 用二氯甲烷 (35mL*2) 萃取。合并后的有机相无水硫酸钠干燥后真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (甲醇: 二氯甲烷=0~30%) 得到化合物 21-1。LCMS m/z =329.1[M+1]⁺。

步骤 2: 化合物 21-2 的合成

将化合物 21-1(90 mg, 274.10 μmol, 1 eq), 化合物 A-11(56.47 mg, 274.10 μmol, 1 eq)溶于 THF (10 mL) 溶剂中, 氮气保护, 0°C下缓慢加入 LiHMDS (1 M, 1.10 mL, 4 eq), 然后升至室温 25°C搅拌 2 hr。反应结束后, 向反应液中加入甲醇 (8 mL), 然后减压浓缩, 然后加入水 (20 mL), 用二氯甲烷 (30 mL*2) 萃取。合并后的有机相用无水硫酸钠干燥后真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (甲醇: 二氯甲烷=0~40%) 得到化合物 21-2。LCMS m/z =498.1[M+1]⁺。

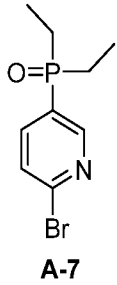
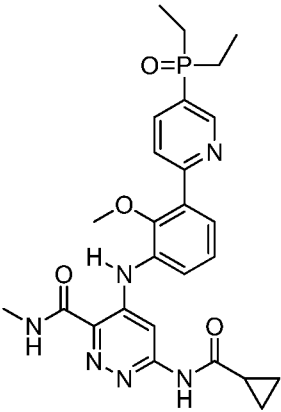
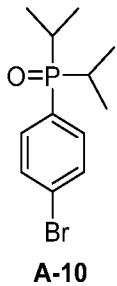
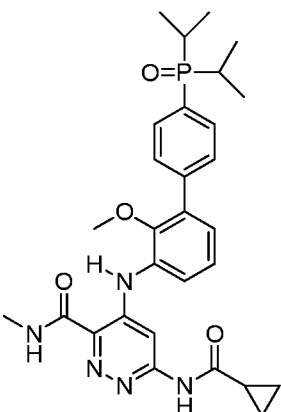
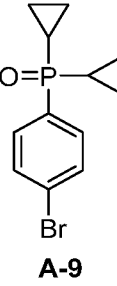
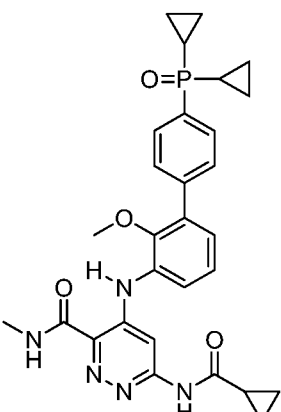
步骤 4: 化合物 WX-021 的合成

将化合物 21-2(50 mg, 100.42 μmol, 1 eq), 环丙基甲酰胺 (213.65 mg, 2.51 mmol, 25 eq), Xantphos (8.72 mg, 15.06 μmol, 0.15 eq)溶于 1,4-二氧六环(6 mL)和 NMP (1 mL)混合溶剂中, 加入碳酸铯 (98.16 mg, 301.26 μmol, 3 eq)。氮气置换, 最后加入 Pd₂(dba)₃ (13.79 mg, 15.06 μmol, 0.15 eq), 氮气氛围下 130°C搅拌 12 小时。冷却至室温后, 向反应液中加入水 (10 mL), 用二氯甲烷 (20 mL*2) 萃取。合并后的有机相用无水硫酸钠干燥, 真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=100:0~30:1) 得到化合物 WX-021。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 11.15 (s, 1H), 9.13 (dd, J = 1.4, 5.4 Hz, 1H), 8.89 (br s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.23 - 8.16 (m, 2H), 8.10 (br d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.66 (dd, J = 1.4, 8.0 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.37 - 7.32 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.08 (d, J = 5.0 Hz, 3H), 1.74 - 1.65 (m, 1H), 1.20 - 0.95 (m, 14H); LCMS m/z =547.1[M+1]⁺。

按照实施例 21 的合成步骤, 将步骤 1 中 A-8 分别替换为下表 8 中的片段, 合成实施例 22, 实施例 23 和实

实施例 24。

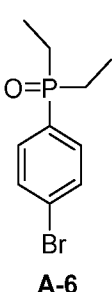
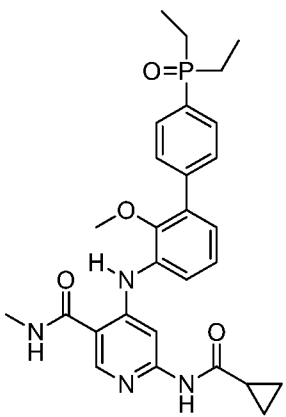
表 8

实 施 例	化 合 物	片 段	结 构 式	谱 图
22	WX-022	 <p>A-7</p>	 <p>WX-022</p>	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ: 11.06 (s, 1H), 8.84 (dd, <i>J</i> = 1.1, 4.4 Hz, 1H), 8.73 - 8.63 (m, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.11 - 8.02 (m, 3H), 7.60 - 7.57 (m, 1H), 7.48 - 7.45 (m, 1H), 7.25 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 3.48 (s, 3H), 2.99 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 3H), 2.07 - 1.86 (m, 4H), 1.63 - 1.59 (m, 1H), 1.18 - 1.09 (m, 6H), 1.07 - 1.03 (m, 2H), 0.89 - 0.84 (m, 2H); LCMS <i>m/z</i> = 523.2 [M+ H] ⁺ 。
23	WX-023	 <p>A-10</p>	 <p>WX-023</p>	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) δ: 11.14 (br s, 1H), 9.23 (br s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.21 - 8.11 (m, 1H), 7.79 - 7.73 (m, 4H), 7.54 - 7.48 (m, 1H), 7.31 - 7.23 (m, 1H), 7.22 - 7.18 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.07 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 3H), 2.44 - 2.31 (m, 2H), 1.81 - 1.64 (m, 1H), 1.30 - 1.24 (m, 6H), 1.18 - 1.08 (m, 8H), 0.98 - 0.92 (m, 2H); LCMS <i>m/z</i> = 550.1 [M+ H] ⁺ 。
24	WX-024	 <p>A-9</p>	 <p>WX-024</p>	¹ H NMR (400MHz, CDCl ₃) δ: 11.14 (s, 1H), 9.02 (br s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.16 (br d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 1H), 7.93 - 7.87 (m, 2H), 7.74 (dd, <i>J</i> = 2.5, 8.3 Hz, 2H), 7.51 (dd, <i>J</i> = 1.4, 7.9 Hz, 1H), 7.31- 7.25 (m, 1H), 7.19 (dd, <i>J</i> = 1.5, 7.8 Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.07 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 3H), 1.75 - 1.65 (m, 1H), 1.17 - 0.87 (m, 14H); LCMS <i>m/z</i> = 546.2 [M+ H] ⁺ 。

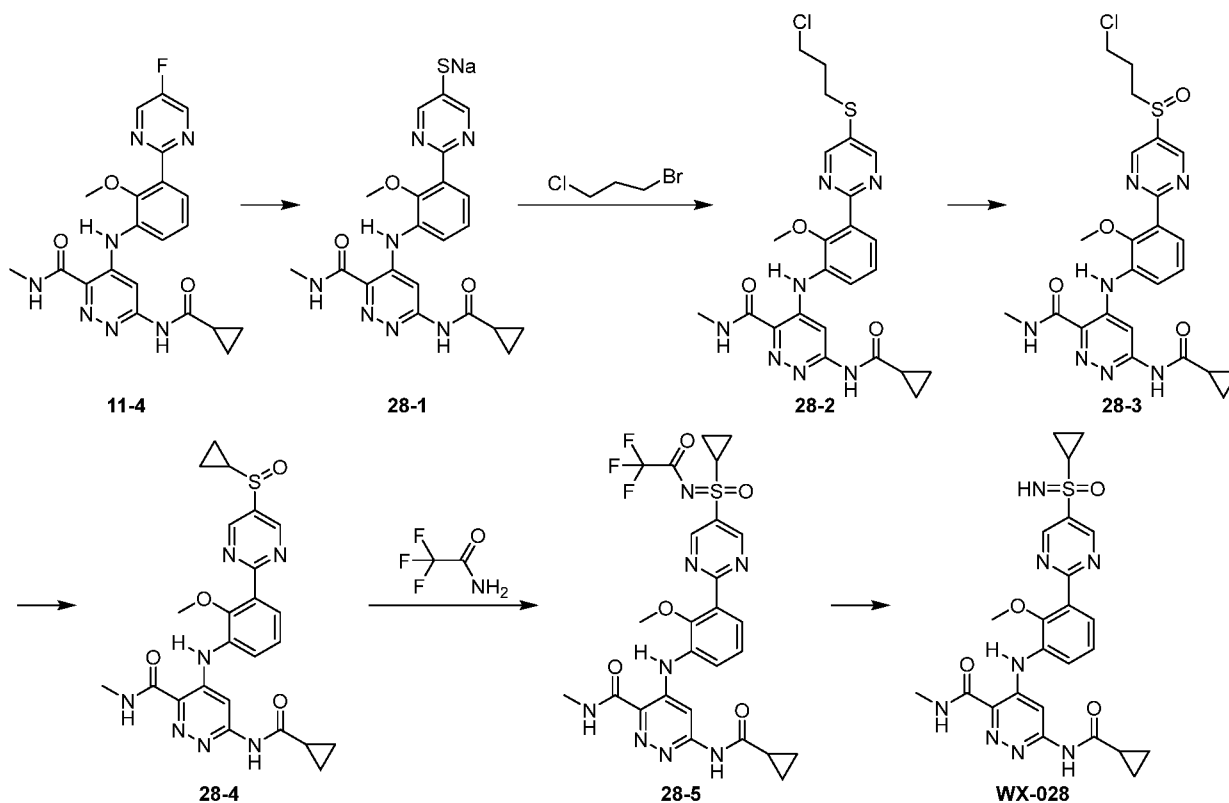
按照实施例 21 的合成步骤, 分别将步骤 1 中 A-8 替换为 A-6, 步骤 2 中 A-11 替换为 A-12, 合成表 9 中实

实施例 25。

表 9

25	WX-025	 <p style="text-align: center;">A-6</p>	 <p style="text-align: center;">WX-025</p>	$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 10.47 (s, 1H), 8.30 - 8.17 (m, 3H), 7.76 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 7.59 - 7.53 (m, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.34 - 6.21 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.04 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 1.96 (br d, $J = 9.8$ Hz, 4H), 1.59 - 1.55 (m, 1H), 1.23 - 1.14 (m, 6H), 1.13 - 1.06 (m, 2H), 0.95 - 0.86 (m, 2H); LCMS $m/z = 521.1$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.
----	--------	---	--	--

实施例 28



步骤 1: 化合物 28-1 的合成

将化合物 11-4 (100 mg, 228.61 μmol , 1 eq) 加入到 DMSO (1 mL) 中, 然后加入硫化钠 (35.68 mg, 457.22 μmol , 19.18 μL , 2 eq), 在 70°C 下反应 2 hr, 冷却至室温后得到化合物 28-1 的粗品溶液。此粗品溶液未经纯化, 直接用于下一步反应。LCMS $m/z = 452.1$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

步骤 2: 化合物 28-2 的合成

将上一步得到的化合物 28-1 的粗品 DMSO 溶液 (理论含量为 108 mg, 228.10 μmol , 1 eq) 溶于 DMF (1

mL) 中, 加入碳酸钾 (45.67 mg, 330.44 μmol , 1.45 *eq*), 1-溴-4-氯-丙烷 (52.31 mg, 305.08 μmol , 35.11 μL , 1.34 *eq*), 在 25°C 下搅拌 10 min。向反应液中加入水 (3 mL), 用乙酸乙酯 (6 mL) 萃取两次, 有机相用饱和食盐水 (5 mL) 清洗一次后用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 **28-2**。LCMS $m/z=528.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 3: 化合物 **28-3** 的合成

将化合物 **28-2** (0.86 g, 1.63 mmol, 1 *eq*) 溶于二氯甲烷 (20 mL) 中, 在 0°C 加入间氯过氧苯甲酸 (330.66 mg, 1.63 mmol, 85% 纯度, 1 *eq*), 在 25°C 下反应 0.5 hr。向反应液中加入 10% 硫代硫酸钠水溶液 (20 mL) 清洗一次, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得到化合物 **28-3**。LCMS $m/z=544.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 4: 化合物 **28-4** 的合成

将化合物 **28-3** (0.27 g, 496.30 μmol , 1 *eq*) 溶于 DMF (9 mL) 中, 在 25°C 加入叔丁醇钾 (111.38 mg, 992.60 μmol , 2 *eq*), 搅拌 1 hr。向反应液中加入饱和氯化铵水溶液 (9 mL), 加入二氯甲烷 (15 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析纯化 (甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得到化合物 **28-4**。LCMS $m/z=508.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

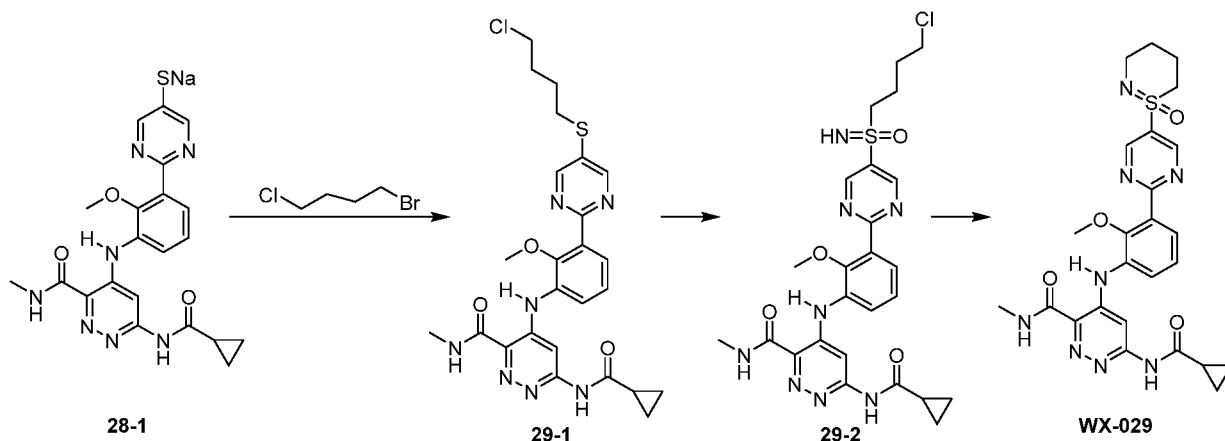
步骤 5: 化合物 **28-5** 的合成

将化合物 **28-4** (0.15 g, 295.53 μmol , 1 *eq*), 三氟乙酰胺 (33.41 mg, 295.53 μmol , 1 *eq*) 溶于二氯甲烷 (7.5 mL) 中, 加入二乙酰氧基碘苯 (142.78 mg, 443.29 μmol , 1.5 *eq*), 氧化镁 (47.64 mg, 1.18 mmol, 13.31 μL , 4 *eq*), 醋酸铯 (26.12 mg, 59.11 μmol , 0.2 *eq*), 在 40°C 下搅拌 1 hr。向反应液中加入水 (5 mL), 静置分液, 有机相用 10% 硫代硫酸钠水溶液 (10 mL) 洗涤后用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经制备硅胶薄层层析板分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10: 1), 得到化合物 **28-5**。LCMS $m/z=619.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 6: 化合物 **WX-028** 的合成

将化合物 **28-5** (10 mg, 16.17 μmol , 1 *eq*) 溶于甲醇 (1 mL) 中, 加入碳酸钾 (2.23 mg, 16.17 μmol , 1 *eq*), 在 25°C 下搅拌 10 min。向反应液中加入水 (1 mL), 用二氯甲烷 (2 mL) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经制备硅胶薄层层析板分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=10: 1) 得到化合物 **WX-028**。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.19 (s, 1H), 9.34 (s, 2H), 8.54 - 8.24 (m, 2H), 7.84 - 7.82 (m, 1H), 7.72 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.41 - 7.37 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.06 (d, $J=4.8$ Hz, 3H), 2.71 - 2.65 (m, 1H), 2.41 - 2.24 (m, 1H), 1.14 - 1.06 (m, 8H); LCMS $m/z=523.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 29



步骤 1: 化合物 **29-1** 的合成

将化合物 **28-1** 的粗品 DMSO 溶液 (理论含量为 108 mg, 228.10 μmol , 1 *eq*) 溶于 DMF (1 mL) 中, 加入碳酸钾 (45.67 mg, 330.44 μmol , 1.45 *eq*), 1-溴-4-氯-丁烷(52.31 mg, 305.08 μmol , 35.11 μL , 1.34 *eq*), 在 25°C 下搅拌 10 min。向反应液中加入水 (3 mL), 用乙酸乙酯 (6 mL*2) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (5 mL) 清洗后用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到化合物 **29-1**。LCMS $m/z=542.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

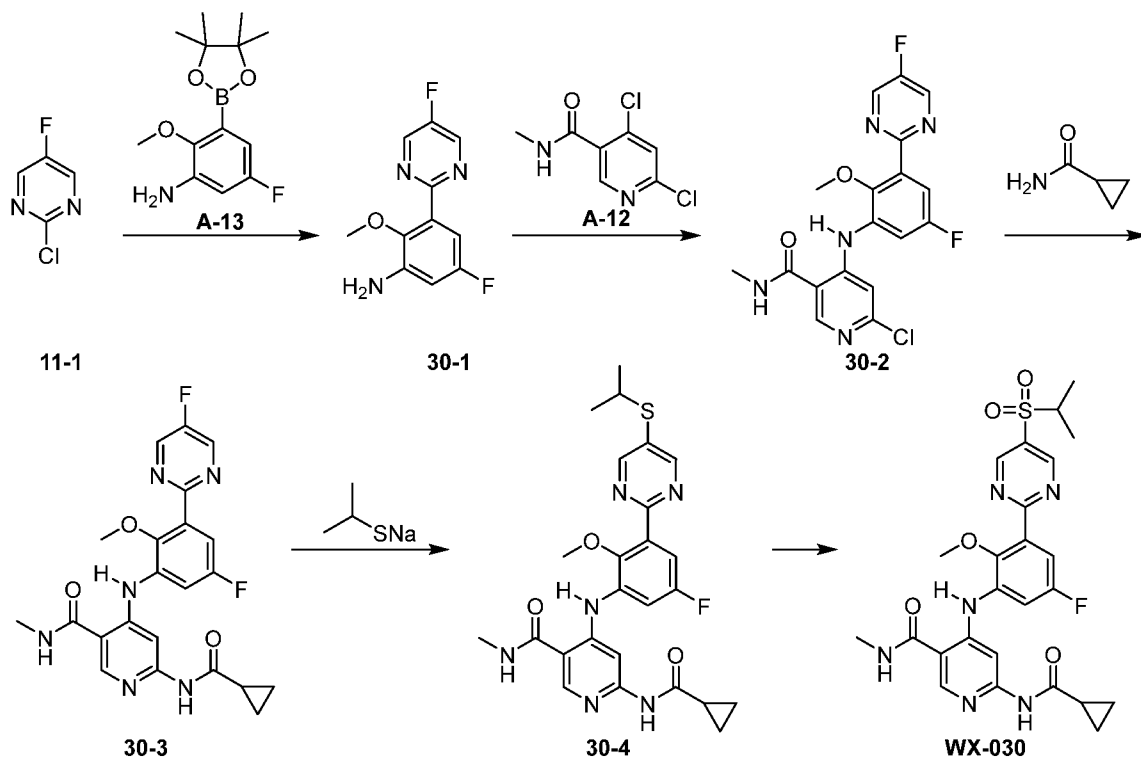
步骤 2: 化合物 **29-2** 的合成

将化合物 **29-1** (120 mg, 221.38 μmol , 1 *eq*) 溶于甲醇 (5 mL) 中, 加入二乙酰氧基碘苯 (213.92 mg, 664.14 μmol , 3 *eq*), 乙酸铵(51.19 mg, 664.14 μmol , 3 *eq*), 在 25°C 下搅拌 10 min。向反应液中加入二氯甲烷 (10 mL) 和水 (5 mL) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得到化合物 **29-2**。LCMS $m/z=573.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

步骤 5: 化合物 **WX-29** 盐酸盐的合成

将化合物 **29-2** (35 mg, 61.08 μmol , 1 *eq*) 溶于 DMF(1 mL) 中, 在 0°C 加入钠氢 (9.77 mg, 244.30 μmol , 60% 纯度, 4 *eq*), 在 25°C 下搅拌 0.5 hr。向反应液中加入饱和氯化铵水溶液 (2 mL) 后加入水 (1 mL), 用二氯甲烷 (3 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经制备高效液相色谱分离(色谱柱: Phenomenex Luna 80*30mm*3 μm ; 流动相: A(水, 含 0.04% 盐酸) 和 B(乙腈); 梯度: B%: 10%-40%, 8 min), 得到化合物 **WX-29** 盐酸盐。¹HNMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 9.64 (s, 2H), 8.12 - 8.09 (m, 1H), 7.83 - 7.81 (m, 1H), 7.51 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 4.31 - 4.21 (m, 1H), 4.12 - 4.08 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.85 - 3.73 (m, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.66 - 2.55 (m, 2H), 2.26 - 2.15 (m, 1H), 2.09 - 2.02 (m, 1H), 1.92 - 1.84 (m, 1H), 1.16 - 1.05 (m, 4H); LCMS $m/z=537.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 30



步骤 1: 化合物 30-1 的合成

将化合物 11-1 (1.24 g, 9.36 mmol, 1.16 mL, 1 eq), A-13 (2.5 g, 9.36 mmol, 1 eq), 碳酸钾 (2.59 g, 18.72 mmol, 2 eq) 溶于 1,4-二氧六环 (80 mL) 和水 (15 mL) 的混合溶剂中, 氮气置换三次后加入 Pd(dppf)Cl₂ (684.86 mg, 936.00 μmol, 0.1 eq), 氮气气氛下, 加热至 80°C 搅拌 4 hr。冷却至室温后, 向反应液中加入饱和氯化铵水溶液 (100 mL) 和水 (100 mL), 然后用乙酸乙酯 (100 mL*2) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (100 mL*2) 洗涤, 然后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=10~30%) 分离纯化得到化合物 30-1。LCMS $m/z = 238.0[M+1]^+$ 。

步骤 2: 化合物 30-2 的合成

在氮气保护下, 将化合物 30-1 (1.8 g, 3.79 mmol, 50% 纯度, 1 eq) 和 A-12 (777.96 mg, 3.79 mmol, 1 eq) 加入到 THF (10 mL) 中, 搅拌溶解, 降温至 0°C, 滴加加入 LiHMDS (1 M, 9.49 mL, 2.5 eq), 然后恢复至 25°C 继续搅拌 2 hr。反应结束后, 往反应液中加入水 (100 mL), 用乙酸乙酯 (50 mL*2) 萃取, 合并后的有机相用饱和食盐水 (50 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷=3%) 分离纯化得到化合物 30-2。LCMS $m/z = 406.0[M+1]^+$ 。

步骤 3: 化合物 30-3 的合成

将化合物 30-2 (1.18 g, 2.91 mmol, 1 eq) 和环丙基甲酰胺 (6.19 g, 72.70 mmol, 25 eq) 加入到 1,4-二氧六环 (80 mL) 和 NMP (2 mL) 中, 然后加入碳酸铯 (2.84 g, 8.72 mmol, 3 eq), Xantphos (252.39 mg, 436.19 μmol, 0.15 eq) 氮气置换三次后加入 Pd₂(dba)₃ (399.43 mg, 436.19 μmol, 0.15 eq), 在 130°C 回流反应 18 hr。反应完

成后,加入水 (100 mL),用乙酸乙酯(50 mL*2) 萃取,合并后的有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤(50 mL*2),有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析纯化(甲醇/二氯甲烷=3%)得到化合物 **30-3**。LCMS $m/z = 455.1[M+1]^+$ 。

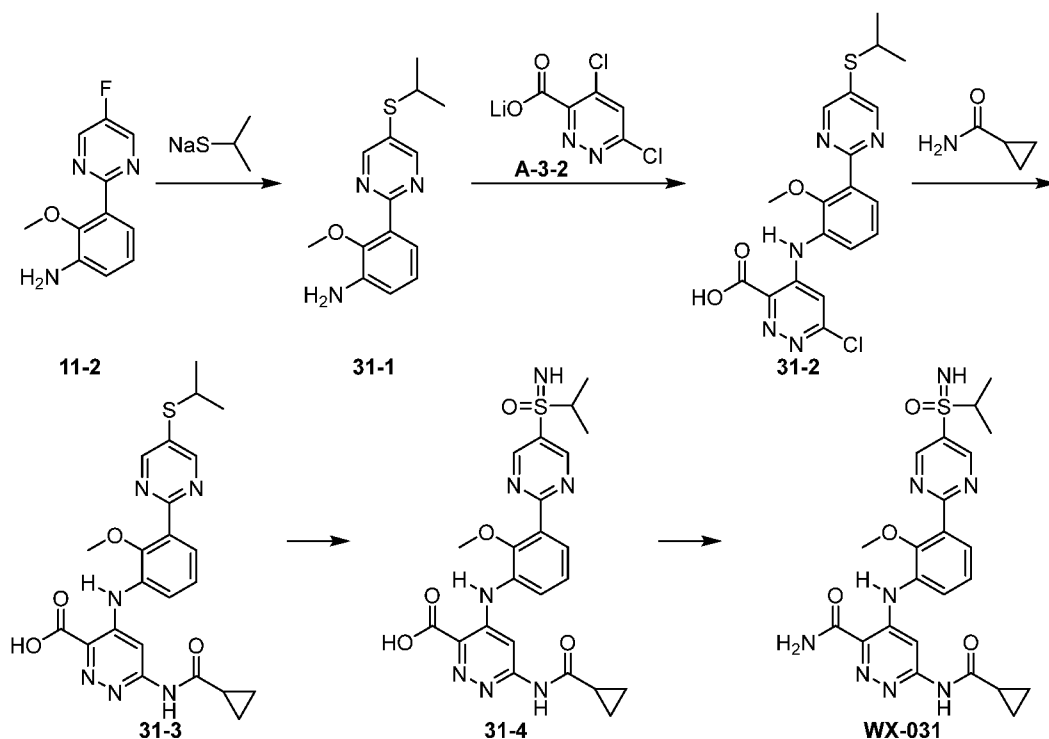
步骤 4: 化合物 **30-4** 的合成

将 **30-3** (200 mg, 440.11 μmol , 1 eq) 溶于 DMF (10 mL), 加入异丙基硫醇钠 (86.39 mg, 880.23 μmol , 2 eq), 在 40 °C 反应 16 hr。反应结束后加入水(10 mL)和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取一次。合并后的有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 真空浓缩得粗品化合物 **30-4**。粗品未经纯化直接用于下一步反应。LCMS $m/z = 511.2[M+1]^+$ 。

步骤 5: 化合物 **WX-030** 的合成

将化合物 **30-4** (200 mg, 391.71 μmol , 1 eq) 加入到乙醇(10 mL)和水(5 mL)的混合溶液中, 然后加入单过硫酸氢钾 (361.21 mg, 587.56 μmol , 1.5 eq), 25°C 反应 2 hr。反应结束后, 往反应液中加入饱和亚硫酸氢钠水溶液 (10 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL*2) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (10 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经制备高效液相色谱分离(色谱柱: Welch Xtimate C18 100*40mm*3 μm ; 流动相: A(水, 含 0.075%三氟乙酸) 和 B(乙腈); 梯度: B%: 13%-43%, 8 min), 将所得到的制备分离的溶液 40°C 真空浓缩除去乙腈, 然后用饱和碳酸氢钠调碱性 (pH=8), 用二氯甲烷萃取 (30 mL*3), 将合并后的有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩后得到化合物 **WX-030**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 10.47 (s, 1H), 9.17 (s, 2H), 8.53 (br s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.31 - 6.23 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.28 - 3.18 (m, 1H), 2.94 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 1.51 - 1.44 (m, 1H), 1.34 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.12 - 0.96 (m, 2H), 0.87 - 0.80 (m, 2H); LCMS $m/z = 543.2[M+1]^+$ 。

实施例 31



步骤 1: 化合物 31-1 的合成

将化合物 11-2 (2 g, 9.12 mmol, 1 eq) 和异丙硫醇钠(906.59 mg, 9.24 mmol, 1.5 eq)溶于 DMF (20 mL)中, 在 40°C下反应 1 hr, 向反应液中加入乙酸乙酯(20mL)和水(20mL), 水相再用乙酸乙酯(20mL) 萃取一次, 有机相用饱和氯化钠水溶液(20mL)洗涤三次, 有机相用无水硫酸钠干燥后减压浓缩,得到化合物 31-1。LCMS $m/z=276.1$ $[M+H]^+$ 。

步骤 2: 化合物 31-2 的合成

将化合物 31-1 (0.8 g, 2.91 mmol, 1 eq) 和化合物 A-3-2 (577.90 mg, 2.91 mmol, 1 eq)溶于 THF (16 mL) 中, 在 -60°C下加入的 LiHMDS (1 mol/L, 8.72 mL, 3 eq), 升温到 25°C反应 3 hr。加入甲醇 (5 mL) 淬灭反应, 向反应液中加入 2 mol/L 的盐酸溶液调 pH=7~8, 向反应液中加入乙酸乙酯(20mL)和水(20mL), 水相再用乙酸乙酯(20mL) 萃取一次, 有机相用饱和氯化钠水溶液(20mL)洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩, 得到的粗品经硅胶柱层析(甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得到化合物 31-2。LCMS $m/z=432.1$ $[M+H]^+$ 。

步骤 3: 化合物 31-3 的合成

将化合物 31-2 (0.46 g, 1.07 mmol, 1 eq)和环丙基甲酰胺(906.42 mg, 10.65 mmol, 10 eq)溶于 1,4-二氧六环 (16 mL) 中, 然后加入碳酸铯(867.55 mg, 2.66 mmol, 2.5 eq), 在氮气保护条件下加入 $Pd_2(dba)_3$ (30.53 mg, 33.34 μ mol, 0.1 eq)和 Xantphos (38.58 mg, 66.68 μ mol, 0.2 eq), 在 120 °C下反应 4 hr。将反应体系降温至 20~30 °C向反应液中加入 2 mol/L 的盐酸溶液至 pH=3, 向反应液中加入二氯甲烷(20mL)和水(20mL), 水相再用二氯甲烷(20mL) 萃取一次, 有机相用饱和氯化钠水溶液 (20 mL) 洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥后减压浓缩, 得到的粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷=0~10%), 得到化合物 31-3。LCMS $m/z=481.0$

[M+ H]⁺。

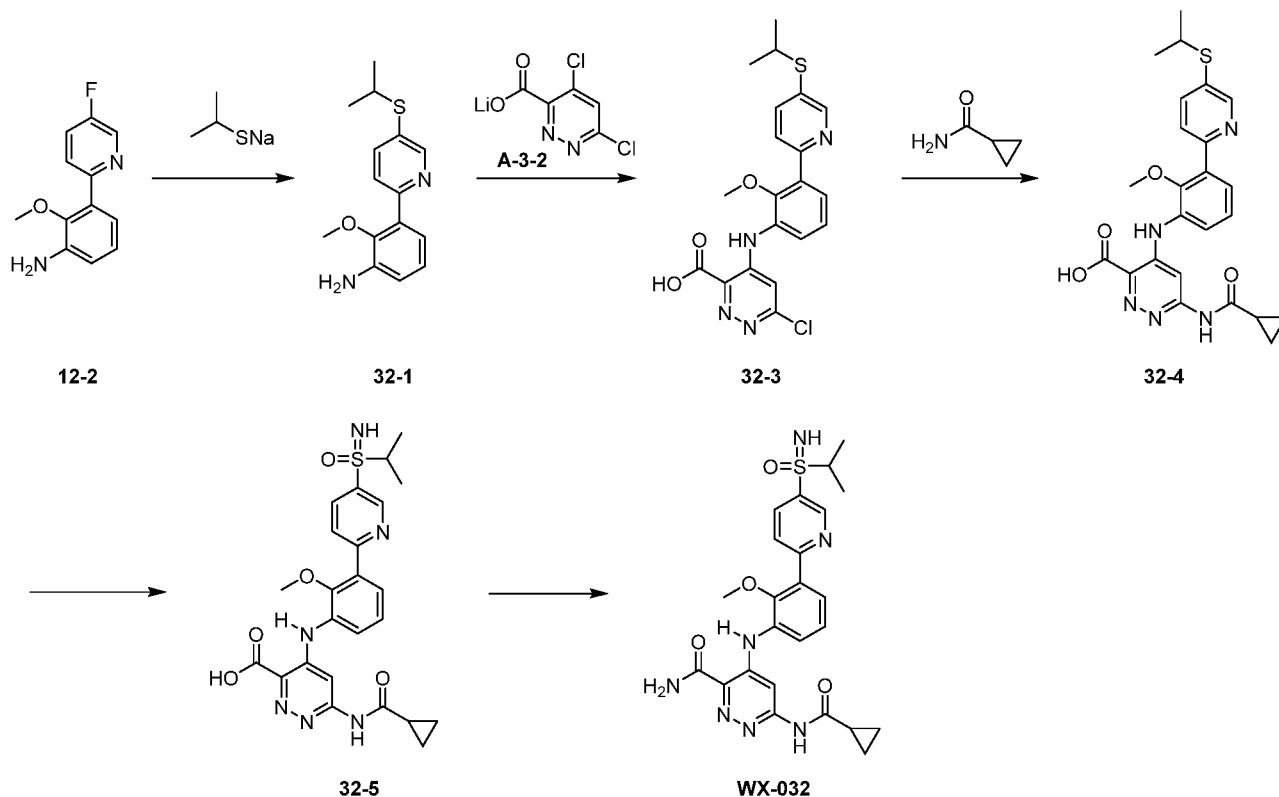
步骤 4: 化合物 **31-4** 的合成

将化合物 **30-3** (0.42 g, 524.41 μ mol, 60% 纯度, 1 *eq*) 溶于 MeOH (10 mL) 中, 然后加入乙酸铵 (160.41 mg, 2.08 mmol, 4 *eq*) 和二(乙酰基氧)碘苯 (502.71 mg, 1.56 mmol, 3 *eq*), 在 25 °C 反应 4 hr。向反应液中加入乙酸乙酯 (10 mL) 和水 (10 mL), 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取一次, 有机相使用饱和氯化钠水溶液 (10 mL*3) 洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩。得到化合物 **31-4**。LCMS m/z = 512.2 [M+ H]⁺。粗品未经纯化直接用于下一步反应。

步骤 5: 化合物 **WX-031 盐酸盐** 的合成

将化合物 **31-4** (450 mg, 175.94 μ mol, 20% 纯度, 1 *eq*) 和氯化铵 (470.55 mg, 8.80 mmol, 50 *eq*) 溶于 DMF (10 mL) 中, 然后加入 HATU (200.69 mg, 527.81 μ mol, 3 *eq*), DIPEA (27.29 mg, 211.12 μ mol, 36.77 μ L, 1.2 *eq*), 在 25°C 条件下反应 3 hr。向反应液中加入乙酸乙酯 (10 mL) 和水 (10 mL), 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取一次, 有机相使用饱和氯化钠水溶液 (10 mL*3) 洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩。得到的粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷=0~10%), 再由制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Phenomenex Luna 80*30mm*3 μ m; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 10%-35%), 得到化合物 **WX-031 盐酸盐**。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 9.47 (s, 2H), 8.10 (dd, J = 0.8, 8.0 Hz, 1H), 7.78 (dd, J = 0.9, 7.9 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.12 - 4.04 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 1.86 - 1.80 (m, 1H), 1.52 (dd, J = 8.0, 18.8 Hz, 6H), 1.18 - 1.08 (m, 4H); LCMS m/z = 511.1 [M+ H]⁺。

实施例 32



步骤 1: 化合物 32-1 的合成

将化合物 12-2 (1.12 g, 5.13 mmol, 1 eq) 溶于 DMF (10 mL) 中, 然后加入异丙基硫醇钠 (2.01 g, 20.53 mmol, 4 eq), 在 40°C 下反应 2 hr。向反应液中加入水 (10 mL) 和乙酸乙酯 (10 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (10 mL) 萃取一次。合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (乙酸乙酯/石油醚=10%) 分离纯化得到化合物 32-1。LCMS $m/z = 275.1[M+1]^+$ 。

步骤 2: 化合物 32-2 的合成

在氮气保护下, 将化合物 32-1 (250 mg, 911.14 μmol , 1 eq) 和 A-3-2 (181.25 mg, 911.14 μmol , 1 eq) 加入到 THF (10 mL) 中, 25°C 搅拌, 然后缓慢滴加加入 LiHMDS (1 M, 2.28 mL, 2.5 eq), 25°C 继续搅拌 2 hr。向反应液中加入饱和氯化铵水溶液 (20 mL) 和水 (50 mL), 用乙酸乙酯 (50 mL*2) 萃取。合并后的有机相用饱和食盐水 (50 mL*2) 清洗后, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷=10%) 分离纯化得到化合物 32-2。LCMS $m/z = 431.0[M+1]^+$ 。

步骤 3: 化合物 32-3 的合成

将化合物 32-2 (240 mg, 556.96 μmol , 1 eq) 和环丙基甲酰胺 (1.19 g, 13.92 mmol, 25 eq) 加入到 1,4-二氧六环 (10 mL) 和 NMP (1 mL) 的混合溶剂中, 然后加入碳酸铯 (544.41 mg, 1.67 mmol, 3 eq) 和 Xantphos (48.34 mg, 83.54 μmol , 0.15 eq), 氮气置换三次后加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (76.50 mg, 83.54 μmol , 0.15 eq) 在 130°C 搅拌反应 18 hr。冷却至室温后, 加入水 (30 mL) 和乙酸乙酯 (30 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (30 mL) 萃取一次。合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品。粗品经硅胶

柱层析（甲醇/二氯甲烷=3%）分离纯化得到化合物 **32-3**。LCMS $m/z = 480.1[M+1]^+$ 。

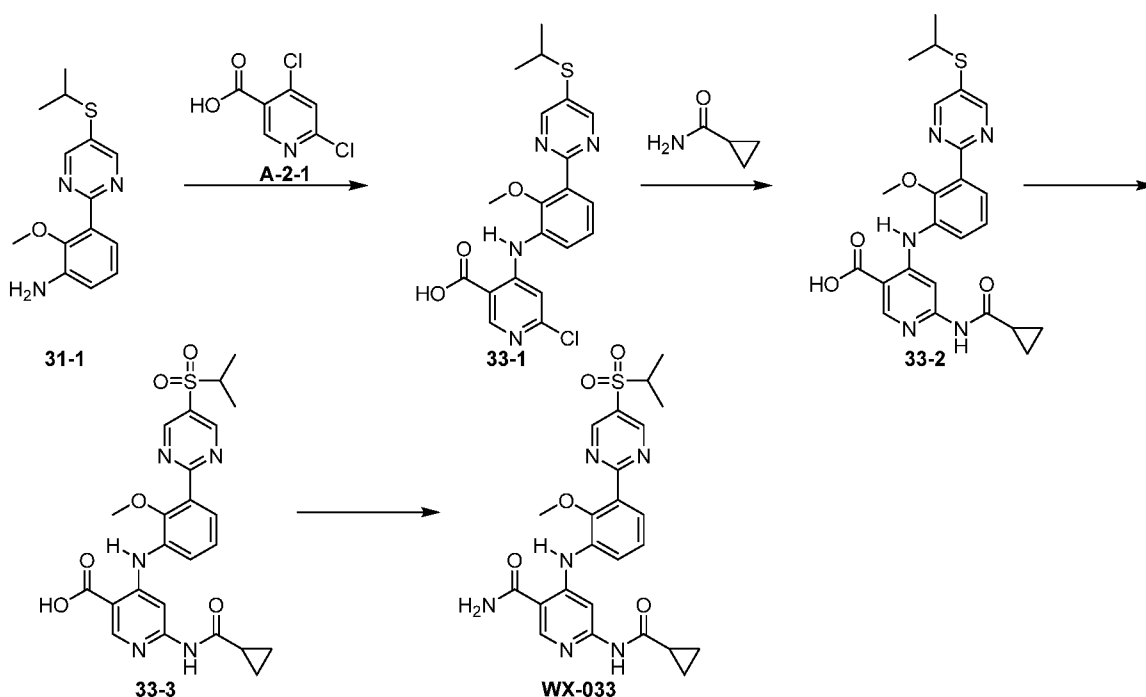
步骤 4: 化合物 **32-4** 的合成

将化合物 **32-3** (187 mg, 389.95 μmol , 1 eq) 加入到甲醇(1 mL)中, 然后加入二乙酰氧基碘苯(376.80 mg, 1.17 mmol, 3 eq)和醋酸铵(120.23 mg, 1.56 mmol, 4 eq), 在 25°C 下反应 2 hr。往反应液中加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取一次。将有机相合并, 用饱和氯化钠水溶液(10 mL)洗涤一次, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品 **32-4**。LCMS $m/z = 511.1[M+1]^+$ 。粗品未经纯化直接用于下一步反应。

步骤 5: 化合物 **WX-032 盐酸盐** 的合成

将化合物 **32-4** (199 mg, 389.76 μmol , 1 eq) 溶于 DMF (10 mL) 中, 然后依次加入氯化铵 (1.04 g, 19.49 mmol, 50 eq), HATU (222.30 mg, 584.65 μmol , 1.5 eq) 和 DIPEA (151.12 mg, 1.17 mmol, 203.67 μL , 3 eq), 在 25°C 下反应 1 hr。往反应体系中加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取一次。将有机相合并, 用饱和氯化钠水溶液 (10 mL) 洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Xtimate C18, 150*40mm*3 μm ; 流动相: A (水, 含 0.04% 盐酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 15%-45%, 10 min) 得到化合物 **WX-032 盐酸盐**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.49 (brs, 1H), 11.12 (brs, 1H), 9.27 - 9.08 (m, 1H), 8.67 - 8.52 (m, 1H), 8.48 - 8.36 (m, 1H), 8.28 - 8.17 (m, 1H), 8.12 - 8.08 (m, 1H), 7.98 - 7.92 (m, 1H), 7.73 - 7.59 (m, 2H), 7.44 - 7.36 (m, 1H), 3.97 - 3.84 (m, 1H), 3.54 - 3.52 (m, 3H), 2.16 - 2.00 (m, 1H), 1.41 - 1.25 (m, 6H), 0.93 - 0.78 (m, 4H); LCMS $m/z = 510.1[M+1]^+$ 。

实施例 33



步骤 1: 化合物 **33-1** 的合成

在氮气保护下, 将化合物 **A-2-1** (627.52 mg, 3.27 mmol, 1 eq) 和 **31-1** (900 mg, 3.27 mmol, 1 eq) 加入到四氢呋喃(10 mL)中, 搅拌溶解, 25°C下缓慢滴加加入 LiHMDS (1 M, 8.17 mL, 2.5 eq), 然后 25°C继续搅拌 1 hr。反应结束后, 加入水(30 mL)和乙酸乙酯(30 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(30 mL)萃取一次, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析(甲醇/二氯甲烷 = 0%-10%)分离纯化得到化合物 **33-1**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.39 (br s, 1H), 8.94 (s, 2H), 8.65 (s, 1H), 7.563 - 7.55 (m, 2H), 7.31 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 3.77 - 3.69 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 1.31 (d, *J*=6.8 Hz, 6H); LCMS *m/z* =431.1 [M+1]⁺。

步骤 2: 化合物 **33-2** 的合成

将化合物 **33-1** (500 mg, 1.16 mmol, 1 eq), 环丙基甲酰胺(2.47 g, 29.01 mmol, 25 eq), Xantphos (201.42 mg, 348.10 μmol, 0.3 eq)依次加入到 NMP (1 mL)和 1,4-二氧六环(10 mL)的混合溶剂中, 氮气置换三次, 然后将碳酸铯(1.51 g, 4.64 mmol, 4 eq)和 Pd₂(dba)₃.CHCl₃(180.16 mg, 174.05 μmol, 0.15 eq)加入, 氮气置换三次, 然后将反应液加热至回流(外温 130°C)反应 16 小时。冷却至室温后, 往反应液中加入水(20 mL)和乙酸乙酯(20 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取一次, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析(甲醇/二氯甲烷 = 0%-10%)分离纯, 得到化合物 **33-2**。LCMS *m/z* =480.1 [M+1]⁺。

步骤 3: 化合物 **33-3** 的合成

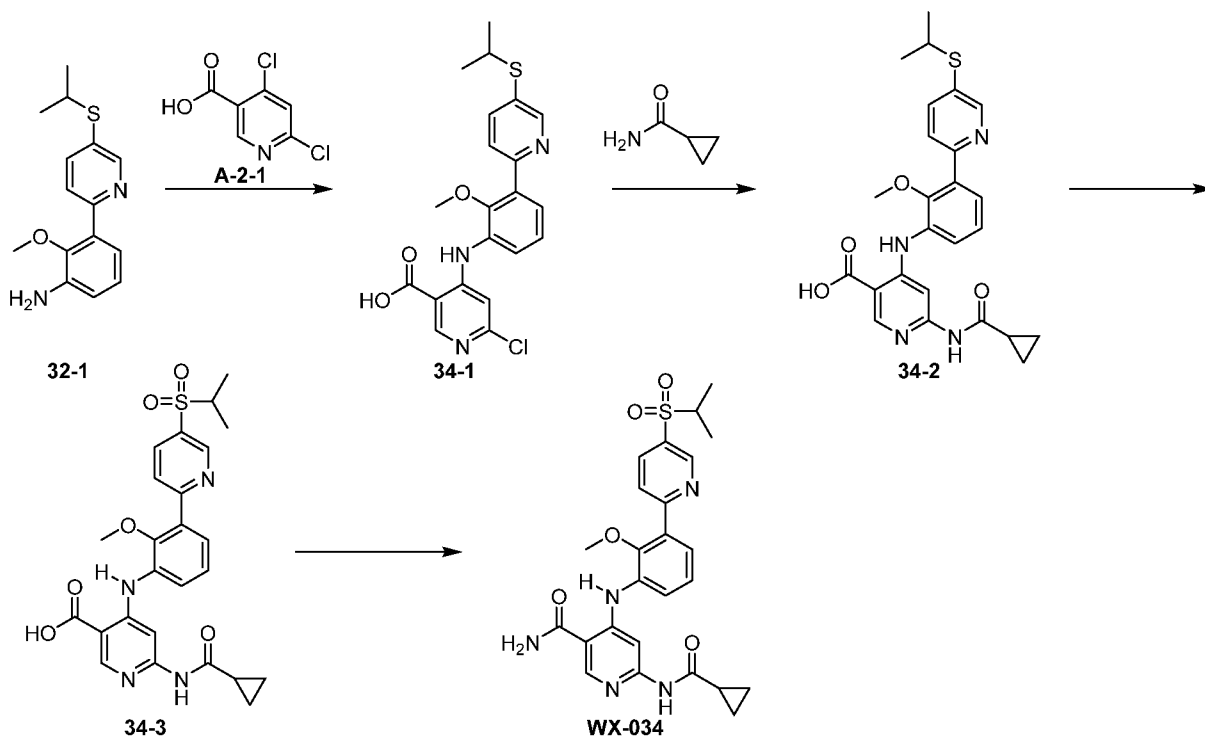
将化合物 **33-2**(150 mg, 312.79 μmol, 1 eq) 溶于 DCM (2 mL)中, 加入 3-氯过氧苯甲酸(80.97 mg, 469.19 μmol, 1.5 eq), 20°C反应 16hr。反应结束后, 向反应液中加入水(20 mL)和乙酸乙酯(20 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取一次, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得到粗品 **33-3**。LCMS *m/z* =512.1 [M+1]⁺。粗品未经纯化直接用于下一步反应。

步骤 4: 化合物 **WX-033** 的合成

将化合物 **33-3** (140 mg, 273.68 μmol, 1 eq)和氯化铵(731.97 mg, 13.68 mmol, 50 eq)加入到 DMF (10 mL)中, 然后依次加入 HATU (312.18 mg, 821.04 μmol, 3 eq) 和 DIPEA (212.23 mg, 1.64 mmol, 286.02 μL, 6 eq), 25°C搅拌反应 1hr。往反应体系中加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10mL)萃取一次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离(色谱柱: Welch Xtimate C18, 100*40mm*3μm; 流动相: A (水, 含 0.075% 三氟乙酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 10%-40%, 8 min), 将所得到的制备分离的溶液 40°C真空浓缩除去乙腈, 然后用饱和碳酸氢钠调碱性 (pH=8), 用二氯甲烷萃取 (30 mL*3), 将合并后的有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩后得到到化合物 **WX-033**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 10.67 (br s, 1H), 9.27 (s, 2H), 8.38 (s, 1H), 8.16 - 8.04 (m, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 6.8

Hz, 1H), 7.40 - 7.34 (m 1H), 5.83 (brs, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.38 - 3.24 (m, 1H), 1.74 - 1.65 (m, 1H), 1.44 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.13 - 1.06 (m, 2H), 0.95 - 0.89 (m, 2H); LCMS $m/z = 511.2 [M+1]^+$ 。

实施例 34



步骤 1: 化合物 34-1 的合成

在氮气保护下, 将 **32-1** (250 mg, 911.14 μmol , 1 eq) 加入到 THF (10 mL) 中, 然后加入 **A-2-1** (174.94 mg, 911.14 μmol , 1 eq), 搅拌溶解, 25°C 下滴加加入 LiHMDS (1 M, 2.28 mL, 2.5 eq), 继续搅拌 2 hr。反应结束后, 向反应液中加入饱和氯化铵水溶液 (20 mL) 和水 (50 mL), 用乙酸乙酯 (50 mL*2) 萃取, 合并后的有机相用饱和食盐水 (50 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷 = 10%) 分离纯化得到化合物 **34-1**。LCMS $m/z = 430.0 [M+1]^+$ 。

步骤 2: 化合物 34-2 的合成

将化合物 **34-1** (550 mg, 1.28 mmol, 1 eq) 和环丙基甲酰胺 (2.72 g, 31.98 mmol, 25 eq) 加入到 1,4-二氧六环 (20 mL) 和 NMP (2 mL) 的混合溶剂中, 然后加入碳酸铯 (1.25 g, 3.84 mmol, 3 eq) 和 Xantphos (111.04 mg, 191.90 μmol , 0.15 eq) 氮气置换三次后, 加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (175.72 mg, 191.90 μmol , 0.15 eq) 在 130°C 反应 18 hr。反应冷却至室温, 加入水 (30 mL) 和乙酸乙酯 (30 mL) 萃取分液, 水相再用乙酸乙酯 (30 mL) 萃取一次, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品。粗品经硅胶柱层析 (甲醇/二氯甲烷 = 3%) 分离纯化得到化合物 **34-2**。LCMS $m/z = 479.2 [M+1]^+$ 。

步骤 3: 化合物 34-3 的合成

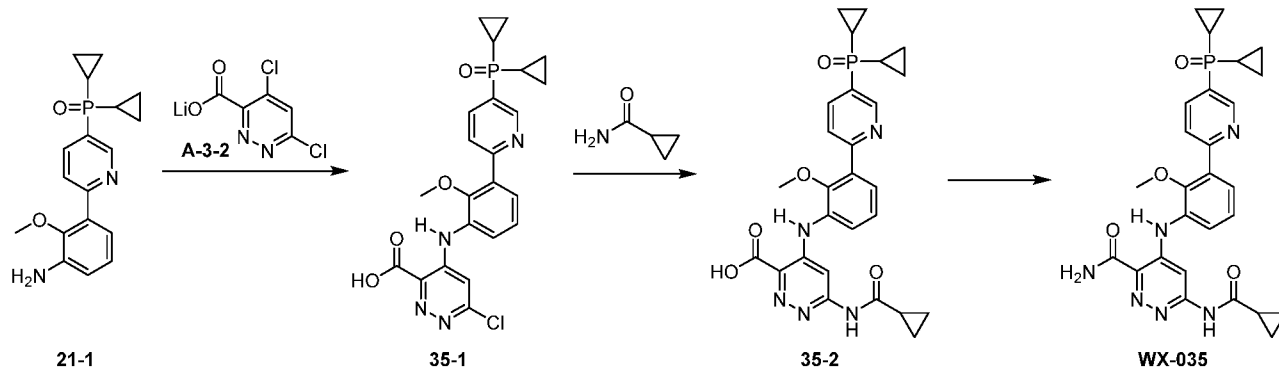
将化合物 **34-2** (430 mg, 898.52 μmol , 1 eq) 溶于二氯甲烷 (10 mL) 中, 然后降温至 0°C 加入 3-氯过氧苯甲酸

(364.84 mg, 1.80 mmol, 85% 纯度, 2 eq), 然后在 25°C 下反应 2 hr。反应完成后, 加入水(30 mL)和乙酸乙酯(30 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(30 mL)萃取一次, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品 **34-3**。LCMS $m/z = 511.1 [M+1]^+$ 。粗品未经下一步纯化, 直接用于下一步反应。

步骤 4: 化合物 **WX-034** 三氟乙酸盐的合成

将化合物 **34-3** (458 mg, 897.05 μmol , 1 eq) 加入到 DMF (10 mL) 中, 然后加入氯化铵(2.40 g, 44.85 mmol, 50 eq) 和 HATU (511.63 mg, 1.35 mmol, 1.5 eq) 和 DIPEA (347.81 mg, 2.69 mmol, 468.74 μL , 3 eq), 在 25°C 下反应 1 hr。反应结束后, 加入水(10 mL)和乙酸乙酯(10 mL)萃取分液, 水相再用乙酸乙酯(10 mL)萃取一次, 合并有机相, 用饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: Welch Xtimate C18, 100*40mm*3 μm ; 流动相: A (水, 含 0.075% 三氟乙酸) 和 B (乙腈); 梯度: B%: 15%-45%, 8 min) 纯化得到化合物 **WX-034** 三氟乙酸盐。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.34 - 10.93 (m, 2H), 9.22 - 9.00 (m, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.50 - 8.23 (m, 2H), 8.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.77 - 7.56 (m, 4H), 7.42 - 7.30 (m, 1H), 3.65 - 3.58 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 2.01 - 1.87 (m, 1H), 1.24 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H), 0.93 - 0.79 (m, 4H); LCMS $m/z = 510.1 [M+1]^+$ 。

实施例 35



步骤 1: 化合物 **35-1** 的合成

将化合物 **21-1** (100 mg, 304.56 μmol , 1 eq) 和 **A-3-2** (60.58 mg, 304.56 μmol , 1 eq) 溶于 THF (10 mL) 中, 0°C 下滴加加入 LiHMDS (1 M, 1.22 mL, 4 eq), 然后 25°C 继续搅拌反应 2 小时。向反应液中加入 8 mL 甲醇, 减压浓缩然后加入水 (20 mL), 用二氯甲烷 (30 mL*2) 萃取, 有机相用饱和氯化钠溶液 (25 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇=100:0~100:5) 得到化合物 **35-1**。LCMS $m/z = 485.0 [M+1]^+$ 。

步骤 4: 化合物 **35-2** 的合成

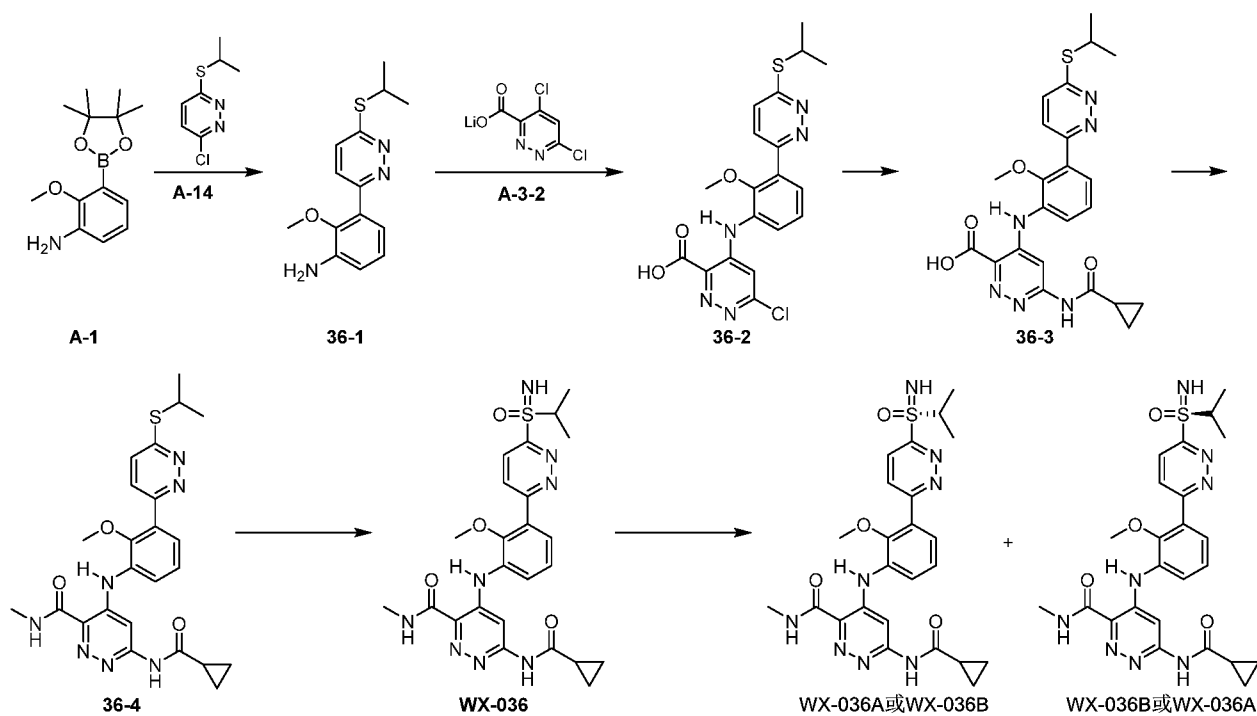
将化合物 **35-1** (50 mg, 103.12 μmol , 1 eq) 和环丙基甲酰胺 (219.40 mg, 2.58 mmol, 25 eq), Xantphos (8.95 mg, 15.47 μmol , 0.15 eq) 溶于 1,4-二氧六环 (1 mL) 和 NMP (0.5 mL) 的混合溶剂中, 加入碳酸铯 (100.80 mg,

309.36 μmol , 3 *eq*), 氮气置换, 加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (14.16 mg, 15.47 μmol , 0.15 *eq*), 氮气置换后, 加热至回流反应 12hr。反应结束后, 冷却至室温, 减压除去有机溶剂。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇 = 100:0~1:1) 得到化合物 **35-2**。LCMS $m/z = 534.1[\text{M}+1]^+$ 。

步骤 5: 化合物 **WX-035** 三氟乙酸盐的合成

将化合物 **35-2** (30 mg, 56.23 μmol , 1 *eq*), 氯化铵 (150.39 mg, 2.81 mmol, 50 *eq*) 和 HATU (32.07 mg, 84.35 μmol , 1.5 *eq*) 溶于 DMF (2 mL) 中, 然后加入 DIPEA (21.80 mg, 168.69 μmol , 29.38 μL , 3 *eq*), 25°C 搅拌反应 12hr。反应结束后加入水 (6mL), 用乙酸乙酯 (10mL*2) 萃取, 有机相饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液真空浓缩得到粗品。粗品经制备高效液相色谱分离 (色谱柱: elch Xtimate C18, 100*40mm*3 μm ; 流动相: A(水, 含 0.075% 三氟乙酸) 和 B(乙腈); 梯度: B%: 8%-38%, 8 min) 纯化得到化合物 **WX-035** 三氟乙酸盐。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 13.05 (br s, 1H), 11.53 (s, 1H), 9.06 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.19 - 8.13 (m, 1H), 7.96 (br d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.61 (br s, 1H), 7.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.35 - 7.30 (m, 1H), 5.81 (br s, 1H), 3.48 (s, 3H), 2.00 - 1.93 (m, 1H), 1.06 - 0.87 (m, 14H); LCMS $m/z = 533.2[\text{M}+1]^+$ 。

实施例 36



步骤 1: 化合物 **36-1** 的合成

将化合物 **A-1** (2 g, 8.03 mmol, 1 *eq*), 化合物 **A-14** (1.36 g, 7.23 mmol, 0.9 *eq*), 磷酸钾 (5.11 g, 24.09 mmol, 3 *eq*) 溶于 1,4-二氧六环 (20 mL) 和水 (10 mL) 中, 氮气置换三次后加入 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (393.38 mg, 481.71 μmol , 0.06 *eq*), 在 100°C 搅拌 2 hr。向反应液中加入水 (10 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL*2) 萃取,

有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化（乙酸乙酯/石油醚=0~50%），得到化合物 **36-1**。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.83 - 7.80 (m, 1H), 7.30 - 7.29 (m, 1H), 7.28 - 7.27 (m, 1H), 7.08 - 7.04 (m, 1H), 6.87 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 4.39 - 4.33 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 1.51 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); LCMS *m/z*=276.1 [M+ H]⁺。

步骤 2: 化合物 **36-2** 的合成

将化合物 **36-1** (1 g, 3.63 mmol, 1 *eq*)和化合物 **A-3-2** (830.74 mg, 4.18 mmol, 1.15 *eq*)溶于异丙醇 (10 mL) 和水 (3 mL) 中，加入醋酸锌(799.56 mg, 4.36 mmol, 1.2 *eq*)，在 80°C下搅拌 16hr。向反应液中加入水 (30 mL)，过滤，收集滤饼，得到化合物 **36-2**。LCMS *m/z*=432.2 [M+ H]⁺。

步骤 3: 化合物 **36-3** 的合成

将化合物 **36-2** (1 g, 2.32 mmol, 1 *eq*)，环丙甲酰胺 (788.19 mg, 9.26 mmol, 4 *eq*)，碳酸铯 (1.51 g, 4.63 mmol, 2 *eq*)，Xantphos (133.97 mg, 231.54 μmol, 0.1 *eq*) 溶于二氧六环(10 mL) 中，氮气置换三次后加入 Pd₂(dba)₃ (212.02 mg, 231.54 μmol, 0.1 *eq*)，在 120°C下搅拌 3 hr。向反应液中加入水 (10 mL)，用二氯甲烷 (10 mL*2) 萃取，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到粗品。向粗品中加入甲基叔丁基醚 (20 mL)，在 20°C下搅拌 1 小时后过滤，收集滤饼，得到化合物 **36-3**。LCMS *m/z*=481.3 [M+ H]⁺。

步骤 4: 化合物 **36-4** 的合成

将化合物 **36-3** (1.42 g, 2.96 mmol, 1 *eq*)溶于 NMP (10 mL)和乙腈(5 mL)中，然后加入 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (793.08 mg, 4.14 mmol, 1.4 *eq*)，1-羟基苯并三唑(199.65 mg, 1.48 mmol, 0.5 *eq*)，甲胺盐酸盐(199.52 mg, 2.96 mmol, 1 *eq*)，甲基咪唑 (727.85 mg, 8.87 mmol, 706.65 μL, 3 *eq*)，在 65°C下搅拌 1 hr。向反应液中加入水 (10 mL)，用二氯甲烷 (10 mL) 萃取两次，有机相用无水硫酸钠干燥后，过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化（乙酸乙酯/石油醚=0~50%），得到化合物 **36-4**。LCMS *m/z*=494.2 [M+ H]⁺。

步骤 5: 化合物 **WX-036A** 和 **WX-036B** 的合成

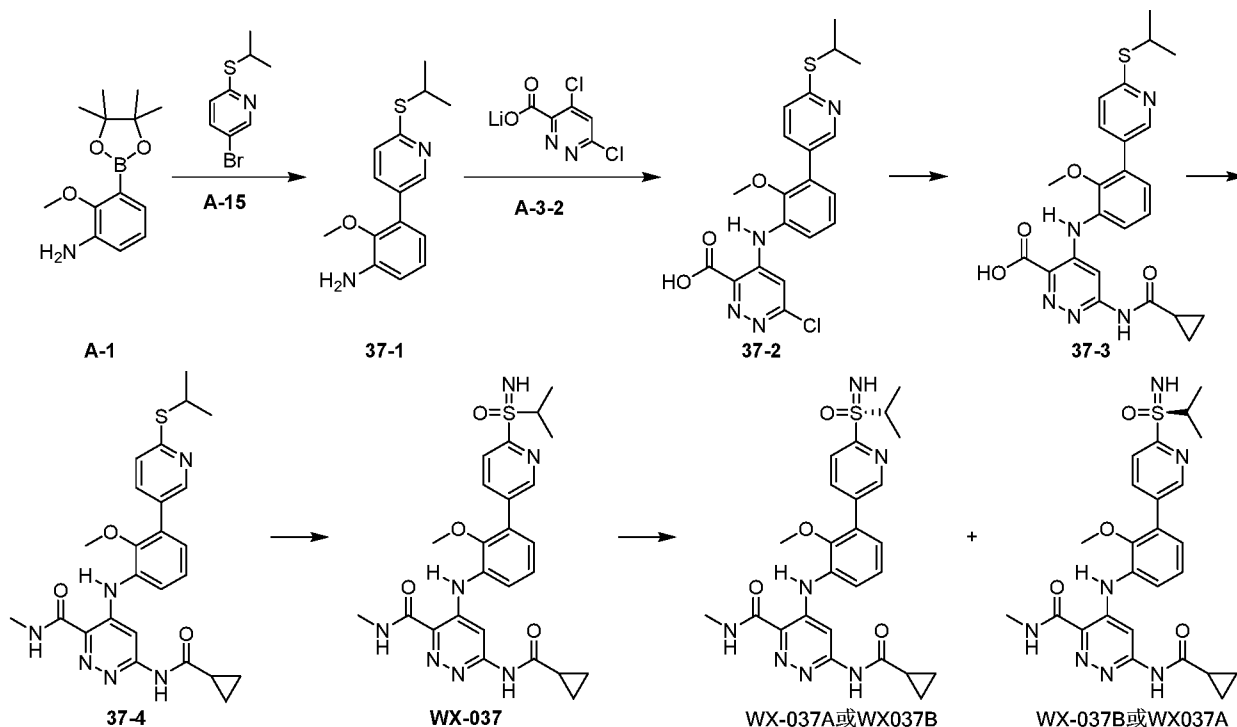
将化合物 **36-4** (0.7 g, 1.42 mmol, 1 *eq*)溶于甲醇 (14 mL)中，加入二乙酰氧基碘苯(1.14 g, 3.55 mmol, 2.5 *eq*)，乙酸铵 (273.30 mg, 3.55 mmol, 2.5 *eq*)，在 15°C下搅拌 2 hr。向反应液中加入水 (15 mL)，用二氯甲烷 (15 mL*2) 萃取，有机相用 5%的硫代硫酸钠水溶液 (20 mL) 清洗，用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化（甲醇/乙酸乙酯=0~10%），得到化合物 **WX-036**。化合物 **WX-036** 经过 SFC 进行拆分(柱子: ChiralPak IH (250mm*30mm,10μm); 流动相: A (CO₂) 和 B (乙醇, 含 0.1%氨水); 梯度: B%=50%-50%, 15 min)，得到化合物 **WX-036A** 和化合物 **WX-036B**。

WX-036A: ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 11.14 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.40 - 8.38 (m, 1H), 8.27 - 8.23 (m, 2H), 8.19 - 8.14 (m, 1H), 7.85 - 7.83 (m, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.42 - 7.38 (m, 1H), 4.08 - 4.01 (m, 2H),

3.56 (s, 3H), 3.07 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H), 1.75 - 1.69 (m, 1H), 1.48 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.42 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.15 - 1.11 (m, 2H), 0.98 - 0.93 (m, 2H); LCMS $m/z=525.2$ $[M+H]^+$. SFC (柱子: Chiralpak IH-3, 3 μm , 0.46 cm id \times 5cm L; 流动相: A (CO₂) 和 B (EtOH, 含 0.1%异丙胺); 梯度: B%=5~50%, 3 min; 流速: 3.4 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 100 bar, Rt=1.615 min), 手性异构体过量 100%。

WX-036B: ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.14 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.40 - 8.38 (m, 1H), 8.27 - 8.22 (m, 2H), 8.19 - 8.17 (m, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.42 - 7.38 (m, 1H), 4.08 - 4.01 (m, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.07 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H), 1.74 - 1.69 (m, 2H), 1.48 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.15 - 1.11 (m, 2H), 0.98 - 0.94 (m, 2H); LCMS $m/z=525.2$ $[M+H]^+$. SFC (柱子: Chiralpak IH-3, 3 μm , 0.46 cm id \times 5cm L; 流动相: A (CO₂) 和 B (EtOH, 含 0.1%异丙胺); 梯度: B%=5~50%, 3 min; 流速: 3.4 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 100 bar, Rt=1.771 min), 手性异构体过量 99.38%。

实施例 37



步骤 1: 化合物 37-1 的合成

将化合物 A-1 (2 g, 8.03 mmol, 1 eq), 化合物 A-15 (1.12 g, 4.82 mmol, 0.6 eq), 磷酸钾 (5.11 g, 24.09 mmol, 3 eq) 溶于二氧六环 (20 mL) 和水 (10 mL) 中, 氮气置换三次后加入 Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (393.38 mg, 481.71 μmol , 0.06 eq), 在 100°C 下搅拌 1.5 hr。向反应液中加入水 (10 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL) 萃取两次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (乙酸乙酯/石油醚 = 0~50%), 得到化合物 37-1。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.67 - 8.65 (m, 1H), 7.76 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H),

7.23 - 7.21 (m, 1H), 7.02 - 6.98 (m, 1H), 6.79 - 6.71 (m, 2H), 4.08 - 3.98 (m, 3H), 3.44 (s, 3H), 1.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H); LCMS $m/z=275.0$ [M+ H]⁺.

步骤 2: 化合物 **37-2** 的合成

将化合物 **37-1** (950 mg, 3.46 mmol, 1 eq), 化合物 **A-3-2** (757.60 mg, 3.81 mmol, 1.1 eq)溶于异丙醇 (9.5 mL) 和水 (3.2 mL), 然后加入醋酸锌(762.32 mg, 4.15 mmol, 1.2 eq), 在 80°C下搅拌 16 hr。向反应液中加入水 (30 mL), 过滤, 收集滤饼, 得到化合物 **37-2**。LCMS $m/z=431.0$ [M+ H]⁺。

步骤 3: 化合物 **37-3** 的合成

将化合物 **37-2** (1 g, 2.32 mmol, 1 eq), 环丙甲酰胺 (790.00 mg, 9.28 mmol, 4 eq), 碳酸铯(1.51 g, 4.64 mmol, 2 eq)溶于二氧六环(10 mL) 中, 氮气置换三次后加入 Xantphos (134.28 mg, 232.07 μ mol, 0.1 eq), Pd₂(dba)₃ (212.51 mg, 232.07 μ mol, 0.1 eq), 在 120°C下搅拌 3 hr。向反应液中加入水 (10 mL), 用二氯甲烷 (10 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。向粗品中加入甲基叔丁基醚 (20 mL), 在 20°C 下搅拌 1 小时后过滤, 收集滤饼, 得到化合物 **37-3**。LCMS $m/z=480.3$ [M+ H]⁺。

步骤 4: 化合物 **37-4** 的合成

将化合物 **37-3** (1.06 g, 2.21 mmol, 1 eq)溶于 NMP (10 mL)和乙腈(5 mL)中, 加入 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(593.23 mg, 3.09 mmol, 1.4 eq), 1-羟基苯并三唑 (149.33 mg, 1.11 mmol, 0.5 eq), 甲胺盐酸盐 (149.24 mg, 2.21 mmol, 1 eq), N-甲基咪唑 (544.42 mg, 6.63 mmol, 528.57 μ L, 3 eq), 在 65°C 下搅拌 1 hr。向反应液中加入水 (10 mL), 用二氯甲烷 (10 mL*2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (乙酸乙酯/石油醚=0~50%), 得到化合物 **37-4**。LCMS $m/z=493.2$ [M+ H]⁺。

步骤 5: 化合物 **WX-037A** 和 **WX-037B** 的合成

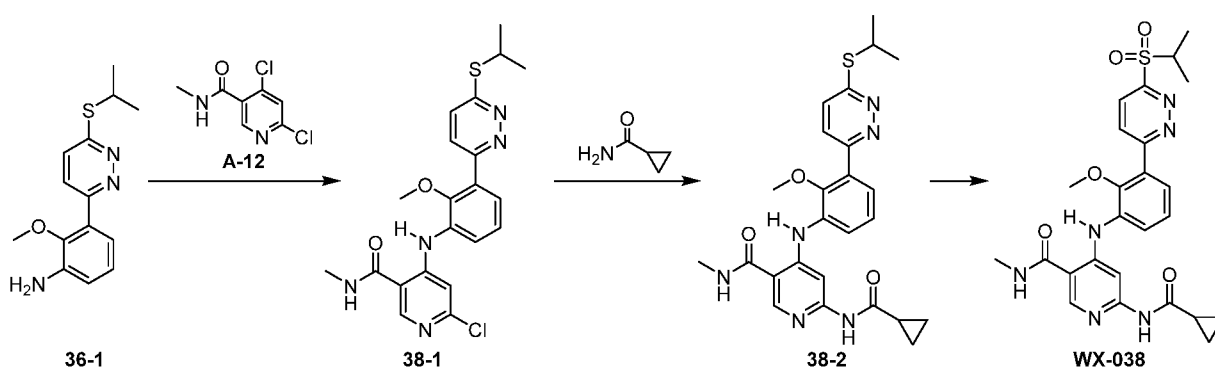
将化合物 **37-4** (0.9 g, 1.83 mmol, 1 eq)溶于甲醇 (18 mL) 中, 加入二乙酰氧基碘苯(1.47 g, 4.57 mmol, 2.5 eq), 乙酸铵(352.08 mg, 4.57 mmol, 2.5 eq), 在 15°C下搅拌 2 hr。向反应液中加入水 (15 mL), 用二氯甲烷 (15 mL*2) 萃取, 有机相用 5%的硫代硫酸钠水溶液 (20 mL) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析分离纯化 (甲醇 /乙酸乙酯=0~10%), 得到化合物 **WX-037**。化合物 **WX-037** 经过 SFC 进行拆分(柱子: ChiralPak IH (250mm*30mm,10 μ m); 流动相: A (CO₂) 和 B (甲醇, 含 0.1%氨水); 梯度: B%=45%-45%, 10min), 得到 **WX-037A** 和 **WX-037B**。

WX-037A: ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 11.14 (s, 1H), 8.97 - 8.96 (m, 1H), 8.84 - 8.75 (m, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.22 - 8.16 (m, 3H), 7.55 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.35 - 7.31 (m, 1H), 7.23 - 7.21 (m, 1H), 3.83 - 3.76 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.07 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H), 1.73 - 1.69 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.36 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.15 - 1.12 (m, 2H), 0.99 - 0.94 (m, 2H); LCMS $m/z=524.2$ [M+ H]⁺。SFC (柱子: Chiralpak IH-3, 3 μ m, 0.46 cm id

× 10cm L; 流动相: A (CO₂) 和 B (MeOH, 含 0.1%异丙胺); 梯度: B%=10~50%, 4 min; 流速: 3.4 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 100 bar), Rt=2.795 min, 手性异构体过量 100%。

WX-037B: ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 11.15 (s, 1H), 9.03 - 8.78 (m, 2H), 8.38 - 8.08 (m, 4H), 7.56 - 7.53 (m, 1H), 7.35 - 7.31 (m, 1H), 7.22 - 7.21 (m, 1H), 3.85 - 3.76 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.07 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H), 1.74 - 1.69 (m, 1H), 1.42 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.42 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.14 - 1.13 (m, 2H), 0.99 - 0.94 (m, 2H); LCMS *m/z*=524.2 [M+H]⁺. SFC (柱子: Chiralpak IH-3, 3 μm, 0.46 cm id × 10cm L; 流动相: A (CO₂) 和 B (MeOH, 含 0.1%异丙胺); 梯度: B%=10~50%, 4 min; 流速: 3.4 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 100 bar), Rt=2.983 min, 手性异构体过量 98.50%。

实施例 38



步骤 1: 化合物 38-1 的合成

在氮气保护下, 将化合物 36-1 (1.82 g, 6.61 mmol, 1 eq)和 A-12(1.36 g, 6.61 mmol, 1 eq)依次加入到四氢呋喃(50 mL)中, 搅拌溶解。在 0°C下, 缓慢滴加加入 LiHMDS (1 M, 16.52 mL, 2.5 eq), 然后在 25 °C下继续搅拌 2 hr。反应结束后, 往反应液中加入水 (100 mL), 用乙酸乙酯 (100 mL*2)萃取。合并有机相用饱和食盐水 (100 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=100:3) 分离纯化得到化合物 38-1。LCMS *m/z* =444.0 [M+1]⁺。

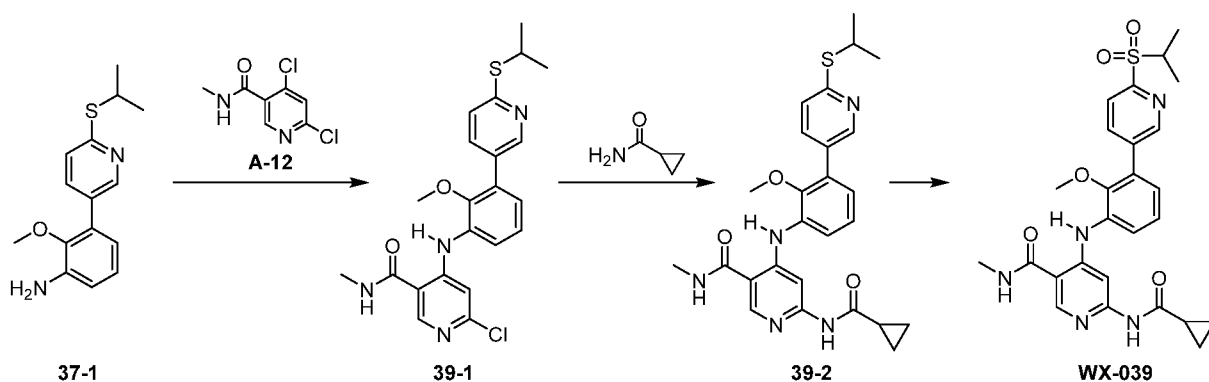
步骤 2: 化合物 38-2 的合成

将化合物 38-1(2.1 g, 4.73 mmol, 1 eq)和环丙基甲酰胺 (4.03 g, 47.30 mmol, 10 eq) 溶于二氧六环 (40 mL) 和 NMP (2 mL) 中, 加入碳酸铯 (4.62 g, 14.19 mmol, 3 eq) 和 Xantphos (410.55 mg, 709.54 μmol, 0.15 eq), 置换氮气三次, 加入 Pd₂(dba)₃ (649.74 mg, 709.54 μmol, 0.15 eq), 130 °C搅拌 16 hr。反应结束, 冷却至室温后, 向反应液中加入水 (40 mL), 用乙酸乙酯 (40 mL*2)萃取, 有机相用饱和食盐水 (40 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=10:1) 分离纯化得到化合物 38-2。LCMS *m/z* =493.1 [M+1]⁺。

步骤 3: 化合物 WX-038 的合成

将化合物 **38-2** (200 mg, 406.02 μmol , 1 eq) 加入到乙醇(10 mL) 和水 (5 mL) 的混合溶液中, 加入单过硫酸氢钾 (374.41 mg, 609.02 μmol , 1.5 eq), 25 °C 反应 2 hr。将反应液直接过滤, 得到化合物 **WX-038**。
 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.97 (br s, 1H), 9.39 (br s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.27 - 8.16 (m, 2H), 7.97 (dd, $J = 1.4, 7.9$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.19 - 4.09 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.06 (d, $J = 4.3$ Hz, 3H), 2.09 - 1.97 (m, 1H), 1.48 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H), 1.05 - 0.96 (m, 2H), 0.94 - 0.85 (m, 2H); LCMS $m/z = 525.1$ $[\text{M}+1]^+$ 。

实施例 39



步骤 1: 化合物 **39-1** 的合成

在氮气保护下, 将化合物 **37-1**(532 mg, 1.94 mmol, 1 eq)和 **A-12**(397.56 mg, 1.94 mmol, 1 eq)依次加入到四氢呋喃 (20 mL)中, 搅拌溶解, 0°C下, 缓慢滴加加入 LiHMDS (1 M, 4.85 mL, 2.5 eq), 然后在 25 °C 下继续搅拌 2 hr。反应结束后, 往反应液中加入水 (50 mL), 用乙酸乙酯 (50 mL*2)萃取。合并有机相用饱和食盐水 (100 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=100:3) 分离纯化得到化合物 **39-1**。LCMS $m/z = 443.0$ $[\text{M}+1]^+$ 。

步骤 2: 化合物 **39-2** 的合成

将化合物 **39-1** (786 mg, 1.77 mmol, 1 eq)和环丙基甲酰胺(1.51 g, 17.74 mmol, 10 eq)溶于二氧六环 (20 mL) 和 NMP (0.5 mL) 中, 加入碳酸铯(1.73 g, 5.32 mmol, 3 eq)和 Xantphos (154.01 mg, 266.16 μmol , 0.15 eq), 置换氮气三次, 加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (243.73 mg, 266.16 μmol , 0.15 eq), 130 °C 搅拌 16 hr。反应结束, 冷却至室温后, 向反应液中加入水 (20 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL*2)萃取, 有机相用饱和食盐水 (20 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=10:1) 分离纯化得到化合物 **38-2**。LCMS $m/z = 492.2$ $[\text{M}+1]^+$ 。

步骤 3: **WX-039** 的合成

将化合物 **39-2** (200 mg, 406.83 μmol , 1 eq) 加入到乙醇 (10 mL) 和水 (5 mL) 的混合溶液中, 加入单过硫酸氢钾 (375.16 mg, 610.25 μmol , 1.5 eq), 25°C 反应 2 hr。反应结束后, 往反应液中加入饱和亚硫酸

氢钠水溶液 (10 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL*2) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (10 mL*2) 清洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱层析 (DCM: MeOH=10:1) 分离纯化得到化合物 **WX-039**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 10.58 (s, 1H), 9.10 - 8.90 (m, 1H), 8.35 (s, 2H), 8.28 - 8.21 (m, 1H), 8.20 - 8.14 (m, 2H), 7.62 (dd, *J* = 1.3, 8.0 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 1.5, 7.8 Hz, 1H), 6.35 (br s, 1H), 3.89 - 3.79 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.05 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 1.61 - 1.53 (m, 1H), 1.40 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.15 - 1.07 (m, 2H), 0.96 - 0.88 (m, 2H); LCMS *m/z* = 524.1 [M+1]⁺。

生物测试数据

实验例 1: 化合物对 TYK2 JH2 假激酶抑制活性

本实验采用荧光共振能量转移(TR-FRET) 的方法测试化合物对TYK2 JH2 假激酶的抑制作用。该实验中TYK2JH2或JAK1JH2假激酶可同时与带荧光标签的Tracer以及Tb抗体相结合形成“三明治结构”, Tb抗体作为荧光供体在一定波长激发光作用下产生495nm波长荧光, 而Tracer作为荧光受体只有在“三明治结构”中, 即与Tb抗体足够靠近的情况下可以接收到495nm波长荧光从而产生520nm波长荧光, 即荧光共振能量转移信号。当加入化合物与Tracer竞争结合假激酶时, 由于Tracer结合减少从而TR-FRET信号减弱, 可通过520nm/495nm信号比值可反应出化合物与假激酶结合抑制活性强弱。

1 实验试剂: 见表10

表10: 实验试剂信息

试剂名称	供应商	存储条件
TYK2/JAK1	Bioduro	-80°C
Tracer	Bioduro	-80°C
Tb抗体	Cisbio	-80°C
HEPES	Invitrogen	4°C
MgCl ₂ 1M	Sigma	常温
Brij L23 solution (Brij-35)	Sigma	常温
DTT	Sigma	-20°C
BSA	Sigma	4°C

2 实验方法

1) 准备1X实验工作液

HEPES pH7.5, 终浓度20mM; MgCl₂, 终浓度10mM; Brij-35, 终浓度0.015%; DTT, 终浓度2mM; BSA, 终浓度50 μg/mL。

2) 实验操作步骤:

- a) 用DMSO溶解化合物到10mM的存储浓度。
- b) 在化合物稀释板中配制200倍于终浓度的化合物不同浓度梯度，并转移到Echo板中。
- c) 利用Echo仪器将化合物从Echo板中转移150nL到384孔实验板中。
- d) 加5 μ L 3倍于终浓度的 TYK2 JH2激酶到384实验板中。
- e) 加5 μ L 3倍于终浓度的Tb 到384实验板中。
- f) 加5 μ L 3倍于终浓度的 Tracer到384孔实验板中。
- g) 离心30秒，室温孵育60分钟。
- h) Envision 酶标仪 (PerkinElmer) 520nm/495nm荧光信号值。

3) 数据分析

使用XL-Fit软件进行数据分析，得出化合物IC₅₀。结果如表11:

表 11: 激酶半数抑制浓度 IC₅₀(nM)

受试品	TYK2 JH2
WX-001 盐酸盐	0.27
WX-002 盐酸盐	0.19
WX-003	0.34
WX-004	0.20
WX-011A	0.10
WX-011B	0.08
WX-012A	0.08
WX-012B	0.08
WX-018 盐酸盐	0.13
WX-019	0.09
WX-020 盐酸盐	0.08
WX-021	0.08

结论: 本发明化合物对 TYK2 JH2 假激酶具有良好的抑制作用。

实验例 2: 化合物对 Ba/F3-FL-TYK2-E957D 和 Ba/F3-TEL-TYK2 细胞增殖的抑制活性

三磷酸腺苷(Adenosine Tri-Phosphate, ATP)是自然界中各种生命活动中共用的能量载体，是能量储存和转移的最小单位。CellTiter-Glo™活细胞检测试剂盒采用萤光素酶作检测物，发光过程中萤光素酶需要 ATP

的参与。向细胞培养基中加入 CellTiter-Glo™试剂，测量发光值，光信号和体系中 ATP 量成正比，而 ATP 又和活细胞数正相关。因此通过使用 CellTiter-Glo 试剂盒检测 ATP 含量，可以检测出细胞的增殖情况。本测试中，细胞系为 Ba/F3-FL-TYK2-E957D 和 Ba/F3-TEL-TYK2。其中 Ba/F3-FL-TYK2-E957D 细胞能够稳定表达外源导入的人 TYK2-E957D 基因，TYK2-E957D 基因序列包含有 JH1 和 JH2 结构域；Ba/F3-TEL-TYK2 细胞能够稳定表达外源导入的人 TEL-TYK2 基因，TEL-TYK2 基因序列仅包含 TYK2 的 JH1 结构域。

IC₅₀测定过程：

1) 细胞培养

将细胞系在培养条件 37°C，5% CO₂ 的培养箱中进行培养。定期传代，取处于对数生长期的细胞用于铺板。

2) 化合物存储板制备

- a) 用 DMSO 将待测化合物配置成 10 mM 溶液，再用 DMSO 将待测化合物稀释至 0.3 或 1 mM。
- b) 制备 1000×化合物存储板（管）：用 DMSO 从最高浓度 3 倍梯度稀释至最低浓度，9 个浓度。
- c) 20× 化合物工作液的配制：在平底 96 孔透明药板中加入 49 μL 细胞培养液，从 1000×化合物存储板中吸取 1 μL 化合物加入 96 孔透明药板的细胞培养液中。在溶媒对照中加入 1 μL DMSO。加入化合物或 DMSO 后用排枪吹打混匀。

3) 细胞铺板与给药

- a) 用台盼兰进行细胞染色并计数活细胞，要求细胞活率 90% 以上。
- b) 在化合物检测细胞板中每孔加入 95 μL 细胞悬液（2000 cells/well），在 Min 对照孔中加入不含细胞（含 0.1% DMSO）的培养液。
- c) 化合物检测细胞板加药：取 5 μL 的 20×化合物工作液加入到细胞培养板中。在 Max 对照中加入 5 μL DMSO-细胞培养液混合液。DMSO 终浓度为 0.1%。
- d) 将培养板在 37°C，5% CO₂培养箱中培养72小时。

4) CellTiter-Glo 发光法细胞活性检测

以下步骤按照 Promega CellTiter-Glo 发光法细胞活性检测试剂盒（Promega-G7573）的说明书来进行。

- a) 将CellTiter-Glo 缓冲液融化并放置至室温。
- b) 将CellTiter-Glo 底物放置至室温。
- c) 在一瓶 CellTiter-Glo 底物中加入 CellTiter-Glo 缓冲液以溶解底物，从而配制CellTiter-Glo工作液。
- d) 缓慢涡旋震荡使充分溶解。
- e) 取出细胞培养板放置 10 分钟使其平衡至室温。

- f) 在每孔中加入 50 μL (等于每孔中细胞培养液一半体积) 的 CellTiter-Glo 工作液。
- g) 将培养板在轨道摇床上振摇 2 分钟以诱导细胞裂解。
- h) 培养板在室温放置 10 分钟以稳定发光信号。
- i) 在 SpectraMax Paradigm 读板器上检测发光信号。

5) 数据处理

使用 GraphPad Prism 5.0 软件分析数据, 利用非线性 S 曲线回归来拟合数据得出剂量-效应曲线, 并由此计算 IC_{50} 值, 数据见表 12。

表 12: 细胞半数抑制浓度 IC_{50} (nM)

化合物	Ba/F3-FL-TYK2-E957D	Ba/F3-TEL-TYK2
WX-001 盐酸盐	13.7	-
WX-002 盐酸盐	19.2	-
WX-004	5.5	-
WX-005	2.2	-
WX-006 盐酸盐	10.6	-
WX-007 盐酸盐	9.5	-
WX-008 盐酸盐	16.0	-
WX-009 三氟乙酸盐	12.1	-
WX-010 盐酸盐	12.6	-
WX-011A	5.3	>10000
WX-011B	3.3	>10000
WX-012A	3.3	>10000
WX-012B	2.4	>10000
WX-013	12.1	-
WX-014 三氟乙酸盐	10.9	-
WX-015 盐酸盐	13.0	-
WX-016 盐酸盐	11.7	-
WX-017 盐酸盐	4.0	-
WX-018 盐酸盐	4.2	-
WX-019	2.0	>10000

WX-020 盐酸盐	1.5	>10000
WX-021	2.5	>10000
WX-022	13.7	-
WX-023	13.8	-
WX-024	10.0	-
WX-025	12.7	-
WX-026 三氟乙酸盐	18.8	-
WX-027 盐酸盐	18.3	-
WX-028	4.0	-
WX-029 盐酸盐	3.8	-
WX-030	2.0	-
WX-031 盐酸盐	2.6	-
WX-032 盐酸盐	2.9	-
WX-033	0.1	>10000
WX-034 三氟乙酸盐	0.1	>10000
WX-035 三氟乙酸盐	6.7	-
WX-036A	8.3	-
WX-036B	17.3	-
WX-037A	15.0	-
WX-037B	17.0	-
WX-038	3.0	-
WX-039	4.7	-

“-”表示未检测。

结论：本发明化合物对转染人 TYK2-E957D 基因（含有 TYK2 的 JH1 和 JH2 结构域）的 Ba/F3 细胞的增殖具有较强的抑制活性，而对转染人 TEL-TYK2 基因（仅包含 TYK2 的 JH1 结构域）的 Ba/F3 细胞的增殖无抑制活性，表明本发明化合物是高选择性 TYK2 JH2 别构抑制剂。

实验例 3：化合物对人 PBMC 细胞 TYK2、JAK1/2、JAK2/2 和 JAK1/3 信号通路的抑制活性

本实验目的是在人外周血单个核细胞（PBMC）中检测化合物对细胞因子激活的 JAK-STAT 信号通路的抑制作用。

1 主要试剂及仪器

1) 细胞：人外周血单个核细胞（PBMC）（供应商：赛笠生物）

2) 试剂：见表 13

表 13：试剂信息

名称	供应商
1640 培养基	Gibco
非必需氨基酸	Gibco
胎牛血清	依科赛
双抗（青霉素、链霉素）	Millipore
人白细胞介素 6（IL-6）	Absin
人干扰素 α （IFN- α ）	pbl assay science
人白细胞介素 2（IL-2）	Absin
人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）	Peptotech
人 CD4 抗体	Biolegend
人 CD33 抗体	Biolegend
人 pSTAT1 抗体	BD
人 pSTAT5 抗体	BD
染色液	Biolegend
固定液	BD
破膜液	BD
磷酸缓冲液（DPBS）	Corning

3) 仪器

流式细胞仪：品牌：BD；型号：Fortessa

2 试剂配制

培养液：1640 培养液+10%胎牛血清+1%双抗+1%非必需氨基酸（百分比均为体积比）

3 实验步骤

- 将于液氮中冻存的 PBMC 在 37°C 水浴中解冻，加入培养液，320 g 离心 3 min。
- 培养液重悬细胞后计数，用培养液将细胞浓度调整为 5×10^5 个/mL，然后将细胞悬液接种至两个 96 孔圆底板，每孔 200 μ L。37°C、5% CO₂ 条件下孵育 90 min。
- 加入不同浓度的待测化合物（2 μ M 起始，5 倍梯度稀释，共 8 个浓度），37°C、5% CO₂ 孵育 30

min。

- d) 在第一个圆底板中加入 IL-6 (终浓度 20 ng/mL), 37°C、5% CO₂ 孵育 15 min。
- e) 在第二个圆底板中加入 IFN α (终浓度 1000 U/mL), 37°C、5% CO₂ 孵育 15 min。
- f) 在第三个圆底板中加入 IL-2 (终浓度 4 ng/mL), 37°C、5% CO₂ 孵育 15 min。
- g) 在第四个圆底板中加入 GM-CSF (终浓度 20 pg/mL), 37°C、5% CO₂ 孵育 15 min。
- h) 细胞 320 g 离心 3 min, 每孔加入 200 μ L 染色液洗一次。
- i) 在 GM-CSF 刺激的培养板中每孔加入 50 μ L 含有人 CD33 抗体的染色液, 其余三个培养板中加入 50 μ L 含有 CD4 抗体的染色液, 4°C 染色 30 min。染色液洗两次。
- j) 每孔加入 100 μ L 固定液, 4°C 固定 15 min。染色液洗一次。
- k) 每孔加入 100 μ L 破膜液, 4°C 破膜 20 min。染色液洗两次。
- l) 在 IL-6、IFN- α 刺激的培养板中每孔加入 50 μ L 含有人 pSTAT1 抗体的染色液; 在 IL-2、GM-CSF 刺激的培养板中每孔加入 50 μ L 含有人 pSTAT5 抗体的染色液, 室温染色 15 min。染色液洗两次。
- m) 150 μ L 染色液重悬细胞。
- n) 用流式细胞仪检测 CD4 阳性细胞中 pSTAT1 (IL-6 和 IFN- α 刺激) 或 pSTAT5 (IL-2 刺激) 的荧光强度; 检测 CD33 阳性细胞中 pSTAT5 (GM-CSF 刺激) 的荧光强度。

4 数据分析

使用Flowjo软件进行数据分析, 得出化合物IC₅₀。结果见表14:

表 14: 细胞半数抑制浓度 IC₅₀ (nM)

化合物	IFN- α /pSTAT1 (TYK2)	IL-6/pSTAT1 (JAK1/2)	GM-CSF/pSTAT5 (JAK2/2)	IL-2/pSTAT5 (JAK1/3)
WX-011A	2.6	87.0	1656	1311
WX-011B	2.4	72.5	1348	773
WX-012A	2.0	52.4	-	-
WX-012B	1.5	32.5	-	-
WX-019	1.5	99.7	1438	1576
WX-020 盐酸盐	1.3	163.9	1072	1396
WX-021	2.1	63.4	580	540

“-”表示未检测。

结论: 本发明化合物在人 PBMC 细胞中, 对 IFN- α 刺激激活的 TYK2 信号通路展现了较高的抑制活性; 同时对 IL-6 刺激激活的 JAK1/2 信号通路、GM-CSF 刺激激活的 JAK2/2 信号通路、IL-2 刺激激活的 JAK1/3

信号通路展现了较弱的抑制活性，展现了较高的选择性。

实验例 4：化合物在小鼠体内的药代动力学测试

实验目的：

以 7-9 周雄性 CD-1 小鼠为受试动物，应用 LC/MS/MS 法测定单次静脉注射（IV）及灌胃（PO）给予化合物后，不同时刻血浆中化合物的药物浓度，研究本发明的化合物在小鼠体内的药代动力学行为，评价其药动学特征。

实验操作：

以标准方案测试化合物静脉注射及口服给药后的啮齿类动物药代特征。受试动物给药前禁食 10-14 小时，给药 4 小时后进食。化合物均以相应溶媒配成澄清溶液用于 IV（静注）和 PO（灌胃）组给药。溶媒为 10%DMSO+10%solurol+80%(10% HP-β-CD 水溶液)。收集 24 小时内的全血样品，6000g 离心 3 分钟，分离上清得血浆样品，加入 4 倍体积含内标的乙腈溶液沉淀蛋白，离心取上清液加入等倍体积的水再离心取上清进样，以 LC-MS/MS 分析方法定量分析血药浓度，并计算药代参数，如达峰浓度，达峰时间，清除率，半衰期，药时曲线下面积，生物利用度等。

药代动力学参数结果见表 15：

表 15：小鼠体内药代动力学测试结果

		WX-011	WX-011A	WX-012	WX-019	WX-020 (盐酸盐)	WX-021
IV	给药剂量 Dose (mg/kg)	1	3	1	3	3	3
	起始浓度 C ₀ (nM)	5422	9915	2747	16325	8045	9889
	半衰期 T _{1/2} (h)	3.2	4.2	4.4	1.1	2.3	2.9
	表观分布容积 V _d (L/kg)	0.7	0.8	2.9	0.4	1.1	0.9
	表观清除率 Cl (mL/Kg/min)	6.6	14.1	12.8	4.7	7.0	8.5
	曲线下面积 AUC _{0-last} (nM.hr)	4791	6908	2462	21042	14130	11869
PO	给药剂量 Dose (mg/kg)	10	10	10	10	10	10
	达峰浓度 C _{max} (nM)	10169	16814	12436	17335	15539	11337
	达峰时间 T _{max} (h)	0.5	0.3	0.3	0.8	0.5	0.3
	曲线下面积 AUC _{0-last} (nM.hr)	24983	26715	16661	61215	56784	20720
	生物利用度 F%	52%	51%	68%	87%	121%	52%

结论：本发明化合物在小鼠中展现了优异的药代动力学特性。

实验例 5：化合物在大鼠体内的药代动力学测试**实验目的：**

以 7-9 周雄性 SD 大鼠为受试动物，应用 LC/MS/MS 法测定单次静脉注射（IV）及灌胃（PO）给予化合物后，不同时刻血浆中化合物的药物浓度，研究本发明的化合物在大鼠体内的药代动力学行为，评价其药动学特征。

实验操作：

以标准方案测试化合物静脉注射及口服给药后的啮齿类动物药代特征。受试动物给药前禁食 10-14 小时，给药 4 小时后进食。化合物均以相应溶媒配成澄清溶液用于 IV（静注）和 PO（灌胃）组给药。溶媒为 10%DMSO+10%solurol+80%(10% HP- β -CD 水溶液)。收集 24 小时内的全血样品，6000g 离心 3 分钟，分离上清得血浆样品，加入 4 倍体积含内标的乙腈溶液沉淀蛋白，离心取上清液加入等倍体积的水再离心取上清进样，以 LC-MS/MS 分析方法定量分析血药浓度，并计算药代参数，如达峰浓度，达峰时间，清除率，半衰期，药时曲线下面积，生物利用度等。

药代动力学参数结果见表 16：

表 16：大鼠体内药代动力学测试结果

		WX-011A	WX-020
		盐酸盐	
IV	给药剂量 Dose (mg/kg)	1	3
	起始浓度 C₀ (nM)	4545	3026
	半衰期 T_{1/2} (h)	0.6	0.9
	表观分布容积 Vd (L/kg)	0.5	0.9
	表观清除率 Cl (mL/Kg/min)	16.8	13.1
	曲线下面积 AUC_{0-last} (nM.hr)	2075	2606
PO	给药剂量 Dose (mg/kg)	10	10
	达峰浓度 C_{max} (nM)	4394	3377
	达峰时间 T_{max} (h)	0.5	0.8
	曲线下面积 AUC_{0-last}(nM.hr)	8202	9762
	生物利用度 F%	41%	39%

结论： 本发明化合物在大鼠中展现了优异的药代动力学特性。

实验例 6：化合物对 IFN- α 诱导小鼠全血 STAT1 磷酸化抑制实验

本实验目的是在小鼠全血中检测化合物对 IFN- α 激活的 JAK-STAT 信号通路的抑制作用。采集新鲜的小鼠全血，将全血置于 96 孔板中，加入待测化合物孵育 1h 后再加入 IFN- α 刺激，通过膜表面抗体以及胞内磷酸化抗体染色的方式，用流式细胞仪分析 CD3⁺细胞群体相应的 STAT1 磷酸化水平。INF- α 诱导的小鼠全血 STAT1 磷酸化是由 TYK2 活性依赖的，检测化合物对下游 STAT5 磷酸化的抑制活性，可得出化合物对 TYK2 信号通路活性的半数抑制浓度 IC₅₀。

1 主要试剂和仪器**1) 主要试剂：见表 17**

表 17：试剂信息

名称	供应商
二甲基亚砜	Sigma
Perm buffer III (破膜剂)	BD Biosciences
Lyse/Fix buffer (裂解固定液)	BD Biosciences
EDTA (乙二胺四乙酸)	Invitrogen
PBS (磷酸盐缓冲液)	BI
Brilliant Violet 421 anti-mouse CD3 Antibody (抗小鼠 CD3 抗体)	Biolegend
Alexa Fluor647 anti-STAT1 phospho(Ser727)antibody (抗 STAT1 抗体)	Biolegend
Recombinant mouse IFNalpha (小鼠干扰素重组蛋白 IFN- α)	Miltenyi

2) 实验耗材

96 V 型尖底微孔板, Greiner; 96 方孔深孔板, Thermo; 96 平底微孔板, Corning。

3) 仪器

二氧化碳培养箱: MCO-15AC (Thermo);

单通道移液器: 0.2-10 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L (Thermo);

多通道移液器: 0.2-10 μ L, 5-50 μ L, 20-300 μ L (Raining);

离心机: Thermo Centrifuge ST 40R; Thermo LEGEND Micro 21R;

净水器: Millipore Milli-Q Reference system;

涡旋器: EARTH REQUIRED;

振板器: QI LIN BEI ER; MH-2;

流式细胞仪: Beckman CytoFlex。

2 实验步骤

1) 化合物稀释

- a) 化合物用二甲基亚砜配制成 10mM 溶液,在二甲基亚砜中稀释至 500 倍于终浓度的不同浓度梯度 溶液。
- b) 转移 5 μ L 稀释好的化合物到 120 μ L 含 0.1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲溶液中。
- c) 设置阳性和阴性对照组, 阳性对照和阴性对照组最终含 0.2% 二甲基亚砜。

2) 实验过程

- a) 在 96 孔细胞培养板中每孔加入体积为 67.5 μ L 的小鼠全血。
- b) 加入 3.5 μ L 稀释好的化合物, 混匀。
- c) 在 37°C 培养箱中孵育 60 分钟。
- d) 将小鼠干扰素重组蛋白在含 0.1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中 125 倍稀释, 抗小鼠 CD3 抗体在含 0.1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液中 5 倍稀释。每孔加入稀释好 5 μ L 的抗小鼠 CD3 抗体, 每孔加入 4 μ L 稀释好的小鼠干扰素重组蛋白。
- e) 在 37°C 培养箱中孵育 30 分钟。
- f) 将所有细胞转移到 96 孔深孔板中, 加入 1mL 37°C 预热的 1x 裂解固定液。
- g) 37°C 避光孵育 10 分钟。
- h) 600g 离心 5 分钟后弃上清, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液离心洗两遍。
- i) 细胞沉淀中加入 0.4 mL/孔的破膜液,混匀。 10) 4°C 避光孵育 30 分钟。
- j) 600g 离心 5 分钟后弃上清, 加入 1 mL 流式染色缓冲液 (磷酸盐缓冲液+0.2%BSA+1mM 乙二胺四乙酸) 离心洗两遍。
- k) 将抗 STAT1 抗体在流式染色缓冲液中 65 倍稀释, 100 μ L 每孔加入细胞孔中, 混匀。
- l) 室温孵育 40 分钟。
- m) 加入 1mL/孔的流式染色缓冲液, 600g 离心 5 分钟洗两遍。
- n) 弃上清后细胞沉淀在 300 μ L 流式染色缓冲液中重悬。
- o) 在 Beckman CytoFlex 流式细胞仪中上样分析。

3 数据分析

利用 FlowJo 软件进行数据分析, GraphPad Prism 8 软件进行曲线拟合, 并计算出 IC₅₀。结果见表 18。

表 18: 半数抑制浓度 IC₅₀ (nM)

化合物	IFN- α /pSTAT1 (TYK2)
WX-011A	148.2
WX-011B	375.0

WX-012B	418.6
WX-019	427.2
WX-020	369.3
WX-021	452.0
WX-033	315.9
WX-034 三氟乙酸盐	93.2

结论：在小鼠全血中，本发明化合物对 IFN α 刺激激活的 TYK2 信号通路展现了较高的抑制活性。

实验例 7：化合物对细胞因子诱导人全血/血小板 STAT 磷酸化抑制实验

本实验目的是在人全血或富含血小板的血浆中检测化合物对细胞因子激活的 JAK-STAT 信号通路的抑制作用。将新鲜人全血/血小板置于 96 孔板中，加入待测化合物孵育 1h 后再加入不同细胞因子刺激，通过膜表面抗体以及胞内磷酸化抗体染色的方式，用流式细胞仪分析各细胞群体相应的 STAT 磷酸化水平。其中以细胞因子 IFN- α ，IL-6 和 IL-2 作为刺激物的实验是在人全血中进行的，而以细胞因子 TPO 作为刺激物的实验是在富含人血小板的血浆中进行的。

1 主要试剂：见表19

表 19：试剂信息

名称	供应商
1640 培养基	BI
Alexa Fluor 647 Mouse Anti-Stat5 (pY694) (AF647 标记小鼠抗 STAT5(pY694)抗体)	BD
FITC Mouse Anti-Human CD3 (FITC 标记小鼠抗人 CD3 抗体)	BD
PE anti-human CD61 Antibody (PE 标记小鼠抗人 CD61 抗体)	Biologend
Alexa Fluor 647 mouse IgG1,k Isotype Ctrl antibody (AF647 标记小鼠 IgG1 同型对照抗体)	Biologend
Recombinant human IL-2 (重组人白细胞介素 2)	PEPROTECH
Universal Type I IFN(1MU) (α 干扰素)	R&D
Recombinant human TPO (重组人血小板生成素)	Stem cell
96 Well Microplate (96 孔微孔细胞培养板)	Beaver

2 mL 96 Well Standard Certified RNase/DNase Free Non-Sterile (2 毫升 96 孔深孔板)	Costar
Phosflow Lyse/Fix Buffer 5X (5 倍浓缩的裂红固定液)	BD
Perm Buffer III (破膜液 III)	BD

2 实验步骤

1) 细胞因子诱导人全血磷酸化实验

- a) 用 EDTA 抗凝管采集志愿者的新鲜血液。
- b) 迅速种 90 μL /孔全血于 96 孔板中, 置于细胞培养箱孵育 15 min; 加入 10 μL 待测化合物, 均单孔; 阴性对照组和阳性对照组均加入与实验组 DMSO 含量相同的等量 1640 培养液, 均为三重孔。培养箱孵育 60 min。
- c) 孵育结束后, 每孔加入 25 μL 终浓度为 20 ng/mL 的 IL-2 或终浓度为 50 ng/mL 的 IL-6 或终浓度为 1000 U/mL 的 IFN- α 刺激诱导; 阴性对照组加入等体积的 1640 培养基, 培养箱中孵育 15 min。
- d) 每孔加入 100 μL 1 \times Lyse/Fix 裂解液, 置于冰上终止反应, 再将样品转入含有 10 倍血样体积的 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 1 \times Lyse/Fix 裂解液(96 孔深孔板), 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 15 min。
- e) 每孔加入 500 μL 的冰冷 PBS, 500 \times g 离心 8 min, 弃掉上清。
- f) 每孔加入 250 μL 预冷的 PBS 将细胞重悬, 转入 96 孔浅孔板, 500 \times g 8 min 离心去上清。
- g) 细胞沉淀用预冷的 PBS 洗涤一遍。
- h) 弃去上清后, 加入 anti-human CD3 抗体, 室温孵育 40 min。
- i) 500 \times g 8 min 离心去上清, 加入 200 μL 预冷的 PBS 洗涤两遍。
- j) 每孔加入 200 μL 预冷的 Perm Buffer III 重悬细胞, 冰上破膜 60 min。
- k) 600 \times g 8 min 离心去上清, 用预冷的 PBS 洗涤两遍。
- l) 加入胞内 anti-pSTAT5 抗体染色, 室温孵育 60 min。
- m) 600 \times g 离心 8 min, 细胞用 PBS 洗涤两次, 加入 200 μL PBS 将细胞重悬后, 用 CytoFlex S 流式仪上机检测。
- n) 用 FlowJo 和 GraphPad Prism 8 软件进行分析数据。

2) 细胞因子诱导人血小板磷酸化实验

- a) 用 EDTA 抗凝管采集志愿者的新鲜血液; 200g 离心 20 min, 制备富含血小板的血浆(PRP, Platelet-Rich Plasma)。
- b) 迅速种 90 μL /孔 PRP 于 96 孔板中, 置于细胞培养箱孵育 15 min; 加入 10 μL 待测化合物, 均单孔; 阴性对照组和阳性对照组均加入与实验组 DMSO 含量相同的等量 1640 培养液, 均为三重孔。培养箱孵育

60 min。

c) 加入 25 μL 终浓度为 200 ng/mL 的 TPO 刺激诱导；阴性对照组加入等体积的 1640 培养基，培养箱中孵育 15 min。

d) 孵育完成后，1000 \times g 10 min 离心弃去上清，再加入 200 μL PBS 洗涤两次。

e) 每孔加入 PE-anti-human CD61 抗体，室温孵育 40 min。

f) 孵育完成后，1000 \times g 10 min 离心弃去上清，再加入 200 μL PBS 洗涤两次。

g) 加入 200 μL 预冷的 Perm Buffer III 重悬细胞，冰上破膜 60 min。

h) 1000 \times g 10 min 离心弃上清，用预冷的 PBS 洗涤两遍。

i) 加入胞内 anti-pSTAT5 磷酸化抗体，室温孵育 60 min。

j) PBS 洗涤两次并用 200 μL 重悬后，CytoFLEX S 流式仪上机检测。

3 数据分析

利用 FlowJo 软件进行数据分析，GraphPad Prism 8 软件进行曲线拟合，并计算出 IC_{50} 。数据以平均值和标准差 (standard deviation, SD) 表示。化合物的抑制率定义为： $\text{Inhibition}\% = (1 - (A - B) / (C - B)) * 100$ 。其中：A 为含有化合物和细胞因子实验孔的 MFI (平均荧光强度)；B 为无细胞因子对照孔的 MFI (最低平均荧光强度)；C 为只含有细胞因子对照孔的 MFI (最大平均荧光强度)。结果见表 20。

表 20：半数抑制浓度 IC_{50} (nM)

化合物	IFN- α /pSTAT5 (TYK2)	IL-6/pSTAT3 (JAK1/2)	TPO/pSTAT5 (JAK2/2)	IL-2/pSTAT5 (JAK1/3)
WX-011A	23.1	10754	>100000	11188
WX-019	29.7	33851	>100000	33754
WX-020	40.3	>100000	>100000	>100000

结论：在人全血或血小板中，本发明化合物对 IFN α 刺激激活的 TYK2 信号通路展现了较高的抑制活性；同时对 IL-6 刺激激活的 JAK1/2 信号通路、TPO 刺激激活的 JAK2/2 信号通路、IL-2 刺激激活的 JAK1/3 信号通路展现了较弱的抑制活性，展现了较高的选择性。

实验例 8：化合物对 IL-12/IL-18 诱导小鼠免疫细胞分泌 IFN- γ 体内模型的药效学研究

本实验的目的是评价化合物对 IL-12/IL-18 诱导小鼠免疫细胞分泌 IFN- γ 的抑制作用，使用酶联免疫分析 (ELISA) 的方法，检测化合物治疗后小鼠血清样品中 IFN- γ 蛋白水平。

1 实验材料

a) 实验动物

C57BL/6J 小鼠，9-10 周龄，体重 17.82-21.42 克，雌性，供应商为上海灵畅生物科技有限公司。

b) 重组蛋白信息：见表21

表21：重组蛋白信息

产品名	供应商
Recombinant Mouse IL-12 Protein (重组小鼠 IL-12 蛋白)	R&D
Recombinant Mouse IL-18/IL-1F4 Protein (重组小鼠 IL-18/IL-1F4 蛋白)	R&D
Mouse IFN-gamma Quantikine ELISA Kit (重组小鼠 IFN- γ 定量 ELISA 试剂盒)	R&D

2 实验方法与步骤

1) 实验设计及药物配制

本实验一共进行了两次，具体实验动物分组及给药方案分别见表 22 和表 23。

化合物均以 10%DMSO+10%soluol+80%(10%HP- β -CD) 为溶媒配成澄清溶液，用于 PO（灌胃）组给药。给药频率为每天一次（QD）。

重组小鼠 IL-12 蛋白配制方法：取适量抗体于离心管内，加入一定体积的 PBS 缓冲液，配制浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，轻摇混匀，现配现用。

重组小鼠 IL-18/IL-1F4 蛋白配制方法：取适量抗体于离心管内，加入一定体积的 PBS 缓冲液，配制浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ，轻摇混匀，现配现用。

其中 Normal 正常组给药为 PO（灌胃）空白溶媒和腹腔注射空白 PBS 溶液；空白对照组给药为 PO（灌胃）空白溶媒和腹腔注射造模剂 IL-12/IL-18。

表 22：实验动物分组及给药方案（第一次实验）

组别	药物	剂量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药频率	N
1	Normal 正常组	/	10	QD	3
2	空白对照组	/	10	QD	6
3	WX-011A	3	10	QD	6
4	WX-011A	10	10	QD	6

表 23：实验动物分组及给药方案（第二次实验）

组别	药物	剂量(mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药频率	N
----	----	-----------	--------------	------	---

1	Normal 正常组	/	10	QD	3
2	空白对照组	/	10	QD	6
3	WX-020	3	10	QD	6
4	WX-020	10	10	QD	6

2) 给药和样品采集

- a) 根据分组对小鼠进行灌胃 (PO 给药) 给予化合物制剂或溶剂对照;
- b) 1 小时后, 每只小鼠腹腔注射 IL-12 (0.01 $\mu\text{g}/\text{只}$) 或 PBS 缓冲溶液;
- c) IL-12 给药 1 小时后, 每只小鼠腹腔注射 IL-18 (1 $\mu\text{g}/\text{只}$) 或 PBS 缓冲溶液;
- d) IL-18 给药 3 小时后采血, 并分离血清。

3) 血清样本 ELISA 检测

- a) 使用前, 将所有试剂充分混匀, 避免产生泡沫。
- b) 根据实验孔 (空白和标准品) 数量, 确定所需的板条数目。样本 (含标准品) 和空白做复孔。
- c) 加样: 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入稀释后的 Cytokine standard 至标准品孔, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入样本至样本孔, 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 Dilution buffer R (1 \times) 至空白对照孔。
- d) 加检测抗体: 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 Biotinylated antibody 工作液。混匀后, 盖上封板膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 分钟。
- e) 洗板: 扣去孔内液体, 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 1 \times Washing buffer 工作液; 停留 1 分钟后弃去孔内液体。重复 4 次, 每一次在滤纸上扣干。
- f) 加酶: 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 Streptavidin-HRP 工作液。盖上封板膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟。
- g) 洗板: 重复步骤 5。
- h) 显色: 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加入 TMB, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 5-30 分钟, 根据孔内颜色的深浅 (深蓝色) 来判定终止反应。通常显色 10-20 分钟可以达到很好的效果。
- i) 终止反应: 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 迅速加入 Stop solution 终止反应。
- j) 读板: 终止后 10 分钟内, 用检测波长 (measurement wavelength) 450 nm 读值。推荐用双波长即检测波长 (measurement wavelength) 450 nm、参考波长或校正波长 (reference wavelength) 610-630 nm 同时读板。

4) 数据分析

根据标曲计算各个样品的表达量, 对各组结果进行统计学分析, 包括均值和标准差 (SEM)。每一组信号值均以空白对照组为基数进行归一化处理。基于此数据进行统计学分析评估组间差异。T-test 进行分析, 三组或多组间比较用 one-way ANOVA 进行分析。所有数据使用 GraphPad Prism 6.02 进行分析。化合物单次给药后对血清 IFN- γ 的抑制率见表 24。

表 24: 化合物单次给药后对血清 IFN- γ 的抑制率

化合物	剂量	血清 IFN- γ 抑制率 (%)
WX-011A	3 mg/kg	64%
WX-011A	10 mg/kg	96%
WX-020	3 mg/kg	40%
WX-020	10 mg/kg	86%

结论：本发明化合物对 IL-12/IL-18 诱导的小鼠 IFN γ 的释放具有显著的剂量依赖性抑制作用。

实验例 9：CD40 抗体诱导的小鼠急性肠炎模型体内药效学实验

本实验的目的是在 CD40 抗体诱导的小鼠肠炎模型上评价化合物对肠炎的缓解作用。

1 实验材料

1) 实验动物

CB-17 SCID 小鼠，8 周龄，体重 18-20 克，雌性，供应商为北京维通利华实验动物技术有限公司。

2) 试剂：见表 25

表 25：试剂信息

试剂	来源
Anti-CD40 抗体	BioXCell
IL-12 P40 抗体	BioXcell
隐血试剂（匹拉米洞法）	珠海贝索生物技术
生理盐水	山东科伦药业
杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)	Corning

2 实验方法

1) 实验设计

CB-17 SCID 小鼠随机分组。每组 6 只小鼠，于 Day0 腹腔注射 (IP) CD40 抗体（每只小鼠 80 微克）。阳性药 IL-12 P40 抗体与测试化合物于 Day-1 天开始给药至 Day4 结束，Day5 为实验终点。动物具体分组见表 26。阳性药 IL-12 P40 抗体给药途径为腹腔注射 (IP)，三天一次；测试化合物给药途径为灌胃 (PO)，一天两次 (BID)。

表 26：动物分组及给药方案

组别	药物	给药剂量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药途径	给药频率	动物数
1	空白对照组	---	10	PO	BID	6

2	IL-12 P40 抗体	20	10	IP	Once/3days	6
3	WX-011A 盐酸盐	30	10	PO	BID	6
4	WX-011A 盐酸盐	50	10	PO	BID	6
5	WX-020 硫酸盐	50	10	PO	BID	6
6	WX-020 硫酸盐	100	10	PO	BID	6

2) 药物配制

化合物均以10%DMSO+10%soluol+80%(10%HP- β -CD)为溶媒配成澄清溶液,用于PO(灌胃)组给药。
给药体积参数:根据小鼠体重10 mL/kg。

IL-12 P40抗体配制方法:取适量IL-12 P40抗体原液于15 mL离心管内,加入一定体积的DPBS,配制成浓度为2 mg/mL的工作液,轻摇混匀,现配现用。

3) 模型构建

IL-12 P40 抗体、受试化合物从 Day-1 开始给药到 Day4 结束。Day 0, 给药 30 分钟后,腹腔注射 200 微升 CD40 抗体(4 mg/kg), 而空白对照组小鼠腹腔对照 200 微升 DPBS。在实验期间记录体重并对粪便评分。

4) 动物粪便观察过程的描述

粪便评分,首先将每只小鼠单独放进特制笼子中,放置 10 分钟左右,进行评分,粪便评分标准按照表 27 进行。

5) 粪便隐血测定的方法描述

如果看到粪便或肛门处有血的话,不再测定隐血。其余未见明显血便小鼠的粪便会收集起来,进行隐血的测定。我们会基于每天 Normal 组小鼠的隐血测定为 0 的假定进行隐血评分。每天观察 4 只空白对照组小鼠的粪便在隐血测定试纸条上显色的时间,4 只空白对照组小鼠粪便中 fastest 显色所需的时间,设定为每天的阈值。若粪便低于这个时间点开始出现颜色,并且 1-2 分钟内,颜色越来越深,给 2 分。如果在这个阈值时间内未见明显的颜色或颜色很弱,后面有颜色出现,但颜色深度明显低于 2 分小鼠粪便的颜色,给 1 分。

4 数据获得

每天记录动物的体重及 DAI 评分,用于评价各组动物发病情况及测试化合物对疾病的影响。日常疾病指数(DAI)评分由 3 部分组成,具体标准参考表 27。结果见表 28。DAI 评分见表 29。

注: Mean 表示平均值。

表 27: DAI 评分标准

评分	体重降低%	大便性状	隐血或血便
----	-------	------	-------

0	0	正常	隐血阴性
1	1~5	软便	隐血弱阳性
2	6~10	松散便	隐血阳性
3	11~20	稀便	少量血迹
4	>20	水样便	大量血迹

表 28: 小鼠体重变化率 (%)

组别	Day	体重变化率 (%)						
		-1	0	1	2	3	4	5
空白对照组	Mean	100.00	97.58	98.63	89.07	86.11	92.24	93.88
IL-12 P40 抗体, 20mg/kg	Mean	100.00	100.28	101.07	98.73	102.65	104.08	108.98
WX-011A 盐酸盐 50 mg/kg, BID	Mean	100.00	100.63	99.54	97.69	100.43	100.96	99.34
WX-011A 盐酸盐 30 mg/kg, BID	Mean	100.00	100.60	100.01	95.93	98.85	99.69	97.07
WX-020 硫酸盐 100 mg/kg, BID	Mean	100.00	100.78	99.88	97.14	99.65	101.16	100.90
WX-020 硫酸盐 50 mg/kg, BID	Mean	100.00	100.48	98.37	95.22	100.73	100.81	100.44

表 29: DAI 评分

组别	Day	DAI 评分						
		-1	0	1	2	3	4	5
空白对照组	Mean	0.00	0.67	1.33	4.33	5.17	3.17	2.67
IL-12 P40 抗体, 20mg/kg	Mean	0.00	0.33	0.33	1.17	0.67	0.00	0.00
WX-011A 盐酸盐 50 mg/kg, BID	Mean	0.00	0.33	1.00	1.83	0.67	0.50	1.17
WX-011A 盐酸盐 30 mg/kg, BID	Mean	0.00	0.17	1.00	2.17	0.83	0.50	1.00
WX-020 硫酸盐	Mean	0.00	0.33	1.33	1.67	0.50	0.33	0.33

100 mg/kg, BID								
WX-020 硫酸盐 50 mg/kg, BID	Mean	0.00	0.33	1.17	2.67	0.83	0.33	0.50

结论：在 CD40 抗体诱导的小鼠肠炎模型中，本发明化合物在不同剂量下，在控制体重降低和降低 DAI 评分两个指标上均显著优于空白对照组，本发明化合物对 CD40 抗体诱导的小鼠肠炎具有显著的缓解作用。

实验例 10：IL-23 诱导的小鼠银屑病样模型的药效实验

本试验目的是通过小鼠耳廓皮内注射 IL-23 诱发银屑病样皮损模型，评价受试物对 IL-23 诱导的小鼠银屑病样皮损有否防治作用。

1 实验材料

1) 实验动物

C57BL/6 小鼠，SPF 级，体重 19 ± 2 g，雌性，来源为上海市计划生育科学研究所实验动物经营部。适应环境时间为 5-7 天。

2) 试剂：见表 30

表 30：试剂信息

试剂	来源
重组人白介素 23 (IL-23)	Novoprotein
Ustekinumab (anti-IL-12/IL-23)	Selleck
灭菌注射用水	广东艾希德药业有限公司
生理盐水	济民健康管理股份有限公司

3 实验方法

1) 实验设计

将体重合格的雌性 C57BL/6 小鼠随机分组法分组，每组 6 只，分组及给药信息如下。组别分别为：空白对照组、模型组、阳性药对照 Ustekinumab (5 mg/kg) 组、WX-011A 盐酸盐 (30、50 mg/kg) 组、WX-020 硫酸盐 (30、50 mg/kg) 组。除空白对照组外，其余各组动物右耳连续 8 天 (day0~day7) 皮内注射 IL-23 (3 μ g/10 μ L/mouse/day, QD)，空白对照组动物右耳连续 8 天 (day0~day7) 皮内注射等体积的生理盐水溶液 (10 μ L/mouse/day, QD)。造模同时口服给予溶媒、受试药物，一天两次 (Bid)，间隔时间为 6 h，连续 8 天 (day0~day7)。阳性对照于 day0 和 day3 皮下注射给药 (共 2 次)。给药期间，每两天监测一次动物体重。在 Day0、Day2、Day4、Day6 (均为 IL-23 注射前)、Day8 对小鼠右耳进行厚度测量和耳廓外观观察评分。动物分组及给药方案见表 31。

表 31：动物分组及给药方案

组别	药物	单次给药剂量 (mg/kg)	给药体积 (mL/kg)	给药途径和频率
1	空白对照组	溶剂	10	PO/BID
2	模型组	溶剂	10	(间隔 6 h 给药)
3	Ustekinumab (anti-IL-12/IL-23)	5	10	SC (Day0 和 Day3 给药)
4	WX-011A 盐酸盐	30	10	PO/BID (间隔 6 h 给药)
5		50	10	
6	WX-020 硫酸盐	30	10	
7		50	10	

*SC: 皮下注射; PO: 口服; BID: 一天两次

2) 仪器: 见表32

表32: 仪器信息

仪器	型号	厂家
电子显数千分尺	0-10X30	浙江德清盛泰芯电子科技有限公司
电动耳肿打耳器	YLS-25A	济南益延科技发展有限公司

3) 药物配制

化合物均以10%DMSO+10%solurol+80%(10%HP-β-CD)为溶媒配成澄清溶液,用于PO(灌胃)组给药。给药体积参数: 根据小鼠体重10 mL/kg。

造模剂IL-23配制方法: 取3瓶, 每瓶(500 μg)加入1.667 mL的灭菌注射用水, 震荡混匀后, 转移至10 mL的EP管中, 震荡混匀, 即得0.3 mg/mL的IL-23溶液。分成8份, 分装后储存在-80°C冰箱中。

Ustekinumab (anti-IL-12/IL-23)配制方法: 吸取规格为5 mg/mL的Ustekinumab (anti-IL-12/IL-23) 0.15 mL, 加入1.35 mL的PBS (PH7.2) 溶液稀释, 即得0.5 mg/mL的Ustekinumab (anti-IL-12/IL-23)溶液。

3) 模型构建和给药

动物分组后, 右耳连续 8 天 (day0~day7) 皮内注射 IL-23 (3 μg/10 μL/mouse/day, QD), 在 Day0、Day2、Day4、Day6(均为 IL-23 注射前)、Day8 对小鼠右耳进行厚度测量和耳廓外观观察评分。实验结束时(Day8), 取受试物(G4~G10)组小鼠的左耳组织(每组每个时间点 3 只动物), 摘取其造模侧耳朵(右耳), 用 8 mm 打孔器沿耳廓边缘打一耳片并称其重量, 打下的右耳片用福尔马林固定后, 进行组织病理学检查(H&E)染色。

给药: 造模同时给予相应药物治疗。除阳性对照药(Ustekinumab)在 day0 和 day3 皮下注射(一天一次)给药外, 对照药和受试药各剂量组动物按照应给予药业经口灌胃给药, 一天两次, 间隔时间为 6 小时,

连续 8 天 (day0~day7)。

根据如下表 33 的标准对小鼠耳部组织切片进行病理评分：

表 33：病理评分标准

评分	角化程度	表皮厚度	真皮厚度	炎性细胞浸润
0	相对正常	相对正常	相对正常	相对正常
1	轻度	轻度	轻度	轻度
2	中度	中度	中度	中度
3	中度到显著	中度到显著	中度到显著	中度到显著
4	显著	显著	显著	显著

4) 数据统计

实验数据以 Mean±SD 表示；数据运用 IBM SPSS Statistics 21 进行统计分析，两组间数据 $p < 0.05$ 认为是显著性差异。受试物对 IL-23 诱导小鼠耳廓表皮异常增生模型小鼠耳厚度的影响见表 34。受试物对 IL-23 诱导小鼠耳廓表皮异常增生总评分及其 AUC 的影响见表 35。受试物对 H&E 染色后的右耳组织切片病理评分的影响见表 36。

表 34：受试物对 IL-23 诱导小鼠耳廓表皮异常增生模型小鼠耳厚度的影响 (\bar{x})

组别	耳厚度 (mm)/天				
	Day0	Day2	Day4	Day6	Day8
空白对照组	0.196	0.211	0.213	0.213	0.217
模型组	0.198	0.297	0.354	0.446	0.482
Ustekinumab 5 mg/kg, SC	0.196	0.277*	0.288**	0.316**	0.329*
WX-011A 盐酸盐 30 mg/kg, BID	0.199	0.274*	0.299*	0.297**	0.301**
WX-011A 盐酸盐 50 mg/kg, BID	0.197	0.279 ^{p=0.081}	0.291**	0.299**	0.300**
WX-020 硫酸盐 30 mg/kg, BID	0.197	0.283	0.311	0.351**	0.343 ^{p=0.082}
WX-020 硫酸盐 50 mg/kg, BID	0.195	0.289	0.303*	0.311**	0.317**

$P < 0.01$ vs. 空白对照组* $P < 0.05$ vs. 模型组** $P < 0.01$ vs. 模型组表 35: 受试物对 IL-23 诱导小鼠耳廓表皮异常增生总评分及其 AUC 的影响 (\bar{x})

组别	耳廓表皮异常增生总评分/天					AUC
	Day0	Day2	Day4	Day6	Day8	
空白对照组	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	0.00	0.00	2.33 ^{##}	5.83 ^{##}	7.83 ^{##}	24.17 ^{##}
Ustekinumab 5 mg/kg, SC	0.00	0.00	0.33*	0.67**	0.83**	2.83**
WX-011A 盐酸盐 30 mg/kg, BID	0.00	0.00	0.33*	0.67**	1.17**	3.17**
WX-011A 盐酸盐 50 mg/kg, BID	0.00	0.00	0.17**	0.67**	1.00*	2.67**
WX-020 硫酸盐 30 mg/kg, BID	0.00	0.00	0.50*	2.5	1.67*	7.67
WX-020 硫酸盐 50 mg/kg, BID	0.00	0.00	0.50*	1.33*	1.33**	5.00*

$P < 0.01$ vs. 空白对照组* $P < 0.05$ vs. 模型组** $P < 0.01$ vs. 模型组表 36: 受试物对 H&E 染色后的右耳组织切片病理评分的影响 (\bar{x})

组别	病理评分				
	角化程度	表皮厚度	真皮厚度	炎性细胞 浸润	病理综合 评分
空白对照组	0.00	0.17	0.00	0.33	0.50
模型组	1.67 ^{##}	2.50 ^{##}	2.17 ^{##}	3.00 ^{##}	9.33 ^{##}
Ustekinumab 5 mg/kg, SC	0.50**	1.17**	0.67	1.17**	3.50**
WX-011A 盐酸盐	0.17**	0.67**	0.17	0.17**	1.17**

30 mg/kg, BID					
WX-011A 盐酸盐 50 mg/kg, BID	0.33**	0.50**	0.50	0.50**	1.83**
WX-020 硫酸盐 30 mg/kg, BID	0.83**	0.83**	1.33	1.17**	4.17**
WX-020 硫酸盐 50 mg/kg, BID	0.33**	0.67**	0.50	0.67**	2.17**

$P < 0.01$ vs. 空白对照组

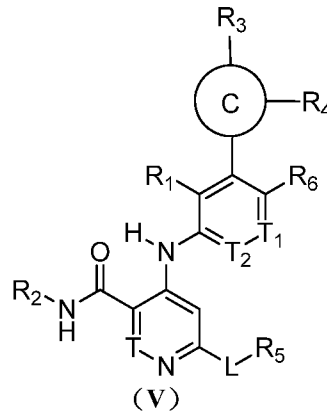
* $P < 0.05$ vs. 模型组

** $P < 0.01$ vs. 模型组

结论：相比模型组，本发明化合物在不同剂量下，在造模侧耳厚度增加、造模侧耳朵总评分、耳组织切片病理综合评分等维度上，对 IL-23 诱导的小鼠银屑病样症状具有显著的缓解作用，均展现了显著药效。

权 利 要 求

1. 式 (V) 所示化合物或其药学上可接受的盐,



其中,

L 选自 -NH-、-NHC(=O)-、-NHC(=O)O- 和 -NHC(=O)NH-;

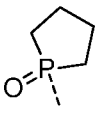
T、T₁ 和 T₂ 分别独立地选自 N 和 CH, 所述 CH 任选被 1 个卤素取代;

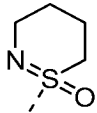
R₁ 选自 C₁₋₃ 烷氧基, 所述 C₁₋₃ 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代;

R₂ 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基, 所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代;

环 C 选自苯基和 6 元杂芳基;

R₃ 选自 -P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₄ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)_n-4-5 元杂环

烷基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₄ 烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)(=NR)C₃₋₅ 环烷基、 和

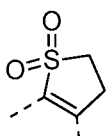
, 所述 -P(=O)(C₁₋₃ 烷基)₂、-P(=O)(C₃₋₅ 环烷基)₂、-S(=O)_nC₁₋₄ 烷基、-S(=O)_nC₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)_n-4-

5 元杂环烷基、-S(=O)_nNH₂、-S(=O)(=NR)C₁₋₄ 烷基、-S(=O)(=NR)C₁₋₃ 烷氨基、-S(=O)(=NR)C₃₋₅ 环烷基、

 和  分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代;

R₅ 选自 C₁₋₃ 烷基、C₃₋₅ 环烷基和 5-6 元杂芳基, 所述 C₁₋₃ 烷基、C₃₋₅ 环烷基和 5-6 元杂芳基分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代;

R₄ 和 R₆ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br 和 I;

或者, R₃ 和 R₄ 与它们相连的碳原子共同构成  ;

R_a 和 R_b 分别独立地选自 H、D、F、Cl、Br 和 I;

R_c 选自 F、Cl、Br、I 和 C₁₋₃ 烷基；

R 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基；

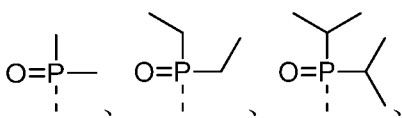
n 为 1 或 2；

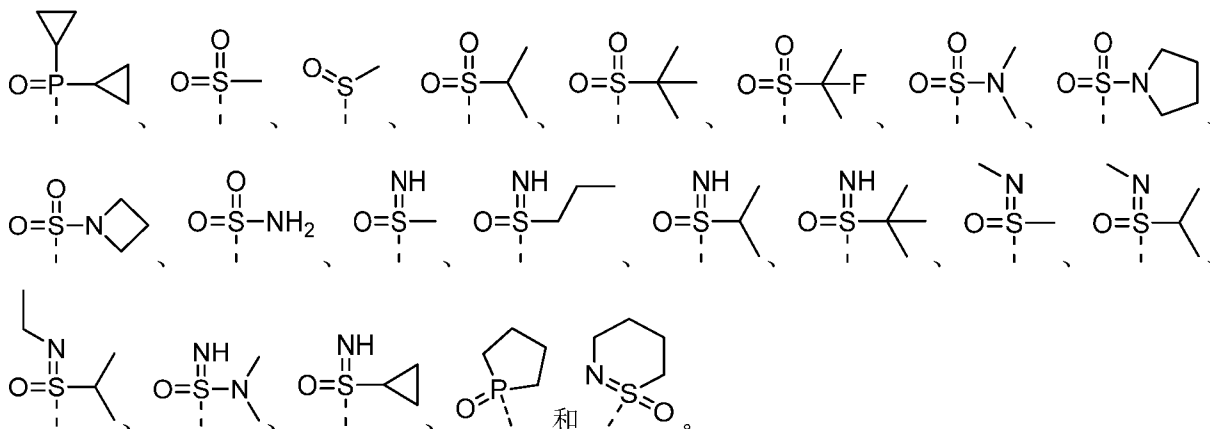
条件是：

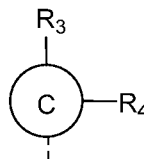
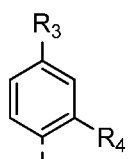
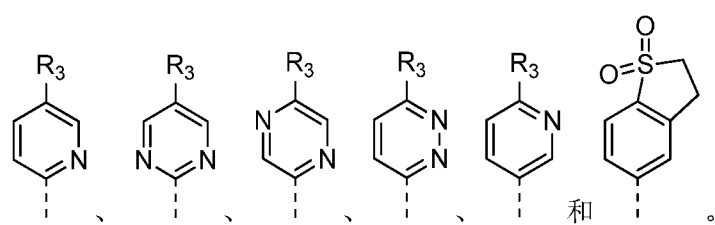
T 为 N 时，R₃ 不为 -S(=O)_nC₁₋₄ 烷基；

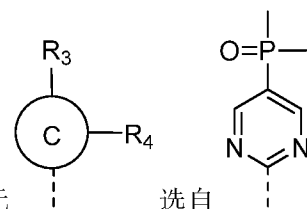
所述 4-5 元杂环烷基和 5-6 元杂芳基的“杂”选自 1、2 或 3 个独立选自 -O-、-NH-、-S- 和 -N- 的杂原子或杂原子团。

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，R₁ 选自 OCH₃，所述 OCH₃ 任选被 1、2 或 3 个 R_a 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，R₁ 选自 OCH₃ 和 OCF₃。
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，R₂ 选自 H 和 CH₃，所述 CH₃ 任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代。
5. 根据权利要求 4 所述化合物或其药学上可接受的盐，其中，R₂ 选自 H、CH₃ 和 CD₃。

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，R₃ 选自 

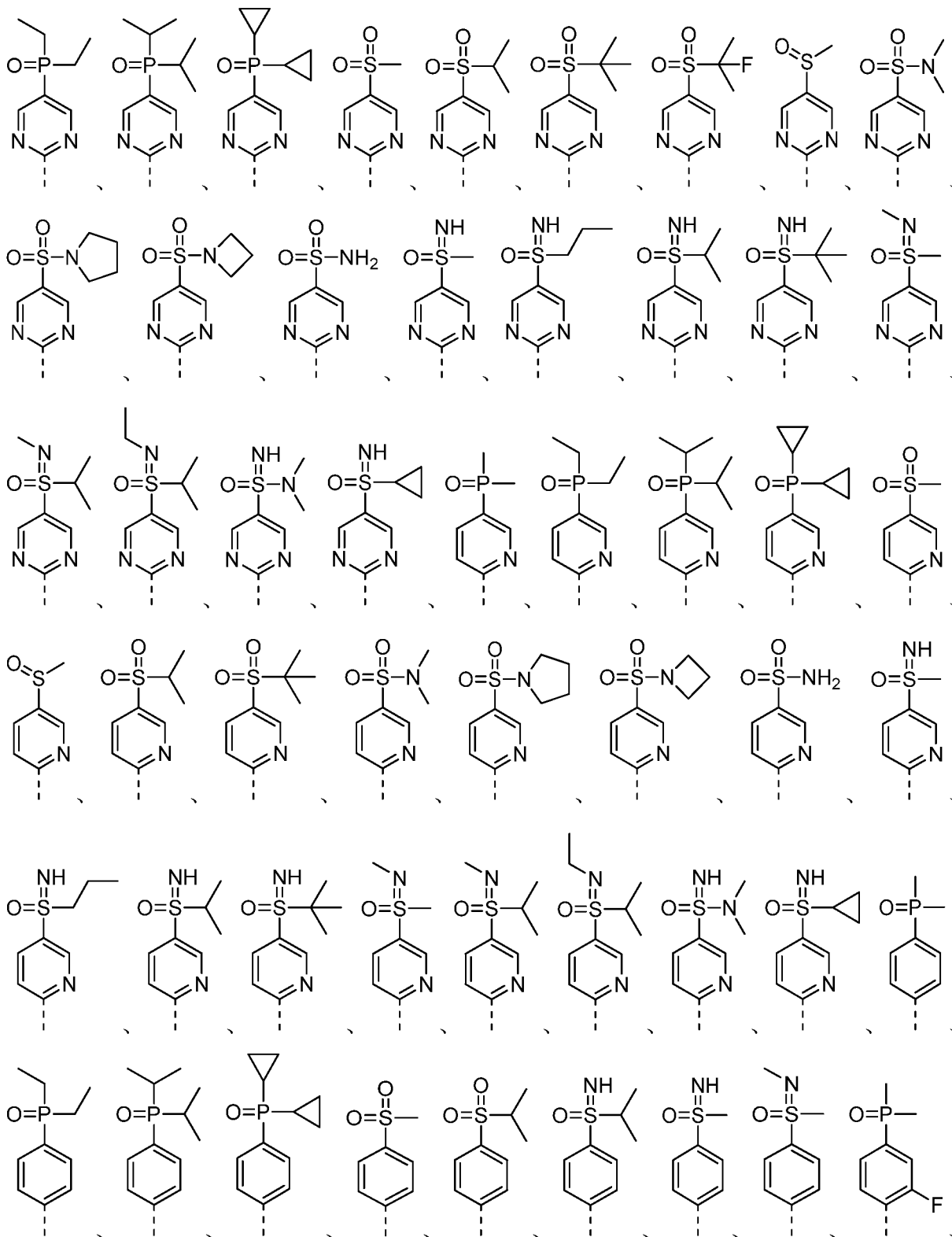


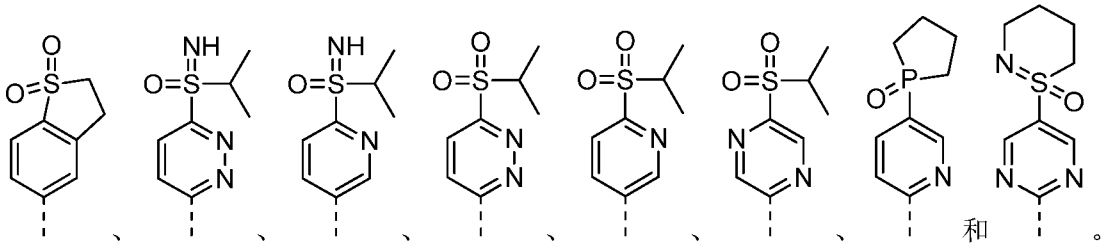
7. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐，其中，结构单元  和  选自 






8. 根据权利要求 6 或 7 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, 结构单元

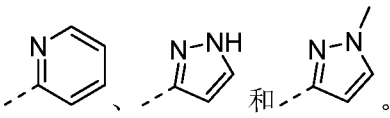
选自

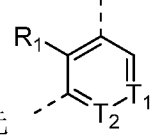
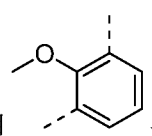


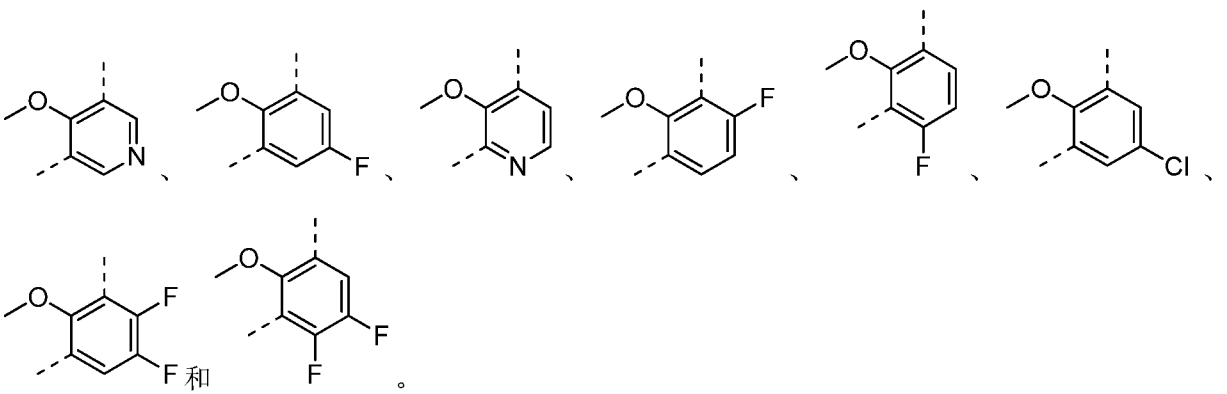


9. 根据权利要求1所述化合物或其药学上可接受的盐，其中，R₅选自CH₃、环丙基、咪唑基、吡唑基和吡啶基，所述CH₃、环丙基、咪唑基、吡唑基和吡啶基分别独立地任选被1、2或3个R_c取代。

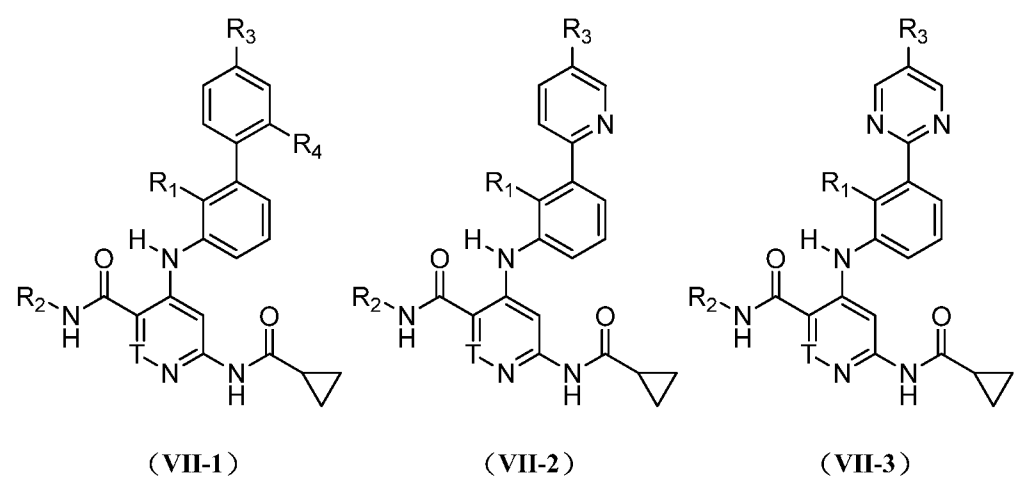
10. 根据权利要求9所述化合物或其药学上可接受的盐，其中，R₅选自CH₃、、、、

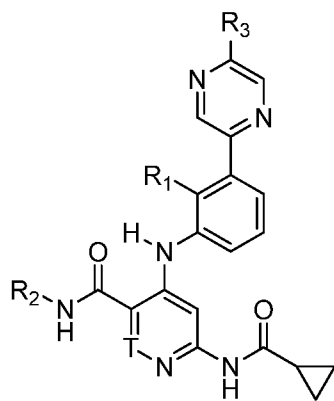


11. 根据权利要求1所述化合物或其药学上可接受的盐，其中，结构单元  选自 、

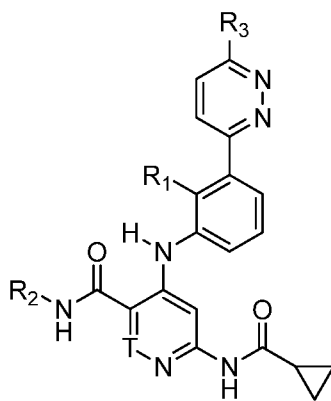


12. 根据权利要求1~11任意一项所述化合物或其药学上可接受的盐，其选自：

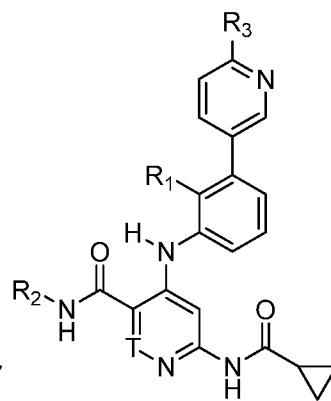




(VII-4)



(VII-5)

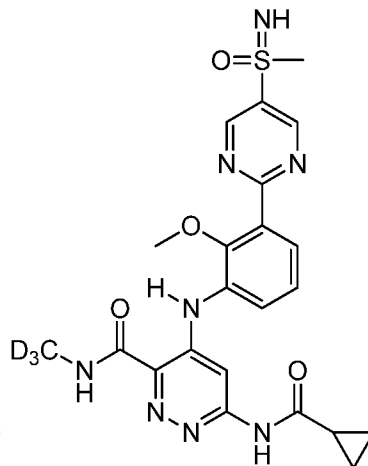
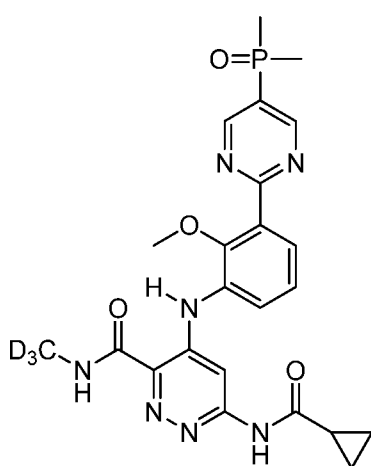
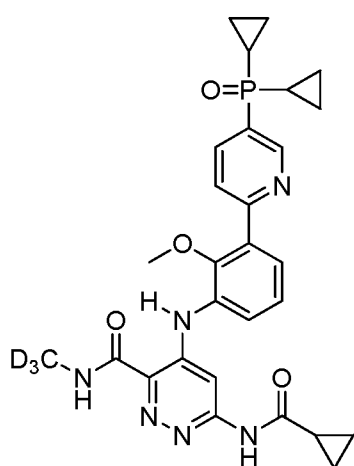
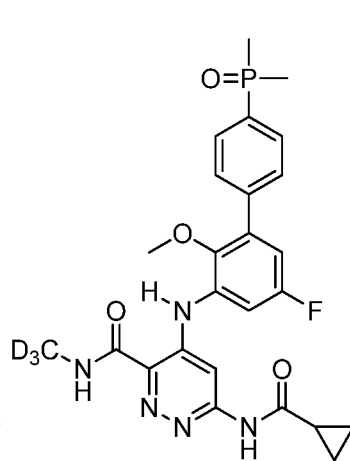
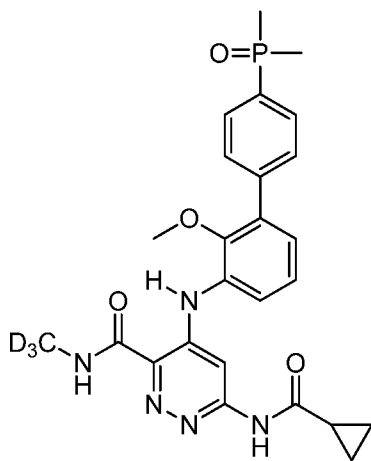
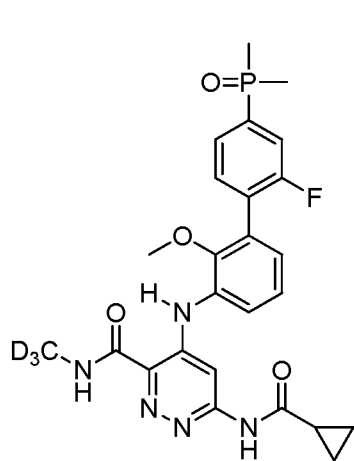


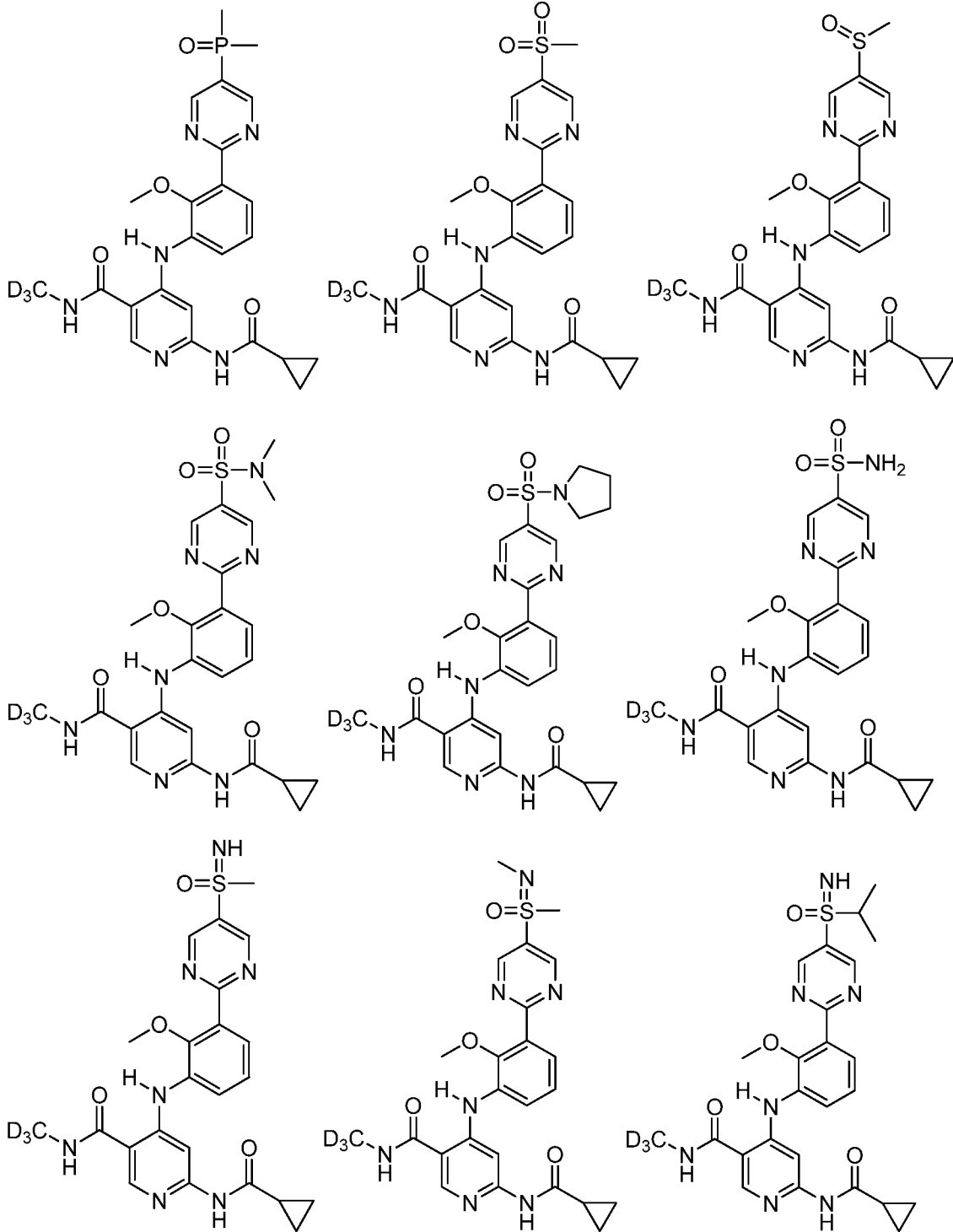
(VII-6)

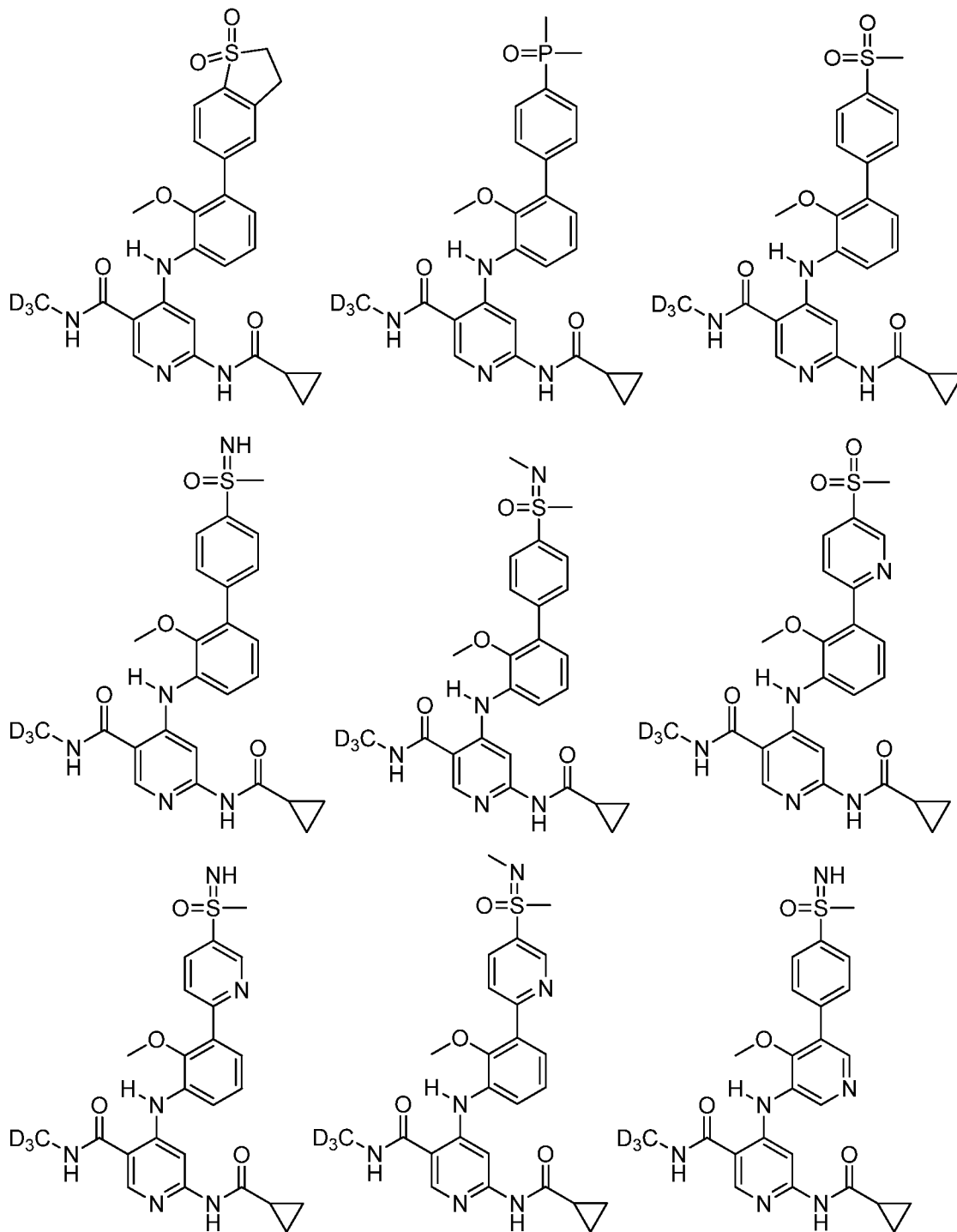
其中,

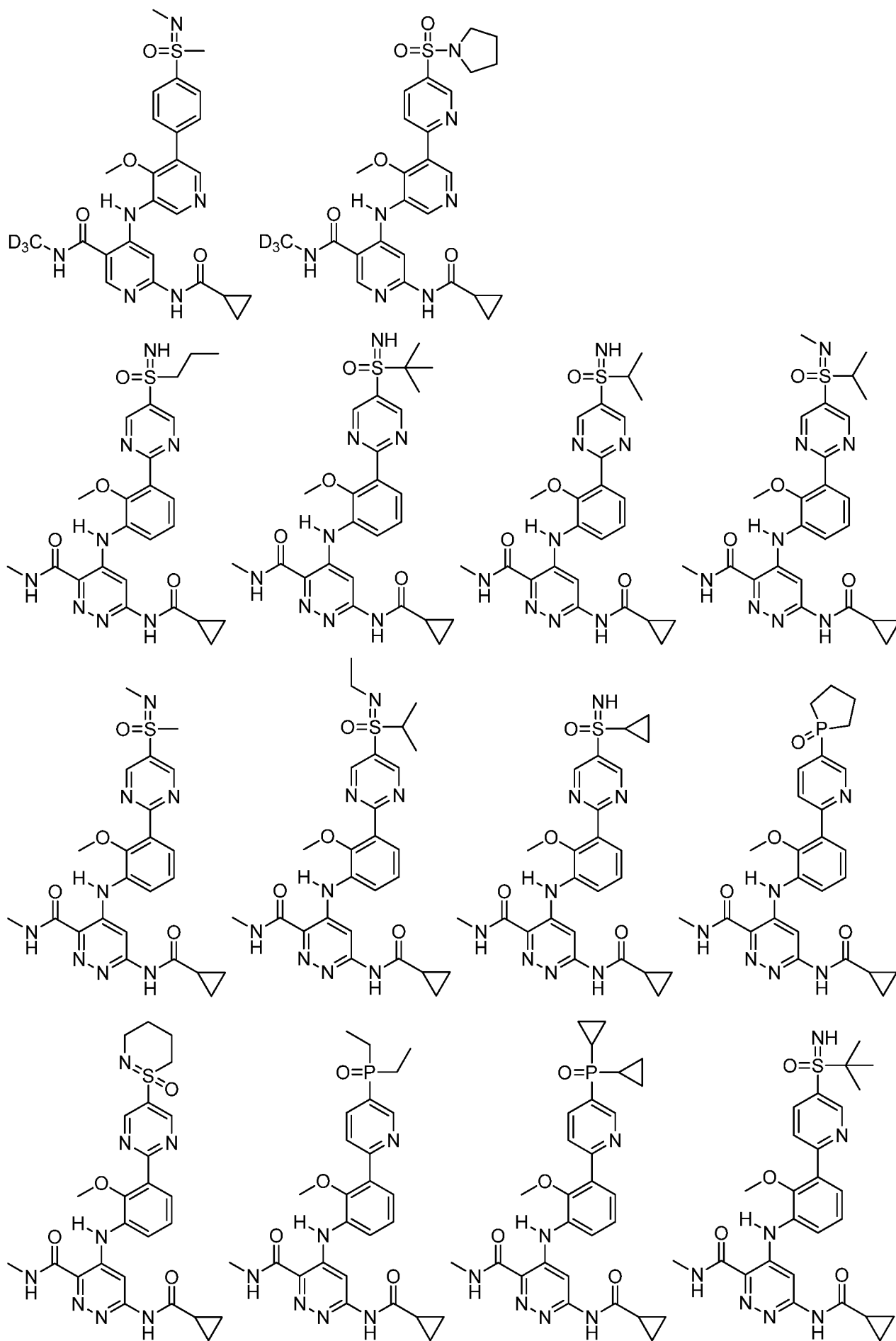
R₁、R₂、R₃、R₄和T如权利要求1~11任意一项所定义。

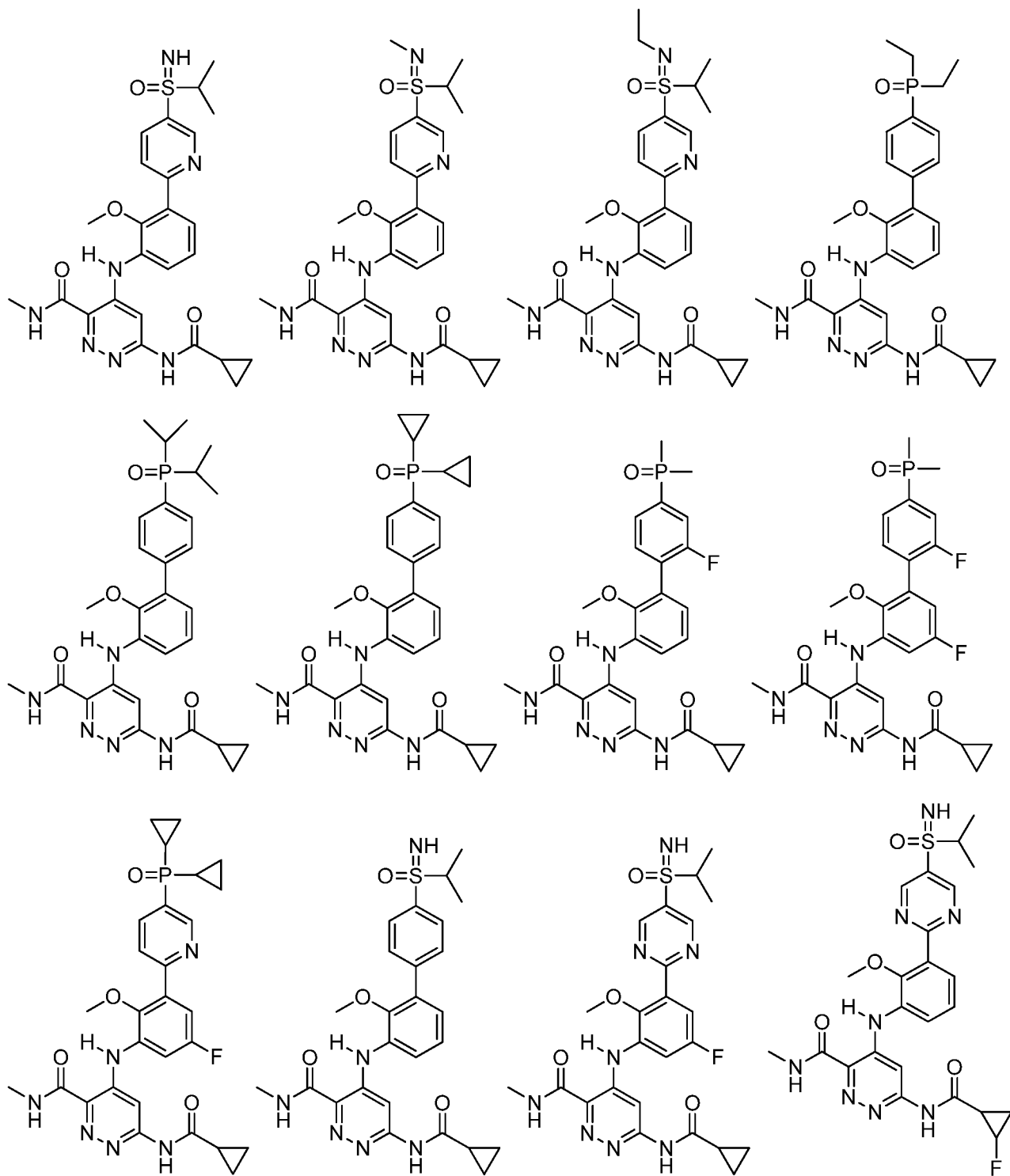
13. 下式所示化合物或其药学上可接受的盐,

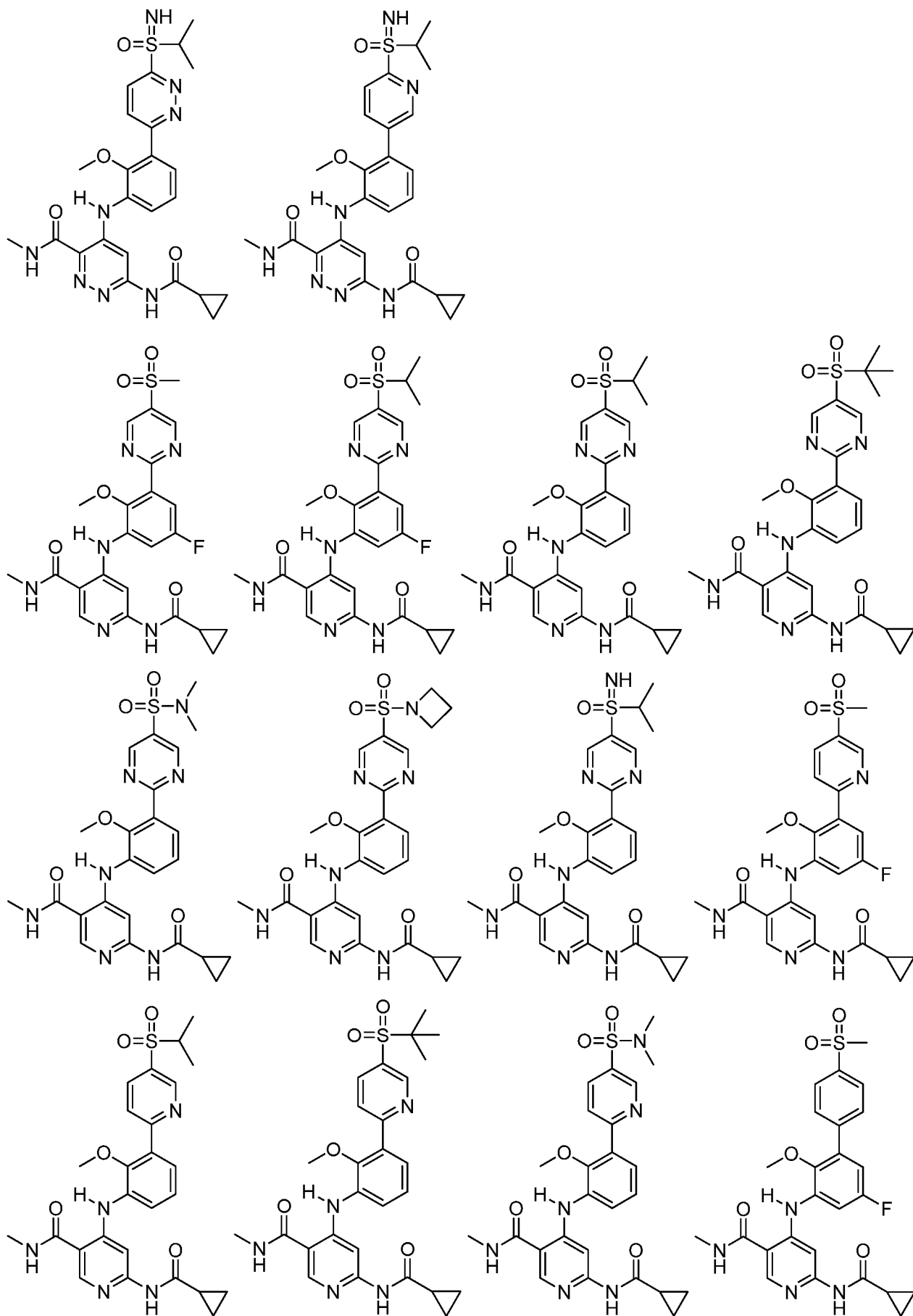


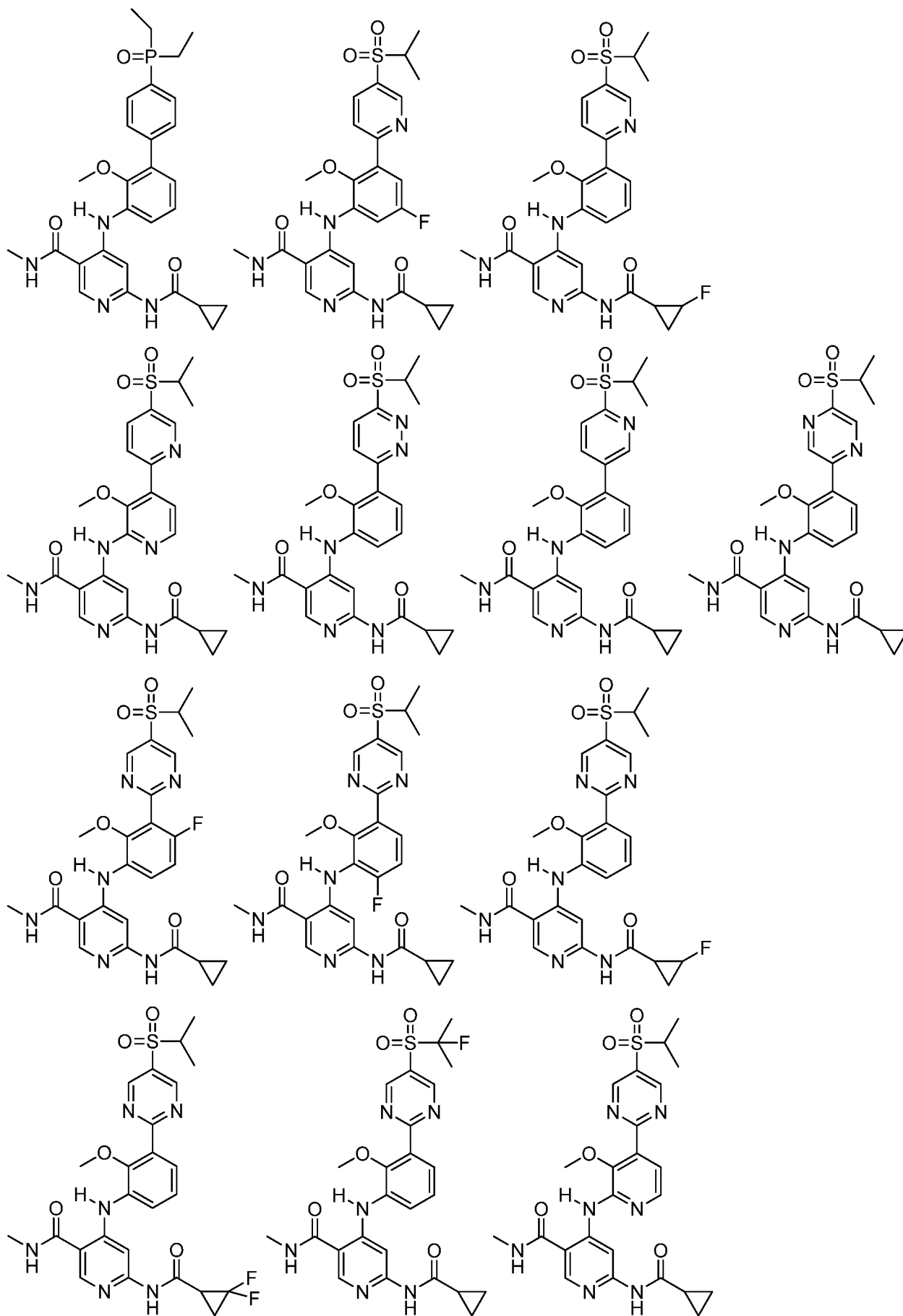




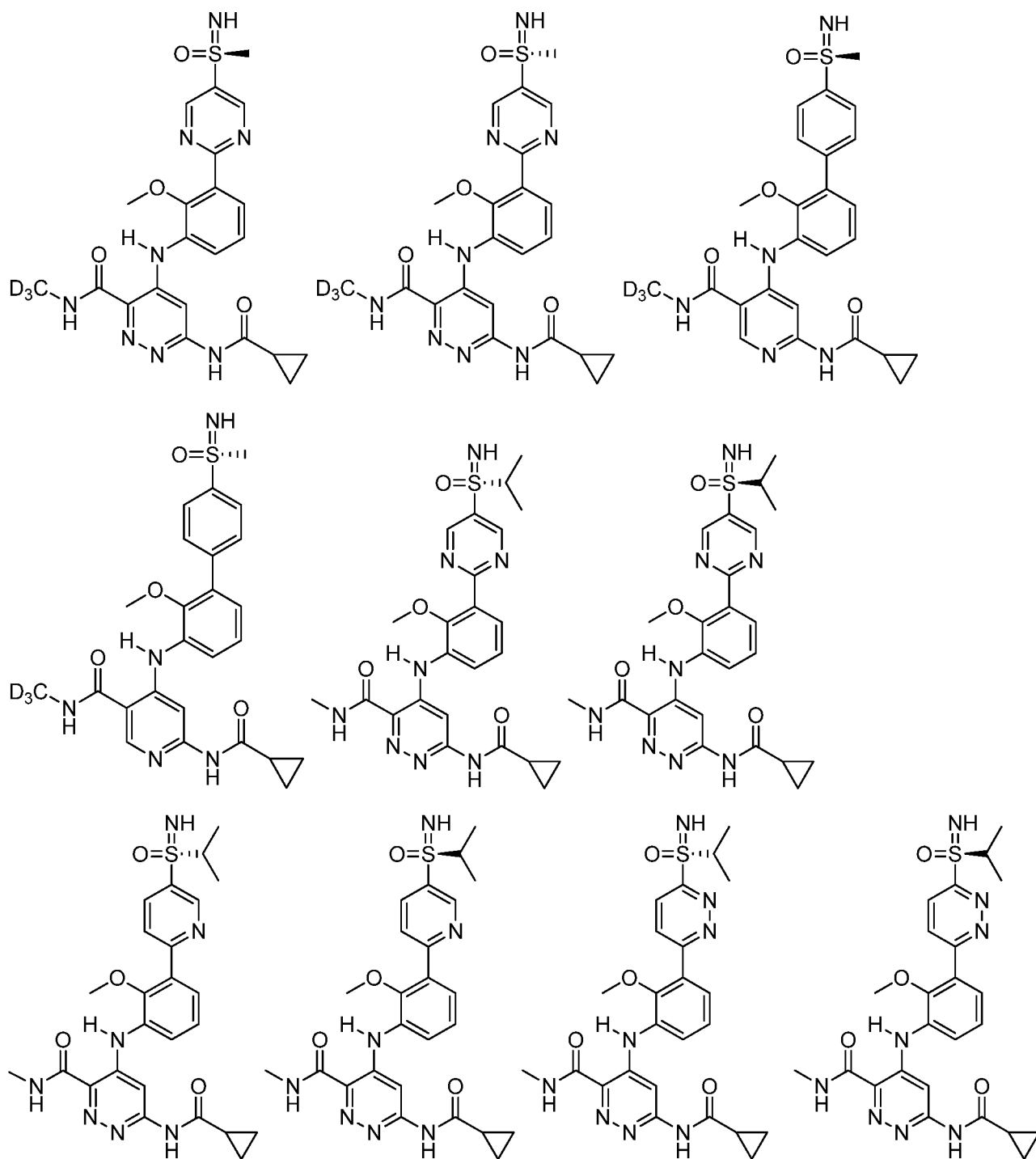


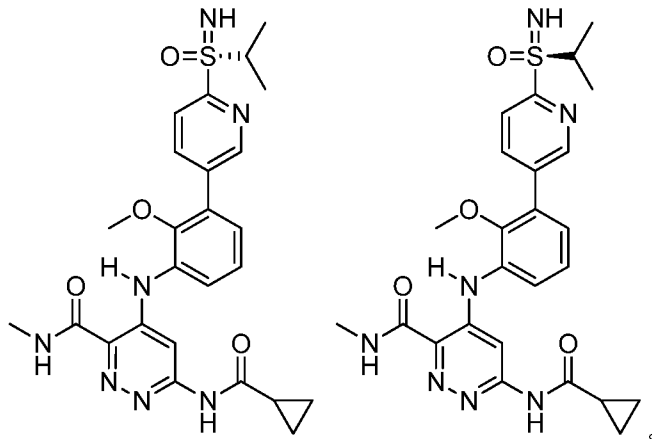






14. 根据权利要求 13 所述化合物或其药学上可接受的盐，其选自：





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/106053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07D 401/12(2006.01)i; C07D 401/14(2006.01)i; C07D 403/12(2006.01)i; C07D 403/14(2006.01)i; C07D 413/12(2006.01)i; C07D 413/14(2006.01)i; C07D 417/12(2006.01)i; C07D 417/14(2006.01)i; C07D 487/04(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D401/-, C07D403/-, C07D413/-, C07D417/-, C07D487/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI Web of Knowledge, STN (REGISTRY, CAPLUS, MARPAT) : 南京明德新药研发有限公司, 硫, 磷, 酪氨酸激酶, 抑制剂, 肠炎, 银屑病, JAK, TYK, sulfur, phosphorus, tyrosine kinase, inhibitor, enteritis, psoriasis, structural formula search.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2022105771 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 27 May 2022 (2022-05-27) abstract, claim 1, and description, page 17 compound 5P	1, 14
PX	WO 2021222153 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 04 November 2021 (2021-11-04) abstract, and description, pages 104-105 compounds 110 and 111	1-14
X	WO 2020086616 A1 (FRONTHERA U. S. PHARMACEUTICALS LLC.) 30 April 2020 (2020-04-30) abstract, and claims 1-45	1-14
X	WO 2020092196 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 07 May 2020 (2020-05-07) abstract, claim 1, and table 1 embodiment compounds 4, 32, 38, and 44	1-14
X	CN 104884454 A (BRISTOL MYERS SQUIBB CO.) 02 September 2015 (2015-09-02) abstract, claim 1, and description, embodiment compounds 190 and 201	1-14
X	CN 111936486 A (BRISTOL MYERS SQUIBB CO.) 13 November 2020 (2020-11-13) abstract, claim 1, and description, table 5 embodiment compounds 111-113, 115 and 116	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 August 2022		Date of mailing of the international search report 27 September 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/106053

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2022105771	A1	27 May 2022	None	
WO	2021222153	A1	04 November 2021	None	
WO	2020086616	A1	30 April 2020	SG 11202104017V A CN 113490664 A CL 2021000989 A1 US 2020354338 A1 JP 2022505987 A US 2022235035 A1 KR 20210095634 A EP 3870579 A1 CA 3117200 A1 IL 282487 A BR 112021007679 A2 AU 2019364336 A1	28 May 2021 08 October 2021 29 October 2021 12 November 2020 14 January 2022 28 July 2022 02 August 2021 01 September 2021 30 April 2020 30 June 2021 27 July 2021 27 May 2021
WO	2020092196	A1	07 May 2020	SG 11202104307V A BR 112021007861 A2 IL 282840 A CN 113227071 A JP 2022506445 A AU 2019373203 A1 KR 20210086674 A EP 3873892 A1 EA 202191142 A1 CA 3118094 A1	28 May 2021 03 August 2021 30 June 2021 06 August 2021 17 January 2022 10 June 2021 08 July 2021 08 September 2021 20 July 2021 07 May 2020
CN	104884454	A	02 September 2015	CA 2890981 A1 CY 1121188 T1 US 2018265504 A1 HK 1215255 A1 ES 2914793 T3 EP 2922846 A1 MX 2015005731 A PT 3495358 T ES 2702148 T3 RS 58187 B1 SG 10201706897 T A TW 201422593 A JP 2020002157 A US 2015299183 A1 AU 2018267545 A1 HU E041750 T2 PL 3495358 T3 AU 2020203967 A1 PH 12015501004 A1 DK 3495358 T3 HR P20181937 T1 IL 238610 D0 AU 2013341186 A1 LT 2922846 T US RE47929 E SI 2922846 T1	15 May 2014 29 May 2020 20 September 2018 19 August 2016 16 June 2022 30 September 2015 16 September 2015 02 June 2022 27 February 2019 29 March 2019 28 September 2017 16 June 2014 09 January 2020 22 October 2015 13 December 2018 28 May 2019 27 June 2022 16 July 2020 27 July 2015 23 May 2022 25 January 2019 30 June 2015 02 July 2015 10 December 2018 07 April 2020 30 April 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/106053

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		MA 38072 A1	29 July 2016
		AU 2017201076 A1	09 March 2017
		JP 2018154636 A	04 October 2018
		JP 2016506369 A	03 March 2016
		AR 094452 A1	05 August 2015
		PT 2922846 T	19 December 2018
		SG 10201706985 U A	30 October 2017
		TR 201820824 T4	21 January 2019
		SI 3495358 T1	30 June 2022
		WO 2014074661 A1	15 May 2014
		EA 201590917 A1	30 September 2015
		PE 20150944 A1	20 June 2015
		NZ 708859 A	30 November 2018
		SG 11201503399 X A	28 May 2015
		US 2017022192 A1	26 January 2017
		EP 3495358 A1	12 June 2019
		BR 112015010102 A2	11 July 2017
		MY 175448 A	29 June 2020
		LT 3495358 T	25 May 2022
		KR 20150081339 A	13 July 2015
		UY 35126 A	30 May 2014
		PL 2922846 T3	29 March 2019
		DK 2922846 T3	21 January 2019
<hr/>			
CN 111936486 A	13 November 2020	WO 2019183186 A1	26 September 2019
		KR 20200135425 A	02 December 2020
		EP 3768667 A1	27 January 2021
		US 2021032220 A1	04 February 2021
		JP 2021518389 A	02 August 2021
<hr/>			

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07D 401/12(2006.01)i; C07D 401/14(2006.01)i; C07D 403/12(2006.01)i; C07D 403/14(2006.01)i; C07D 413/12(2006.01)i; C07D 413/14(2006.01)i; C07D 417/12(2006.01)i; C07D 417/14(2006.01)i; C07D 487/04(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07D401/-, C07D403/-, C07D413/-, C07D417/-, C07D487/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI Web of Knowledge, STN (REGISTRY, CAPLUS, MARPAT); 南京明德新药研发有限公司, 硫, 磷, 酪氨酸激酶, 抑制剂, 肠炎, 银屑病, JAK, TYK, sulfur, phosphorus, tyrosine kinase, inhibitor, enteritis, psoriasis, 结构式检索。</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2022105771 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. 等) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 摘要, 权利要求1, 说明书第17页化合物5P</td> <td>1, 14</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2021222153 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2021年11月4日 (2021 - 11 - 04) 摘要, 说明书第104-105页化合物110和111</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020086616 A1 (FRONTHERA U. S. PHARMACEUTICALS LLC) 2020年4月30日 (2020 - 04 - 30) 摘要, 权利要求1-45</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020092196 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2020年5月7日 (2020 - 05 - 07) 摘要, 权利要求1和表1实施例化合物4、32、38、44</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 104884454 A (百时美施贵宝公司) 2015年9月2日 (2015 - 09 - 02) 摘要, 权利要求1, 说明书实施例化合物190和201</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 111936486 A (百时美施贵宝公司) 2020年11月13日 (2020 - 11 - 13) 摘要, 权利要求1, 说明书表5实施例化合物111-113、115和116</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	WO 2022105771 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. 等) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 摘要, 权利要求1, 说明书第17页化合物5P	1, 14	PX	WO 2021222153 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2021年11月4日 (2021 - 11 - 04) 摘要, 说明书第104-105页化合物110和111	1-14	X	WO 2020086616 A1 (FRONTHERA U. S. PHARMACEUTICALS LLC) 2020年4月30日 (2020 - 04 - 30) 摘要, 权利要求1-45	1-14	X	WO 2020092196 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2020年5月7日 (2020 - 05 - 07) 摘要, 权利要求1和表1实施例化合物4、32、38、44	1-14	X	CN 104884454 A (百时美施贵宝公司) 2015年9月2日 (2015 - 09 - 02) 摘要, 权利要求1, 说明书实施例化合物190和201	1-14	X	CN 111936486 A (百时美施贵宝公司) 2020年11月13日 (2020 - 11 - 13) 摘要, 权利要求1, 说明书表5实施例化合物111-113、115和116	1-14
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	WO 2022105771 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. 等) 2022年5月27日 (2022 - 05 - 27) 摘要, 权利要求1, 说明书第17页化合物5P	1, 14																					
PX	WO 2021222153 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2021年11月4日 (2021 - 11 - 04) 摘要, 说明书第104-105页化合物110和111	1-14																					
X	WO 2020086616 A1 (FRONTHERA U. S. PHARMACEUTICALS LLC) 2020年4月30日 (2020 - 04 - 30) 摘要, 权利要求1-45	1-14																					
X	WO 2020092196 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2020年5月7日 (2020 - 05 - 07) 摘要, 权利要求1和表1实施例化合物4、32、38、44	1-14																					
X	CN 104884454 A (百时美施贵宝公司) 2015年9月2日 (2015 - 09 - 02) 摘要, 权利要求1, 说明书实施例化合物190和201	1-14																					
X	CN 111936486 A (百时美施贵宝公司) 2020年11月13日 (2020 - 11 - 13) 摘要, 权利要求1, 说明书表5实施例化合物111-113、115和116	1-14																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年8月19日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年9月27日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>李冰</p> <p>电话号码 86-(10)-53962156</p>																					

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/106053

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2022105771	A1	2022年5月27日	无			
WO	2021222153	A1	2021年11月4日	无			
WO	2020086616	A1	2020年4月30日	SG	11202104017V	A	2021年5月28日
				CN	113490664	A	2021年10月8日
				CL	2021000989	A1	2021年10月29日
				US	2020354338	A1	2020年11月12日
				JP	2022505987	A	2022年1月14日
				US	2022235035	A1	2022年7月28日
				KR	20210095634	A	2021年8月2日
				EP	3870579	A1	2021年9月1日
				CA	3117200	A1	2020年4月30日
				IL	282487	A	2021年6月30日
				BR	112021007679	A2	2021年7月27日
				AU	2019364336	A1	2021年5月27日
WO	2020092196	A1	2020年5月7日	SG	11202104307V	A	2021年5月28日
				BR	112021007861	A2	2021年8月3日
				IL	282840	A	2021年6月30日
				CN	113227071	A	2021年8月6日
				JP	2022506445	A	2022年1月17日
				AU	2019373203	A1	2021年6月10日
				KR	20210086674	A	2021年7月8日
				EP	3873892	A1	2021年9月8日
				EA	202191142	A1	2021年7月20日
				CA	3118094	A1	2020年5月7日
CN	104884454	A	2015年9月2日	CA	2890981	A1	2014年5月15日
				CY	1121188	T1	2020年5月29日
				US	2018265504	A1	2018年9月20日
				HK	1215255	A1	2016年8月19日
				ES	2914793	T3	2022年6月16日
				EP	2922846	A1	2015年9月30日
				MX	2015005731	A	2015年9月16日
				PT	3495358	T	2022年6月2日
				ES	2702148	T3	2019年2月27日
				RS	58187	B1	2019年3月29日
				SG	10201706897T	A	2017年9月28日
				TW	201422593	A	2014年6月16日
				JP	2020002157	A	2020年1月9日
				US	2015299183	A1	2015年10月22日
				AU	2018267545	A1	2018年12月13日
				HU	E041750	T2	2019年5月28日
				PL	3495358	T3	2022年6月27日
				AU	2020203967	A1	2020年7月16日
				PH	12015501004	A1	2015年7月27日
				DK	3495358	T3	2022年5月23日
				HR	P20181937	T1	2019年1月25日
				IL	238610	D0	2015年6月30日
				AU	2013341186	A1	2015年7月2日
				LT	2922846	T	2018年12月10日
				US	RE47929	E	2020年4月7日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/106053

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		SI 2922846 T1	2019年4月30日
		MA 38072 A1	2016年7月29日
		AU 2017201076 A1	2017年3月9日
		JP 2018154636 A	2018年10月4日
		JP 2016506369 A	2016年3月3日
		AR 094452 A1	2015年8月5日
		PT 2922846 T	2018年12月19日
		SG 10201706985U A	2017年10月30日
		TR 201820824 T4	2019年1月21日
		SI 3495358 T1	2022年6月30日
		WO 2014074661 A1	2014年5月15日
		EA 201590917 A1	2015年9月30日
		PE 20150944 A1	2015年6月20日
		NZ 708859 A	2018年11月30日
		SG 11201503399X A	2015年5月28日
		US 2017022192 A1	2017年1月26日
		EP 3495358 A1	2019年6月12日
		BR 112015010102 A2	2017年7月11日
		MY 175448 A	2020年6月29日
		LT 3495358 T	2022年5月25日
		KR 20150081339 A	2015年7月13日
		UY 35126 A	2014年5月30日
		PL 2922846 T3	2019年3月29日
		DK 2922846 T3	2019年1月21日
CN 111936486 A	2020年11月13日	WO 2019183186 A1	2019年9月26日
		KR 20200135425 A	2020年12月2日
		EP 3768667 A1	2021年1月27日
		US 2021032220 A1	2021年2月4日
		JP 2021518389 A	2021年8月2日