



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104592242 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201410833295. 0 *A61P 29/00*(2006. 01)
(22) 申请日 2009. 07. 07 *A61P 19/02*(2006. 01)
(66) 本国优先权数据 *A61P 9/10*(2006. 01)
200810132631. 3 2008. 07. 08 CN *A61P 17/06*(2006. 01)
200810132458. 7 2008. 07. 17 CN *A61P 3/10*(2006. 01)
200810188272. 3 2008. 12. 23 CN *A61P 27/02*(2006. 01)

(62) 分案原申请数据
200980100666. 1 2009. 07. 07

(71) 申请人 贝达药业股份有限公司
地址 311100 浙江省杭州市余杭经济技术开
发区红丰路 589 号

(72) 发明人 王印祥 丁列明 谭芬来 胡云雁
何伟 韩斌 龙伟 刘勇

(51) Int. Cl.
C07D 491/056(2006. 01)
A61K 31/519(2006. 01)
A61P 1/18(2006. 01)
A61P 13/12(2006. 01)
A61P 35/00(2006. 01)
A61P 17/00(2006. 01)
A61P 13/08(2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页 附图10页

(54) 发明名称
埃克替尼盐酸盐晶型、药物组合物和用途

(57) 摘要
本发明涉及 4-[(3- 乙炔基苯基) 氨基]- 喹啉并 [6, 7-b]-12- 冠-4 盐酸盐的晶型 II、III 和 IV; 本发明还涉及所述晶型的制备方法, 含有所述晶型的药物组合物, 所述晶型治疗癌症的用途。

1. 4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 盐酸盐的晶型III,其特征在于X-射线粉末衍射谱图中具有如下衍射角谱峰:

峰号	衍射角 (2 θ)	晶面间距	相对强度
1	9.720	9.0919	100
2	10.400	8.4989	53

2. 根据权利要求1所述的4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 盐酸盐的晶型III,其特征在于,其X射线粉末衍射谱图如附图3所示。

3. 权利要求1或2所述的晶型III的制备方法,其包括用极性溶剂加热回流至4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 盐酸盐完全溶解,抽滤,冷却,结晶,抽滤,干燥,得到所述晶型III,其中所述极性溶剂为水。

4. 一种药物组合物,其特征在于含有治疗有效量的权利要求1或2所述的晶型III和药学上可接受的载体。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物,其特征在于所述药物组合物适于口服给药。

6. 根据权利要求4所述的药物组合物,其特征在于所述药物组合物为片剂或胶囊。

7. 根据权利要求6所述的药物组合物,其特征在于所述片剂或胶囊的单位剂量为25-1025毫克。

8. 根据权利要求4所述的药物组合物,其特征在于所述药物组合物中权利要求1或2所述晶型III的含量为1-99重量%。

9. 根据权利要求4所述的药物组合物,其特征在于所述药物组合物中权利要求1或2所述晶型III的含量为1-70重量%。

10. 根据权利要求4所述的药物组合物,其特征在于所述药物组合物中权利要求1或2所述晶型III的含量为10-30重量%。

11. 权利要求1或2所述晶型III在制备用于治疗或预防哺乳动物的非恶性过度性增生病症、胰腺炎、肾病、肿瘤、血管生成或血管发生有关的疾病的药物或用于哺乳动物的内胚细胞移植药物中的应用。

12. 根据权利要求11的应用,其中所述的非恶性过度性增生病症是良性皮肤增生或良性前列腺增生。

13. 根据权利要求11的应用,其中所述的非恶性过度性增生病症,胰腺炎,肾病,肿瘤,血管生成或血管发生有关的疾病选自:肿瘤血管生成、慢性发炎疾病、动脉粥样硬化,皮肤病、糖尿病性视网膜病,早熟视网膜病,与年龄有关的色斑变性、血管瘤、神经胶质瘤、卡波济内瘤,卵巢癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、淋巴瘤、前列腺癌、结肠癌或皮肤肿瘤及它们的并发症。

14. 根据权利要求13所述的应用,其特征在于,所述慢性发炎疾病是类风湿关节炎。

15. 根据权利要求13所述的应用,其特征在于,所述皮肤病是牛皮癣、硬皮病或糖尿病所致的皮肤病。

16. 权利要求1或2所述晶型III在制备用于治疗或预防哺乳动物组织过度增生疾病的药物中的应用。

17. 根据权利要求 16 所述的应用, 该应用还结合使用选自基质金属蛋白酶抑制剂、血管内皮生长因子受体激酶抑制剂、Her2 的抑制剂、血管内皮生长因子受体抗体的药物或内皮抑素的药物。

18. 根据权利要求 16 所述的应用, 该应用还结合使用以下抗肿瘤剂: 有丝分裂抑制剂、烷基化剂、抗代谢物、肿瘤抗生素类、生长因子抑制剂、细胞循环抑制剂、酶类、酶抑制剂、生物应答修饰剂或抗激素类。

19. 权利要求 1 或 2 所述晶型 III 在制备用于治疗或预防酪氨酸激酶功能失调所致相关疾病的药物中的应用。

20. 根据权利要求 19 所述的应用, 其中该酪氨酸激酶功能失调所致相关疾病选自脑、肺、肝脏、膀胱、胸、头颈部、食道、胃肠道、乳腺、卵巢、子宫颈或甲状腺的肿瘤及它们的并发症。

21. 根据权利要求 16-20 中任一项所述的应用, 其中所述疾病选自脑癌、肺癌、肾癌、骨癌、肝癌、膀胱癌、胸、头颈部肿瘤、食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、皮肤癌、肾上腺癌、宫颈癌、淋巴癌或甲状腺肿瘤及它们的并发症。

埃克替尼盐酸盐晶型、药物组合物和用途

[0001] 本申请是中国申请 201210438377.6 号的分案申请,申请日 2009 年 07 月 07 日,发明创造名称埃克替尼盐酸盐晶型、药物组合物和用途。

技术领域

[0002] 本发明涉及 4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 盐酸盐及其新的晶型;本发明还涉及所述化合物的制备方法,含有所述化合物的药物组合物,所述化合物治疗癌症的用途以及相关的中间体化合物。

背景技术

[0003] 酪氨酸激酶受体是参与信号转化的跨膜蛋白,它们将拥有控制诸如生长、变异、血管生成和抑制凋亡等重要功能的生长因子信号,从细胞表面传导到细胞内。其中一类这样的酪氨酸激酶受体是表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶。这些受体会在许多主要的人体肿瘤中过度表达,如脑、肺、肝脏、膀胱、胸、头颈部、食道、胃肠道、乳腺、卵巢、子宫颈或甲状腺的肿瘤。

[0004] EGFR 表达于多种类型的肿瘤细胞,和其配体 EGF、TGF- α (Transforming Growth Factor- α , 转化生长因子- α) 结合后,激活细胞浆部分的激酶,导致 EGFR 羧基端的酪氨酸磷酸化,然后通过不同的信号传导途径调节多种基因的转录,从而调控肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡等,和肿瘤的转移、血管增生及化疗药的耐药性密切相关。

[0005] 在分子生物学和临床应用上已经证明,EGFR 激酶抑制剂能阻断和癌细胞增殖、转移等相关的 EGFR 信号传导,从而达到临床抗肿瘤治疗效应。

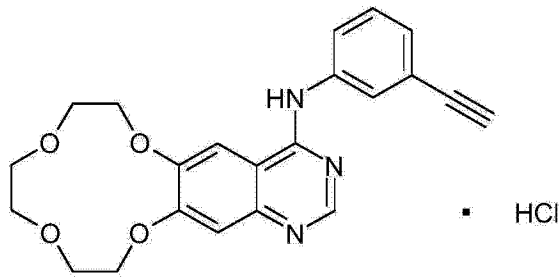
[0006] 两个化学结构上类似的口服 EGFR 激酶抑制剂吉非替尼(易瑞沙,阿斯利康公司)于 2003 年被美国 FDA 批准用于晚期非小细胞肺癌的治疗,盐酸厄洛替尼(特罗凯,罗氏及 OSI 公司)于 2004 年被美国 FDA 批准用于晚期非小细胞肺癌和胰腺癌的治疗。

[0007] 中国专利文献 CN1305860C(公开号)在说明书 29 页实施例 15 中的化合物 23 已经公开了 4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 的结构信息,该化合物是一种游离碱。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的在于提供一种如下结构式 I 的 4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 盐酸盐:

[0009]



结构式 I

[0010] 本发明的发明人也令人惊奇地发现上述结构式 I 的化合物可以以一种以上的晶型存在。发明人将这些晶型简称为晶型 I, II, III 和 IV。上述结构式 I 的化合物及其相应的晶型具有更好的溶解性和代谢特性,是临床用药的优选形式。为了描述上的方便,在本发明的下文中,结构式 I 的化合物“4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-咪唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 盐酸盐”将简称为“盐酸埃克替尼”,而游离碱“4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-咪唑啉并[6,7-b]-12-冠-4”将简称为“埃克替尼”。

[0011] 本发明一方面提供了盐酸埃克替尼的晶型 I,如附图 1 所示,其 X 射线粉末衍射谱图中典型地具有如下衍射角的谱峰(其中“晶面间距”即附图中所示“d-值”):

[0012]

峰号	衍射角 (2 θ)	晶面间距	相对强度
1	5.740	15.3841	100
2	10.720	8.2459	13
3	11.500	7.6884	10
4	21.400	4.1487	17
5	22.980	3.8669	12

[0013] 本发明的发明人发现晶型 I 是比较稳定的晶型,并且晶型 I 的粒度细,分布均匀,平均粒径 (D_{90}) 在 1-10 μM 左右,可给制剂的制备工艺带来方便。

[0014] 本发明的另一方面提供了盐酸埃克替尼的晶型 II,如附图 2 所示,其 X-射线粉末衍射谱图中典型地具有如下衍射角谱峰(其中“晶面间距”即附图中所示“d-值”):

[0015]

峰号	衍射角 (2 θ)	晶面间距	相对强度
1	7.460	11.8405	46
2	15.040	5.8857	30
3	16.240	5.4534	31
4	22.460	3.9553	100
5	22.840	3.8903	47

[0016] 本发明的另一方面提供了盐酸埃克替尼的晶型 III,如附图 3 所示,其 X-射线粉末

衍射谱图中典型地具有如下衍射角谱峰（其中“晶面间距”即附图中所示“d-值”）：

[0017]

峰号	衍射角 (2 θ°)	晶面间距	相对强度
1	9.720	9.0919	100
2	10.400	8.4989	53

[0018] 本发明的又一方面提供了盐酸埃克替尼的晶型 IV, 如附图 4 所示, 其 X-射线粉末衍射谱图中典型地具有如下衍射角谱峰（其中“晶面间距”即附图中所示“d-值”）：

[0019]

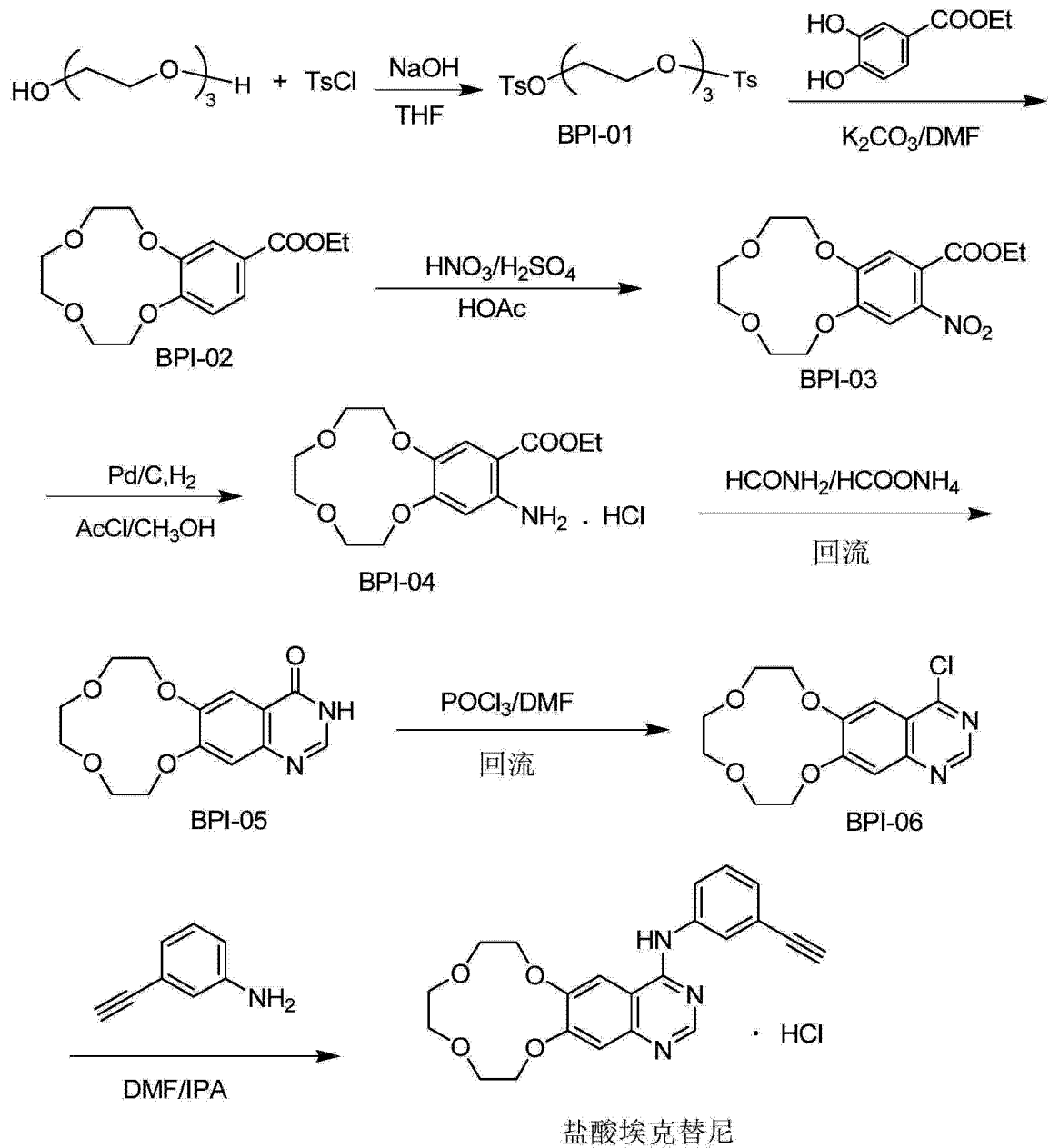
峰号	衍射角 (2 θ°)	晶面间距	相对强度
1	6.340	13.9295	84
2	7.660	11.5318	100
3	12.260	7.2134	34
4	15.700	5.6398	36
5	16.660	5.3169	46
6	23.180	3.8340	74
7	24.980	3.5617	34

[0020] 上述的晶型仅仅概括了主要的峰（也就是最特征、显著、独特和/或可再现的峰），附加峰可使用常规方法从衍射图中得到。上述的主峰可再现并且在误差限度内（在上次给定小数点位置 ± 2 , 即所述值 ± 0.2 ）。

[0021] 本发明的又一目的在于提供如结构式 I 化合物的制备方法：

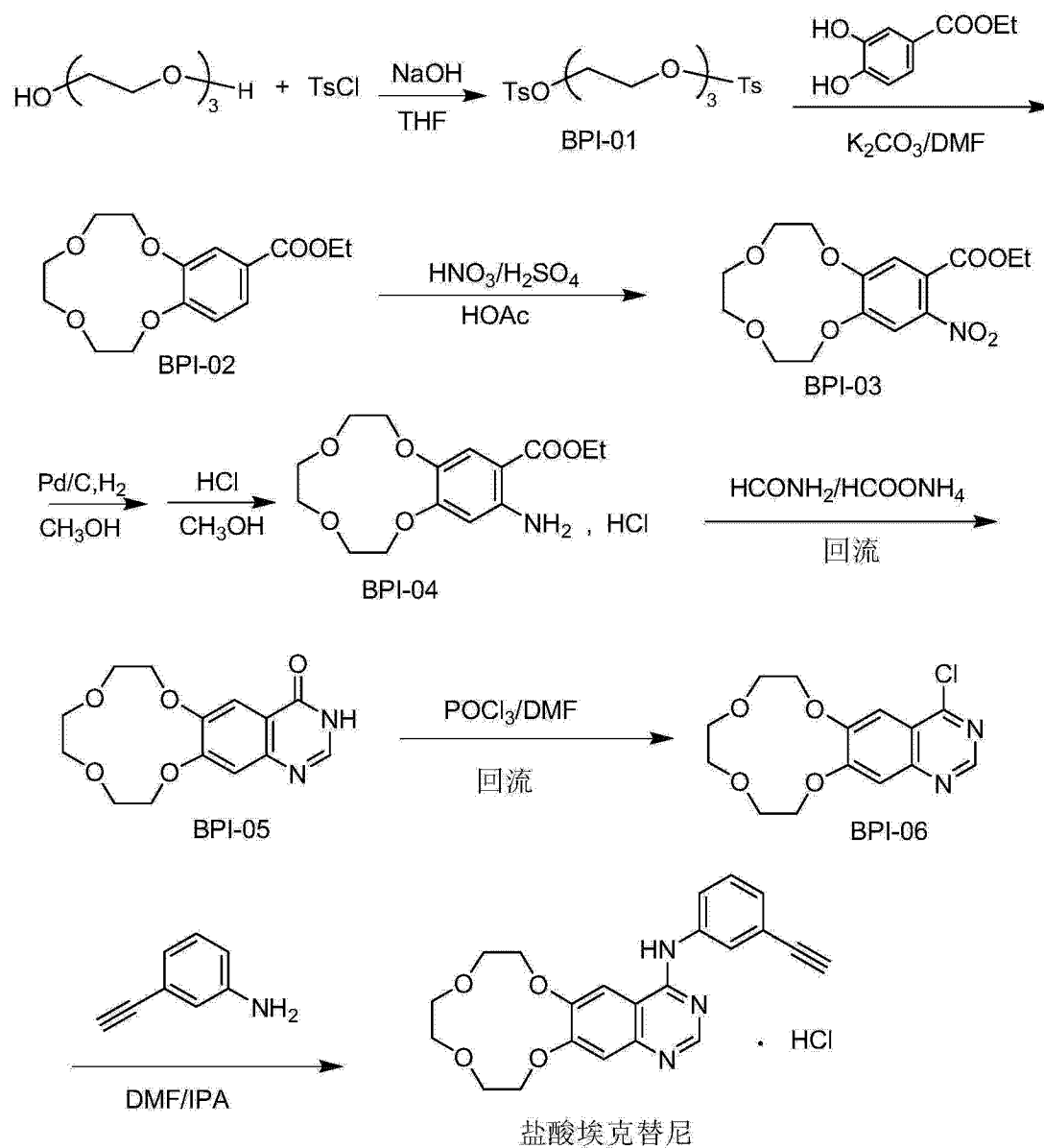
[0022] 方法一：

[0023]



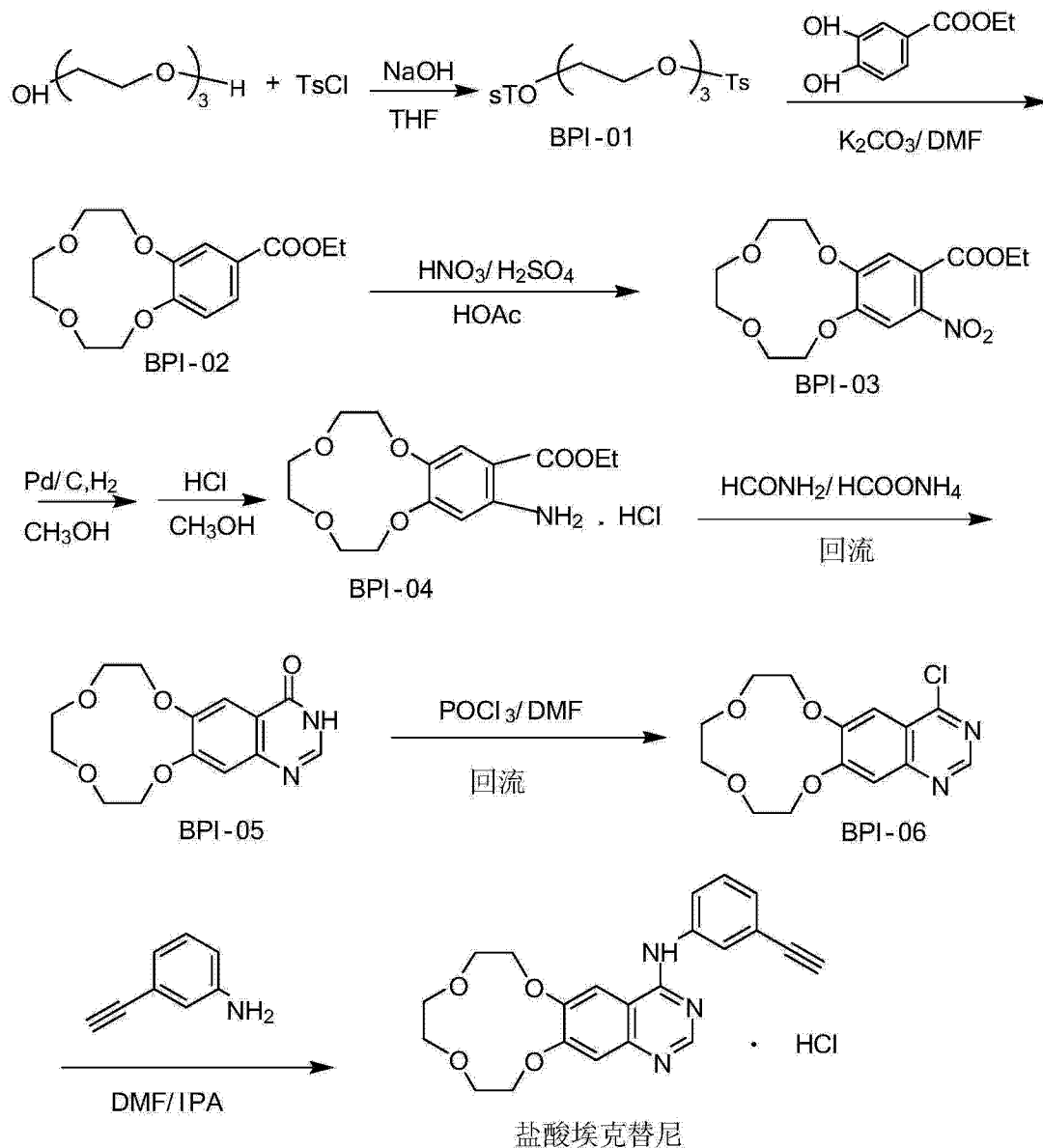
[0024] 方法二：

[0025]



[0026] 方法三：

[0027]



[0028] 其中化合物 BPI-02 采用重结晶工艺。

[0029] 本发明的盐酸埃克替尼晶型 I、II、III 和 IV 可通过如下方法来制备：把 4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4 盐酸盐用极性溶剂加热回流至完全溶解，抽滤，冷却，结晶，抽滤，干燥，得到其不同晶型。具体的结晶程序可参见本发明的具体实施方式部分。

[0030] 上述的结晶可以在单一溶剂、溶剂混合物或在其含水混合物中进行。

[0031] 用于结晶的合适的极性溶剂为水、例如低级醇的醇、酮、醚、酯、卤代烷烃、烷烃、卤代苯、脂族腈和芳香族溶剂。优选的极性溶剂选自异丙醇、乙酸乙酯、50%乙醇、水、N,N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇、丙酮和正丙醇。

[0032] 术语“低级醇”此处包括直链或支链 C_1-C_5 醇，例如直链或支链 C_2-C_3 醇。其它例子为甲醇、乙醇、异丙醇和丁醇。

[0033] 本发明化合物从含有至少一种溶剂的合适的溶剂体系中的结晶可通过溶剂蒸发、温度下降和/或通过加入反溶剂（亦即在其中本发明化合物溶解性较差的溶剂），在溶剂体系中达到过饱和实现。

[0034] 结晶可使用或不使用适于结晶本发明化合物的晶种引发和 / 或实现。

[0035] 本发明的结晶与特定条件下各个晶型的动力学和平衡条件有关。因此本领域技术人员会意识到,得到的晶型取决于结晶过程的动力学和热力学。在特定条件下(溶剂体系、温度、压力和本发明化合物的浓度),一种晶型可能要比另一种晶型稳定(或实际上比任何其它晶型稳定)。然而,具有相对较低热力学稳定性的晶型可能动力学上有利。因此动力学之外的因素,例如时间、杂质分布、搅动、晶种的存在与否等也可能影响结晶的形式。

[0036] 本发明的又一目的在于提供一种药物组合物,它含有治疗有效量的盐酸埃克替尼和其上述晶型 I、II、III和IV中的一种或多种以及药学上可接受的载体。活性化合物在该药物组合物中的含量为 1-99 重量%,优选 1-70 重量%,更优选 10-30 重量%。

[0037] 该药物组合物,可以是例如适用于口服的形式,如药片(片剂)、胶囊、丸粒、粉剂、持续释放剂、溶液、悬浮液;适用于非肠道注射的形式,如无菌溶液、悬浮液或乳液;适用于局部施用的形式,如膏剂或乳膏(软膏或眼膏);或者适用于直肠施用的形式,如栓剂。该药物组合物可以是适合于精确剂量的单一施用的单位剂量形式。此外,该药物组合物还可以包括其它的活性成分。

[0038] 适当的药物载体包括水,各种有机溶剂和各种惰性稀释剂或填料。如果需要,这些药物组合物可含有各种添加剂,如香料、粘合剂和赋形剂等。对于口服形式,含有各种赋形剂如柠檬酸的片剂可以与各种分解剂如淀粉、藻酸及某些复合硅酸盐一起使用以及与各种粘合剂如蔗糖、明胶及阿拉伯胶一起使用。此外,润滑剂如硬脂酸镁及滑石粉常用于制作片剂的填料。同样类型的固体成分也可填充于软和硬的明胶胶囊中。当用于口服而且需要是水悬浮液时,其中的活性化合物可与各种甜味剂或香味剂,颜料或染料相结合,如果需要,还可与各种乳化剂或悬浮剂相结合,还可与稀释剂如水、乙醇、丙二醇、甘油、或它们的结合使用。

[0039] 上述药物组合物优选口服给药。

[0040] 上述的药物组合物的剂型优选片剂或胶囊。

[0041] 本发明另一方面提供了本发明的盐酸埃克替尼和其上述晶型 I、II、III和IV在制备用于治疗或预防哺乳动物的非恶性过度性增生病症药物中的应用。所述的非恶性过度性增生病症优选是良性皮肤增生或良性前列腺增生。

[0042] 本发明另一方面提供了本发明的盐酸埃克替尼和其上述晶型 I、II、III和IV在制备用于治疗或预防哺乳动物的胰腺炎,肾病,肿瘤,血管生成或血管发生有关的疾病药物中的应用。

[0043] 本发明另一方面提供了本发明的盐酸埃克替尼和其上述晶型 I、II、III和IV在制备用于哺乳动物的内胚细胞移植药物中应用。

[0044] 本发明的盐酸埃克替尼和其上述晶型 I、II、III和IV可以治疗或预防的疾病优选选自:肿瘤血管生成、慢性发炎疾病如类风湿关节炎、动脉粥样硬化,皮肤病如牛皮癣、及硬皮病、糖尿病所致的皮肤病,糖尿病性视网膜病,早熟视网膜病,与年龄有关的色斑变性、血管瘤、神经胶质瘤、卡波济内瘤,卵巢癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌、淋巴癌、前列腺癌、结肠癌及皮肤肿瘤及它们的并发症。

[0045] 上述的哺乳动物优选为人。

[0046] 本发明的又一目的在于提供一种治疗哺乳动物的(恶性)组织过度增生疾病的

方法,其包括对患有哺乳动物的组织过度增生疾病的患者给药治疗有效量的盐酸埃克替尼和/或其上述晶型和/或上述药物组合物。在另一种实施方案中,该方法结合使用选自MMP(基质金属蛋白酶)抑制剂,VEGFR(血管内皮生长因子受体)激酶抑制剂,Her2的抑制剂,VEGFR抗体的药物,内皮抑素(Endostatin)的药物。在又一种实施方案中,该方法结合使用以下抗肿瘤剂:有丝分裂抑制剂,烷基化剂,抗代谢物,肿瘤抗生素类,生长因子抑制剂,细胞循环抑制剂,酶类,酶抑制剂,生物应答修饰剂,抗激素类等,抗肿瘤剂例如是卡铂,紫杉醇,吉西他滨,甲氨蝶呤,5-氟尿嘧啶,喜树碱类药物等。

[0047] 本发明的又一目的在于提供一种治疗患有酪氨酸激酶功能失调所致相关疾病的方法,其包括对患有酪氨酸激酶功能失调所致相关疾病的患者给药治疗有效量的盐酸埃克替尼和/或其上述晶型和/或上述药物组合物。这里,该酪氨酸激酶功能失调所致相关疾病优选包括脑、肺、肝脏、膀胱、胸、头颈部、食道、胃肠道、乳腺、卵巢、子宫颈或甲状腺的肿瘤及它们的并发症。

[0048] 上述的治疗方法中所述疾病优选自脑癌、肺癌(例如非小细胞癌(NSCLC))、肾癌、骨癌、肝癌、膀胱癌、胸、头颈部肿瘤、食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、皮肤癌、肾上腺癌、宫颈癌、淋巴瘤或甲状腺肿瘤及它们的并发症。

[0049] 上述的方法中可以与任何化学治疗、生物治疗及放射治疗相组合。

[0050] 上述的方法中所述治疗进一步包括应用抗-EGFR和抗-EGF抗体中的任何一个或两个同时进行治疗。

[0051] 所施用的活性化合物的量将决定于要治疗的对象个体需求,给药路径和疾病或病症的严重程度、施用速率及指定医师的评价判断。然而,基于活性化合物,有效剂量的范围优选为每天每公斤体重约0.01-120mg,更优选一次性或分开的剂量为每天每公斤体重1-50mg。在某些情况下,剂量水平在上述范围的低限以下更适合,而在其它情况下可使用更大的剂量而不会引起有害的副作用。

[0052] 本发明的再一目的在于提供4-[(3-乙炔基苯基)氨基]-喹唑啉并[6,7-b]-12-冠-4盐酸盐的临床用药方法。具体而言本发明的盐酸埃克替尼的临床治疗方法,对于肿瘤病人给予以下治疗方案:盐酸埃克替尼和/或其晶型I,II,III或IV给药剂量为25-2100毫克/日,给药次数为1-3次/日;优选为75-1200毫克/日,所述给药次数为1-3次/日;更优选给药剂量为75-1200毫克/日,所述给药次数为2-3次/日,还更优选给药剂量为100-1200毫克/日,所述给药次数为2-3次/日。

附图说明

[0053] 图1 盐酸埃克替尼晶型I的X-衍射图谱(异丙醇结晶)

[0054] 图2 盐酸埃克替尼晶型II的X-衍射图谱(50%乙醇结晶)

[0055] 图3 盐酸埃克替尼晶型III的X-衍射图谱(水结晶)

[0056] 图4 盐酸埃克替尼晶型IV的X-衍射图谱(N,N-二甲基甲酰胺结晶)

[0057] 图5 盐酸埃克替尼的¹HNMR谱图

[0058] 图6 盐酸埃克替尼的¹³CNMR谱图

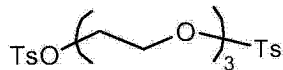
具体实施方式

[0059] 下面通过给出的各实施例和试验例对本发明作出进一步说明,但所述实施例和试验例并不能对本发明要求保护的构成任何限制。

[0060] 实施例 1

[0061] 步骤 1

[0062]



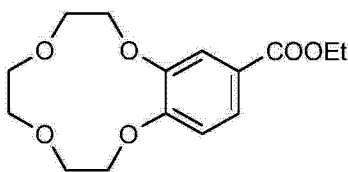
BPI-01

[0063] 制备:将 16kg(400mol) 氢氧化钠、80L 水加入 400L 反应釜中溶解,然后将 18.8L(140mol) 二缩三乙二醇、32L 四氢呋喃加入反应釜中,冷却 5℃ 以下,滴加 47.84kg(260mol) 对甲苯磺酰氯、50L 四氢呋喃的溶液,滴毕,在此温度下反应 2 小时,倒入 240L 冰水中,抽滤,用少量水洗涤,干燥,得 58.64kg 白色结晶性粉末 BPI-01,收率 91.4%。mp:77~80℃,HPLC:97%。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1,Rf=0.87)。

[0064] 核磁数据:¹HNMR(CDCl₃):δ ppm:7.78(d,4H,J=10.4Hz,苯环靠磺酰基质子);7.34(d,4H,J=11.6Hz,苯环靠甲基质子);4.129(dd,4H,J=5.6Hz,靠近磺酰基乙二醇质子);3.64(dd,4H,J=5.6Hz,远离磺酰基乙二醇质子);3.517(s,4H,中间一分子乙二醇质子);2.438(s,6H,苯环上甲基质子)。

[0065] 步骤 2

[0066]



BPI-02

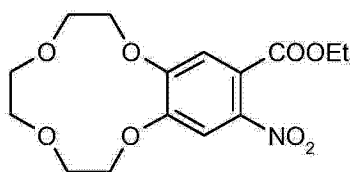
[0067] 制备:将 3.64kg(20mol) 3,4-二羟基苯甲酸乙酯、12.4kg(89.6mol) 碳酸钾和 300L N,N-二甲基甲酰胺混合,搅拌约 30 分钟,升温至 85~90℃,滴加 BPI-019.17kg(20mol) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 40L,1.5~2 小时内滴完,滴毕,反应 30 分钟,TLC 检查反应完毕(展开剂:石油醚:乙酸乙酯=1:1,Rf=0.58)。吸出约 40L 反应液,继续重复以上操作 3~5 次,抽滤,减压蒸干 N,N-二甲基甲酰胺,用 240L 乙酸乙酯溶解残渣,抽滤,减压蒸溶,残留物用 300L 石油醚进行萃取。减压回收石油醚,固体用异丙醇 1:2.5(W/V) 进行重结晶,得 1.68kg 类白色粉末 BPI-02,收率为 28%。mp:73~76℃,HPLC:96.4%。

[0068] 核磁数据:¹HNMR(CDCl₃):δ ppm:7.701(d,1H,J=2.4Hz,苯环 6 位质子);7.68(s,1H,苯环 2 位质子);6.966(d,1H,J=10.8Hz,苯环 5 位质子);4.374~3.81(q,2H,J=9.6Hz,乙基的亚甲基质子);3.78~4.23(dd,12H,J=4.8Hz,冠醚质子);1.394(t,3H,J=9.6Hz,甲基质子)。

[0069] MS:m/z296。

[0070] 步骤 3

[0071]



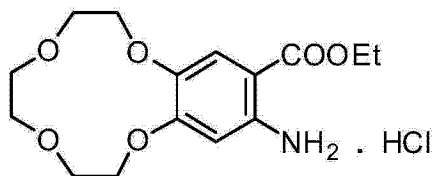
BPI-03

[0072] 制备:将 592g(2mol)BPI-02、600mL 乙酸加入 5L 反应瓶中,冷却至 0℃,缓慢加入 1640mL(25.4mol) 浓硝酸,内温不得超过 10℃,控制 0℃ 以下,滴加 1L 浓硫酸,内温不超过 5℃,滴毕,0~5℃ 下反应 1~2 小时。反应完毕,将反应液倒入有碎冰的 15L 塑料桶中,搅拌,抽滤,乙醇重结晶,得 449g 微黄色至黄色结晶性粉末 BPI-03,收率 65.7%, mp:92~95℃, HPLC:98.2%。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1, R_f=0.52)。

[0073] 核磁数据:¹HNMR(CDCl₃): δ ppm:7.56(s, 1H, 苯环 5 位质子);7.20(s, 1H, 苯环 2 位质子);4.402(q, 2H, J=9.2Hz, 乙基的亚甲基位质子);4.294(dd, 12H, J=4.8Hz, 冠醚质子);1.368(t, 3H, J=9.2Hz, 乙基的甲基质子)。

[0074] 步骤 4

[0075]



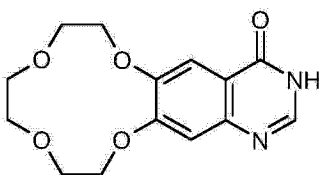
BPI-04

[0076] 制备:在 3L 氢化反应釜中,加入 2L 甲醇,加入 195g(0.57mol)BPI-03,缓慢加入 63ml 乙酰氯,搅拌片刻,加入含水 40%的 Pd/C 33g,在氢压 4atm 下反应直至不吸氢,再保压反应 1~2 小时。反应完毕,倒入 5L 反应瓶中回流,抽滤,结晶,抽滤,得产物。母液减压浓缩,又得产物。合并共得 168g 白色至粉红色结晶性粉末 BPI-04,收率:85%, mp:198~201℃, HPLC:99.1%。TLC(石油醚:乙酸乙酯=1:1, R_f=0.33)。

[0077] 核磁数据:¹HNMR(d₆-DMSO): δ ppm:8~9(br., 3H, 两个氨基质子和 1 个盐酸质子);7.37(s, 1H, 苯环 5 位质子);6.55(s, 1H, 苯环 2 位质子);4.25(q, 2H, J=7.06Hz, 乙基的亚甲基质子);4.05(dd, 12H, J=4.04Hz, 冠醚质子);1.31(t, 3H, J=7.06Hz, 乙基的甲基质子)。

[0078] 步骤 5

[0079]



BPI-05

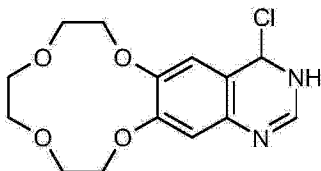
[0080] 制备:将 1105g(3.175mol)BPI-04、4810g(106.9mol) 甲酰胺、540g(8.55mol) 甲酸铵加入 10L 三口瓶中,升温至 165℃,此温度下回流 4 小时,冷却至室温,加入 3L 水,搅拌 10 分钟。抽滤,水洗,干燥,得 742g 类白色结晶性粉末 BPI-05,收率为 80%, mp:248~

251℃, HPLC :99.78%。TLC(氯仿:甲醇=8:1, R_f = 0.55)。

[0081] 核磁数据: ¹HNMR(d₆-DMSO): δ ppm :12.06(s, 1H, 喹啉环 N-H); 8.0(d, 1H, J = 3.28Hz, 喹啉环 3 位质子); 7.62(s, 1H, 喹啉环 6 位质子); 7.22(s, 1H, 喹啉环 9 位质子); 4.25(dd, 12H, J = 4.08Hz, 冠醚质子)。

[0082] 步骤 6

[0083]



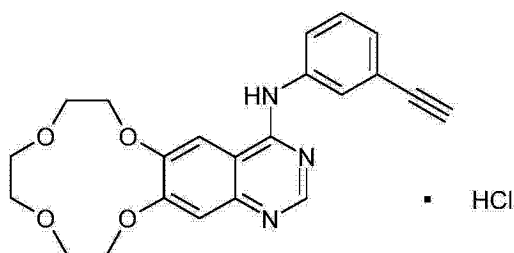
BPI-06

[0084] 制备: 将 337g(1.13mol) BPI-05、7.1L 氯仿、1.83L(19.58mol) POCl₃ 及 132ml N,N-二甲基甲酰胺依次加入 10L 三口瓶中, 搅拌升温至回流、反应液溶清后, TLC 检查反应是否完全(展开剂: 氯仿: 甲醇 = 15:1, R_f = 0.56)。反应时间约 8 小时。反应毕, 冷却, 减压蒸干, 加入 4L 氯仿, 倒入 4kg 碎冰中搅拌 0.5 小时, 分液, 水相用 2Lx2 氯仿萃取, 合并有机相, 加 4L 冰水, 用 6N NaOH 调 pH 至 8~9, 温度控制在 30℃ 以下, 分液, 有机相用饱和 NaCl 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸干溶剂, 残留物用丙酮洗涤, 抽滤, 得 268g 类白色结晶性粉末 BPI-06, 收率: 77%, mp: 164~167℃, HPLC: 99%。

[0085] 核磁数据: ¹HNMR(CDCl₃): δ ppm :8.89(s, 1H, 喹啉环 2 位质子); 7.68(s, 1H, 喹啉环 9 位质子); 7.42(s, 1H, 喹啉环 6 位质子); 4.38~3.81(dd, 12H, J = 3.88Hz, 冠醚质子)。

[0086] 步骤 7

[0087]



[0088] 本发明化合物制备: 将 20.8g BPI-06 悬浮于 500 毫升乙醇中, 加入 25 毫升 N,N-二甲基甲酰胺后, 再加入 8.98g m-乙炔基苯胺的异丙醇溶液 200 毫升。在室温下搅拌 5 分钟到反应液澄清, 加热回流 3 小时。浓缩干燥, 乙酸乙酯溶解、水洗涤, 无水硫酸钠干燥得结构式 I 的化合物 27.1g, 是类白色结晶性粉末。

[0089] 核磁数据: ¹HNMR(Bruker APX-400, 溶剂: d₆-DMSO, TMS 作为内标): δ 3.58ppm, 两个二重峰, 代表 2 个氢, 为冠醚 12 位的 2 个质子; δ 3.60ppm, 两个二重峰, 代表 2 个氢, 为冠醚 13 位的 2 个质子; δ 3.73ppm, 两个二重峰, 代表 2 个氢, 为冠醚 10 位的 2 个质子; δ 3.80ppm, 两个二重峰, 代表 2 个氢, 为冠醚 15 位的 2 个质子; δ 4.30ppm, 单峰, 代表 1 个氢, 为炔基的 1 个质子; δ 4.34ppm, 两个二重峰, 代表 2 个氢, 为冠醚 16 位的 2 个质子; δ 4.40ppm, 两个二重峰, 代表 2 个氢, 为冠醚 9 位的 2 个质子; δ 7.39ppm, 二重峰, 代表 1 个

氢,为苯环上 25 位的 1 个质子; δ 7.46ppm,两个双重峰,代表 1 个氢,为苯环上 26 位的 1 个质子; δ 7.49ppm,单峰,代表 1 个氢,为喹唑啉环苯并环上 6 位的 1 个质子; δ 7.82ppm,双重峰,代表 1 个氢,为苯环上 27 位的 1 个质子; δ 7.94ppm,三重峰(由于间为偶合),代表 1 个氢,为喹唑啉环苯并环上 19 位的 1 个质子; δ 8.85ppm,单峰,代表 1 个氢,为苯环上 23 位的 1 个质子; δ 8.87ppm,单峰,代表 1 个氢,为喹唑啉环上 2 位的质子; δ 11.70ppm,单峰,代表 1 个氢,为芳胺成盐后的 1 个质子; δ 14 ~ 16ppm,宽峰,代表 1 个氢,为盐酸质子。参见附图 5。

[0090] 核磁数据: ^{13}C NMR(溶剂 DMSO),参见附图 6。

[0091] 质谱(MS):仪器型号:ZAB-HS,测定条件:EI,200 $^{\circ}\text{C}$,700ev,质谱测得的分子量为 m/z427。

[0092] 所得产品的元素分析结果为:

[0093] (1)C、H、N 的测定

[0094] 测定仪器:Elementar—Vario EL。

[0095] 表 1 元素分析测定结果与计算值比较(%)

[0096]

元素	C	H	N
计算值	61.70	5.15	9.81
实测值(1)	61.75	5.25	9.79
实测值(2)	61.71	5.25	9.77
实测值平均值	61.73	5.25	9.78
误差	0.03	0.10	0.03

[0097] 所得产品的 C、H、N 实测值与计算值误差均在千分之三以内,符合条件。

[0098] (2)Cl 的测定

[0099] 测定仪器:Carlo—Erba1112 型元素分析仪,氯测定:氧瓶法,硝酸汞标准溶液:0.01079mol/L。测定结果见 1-2。

[0100] 表 2 氯元素测试结果与计算值比较(%)

[0101]

元素	计算值	实测值(1)	实测值(2)	实测平均值	误差
Cl	8.30	8.53	8.43	8.48	0.18

[0102] 所得产品的 Cl 实测值与计算值误差均在 3%以内。

[0103] 实施例 2

[0104] 盐酸埃克替尼晶型 I 的制备

[0105] 将 0.1 克盐酸埃克替尼与 200ml 异丙醇加入 250ml 圆底烧瓶中,加热溶解,抽滤,冷却结晶,抽滤,用少量丙酮洗涤,60 $^{\circ}\text{C}$ 以下真空干燥,得类白色结晶性粉末。mp:225-228 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0106] 用上述粉末 X-射线衍射图像法对晶型 I 作了表征,参见附图 1。采用 NETZSCH 公司的 DSC204 热重分析仪测定盐酸埃克替尼晶型 I,结果该晶型无结晶溶剂。

[0107] 实施例 3

[0108] 盐酸埃克替尼晶型 II 的制备

[0109] 将 0.5 克盐酸埃克替尼与 15ml 50%乙醇加入 25ml 圆底烧瓶中,加热溶解,抽滤,冷却结晶,抽滤,用 5ml 丙酮洗涤,60℃下真空干燥,得类白色结晶性粉末, mp :224-227℃。

[0110] 用上述粉末 X-射线衍射图像法对晶型 II 作了表征,参见附图 2。采用 NETZSCH 公司的 DSC204 热重分析仪测定盐酸埃克替尼晶型 II,结果该晶型含有 2.11 个结晶水。

[0111] 实施例 4

[0112] 盐酸埃克替尼晶型 III 的制备

[0113] 将 0.5 克盐酸埃克替尼与 15ml 水加入 25ml 圆底烧瓶中,加热溶解,抽滤,冷却结晶,抽滤,用 5ml 丙酮洗涤,60℃下真空干燥,得类白色结晶性粉末, mp :224-227℃。

[0114] 用上述粉末 X-射线衍射图像法对晶型 III 作了表征,参见附图 3。采用 NETZSCH 公司的 DSC204 热重分析仪测定盐酸埃克替尼晶型 III,结果该晶型含有 1.90 个结晶水。

[0115] 实施例 5

[0116] 盐酸埃克替尼晶型 IV 的制备

[0117] 将 0.5 克盐酸埃克替尼与 10ml N,N-二甲基甲酰胺加入 25ml 圆底烧瓶中,加热溶解,抽滤,冷却结晶,抽滤,用 5ml 丙酮洗涤,60℃下真空干燥,得浅黄色结晶性粉末, mp : 223-226℃。

[0118] 用上述粉末 X-射线衍射图像法对晶型 IV 作了表征,参见附图 4。采用 NETZSCH 公司的 DSC204 热重分析仪测定盐酸埃克替尼晶型 IV,结果该晶型含有 0.158 个 N,N-二甲基甲酰胺。

[0119] 效果试验

[0120] 试验 1-聚丙酰胺胶电泳法测定盐酸埃克替尼晶型 I 对 EGFR 激酶的抑制和选择特异性实验

[0121] 方法:本方法的作用机制为激酶催化蛋白质底物磷酸化,使反应体系中放射性同位素 ^{32}P 标记的 ATP ($^{32}\text{P}-\gamma\text{-ATP}$) 上的 ^{32}P 标记到蛋白质底物上,经聚丙酰胺胶电泳分离,记录底物蛋白质放射性标记的强度。

[0122] 在体外的 EGFR 激酶检测试验中,将 EGFR 蛋白激酶 (2.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 14.5 单位/ μg , Sigma) 与 Crk (EGFR 底物, 32ng/ μl) 于 25 μl 激酶反应缓冲液中混合。激酶反应缓冲液中包括 1 μM 非同位素标记的 ATP。混合液与不同浓度的盐酸埃克替尼晶型 I (分别是 0 (作为对照组)、0.5、2.5、12.5、62.5nM) 在冰中孵育 10min, 然后加入 1 μCi $^{32}\text{P}-\gamma\text{-ATP}$, 在 30℃ 下孵育 20min。反应结束后加 SDS (十二烷基磺酸钠) 样品缓冲液 (sample buffer) 在 100℃ 水中煮 4min, 用 10% SDS-PAGE (聚丙酰胺) 胶电泳分离蛋白混合物。经真空干胶后以 Phosphorimager 磷屏 (Molecular Dynamics 公司) 检测, 记录放射性标记的强度, 使用 ImageQuant 软件对信号作定量分析。被 EGFR 激酶磷酸化的 Crk 用于反映激酶的活性。

[0123] 抑制率 (%) = (1 - 试验组激酶活性 / 对照组激酶活性) \times 100%。

[0124] 结果:

[0125] (1)、盐酸埃克替尼晶型 I 能抑制 EGFR 的激酶活性,且呈剂量反应关系,和对照组

比较,在盐酸埃克替尼晶型 I 浓度为 0.5、2.5、12.5 和 62.5nM 时,EGFR 激酶活性的抑制率分别达到 20.5%、36.6%、63%和 87.6%。根据剂量反应关系曲线(略),盐酸埃克替尼晶型 I 抑制 EGFR 激酶活性的 IC_{50} (当 50%酶活性被抑制时的抑制剂浓度)为 5nM,和国外上市产品相当。

[0126] (2)、为研究盐酸埃克替尼晶型 I 对 EGFR 激酶抑制的选择特异性,同样方法平行比较了盐酸埃克替尼晶型 I 对 EGFR 和 Arg(abl-related gene) 激酶的抑制作用,两个激酶同属酪氨酸激酶,且皆能介导 Crk 磷酸化。在浓度为 62.5nM 时,埃克替尼没有显示对 Arg 激酶的抑制,但同一浓度及相同试验条件下,盐酸埃克替尼晶型 I 对 EGFR 激酶的抑制率达 97%。表明盐酸埃克替尼晶型 I 抑制的选择特异性。

[0127] 综合以上结果,盐酸埃克替尼晶型 I 为一敏感、选择特异性强的 EGFR 激酶抑制剂。

[0128] 试验 2- 盐酸埃克替尼晶型 I 多在细胞水平对 EGFR 介导的蛋白磷酸化抑制试验

[0129] 方法:实验采用高表达 EGFR 的 A431 细胞株(外阴鳞状细胞癌细胞)。取对数生长长期的 A431 细胞悬液接种于 12 孔培养板上(5×10^5 个/孔),细胞生长于含有 10%胎牛血清(FCS)的 DMEM 细胞培养液(Gibco 公司),在 37°C,5% CO_2 的细胞培养箱中培养 18 小时。弃去培养液上清,用 PBS 缓冲液洗两遍,加入不含 FCS 的 DMEM,培养 18 小时以后,加二甲基亚砜(DMSO)稀释的盐酸埃克替尼晶型 I,终浓度依次为 0(对照组),10,50,250,1000nM,37°C 培养 2.5 小时。加入 100ng/ml EGF 刺激细胞 5 分钟后,用含有 1mM 钒酸盐(抑制去磷酸化)的细胞裂解液裂解细胞并收取细胞总蛋白。细胞总蛋白在 100°C 水中煮沸 4 分钟以后,用 10% SDS-PAGE 胶分离细胞总蛋白,然后用电转移法将蛋白转移到硝酸纤维膜上[6]。纤维膜用抗磷酸化酪氨酸鼠源单克隆抗体(PY99 和 4G10, Upstate Biotech)探查,然后用辣根过氧化物酶标记的第二抗体(抗鼠源抗体的抗体, Transduction Laboratories, Inc.)标记。酪氨酸磷酸化的蛋白信号通过化学发光法(Amersham Corp.)显现出来,由 Densitometer 进行定量(Molecular Dynamics)。抑制率(%) = (1- 试验组激酶活性 / 对照组激酶活性) \times 100%。

[0130] 作为内对照(internal control),纤维膜上抗磷酸化酪氨酸单克隆抗体和标记的第二抗体用脱抗体缓冲液(striping buffer)去除,然后用抗 EGFR 的抗体及 HRP- 标记的第二抗体标记以便对 EGFR 的表达量用进行定量分析。

[0131] 结果:

[0132] 在 A431 细胞,盐酸埃克替尼晶型 I 可抑制 EGF 诱导、EGFR 酪氨酸激酶介导的细胞内蛋白酪氨酸磷酸化,在浓度 10、50、250 和 1000nM 时,其抑制率分别为 5.4%、52.9%、61.9%和 63.7%, IC_{50} 其半数有效浓度约 50nM。结果显示不同处理组的 EGFR 表达量无显著差别,但其细胞总蛋白酪氨酸磷酸化信号却显著不同,表明在 A431 细胞,盐酸埃克替尼晶型 I 并不影响 EGFR 的表达,只抑制了 EGFR 激酶的活性。

[0133] 试验 3- 盐酸埃克替尼晶型 I 对体外培养的人体肿瘤细胞株的生长抑制作用

[0134] 实验目的:观察盐酸埃克替尼晶型 I 对体外培养的人体肿瘤细胞株的生长抑制作用。

[0135] 实验材料

[0136] 受试药物:盐酸埃克替尼晶型 I,批号,050106 由浙江贝达药业有限公司提供,现用现配。

[0137] 瘤株：外阴鳞状细胞癌细胞 A431、人肺腺癌 A549、人肝癌 Be17402、人胃腺癌 BGC823、人结肠癌 HCT8、人大细胞肺癌 H460、人口腔上皮癌细胞 KB。

[0138] 方法：

[0139] 采用中文 MTT 方法，观察盐酸埃克替尼晶型 I 对体外培养的人肿瘤细胞 A431、A549、Be17402、BGC823、HCT8、H460、KB 的生长抑制作用。

[0140] MTT 试验：用胰酶消化肿瘤细胞，以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液配制细胞悬液，浓度为 10^4 个细胞 /ml，于 96 孔培养板内每孔接种 $100 \mu\text{l}$ (1000 个细胞 / 孔)，培养 24 小时后加入药物，每孔加样 $100 \mu\text{l}$ ，每组设三个平行孔。盐酸埃克替尼晶型 I 用 DMSO 溶解后以培养基稀释至 50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 $\mu\text{mol/L}$ ，DMSO 浓度小于 0.1%，对照孔加入含 0.1% DMSO 的培养基。置 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 96 小时后弃去培养液，每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 0.5% MTT 溶液 (RPMI 1640 配制)。 37°C 保温 4 小时，弃上清，每孔加入 DMSO $200 \mu\text{l}$ 溶解中文 Formazan 颗粒，振荡混匀，用酶标仪检测 (参比波长 450nm、检测波长 570nm)，计算药物对细胞生长的抑制率。以药物浓度对数值对抑制率作线性回归，得直线方程，从中求出药物的半数抑制浓度 (IC_{50})。

[0141] 结果：

[0142] 见下表 1，盐酸埃克替尼晶型 I 在体外对人体肿瘤细胞的生长抑制作用呈现剂量依赖性，这些细胞中包括 EGFR 高表达的 A431 细胞。盐酸埃克替尼晶型 I 对 A431 细胞株极为敏感， IC_{50} 为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，其次对胃癌细胞株 BGC823、人肺腺癌细胞株 A549 和人大细胞肺癌株 H460 比较敏感，其 IC_{50} 分别为 4、12、16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当盐酸埃克替尼晶型 I 的浓度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，盐酸埃克替尼晶型 I 几乎可以抑制 BGC823 和 A549 肿瘤细胞的全部生长，抑制率接近 100%，但此时 HCT8 细胞的抑制率仅为 40%。实验结果表明盐酸埃克替尼晶型 I 对于 HCT8、BEL-7402、KB 敏感性低。

[0143] 表 1 盐酸埃克替尼晶型 I 对肿瘤细胞的生长抑制作用

[0144]

细胞株	$\text{IC}_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
A431/人鳞状细胞癌细胞	1
BGC-823/人胃腺癌细胞	4.06
A549/人肺腺癌细胞	12.16
H460/人大细胞肺癌细胞	16.08
HCT8/人结肠癌细胞	>200
KB/人口腔上皮癌细胞	40.71
BEL-7402/人肝癌细胞	>200

[0145] 试验 4- 盐酸埃克替尼晶型 I 对人癌细胞株裸鼠移植肿瘤的抑制作用

[0146] 比较盐酸埃克替尼晶型 I 和盐酸厄洛替尼对人 A431 (人鳞状细胞癌细胞株) 细胞株裸鼠移植肿瘤的抑制作用的预试验

[0147] 方法：实验选择高表达 EGFR 人 A431 (人鳞状细胞癌细胞株) 癌细胞株。

[0148] 肿瘤移植方法:用已在裸鼠体内生长良好的人癌细胞作瘤源,接种于 BALB/C 裸鼠右腋窝皮下,即在超净台内无菌操作下取出肿瘤结节,剪成小瘤块采取常规小块接种法,1 块/鼠(约 6mm^3),经 6-7 天待肿瘤长出并可触及时(约 20mm^3),将动物随机分为 4 组,每组 6-9 只,称体重、标号。4 组分别为对照组、阳性药(盐酸厄洛替尼, $200\text{mg}/\text{kg}$, 本试验室合成)对照组,盐酸埃克替尼晶型 I 高、低剂量组 (200 、 $50\text{mg}/\text{kg}$)。实验组每日灌胃给药一次。给药次数视肿瘤生长情况而定。裸鼠饲养在室温 $20-22^\circ\text{C}$,相对湿度 $40-60\%$,并具屏蔽系统辅以洁净层流柜的环境内。于实验开始后每 3 日用卡尺测一次肿瘤体积 [肿瘤体积 (V) = 肿瘤长径 (L) × 肿瘤短径 (S)²/2],绘出肿瘤生长曲线,末次给药结束后 24h,处死动物,称体重后完整剖取瘤块,并称量,计算抑瘤率,试验结果用 Office Excel 软件进行统计学分析。统计方法:所有数据以 $\bar{X}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, p 值 <0.05 为差异显著,有统计学意义。药效判定标准:肿瘤抑制率 = $[1 - \text{给药组平均瘤重 (T)} / \text{对照组平均瘤重 (C)}] \times 100\%$

[0149] 结果表明,试验用盐酸埃克替尼晶型 I 经口给药对裸鼠 A431 移植瘤有显著的抗肿瘤作用,且成剂量相关关系。

[0150] 试验 5- 盐酸埃克替尼晶型 I 和易瑞沙™片剂对不同的人癌细胞株裸鼠移植肿瘤的抑制作用的比较

[0151] 方法:按照试验 4 的步骤,分别对盐酸埃克替尼晶型 I 和易瑞沙™进行试验

[0152] 试验结果表明,比较盐酸埃克替尼晶型 I 和易瑞沙™片剂研磨粉混悬液口服给药 (14 天) 结果表明,盐酸埃克替尼晶型 I 高、中、低三个剂量组 ($120\text{mg}/\text{kg}$ 、 $60\text{mg}/\text{kg}$ 和 $30\text{mg}/\text{kg}$) 对 H460 移植瘤抑瘤率分别为 52.01% 、 49.37% 和 37.53% ;易瑞沙™对照组 ($120\text{mg}/\text{kg}$) 抑瘤率为 38.29% ,显示在同等剂量水平,盐酸埃克替尼晶型 I 对 H460 移植瘤的抑瘤活性高于易瑞沙™。也可观察到易瑞沙™给药组动物活动呆滞,体重增长减少,这表明盐酸埃克替尼晶型 I 的毒性小于易瑞沙™。

[0153] 本发明的发明人还针对 Beagle 犬,小鼠,大鼠使用盐酸埃克替尼晶型 I 进行了药理毒理学实验,表明:盐酸埃克替尼的口服毒性低,无常见抗肿瘤化疗药的骨髓抑制毒性,其肝脏毒性在恢复期可逆。安全药理试验结果表明,盐酸埃克替尼对呼吸、血压和循环功能、自主活动及中枢神经系统无影响。特殊毒性试验结果未发现有致畸、致突变及生殖毒性。

[0154] 本发明的发明人还针对 Beagle 犬和大鼠使用盐酸埃克替尼晶型 I 进行了非临床药代动力学研究,表明:盐酸埃克替尼经口给药吸收良好,绝对生物利用度在不同动物品种达 $27\% - 62\%$,该药物在体内达峰时间较短,主要经粪便排泄,小部分经尿排泄。盐酸埃克替尼在各组织中广泛分布,在脑组织中含量低,说明该药不容易通过血脑屏障。对大鼠肝 P450 酶没有显著诱导作用,未发现盐酸埃克替尼对药物代谢酶有抑制作用。

[0155] 试验 6 - 临床试验

[0156] 一、采用盐酸埃克替尼晶型 I 制备的片剂,已经完成了临床 I 期 76 名临床受试者 25mg 、 50mg 、 100mg 、 150mg 、 225mg 、 325mg 、 425mg 、 575mg 和 1025mg 等 10 个剂量组的单次给药的安全性研究,结果显示 $25\text{mg}-1025\text{mg}$ 的剂量是安全的。

[0157] 二、针对非小细胞肺癌 (NSCLC) 已完成 104 例病例的临床试验。采用的给药方法是空腹口服盐酸埃克替尼晶型 I 制备的片剂。体疗效评价结果详见表 1。以下涉及的术语,其

精确解释为:PR:部分缓解,CR:完全缓解,SD:疾病稳定,PD:疾病进展,ORR:客观缓解率,DCR:疾病控制率。针对非小细胞肺癌(NSCLC),已完成104例病例的临床试验,具体疗效评价结果详见表1。

[0158] 表1 各剂量组的扩大入组患者入组情况和初步疗效分析

[0159]

剂量组	入组例数	CR	PR	SD	PD	ORR	DCR
225mg/日 (75mg/次, 每日3次)	7	0	0	6	1	0.00% (0/7)	85.70% (6/7)
300mg/日 (100mg/次, 每日3次)	27	2	5	10	10	25.93%(7/27)	62.96% (17/27)
375mg/日 (125mg/次, 每日3次)	24	0	9	13	2	37.50% (9/24)	91.70% (22/24)
450mg/日 (150mg/次, 每日3次)	11	0	5	5	1	45.45% (5/11)	90.10% (10/11)
600mg/日 (200mg/次, 每日3次)	3	0		2	1	0.00% (0/3)	66.67% (2/3)
300mg/日 (150mg/次, 每日2次)	23	1	6	9	4	30.43% (7/23)	69.57% (16/23)
400mg/日 (200mg/次, 每日2次)	9	0	0	5	3	0.00% (0/9)	55.56% (5/9)

[0160] 以上数据说明盐酸埃克替尼对非小细胞肺癌具有良好的治疗效果。

[0161] 试验7- 不同晶型盐酸埃克替尼晶型以及游离碱的大鼠药代试验

[0162] 药品与试剂

[0163] 埃克替尼(游离碱)、盐酸埃克替尼晶型I、II、III、IV,研细。各物质的含量(纯度):不低于99.0%。羧甲基纤维素钠,药用辅料。

[0164] 试验动物

[0165] Wistar 大鼠,雌雄各半,每只体重150-220g。

[0166] 药剂配制

[0167] 称取上述各物质适量,加入 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制成浓度为 $3.5\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的混悬液,。

[0168] 给药与样品的采集

[0169] 大鼠试验:混悬液灌胃给药。每组 Wistar 大鼠给药前禁食 12 小时,自由饮水。以相当于盐酸埃克替尼 $35\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量分别灌胃给药(给药体积为 $10\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$),于给药前和给药后 30 分钟内,1.0 分钟、2.0 分钟、3.0 分钟、6.0 分钟、10.0 分钟、24.0 分钟时于眼球后静脉丛(或尾静脉)取血 0.5-1.0ml,置肝素化试管中,离心,吸取上层血浆, -20°C 保存待测。

[0170] 样品经纯化处理后,采用高效液相色谱法分析,色谱条件为:十八烷基硅烷键合硅胶为固定相;0.02mol/L 磷酸二氢钠溶液-乙腈(40:60,用氢氧化钠试液调节 pH 值至 5.0)为流动相,检测波长为 334nm。统计所得药时曲线下面积数据如下:

[0171]

	药时曲线下面积 (0-t)	药时曲线下面积 (0-无穷)
晶型 I	91.80	93.73
晶型 II	88.28	90.77
晶型 III	89.23	90.26
晶型 IV	86.29	90.23
游离碱	28.83	29.36

[0172] 由以上实验说明盐酸埃克替尼晶型 I、II、III、IV 的药时曲线下面积 (0-t) 以及药时曲线下面积 (0-无穷) 的实验数据比游离碱的数据高 3 倍左右,因而盐酸埃克替尼晶型 I、II、III、IV 的相对生物利用度显著优于埃克替尼游离碱。

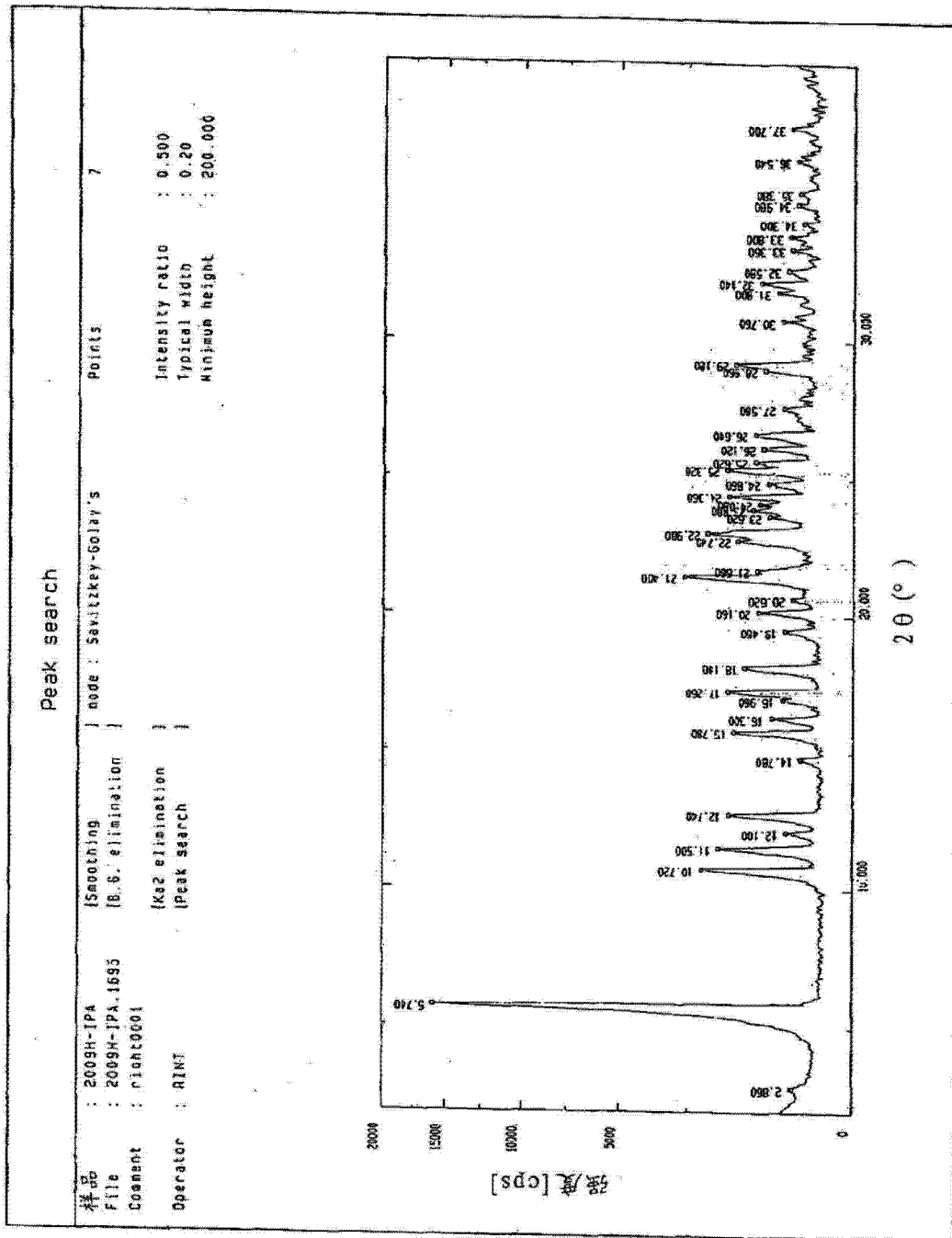


图 1

Peak search											
样品		2009H-IPA		File : 2009H-IPA.1695		Operator : RINI		Comment : Right0001			
峰编号	2θ	FWHM	d-值	强度	I/I ₀	峰编号	2θ	FWHM	d-值	强度	I/I ₀
1	2.860	XXXX	30.8660	354	2	31	29.180	0.165	3.0579	1266	0
2	5.740	0.165	15.3841	15880	100	32	30.760	0.118	2.9043	473	3
3	10.720	0.165	8.2459	2888	33	33	31.800	0.141	2.8117	528	3
4	11.500	0.155	7.8884	1648	10	34	32.140	0.259	2.7827	781	5
5	12.100	0.165	7.3084	408	3	35	32.580	0.141	2.7461	411	3
6	12.740	0.165	6.9427	1404	9	36	33.350	XXXX	2.6037	368	2
7	14.750	XXXX	5.9987	259	2	37	33.800	0.141	2.6497	382	2
8	15.780	0.188	5.6114	1286	8	38	34.300	XXXX	2.6122	239	2
9	16.500	0.141	5.4335	593	4	39	34.950	XXXX	2.5630	303	2
10	16.950	0.165	5.2235	457	3	40	35.380	XXXX	2.5349	281	2
11	17.850	0.188	5.1334	1423	9	41	36.540	XXXX	2.4571	297	2
12	18.140	0.259	4.8863	1066	7	42	37.700	XXXX	2.3841	358	2
13	19.450	0.188	4.5577	432	3						
14	20.180	0.165	4.4010	812	5						
15	20.620	0.188	4.3039	345	2						
16	21.400	0.188	4.1487	2628	17						
17	21.660	0.141	4.0985	833	5						
18	22.740	0.118	3.9072	1213	8						
19	22.980	0.118	3.8669	1958	12						
20	23.620	0.118	3.7636	635	4						
21	23.880	0.141	3.7232	905	6						
22	24.080	0.118	3.6927	790	5						
23	24.360	0.165	3.6509	1415	9						
24	24.860	0.259	3.5766	662	4						
25	25.320	0.188	3.5145	1454	9						
26	25.620	0.212	3.4741	876	6						
27	26.120	0.188	3.4088	736	5						
28	26.640	0.282	3.3434	870	5						
29	27.580	0.212	3.2315	463	3						
30	28.950	0.118	3.0806	713	4						

图 1 续

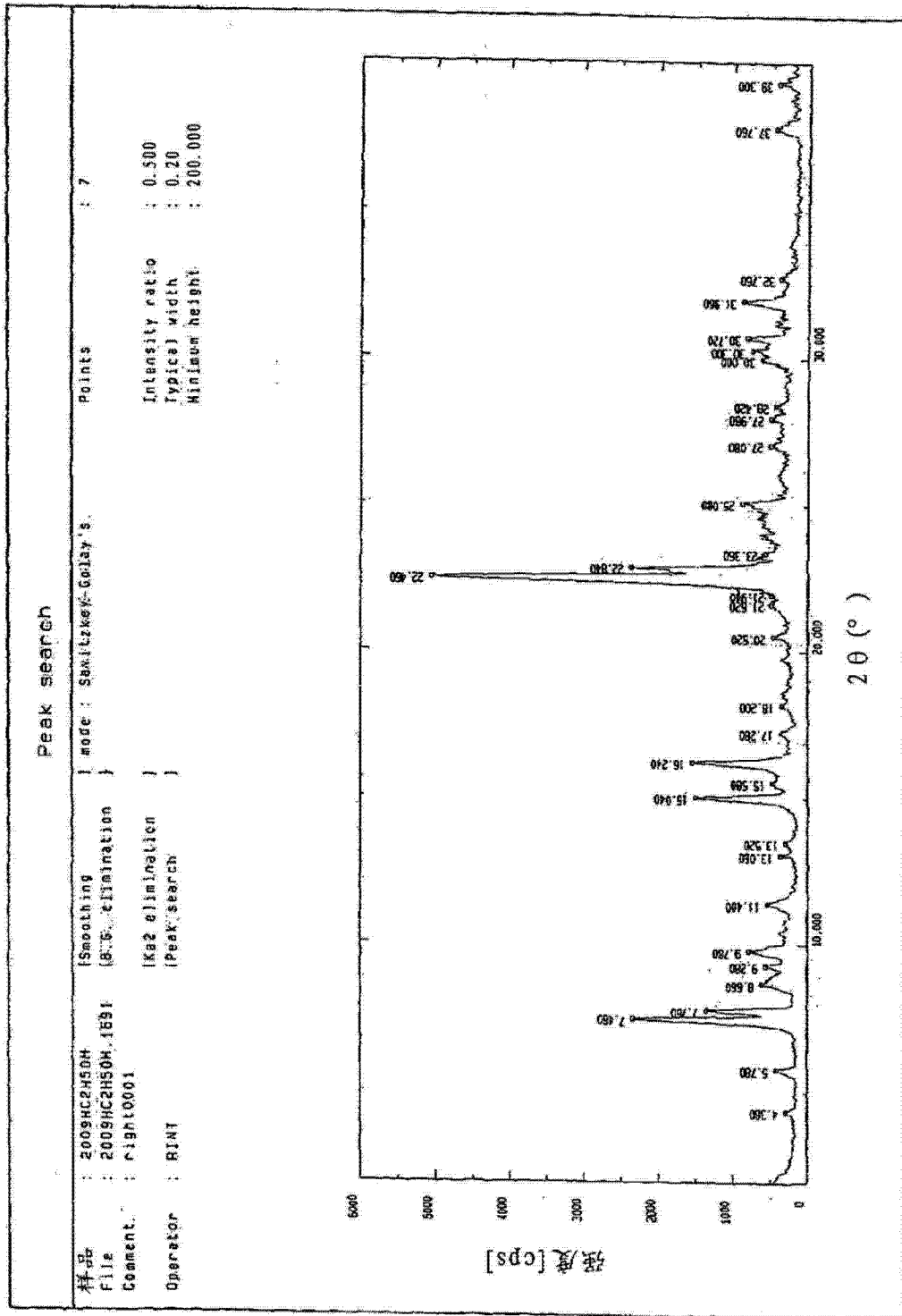


图 2

Peak search											
样品		2009HC2H5OH		File : 2009HC2H5OH.1691		Operator : RINT		Comment : r1ght:0001			
峰编号	2θ	FWHM	d-值	强度	I/I0	峰编号	2θ	FWHM	d-值	强度	I/I0
1	4.380	XXXXX	20.1574	291	6	31	37.760	0.118	2.3804	457	9
2	5.780	XXXXX	15.2777	425	8	32	39.300	0.119	2.2906	426	8
3	7.460	0.235	11.8405	2336	48						
4	7.760	0.165	11.3634	1359	27						
5	9.660	0.141	10.2023	618	12						
6	9.280	0.141	9.5220	560	11						
7	9.780	0.282	9.0363	795	16						
8	11.400	0.212	7.7556	544	11						
9	13.080	XXXXX	6.7630	370	7						
10	13.520	XXXXX	6.5438	303	6						
11	15.040	0.212	5.8957	1507	30						
12	15.560	0.118	5.6929	480	9						
13	16.240	0.212	5.4534	1556	31						
14	17.280	XXXXX	5.1275	367	7						
15	18.200	XXXXX	4.8703	354	7						
16	20.520	0.141	4.3246	475	9						
17	21.620	0.118	4.1070	501	10						
18	21.940	0.118	4.0478	497	10						
19	22.460	0.259	3.9553	5064	100						
20	22.840	0.141	3.8903	2359	47						
21	23.360	0.141	3.8049	585	12						
22	25.080	0.141	3.5477	885	17						
23	27.080	0.118	3.2901	515	10						
24	27.980	0.165	3.1862	510	10						
25	28.420	0.118	3.1379	447	9						
26	30.000	0.188	2.9761	626	12						
27	30.300	0.141	2.9474	762	16						
28	30.720	0.212	2.9080	815	16						
29	31.960	0.188	2.7980	871	17						
30	32.760	0.165	2.7314	383	8						

图 2 续

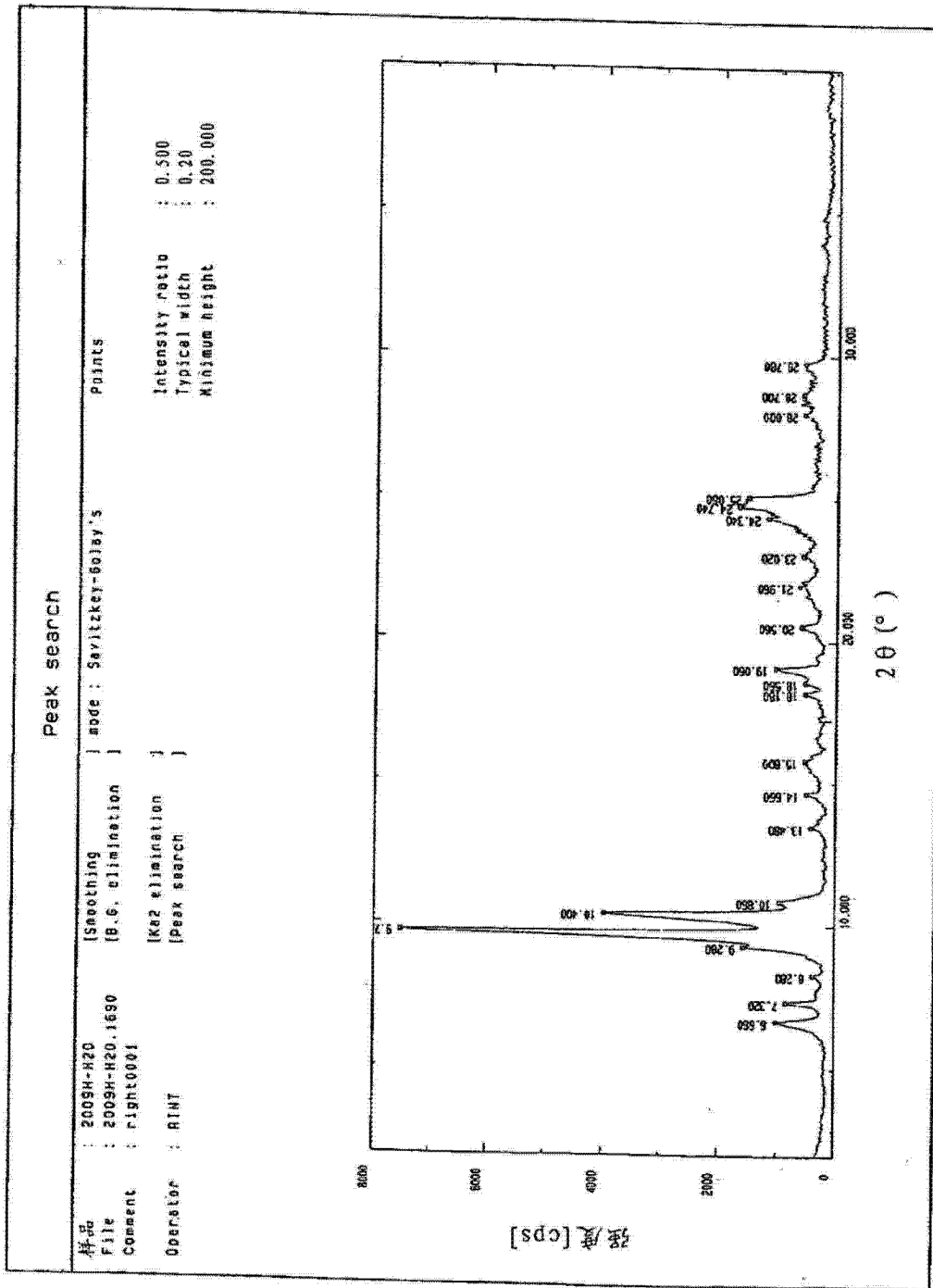


图 3

Peak search										
样品	2009H-N2D		File : 2009H-N2D.1890		Operator : RINT		Comment : right0001			
峰编号	2θ	FWHM	d-值	强度	I/I ₀	峰编号	2θ	FWHM	d-值	强度
1	6.660	0.282	13.2609	1019	14					
2	7.320	0.165	12.0666	838	11					
3	8.280	****	10.6696	380	5					
4	9.280	0.165	9.5220	1575	21					
5	9.720	0.188	9.0919	7527	100					
6	10.400	0.235	8.4989	3976	53					
7	10.860	0.188	8.1400	988	13					
8	13.480	****	6.5632	425	6					
9	14.660	0.165	6.0374	514	7					
10	15.800	0.165	5.6043	537	7					
11	18.180	0.188	4.8756	541	7					
12	18.560	0.141	4.7767	544	7					
13	19.060	0.212	4.5225	1055	14					
14	20.580	0.188	4.3163	629	8					
15	21.960	****	4.0442	652	9					
16	23.020	****	3.8603	593	8					
17	24.340	0.118	3.6539	1213	16					
18	24.740	0.212	3.5957	1709	23					
19	25.060	0.212	3.5505	1547	21					
20	28.000	0.141	3.1840	583	8					
21	28.700	0.141	3.1079	613	8					
22	29.780	0.141	2.9976	579	8					

图 3 续

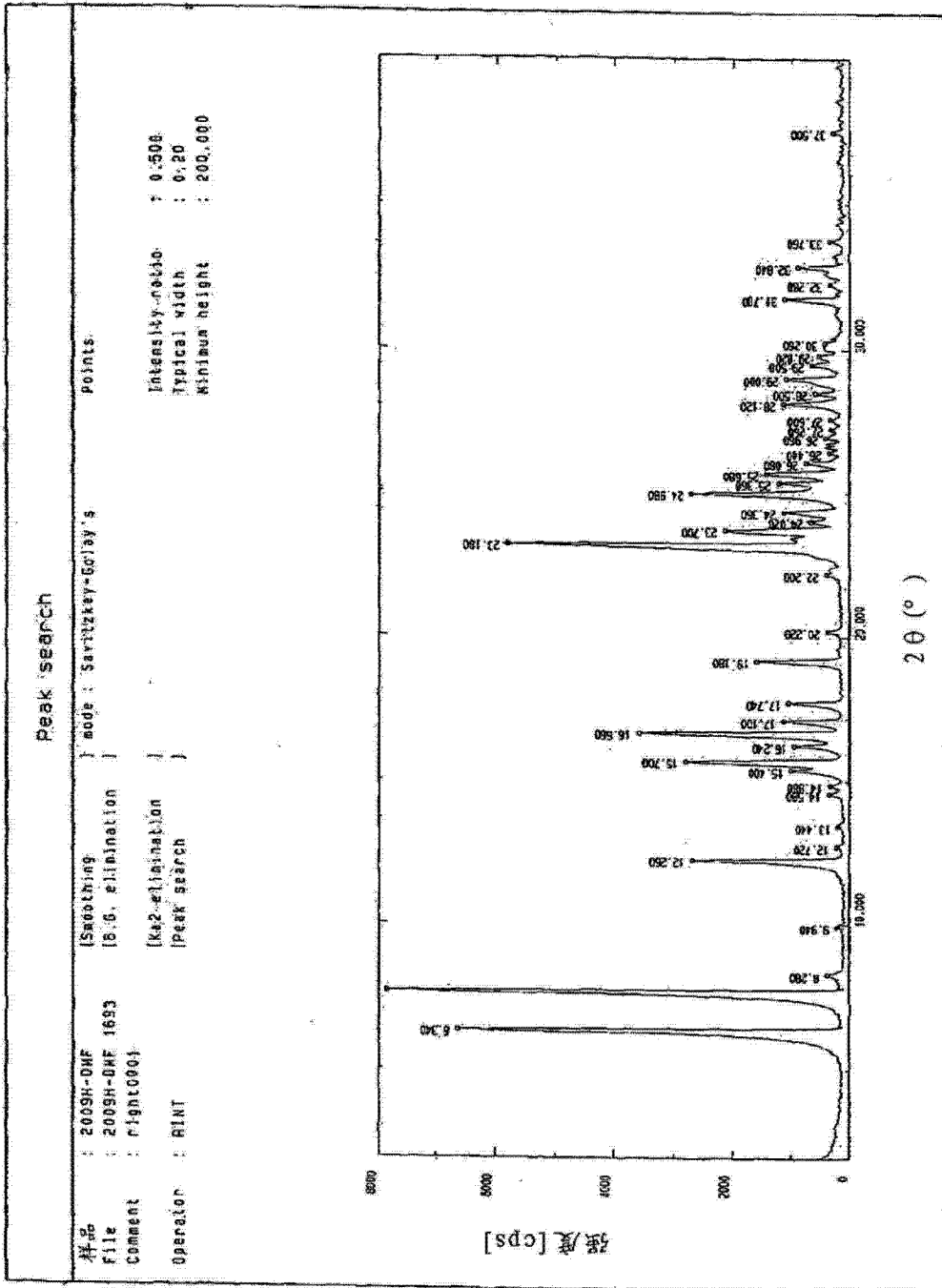


图 4

Peak search												
样品	: 2009H-DMF		File	: 2009H-DMF.1693		Comment	: right0001					
峰编号	2θ	FWHM	0-值	强度	I/I0	峰编号	2θ	FWHM	0-值	强度	I/I0	
1	6.340	0.141	13.9295	5612	84	31	26.150	0.188	9.1707	1192	15	
2	7.650	0.141	11.5318	7855	100	32	28.500	0.141	3.1293	597	8	
3	8.280	0.212	10.6696	381	5	33	29.000	0.165	3.0764	1092	14	
4	9.940	XXXX	8.8912	215	3	34	29.500	0.188	3.0254	656	8	
5	12.260	0.141	7.2134	2675	34	35	29.820	0.235	2.8937	545	7	
6	12.720	XXXX	6.9536	224	3	36	30.260	0.188	2.9512	424	5	
7	13.440	XXXX	6.5826	197	3	37	31.780	0.165	2.8134	1132	14	
8	14.580	0.185	5.0704	359	5	38	32.260	0.188	2.7709	335	4	
9	14.880	0.188	5.9487	338	4	39	32.840	0.141	2.7250	896	11	
10	15.400	0.141	5.7480	1003	13	40	33.760	0.141	2.6528	348	4	
11	15.700	0.188	5.6398	2796	36	41	37.500	XXXX	2.3963	286	4	
12	16.240	0.141	5.4524	943	12							
13	16.660	0.165	5.3169	3581	46							
14	17.100	0.165	5.1611	1135	14							
15	17.740	0.141	4.9956	1047	13							
16	18.180	0.165	4.8236	1600	20							
17	20.220	0.141	4.3661	379	5							
18	22.200	0.118	4.0010	404	5							
19	23.180	0.165	3.8340	5797	74							
20	23.700	0.212	3.7511	2133	27							
21	24.020	0.165	3.7018	665	9							
22	24.360	0.165	3.6509	1138	14							
23	24.980	0.195	3.5617	2710	34							
24	25.360	0.141	3.5092	1228	15							
25	25.680	0.188	3.4662	1427	18							
26	26.080	0.188	3.4139	749	10							
27	26.440	0.141	3.3682	352	4							
28	26.960	0.212	3.3044	409	5							
29	27.260	0.141	3.2667	313	4							
30	27.600	0.118	3.2292	327	4							

图 4 续

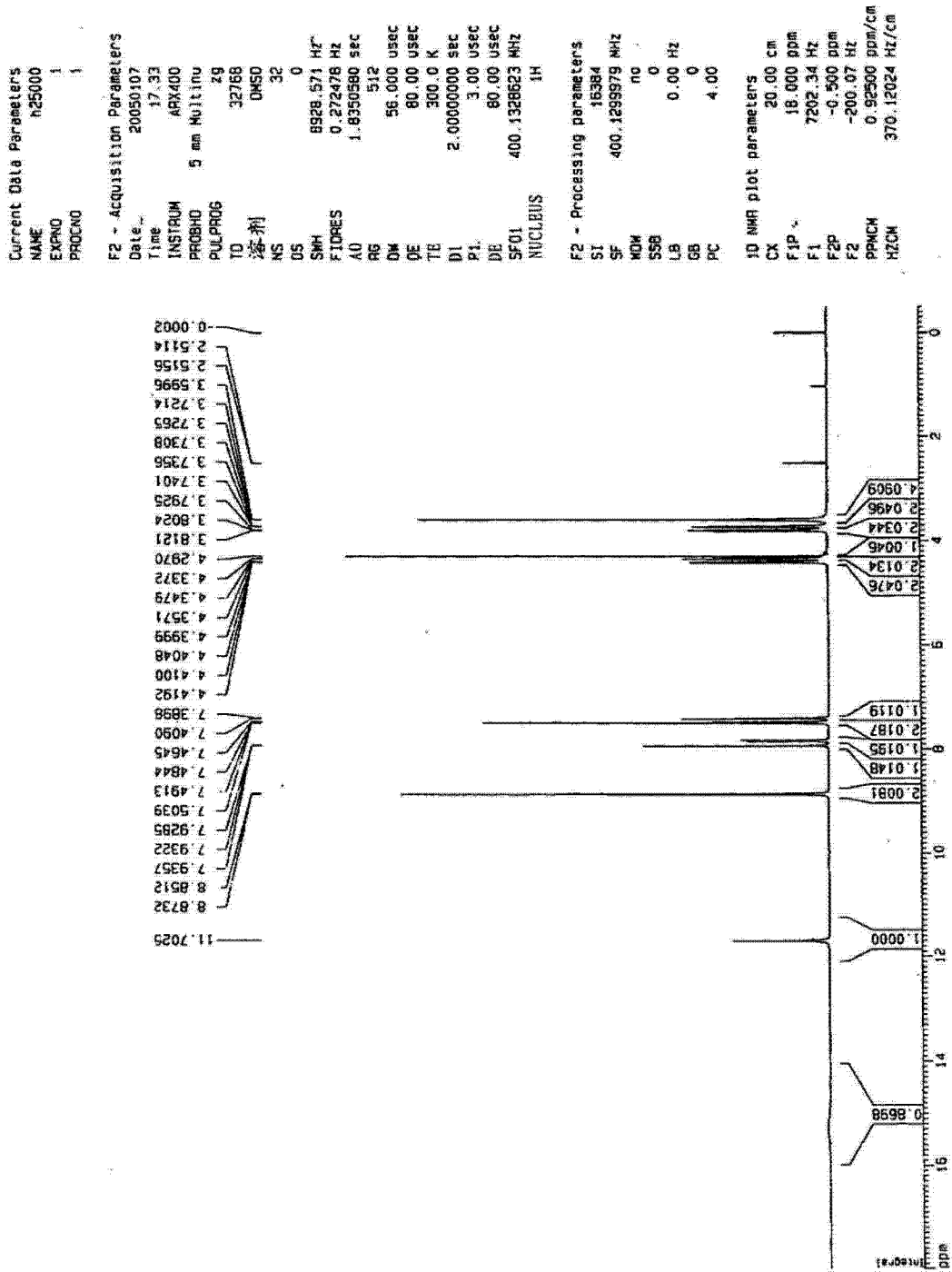


图 5

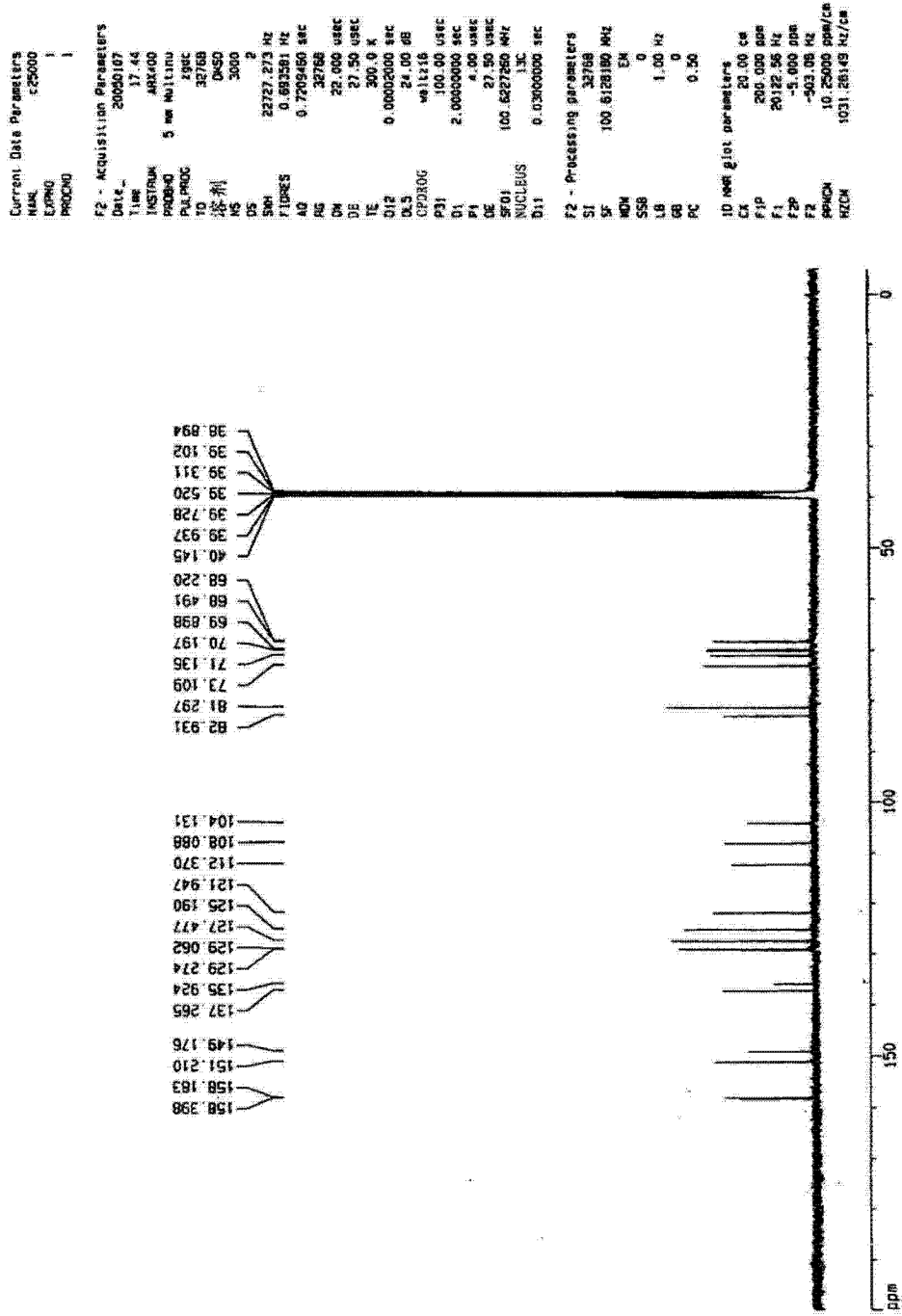


图 6