(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118201940 A
(43)申请公布日 2024.06.14

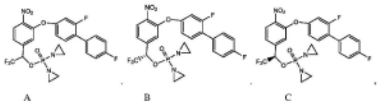
(21)申请号 202180103860.6
(22)申请日 2021.11.05
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.04.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2021/129077 2021.11.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/077452 ZH 2023.05.11
(71)申请人 深圳艾欣达伟医药科技有限公司
地址 518118 广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号
(72)发明人 李安蓉 段建新 孟繁英 齐天阳 孟滕 张梦云
(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
专利代理师 张拥 张广育
(51)Int.Cl.
C07F 9/24(2006.01)
C07F 9/564(2006.01)
A61K 31/664(2006.01)
A61K 31/396(2006.01)
A61K 31/04(2006.01)
A61K 31/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

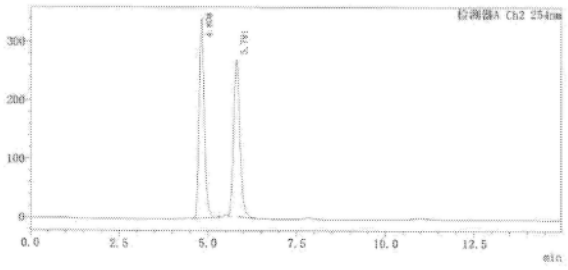
(54)发明名称

AKR1C3活化的DNA烷化剂及其医药用途

(57)摘要

具有以下任一结构式(A,B,C)的AKR1C3活化的DNA烷化剂,或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体,及其抗癌医药用途。





CN 118201940 A

(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 5 月 11 日 (11.05.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/077452 A1

(51) 国际专利分类号:
C07F 9/24 (2006.01) *A61K 31/04* (2006.01)
C07F 9/564 (2006.01) *A61K 31/06* (2006.01)
A61K 31/664 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/396 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/129077

(22) 国际申请日: 2021 年 11 月 5 日 (05.11.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳艾欣达伟医药科技有限公司(ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003室, Guangdong 518118 (CN)。

(72) 发明人: 李安蓉(LI, Anrong); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。 段建新(DUAN, Jianxin); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。 孟繁英(MENG, Fanying); 美国加利福尼亚州旧金山市第47大街830号, California 94121 (US)。 齐天阳(QI, Tianyang); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。 孟滕(MENG, Teng); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。 张梦云(ZHANG, Mengyun); 中国广东省深圳市坪山区坑梓街道金沙社区金辉路14号生物医药创新产业园区10号楼10层1003号, Guangdong 518118 (CN)。

(74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。

(54) **Title:** AKR1C3-ACTIVATED DNA ALKYLATING AGENT, AND MEDICAL APPLICATION THEREOF

(54) **发明名称:** AKR1C3活化的DNA烷化剂及其医药用途

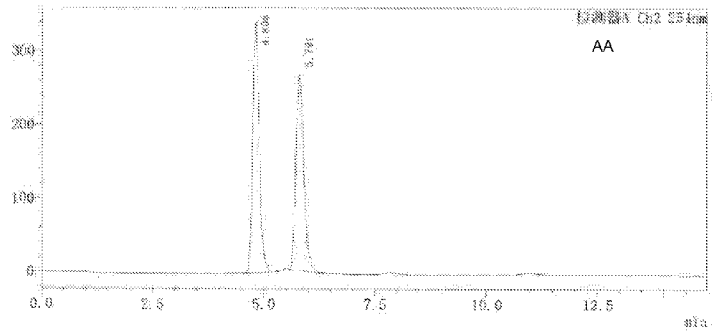
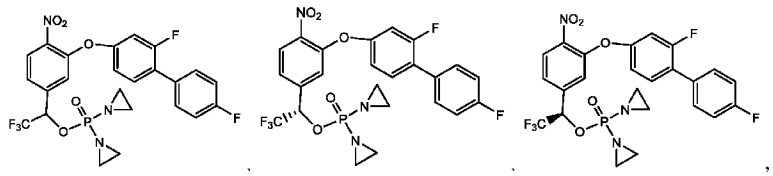


图 1 AA Detector



A B C

(57) **Abstract:** An AKR1C3-activated DNA alkylating agent having any one of the following structural formulas (A, B, C), or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a prodrug thereof, or a solvate thereof, or an isotopic variant thereof, and an anticancer medical application thereof.

(57) **摘要:** 具有以下任一结构式（A，B，C）的AKR1C3活化的DNA烷化剂，或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体，及其抗癌医药用途。

[见续页]

WO 2023/077452 A1

(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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

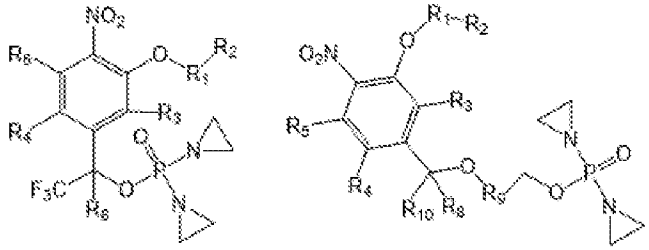
AKR1C3 活化的 DNA 烷化剂及其医药用途

技术领域

本发明涉及癌症治疗化合物领域，属于药物小分子研究领域。

背景技术

发明人段建新、李安蓉等的专利 PCT/CN2020/089692（申请日为 2020 年 5 月 12 日），公开了如下通式的一系列化合物及其抗癌用途：



该发明为了克服 AST-3424 为油状物而不便于制剂、储存和运输的缺点，通过在 AST-3424 及其类似结构化合物的分子结构中的特定位置引入三氟甲基而得到了固体（部分为蜡状物）状态的化合物，并通过初步的细胞测试证实了上述引入三氟甲基的化合物依然是 AKR1C3 活化的 DNA 烷化剂。

在对 AST-3424 进行进一步的研究中发现其是 P-gp 底物，不能透过血脑屏障，对发生在脑部的肿瘤无效。

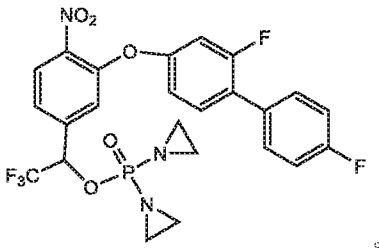
因此应进一步研发能进入脑部或其他中枢神经系统的 AKR1C3 活化的小分子化合物。

发明内容

发明人在后续的研发和筛选中，发现 PCT/CN2020/089692 中公开的 16 号化合物具有穿过脑部或其他中枢神经系统的性质，有望进一步开发为治疗脑部或其他中枢神经系统肿瘤的药物。

本发明提供一种能进入脑部或其他中枢神经系统的 AKR1C3 活化的小分子化合物，其作用机理是通过 AKR1C3 酶的作用后，释放出 DNA 烷化剂，从而起到抑制、杀灭肿瘤细胞的效果。

具体而言，上述 16 号化合物结构式如下：

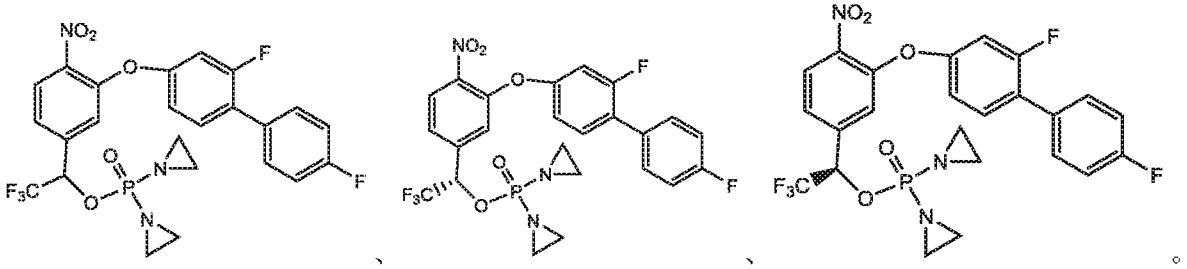


。

实验证明该化合物具有较强的癌细胞增殖抑制活性，特别在 AKR1C3 酶激活下，癌细胞抑制活性更强；而且这些化合物经过测试表明不是 Pgp（P-Glycoprotein，P-糖蛋白）的底物，能够透过血脑屏障，能够进入脑部或其他中枢神经系统发挥药效；进一步在血清和肝微粒体以及动物模型实验中也显示该化合物具有较好的稳定性，对肿瘤具有较好的清除抑制效果。

基于以上的研究发现，本发明提供以下的 AKR1C3 活化的 DNA 烷化剂并明确其具有相关的抗癌、抗肿瘤医药用途。

本发明提供具有以下 A、B、C 任一结构式的化合物，或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体：



A B C

所述盐为碱式盐或酸式盐，所述溶剂合物为水合物或醇合物。

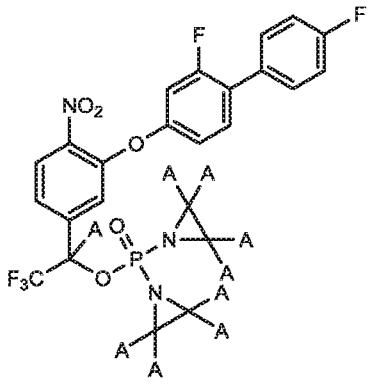
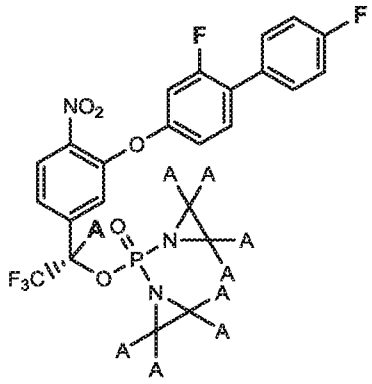
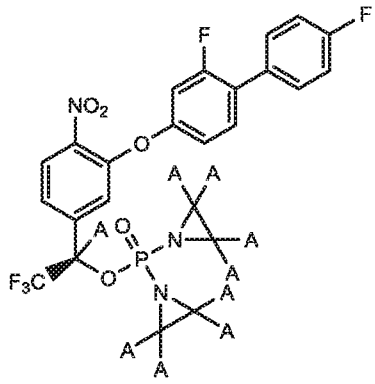
优选地，所述醇合物为乙醇合物。

本发明提供上述三个化合物的药学上可接受的盐，所述盐可以为碱式盐，包括所述化合物与无机碱（例如碱金属氢氧化物、碱土金属氢氧化物等）或与有机碱（例如单乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺等）形成的盐。或者，所述盐可以为酸式盐，包括所述化合物与无机酸（例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、高氯酸、硫酸或磷酸等）或与有机酸（例如甲磺酸、三氟甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、富马酸、草酸、马来酸、柠檬酸等）形成的盐。选择和制备化合物的可接受的盐和溶剂化物等是本领域的公知技术。

关于本文的化合物还可以溶剂合物的形式使用，即本发明提供上述三个化合物的药学上可接受的溶剂合物，所述溶剂合物为水合物、醇合物等，醇合物包括乙醇合物。

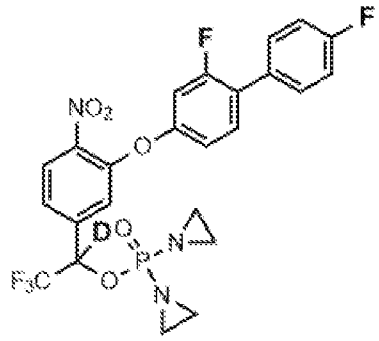
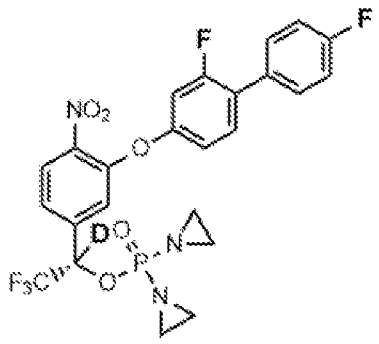
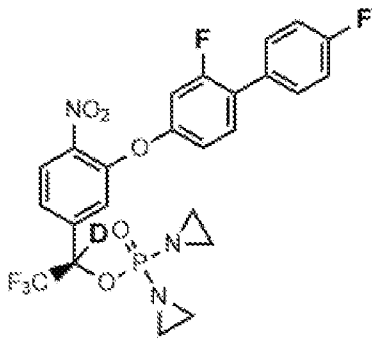
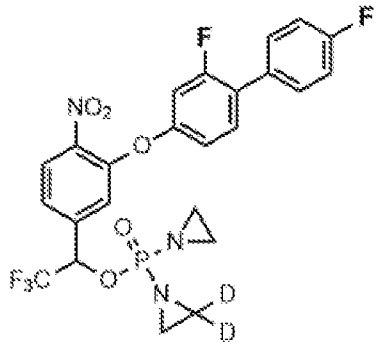
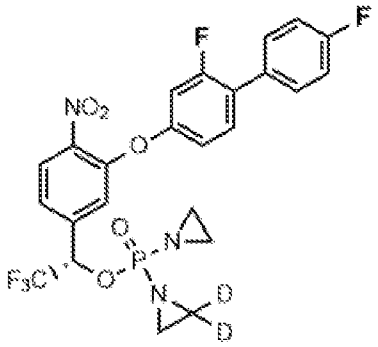
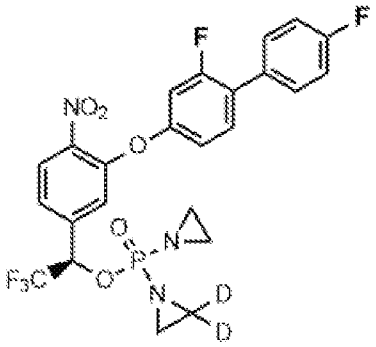
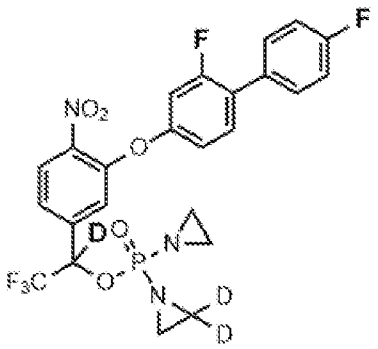
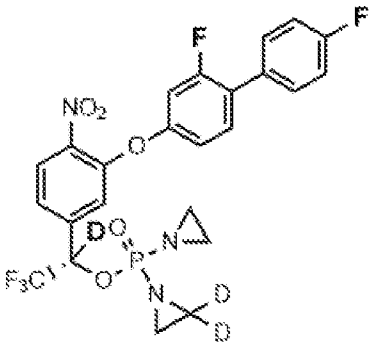
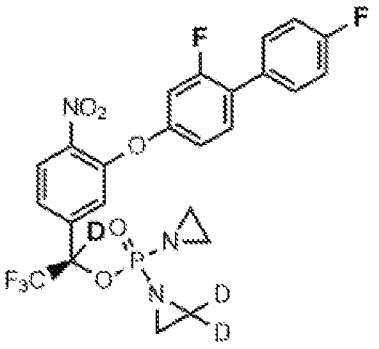
术语“同位素变体”是指在组成此类化合物的原子中的一或多者处含有非天然比例的同位素的化合物。在某些实施例中，化合物的“同位素变体”含有非天然比例的一或多种同位素，包括(但不限于)氢(^{1}H)、氘(^{2}H)、氚(^{3}H)、碳-11(^{11}C)、碳-12(^{12}C)、碳-13(^{13}C)、碳-14 (^{14}C)、氮-13 (^{13}N)、氮-14 (^{14}N)、氮-15(^{15}N)、氧-14(^{14}O)、氧-15(^{15}O)、氧-16 (^{16}O)、氧-17 (^{17}O)、氧-18 (^{18}O)、氟-17(^{17}F)、氟-18(^{18}F)、磷-31(^{31}P)、磷-32 (^{32}P)、磷-33 (^{33}P)、硫-32 (^{32}S)、硫-33(^{33}S)、硫-34(^{34}S)、硫-35(^{35}S)、硫-36(^{36}S)、氯-35(^{35}Cl)、氯-36 (^{36}Cl)、氯-37(^{37}Cl)、溴-79(^{79}Br)、溴-81(^{81}Br)、碘-123(^{123}I)、碘-125(^{125}I)、碘-127(^{127}I)、碘-129(^{129}I)及碘-131(^{131}I)。在某些实施例中，化合物的“同位素变体”呈稳定形式，亦即非放射性。在某些实施例中，化合物的“同位素变体”含有非天然比例的一或多种同位素，包括(但不限于)氢(^{1}H)、氘(^{2}H)、碳-12(^{12}C)、碳-13(^{13}C)、氮-14(^{14}N)、氮-15(^{15}N)、氧-16(^{16}O)、氧-17(^{17}O)、氧-18(^{18}O)、氟-17(^{17}F)、磷-31(^{31}P)、硫-32(^{32}S)、硫-33(^{33}S)、硫-34(^{34}S)、硫-36(^{36}S)、氯-35(^{35}Cl)、氯-37(^{37}Cl)、溴-79(^{79}Br)、溴-81(^{81}Br)及碘-127(^{127}I)。在某些实施例中，化合物的“同位素变体”呈不稳定形式，亦即放射性。在某些实施例中，化合物的“同位素变体”含有非天然比例的一或多种同位素，包括(但不限于)氚(^{3}H)、碳-11(^{11}C)、碳-14(^{14}C)、氮-13(^{13}N)、氧-14(^{14}O)、氧-15(^{15}O)、氟-18(^{18}F)、磷-32(^{32}P)、磷-33(^{33}P)、硫-35(^{35}S)、氯-36(^{36}Cl)、碘-123(^{123}I)、碘-125(^{125}I)、碘-129 (^{129}I)及碘-131(^{131}I)。应理解，在如本文提供的化合物中，在根据本领域技术人员的判断为可行时，任何氢可为例如^{2}H即D，或任何碳可为例如^{13}C，或任何氮可为例如^{15}N，及任何氧可为^{18}O。在某些实施例中，化合物的“同位素变体”含有非天然比例的氘（D）。

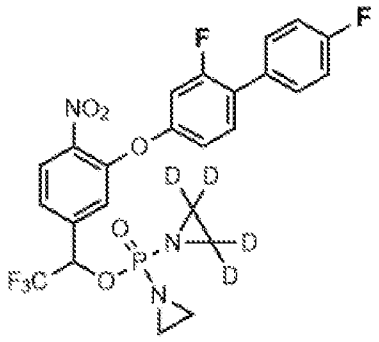
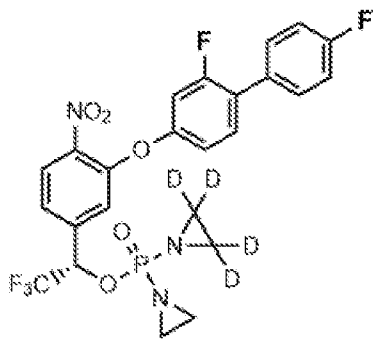
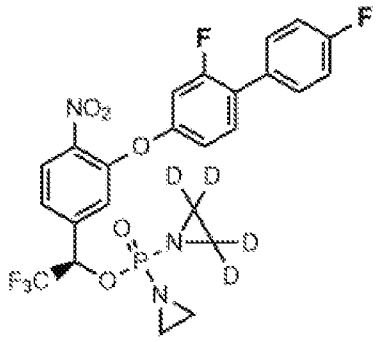
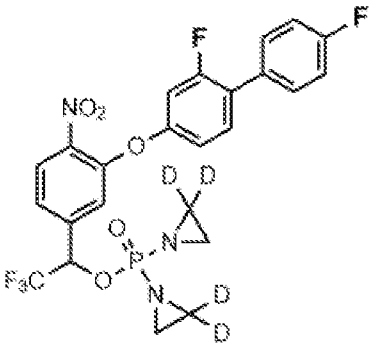
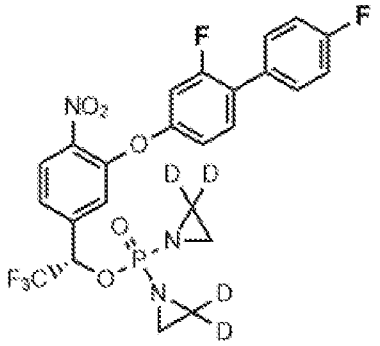
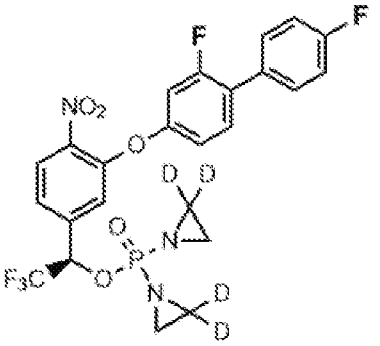
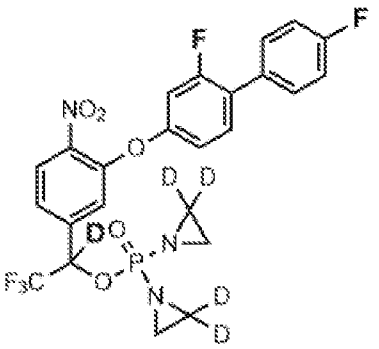
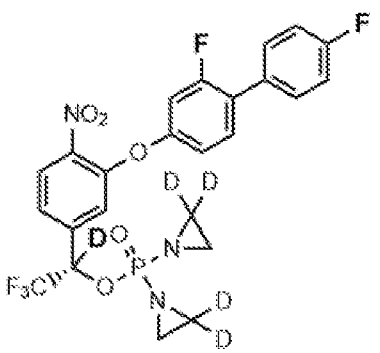
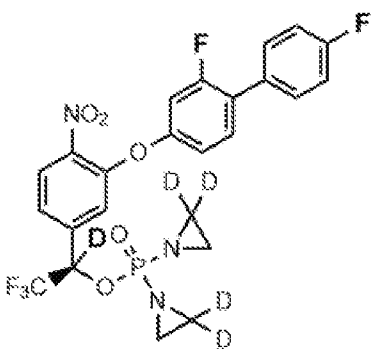
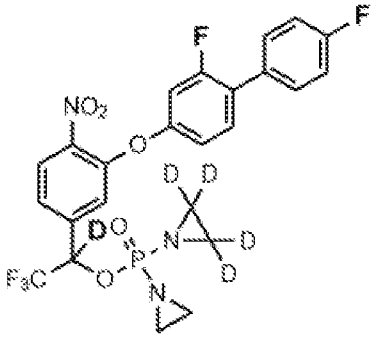
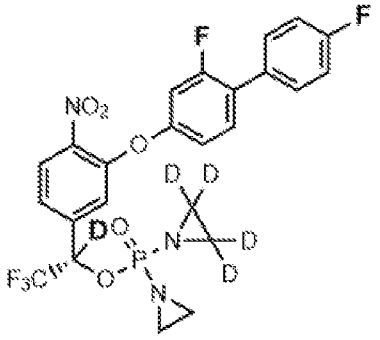
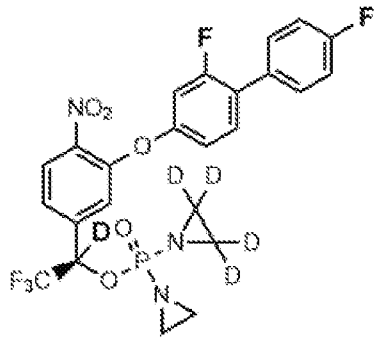
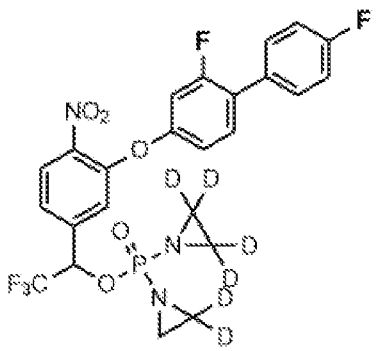
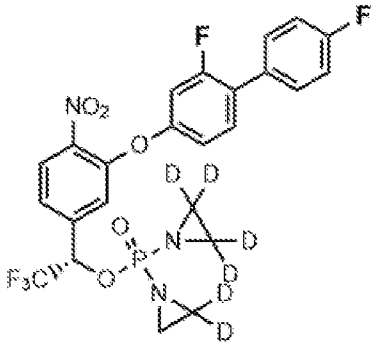
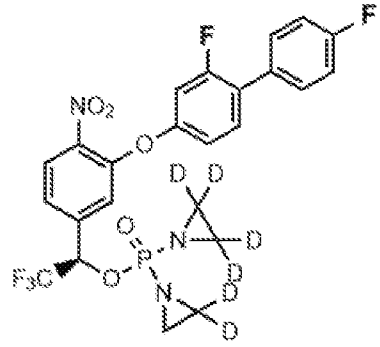
本发明提供的同位素变体对应选自以下结构的氘代化合物：

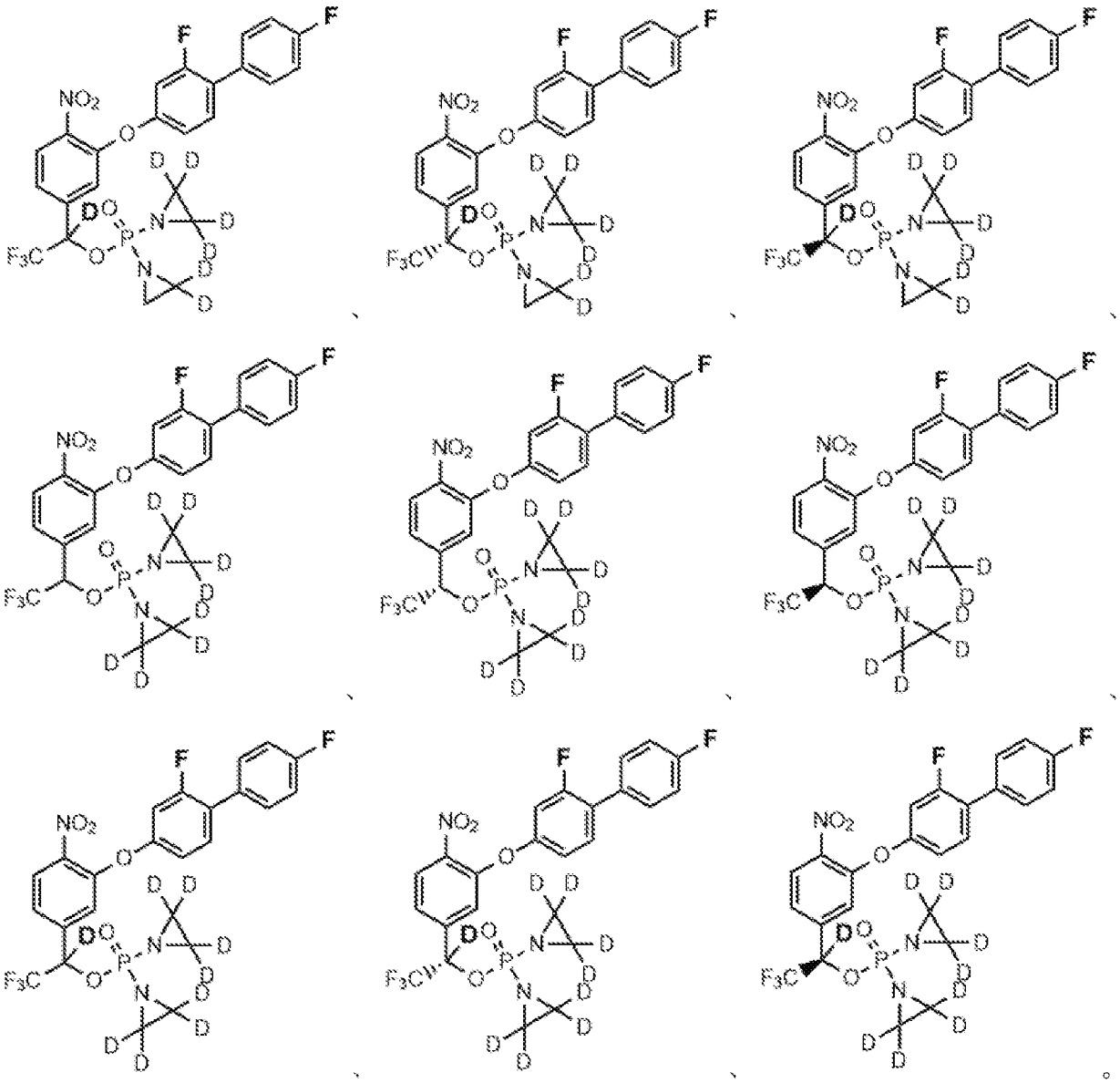




其中，A 各自独立地为 H 或 D，且 9 个 A 中至少一个为 D。

优选地，所述同位素变体对应的氘代化合物如下：


、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、



本发明提供含有上述A、B、C任一结构的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体的药物。

本发明还提供上述的药物用于治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的用途。

治疗包括单药和联合用药治疗。

单药，即单药治疗。联用，即联合用药治疗。单药治疗是指在一个疗程中仅使用一种抗癌药物。联合治疗是指在一个疗程中同时或先后使用两种或两种以上的抗癌药物。

一般而言，联合治疗需要根据病情特点、联用药物种类探索不同的给药剂量、给药周期，只有根据上述情况，探索得到的联合用药治疗方案才可能取得较单一用药治疗好的治疗效果。

单药和联用治疗方案的药物给药剂量、给药周期均需要在参考上述化合物A、B、C及其类似化合物和其他药物的剂量、给药方案通过临床试验探索得到。

本发明同时提供 A、B、C 任一结构的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体的化合物在治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的用途。

特别地，上述癌症或肿瘤为肺癌、胰腺癌、肝癌、胃癌。

特别地，上述癌症或肿瘤为原发性脑癌、脑肿瘤或转移至脑的转移性癌症或肿瘤。

本发明提供上述 A、B、C 任一结构的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体在制备治疗癌症患者、肿瘤患者或由癌症、肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的药物中的用途。

上述肿瘤、癌症包括：肺癌、非小细胞肺癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、骨癌、食道癌、乳房癌、前列腺癌、睾丸癌、结肠癌、卵巢癌、膀胱癌、子宫颈癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊性腺癌、囊性癌、髓状癌、支气管癌、骨细胞癌、上皮癌、胆管癌、绒毛膜癌、胚癌、精原细胞癌、维尔姆斯癌、胶质细胞癌、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血细胞瘤、声带神经瘤、脑膜瘤、成神经细胞瘤、成视神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、神经纤维瘤、纤维肉瘤、成纤维细胞瘤、纤维瘤、纤维腺瘤、纤维软骨瘤、纤维囊瘤、纤维粘液瘤、纤维骨瘤、纤维粘液肉瘤、纤维乳头状瘤、粘液肉瘤、粘液囊瘤、粘液软骨瘤、粘液软骨肉瘤、粘液软骨纤维肉瘤、粘液腺瘤、成粘液细胞瘤、脂肉瘤、脂肪瘤、脂肪腺瘤、成脂细胞瘤、脂肪软骨瘤、脂肪纤维瘤、脂肪血管瘤、粘液脂瘤、软骨肉瘤、软骨瘤、软骨肌瘤、脊索瘤、绒毛膜腺瘤、绒毛上皮瘤、成绒毛膜细胞瘤、骨肉瘤、成骨细胞瘤、骨软骨纤维瘤、骨软骨肉瘤、骨软骨瘤、骨囊瘤、骨牙质瘤、骨纤维瘤、骨纤维肉瘤、血管肉瘤、血管瘤、血管脂肪瘤、血管软骨瘤、成血管细胞瘤、血管角质瘤、血管神经胶质瘤、血管内皮瘤、血管纤维瘤、血管肌瘤、血管脂肪瘤、血管淋巴管瘤、血管脂肪平滑肌瘤、血管肌脂瘤、血管肌神经瘤、血管粘液瘤、血管网状内皮瘤、淋巴管肉瘤、淋巴肉芽瘤、淋巴管瘤、淋巴瘤、淋巴粘液瘤、淋巴肉瘤、淋巴管纤维瘤、淋巴细胞瘤、淋巴上皮瘤、成淋巴细胞瘤、内皮瘤、成内皮细胞瘤、滑膜瘤、滑膜肉瘤、间皮瘤、结缔组织瘤、尤因瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、成平滑肌瘤、平滑肌纤维瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、横纹肌粘液瘤、急性淋巴白血病、急性骨髓性白血病、慢性病贫血、红细胞增多症、淋巴瘤、子宫内膜癌、胶质瘤、结直肠癌、甲状腺癌、尿路上皮癌或多发性骨髓瘤。

优选地，所述癌症或肿瘤为原发性脑癌、脑肿瘤或转移至脑的转移性癌症、肿瘤。

优选地，所述癌症或肿瘤为肺癌、胰腺癌、肝癌、胃癌；更优选地，所述肺癌为非小细胞肺癌。

本发明提供治疗癌症或肿瘤的方法，其包含a或b的步骤：

a.测定患者癌细胞或组织的AKR1C3还原酶含量，如测得该AKR1C3还原酶含量等于或大于预定值，则向该患者投与上述的药物或投与含有上述A、B、C任一结构的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体；

b.测定患者癌细胞或组织的AKR1C3还原酶对应RNA的表达水平，如测得该RNA的表达水平在预定值范围内，则向该患者投与上述的药物或投与含有上述A、B、C任一结构的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体。

AKR1C3 还原酶含量测定可以使用的方法包括但不限于 ELISA 法、IHC 法。

可使用商业化的人醛酮还原酶 1C3(AKR1C3)ELISA 检测试剂盒对血浆、血液等液体样品进行直接检测，其他样本进行处理后进行检测。

IHC 法即免疫组织化学方法，适用于对实体肿瘤样本进行检测。

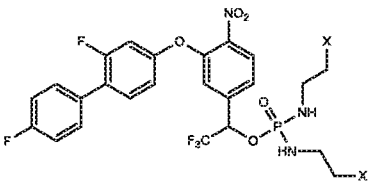
有研究表明，放疗后的头颈癌患者的肿瘤组织的 AKR1C3 酶含量升高，因此通过放疗辐射的放射线照射患者的肿瘤组织有可能提高 AKR1C3 酶的表达水平，放射线包括放射性同位素产生的 α、β、γ 射线和各类 X 射线治疗机或加速器产生的 X 射线、电子线、质子束及其他粒子束等。

本发明提供另一治疗癌症或肿瘤的方法，其包含 AKR1C3 还原酶含量调节步骤，当调节使得该 AKR1C3 还原酶含量等于或大于预定值，则向该患者投与上述的药物或投与含有上述 A、B、C 任一结构的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位

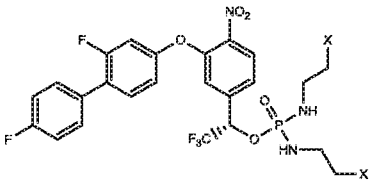
素变体。

这种方法主要是针对患者的 AKR1C3 还原酶含量较低的情况，通过一定的调节治疗/给药过程，将该患者的 AKR1C3 还原酶含量调节到合适的水平。

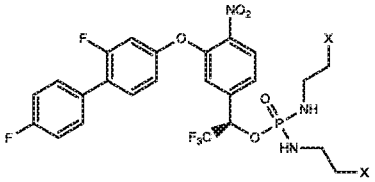
本发明提供制备以下结构 I（化合物 A、B、C）的 AKR1C3 活化的化合物的方法，其包括使得化合物 I-1、I-2 或 I-3 分别发生关环反应得到对应的化合物 A、B 或 C：



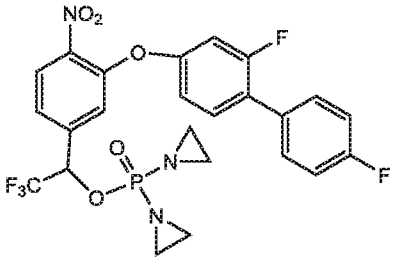
I-1



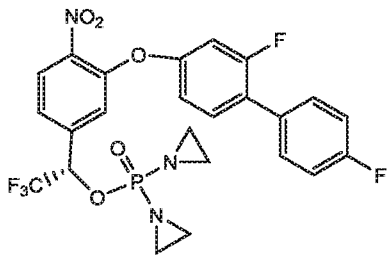
I-2



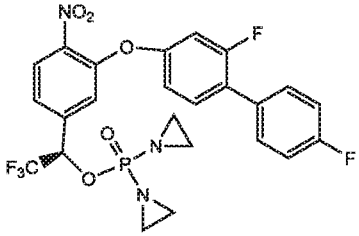
I-3



A



B

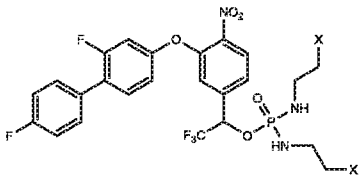


C

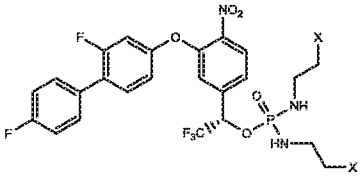
其中，X 各自独立地为氟、氯、溴、碘，优选为溴。

上述制备方法中，关环反应使用氧化银或硝酸银作为催化剂，反应中加入或不加入有机碱。有机碱优选为 N,N-二异丙基乙胺或三乙胺。

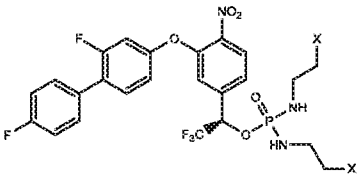
本发明提供具有以下任一结构式的化合物：



I-1



I-2

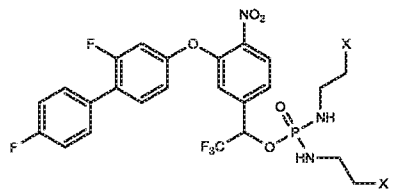


I-3

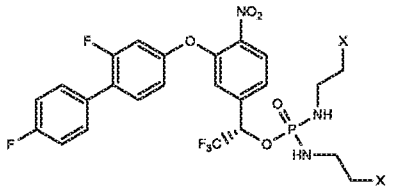
其中，X 各自独立地为氟、氯、溴、碘，优选为溴。

本发明提供上述 I-1、I-2 或 I-3 结构化合物的用途，其作为合成上述的 AKR1C3 活化的 DNA 烷化剂（化合物 A、B、C 或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体）的中间体或用于制备治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的药物。

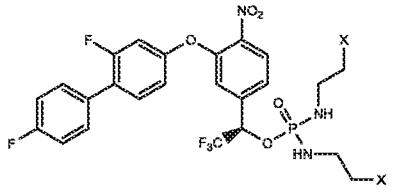
本发明提供合成以下 I-1、I-2 或 I-3 结构的化合物的方法，其包括以化合物 II-1、II-2 或 II-3 作为起始反应物分别与三卤氧磷发生第一次反应得到中间体，然后该中间体与卤代乙胺或卤代乙胺的氢卤酸盐发生第二次反应，最后分别得到对应的化合物 I-1、I-2 或 I-3：



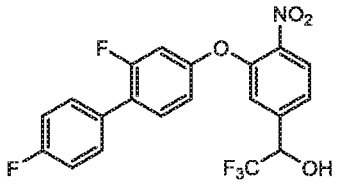
I-1

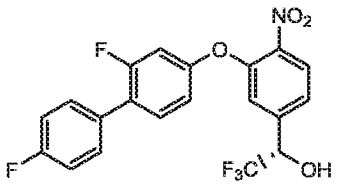


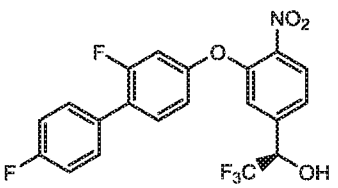
I-2



I-3


II-1


II-2


II-3

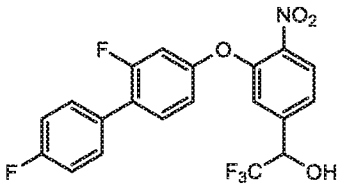
其中，结构化合物 I-1、I-2 或 I-3 中的两个 X 各自独立地为 F、Cl、Br、I，优选为 Br；

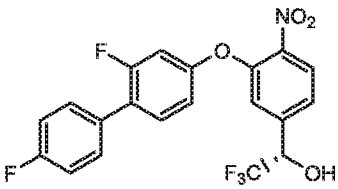
三卤氧磷选自三氟氧磷、三氯氧磷、三溴氧磷、三碘氧磷，优选为三氯氧磷；

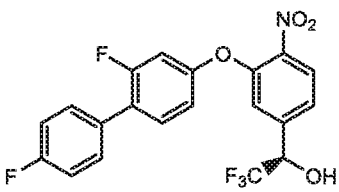
三卤氧磷中的卤素原子与化合物 I-1、I-2 或 I-3 中的两个 X 可以相同也可以不同；

优选地，卤代乙胺为溴代乙胺，卤代乙胺的氢卤酸盐为溴代乙胺的氢溴酸盐。

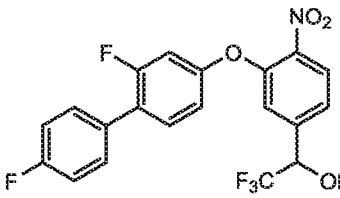
本发明提供以下任一结构的化合物：

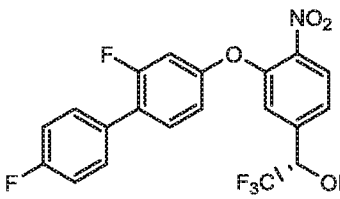

II-1

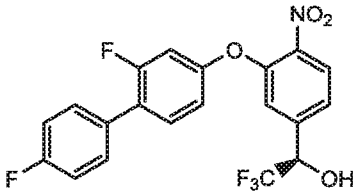

II-2


II-3

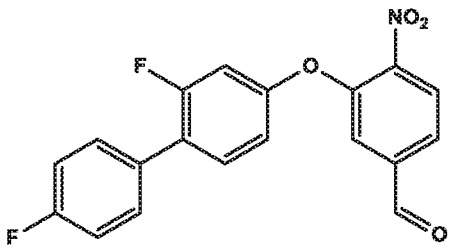
本发明提供合成以下结构的任一化合物的方法：

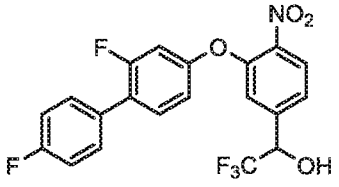

II-1

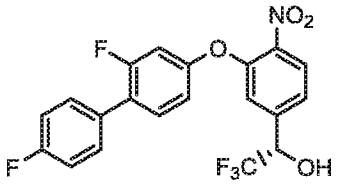

II-2

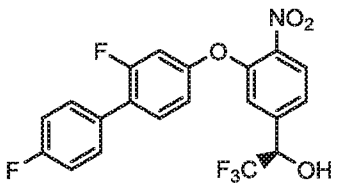

II-3

将化合物 III-3 与 TMSCF3 接触反应，并经脱保护操作后水解得到消旋的醇 II-1，对消旋的醇 II-1 进行手性拆分操作分别得到手性醇 II-2 和手性醇 II-3。


III-3


II-1

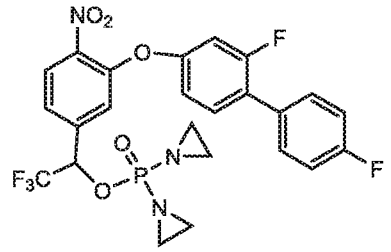

II-2


II-3 。

所述 TMSCF3 为三氟甲基三甲基硅烷，所述脱保护操作使用的脱保护试剂为四丁基氟化铵 TBAF，水解操作使用的是氟化铵、氯化铵水溶液或盐酸。

所述手性拆分的方法包括结晶法和化学拆分法。

本发明提供一种将化合物A的外消旋体分离以得到其中一种对映异构体或在化合物中增浓该化合物的任一对映异构体过量的方法，其包含以下步骤：



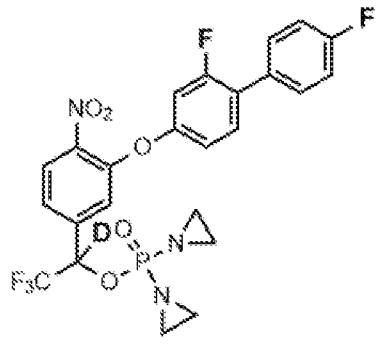
A

使该外消旋体化合物经过光学解析处理，其中通过包含固定相及流动相的手性层析法，其中该固定相包含以官能化多糖浸渍的硅胶，且其中该流动相包含醇及另一溶剂。

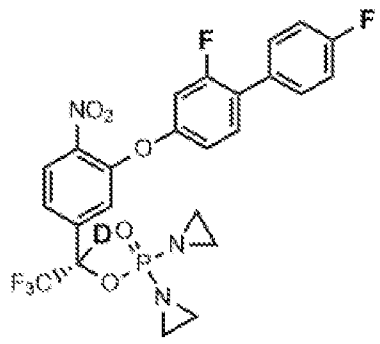
优选的，所述醇为乙醇，另一溶剂为正己烷，手性层析法的操作过程中色谱柱的温度为38°C，所述官能化多糖为直链淀粉-三（3，5-二甲苯基氨基甲酸酯）。

本发明提供另外一种用于将化合物A的外消旋体分离以得到其中一种对映异构体或在化合物中增浓该外消旋体的任一对映异构体过量的HPLC方法，该HPLC方法使用的色谱柱为CHIRALPAK AD，流动相为乙醇，柱温为35℃。

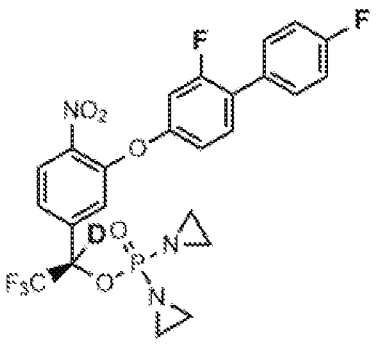
本发明提供制备以下结构的任一氘代化合物的方法，其包括使化合物 IV-1 至 IV-21 分别发生关环反应得到对应的氘代化合物 V-1 至 V-15：



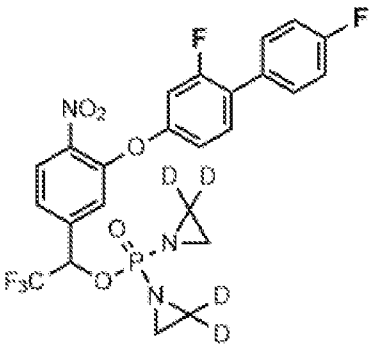
V-1



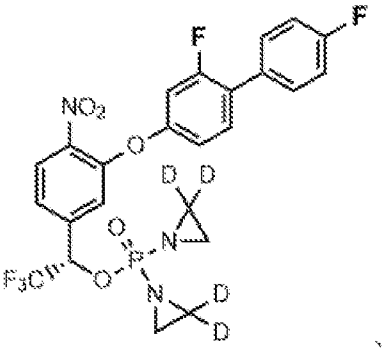
V-2



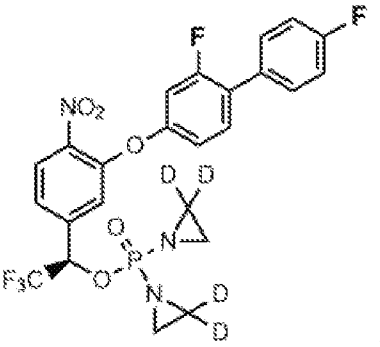
V-3



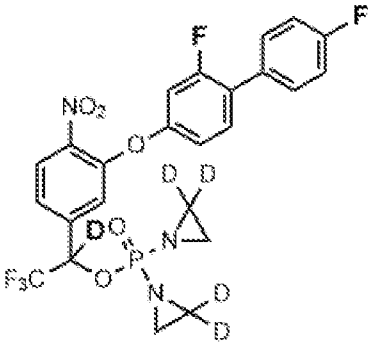
V-4



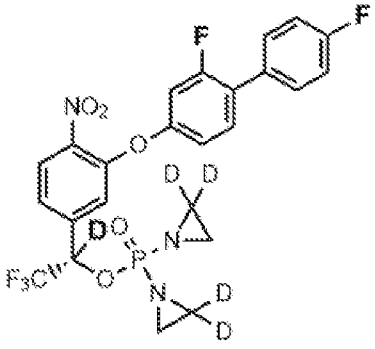
V-5



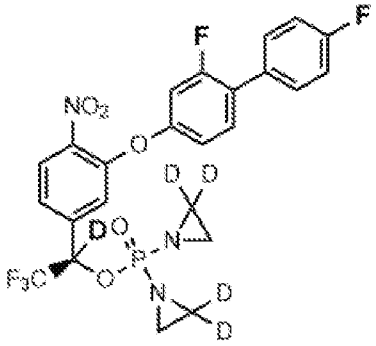
V-6



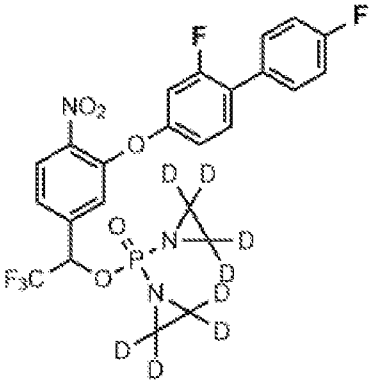
V-7、



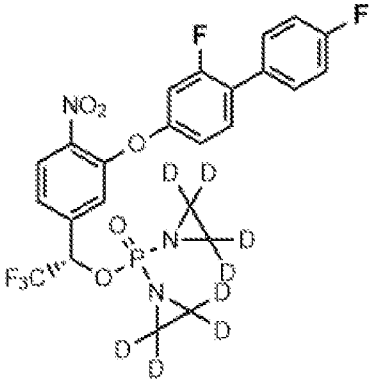
V-8、



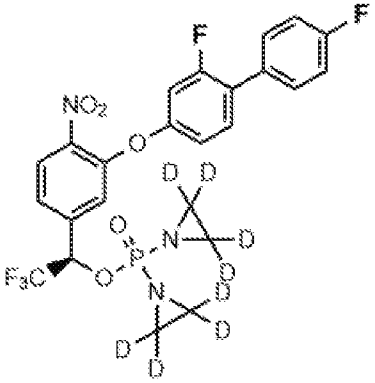
V-9、



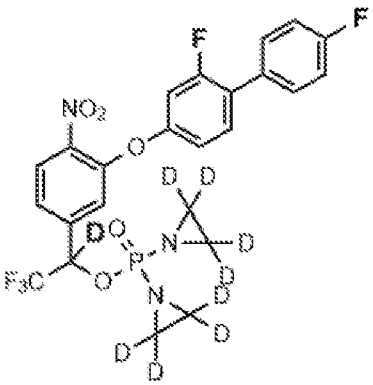
V-10、



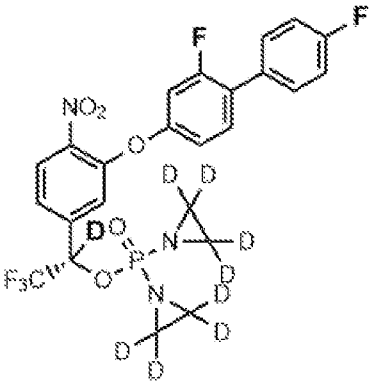
V-11、



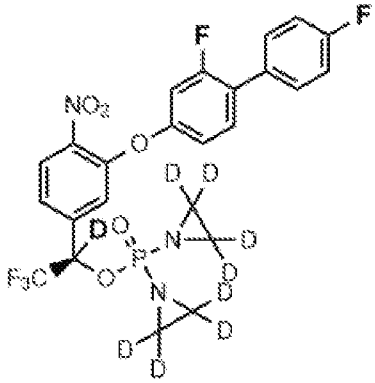
V-12、



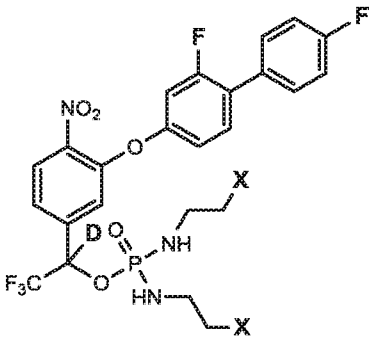
V-13、



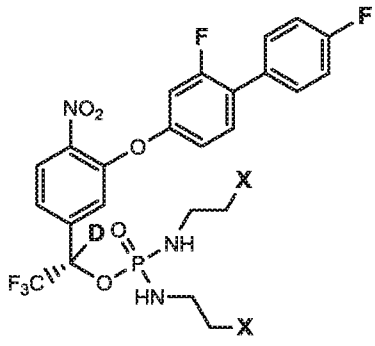
V-14、



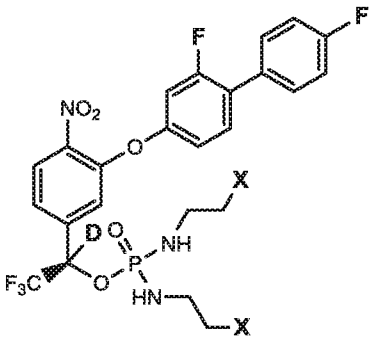
V-15、



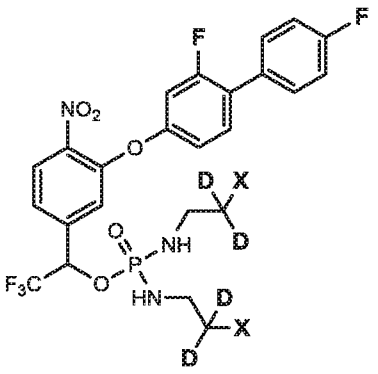
IV-1、



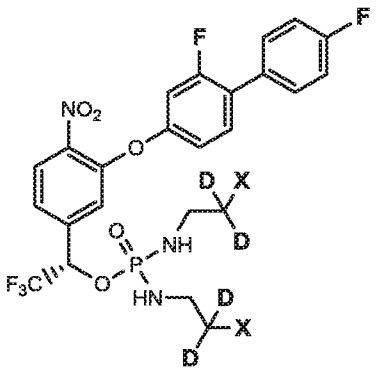
IV-2、



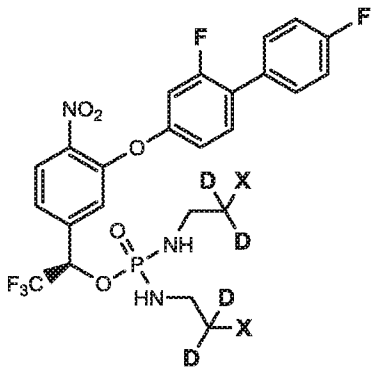
IV-3、



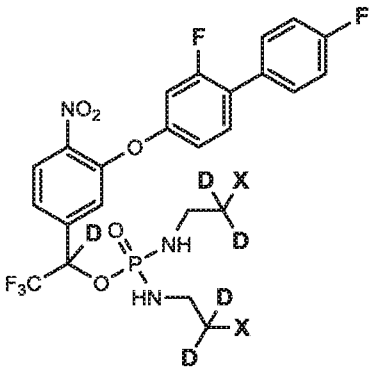
IV-4



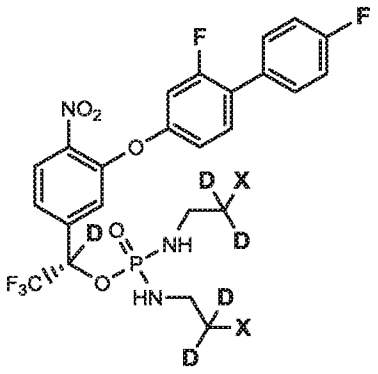
IV-5



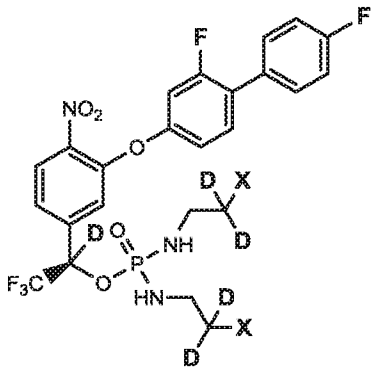
IV-6



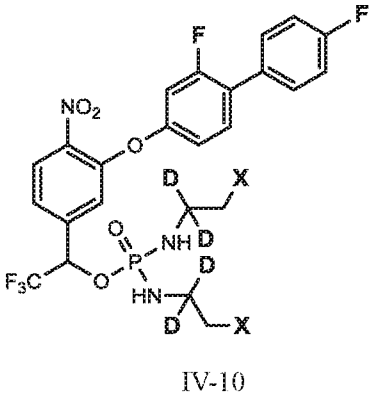
IV-7



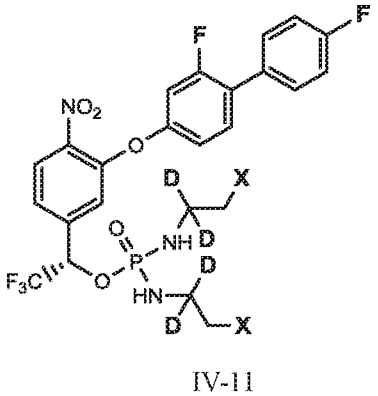
IV-8



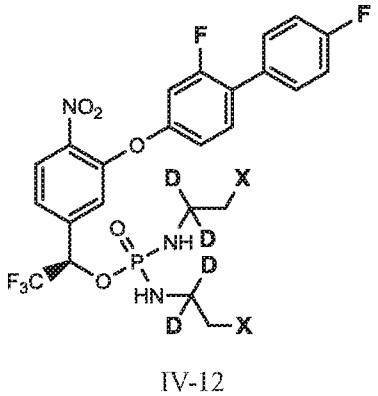
IV-9



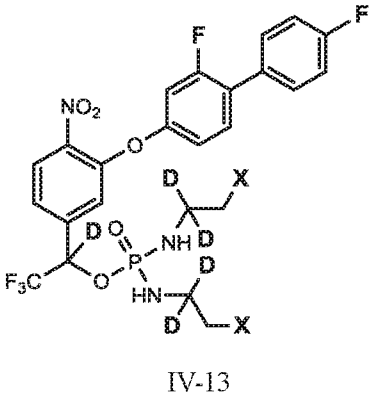
IV-10



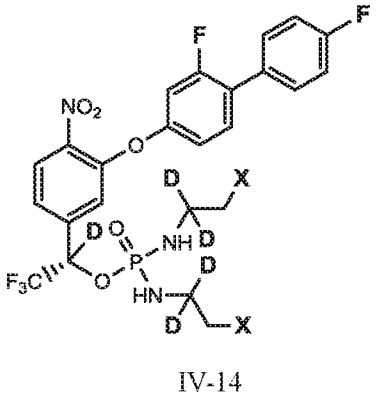
IV-11



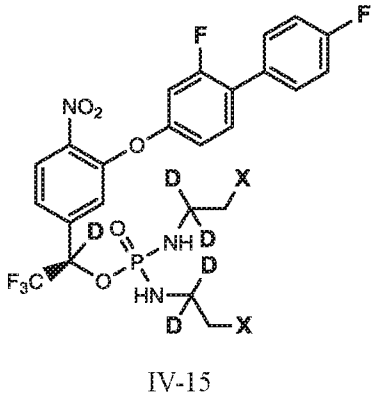
IV-12



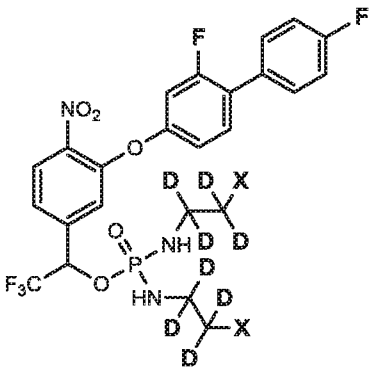
IV-13



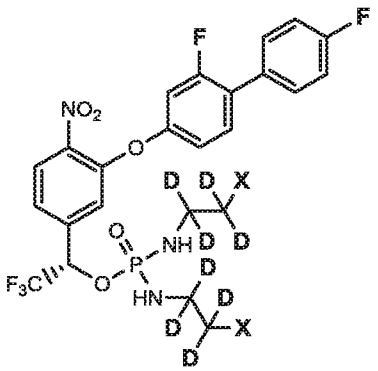
IV-14



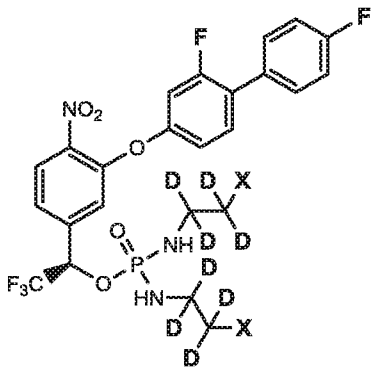
IV-15



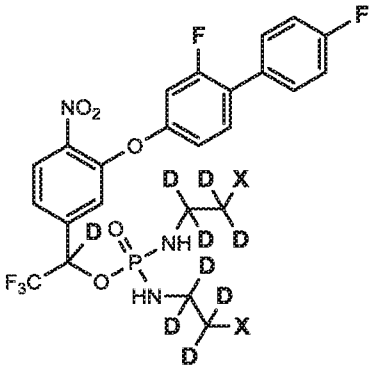
IV-16



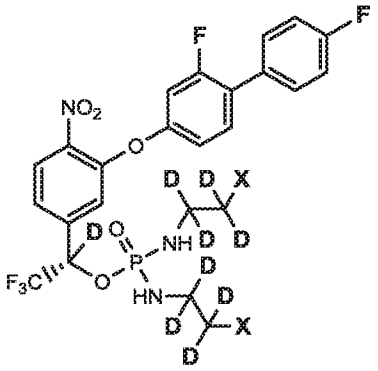
IV-17



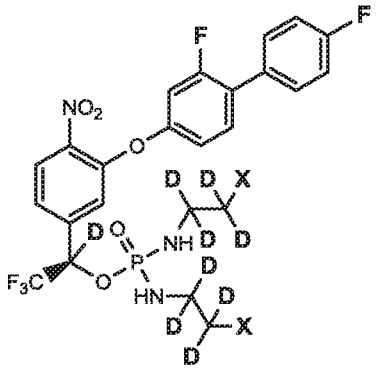
IV-18



IV-19



IV-20

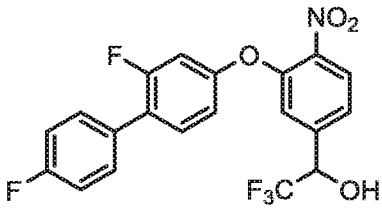


IV-21

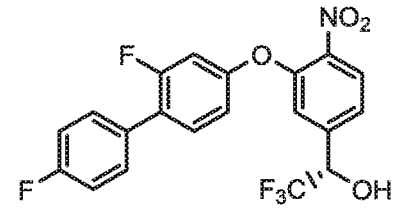
其中，IV-1至IV-21任一化合物中的两个X原子各自独立地为氟、氯、溴、碘，优选为溴；

所述关环反应使用氧化银或硝酸银作为催化剂，反应中加入或不加入碱。

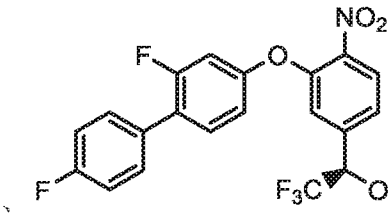
本发明提供制备上述 IV-1 至 IV-21 任一化合物的方法，其包括以化合物 II-1、II-2、II-3 或其氘代物 II-1a、II-2a、II-3a 作为起始反应物分别与三卤氧磷发生第一次反应得到中间体，然后该中间体与对应的氘代卤代乙胺 VI-1 或 VI-2，或氘代卤代乙胺 VI-1 或 VI-2 的氢卤酸盐发生第二次反应，最后得到对应的化合物 IV-1 至 IV-21：



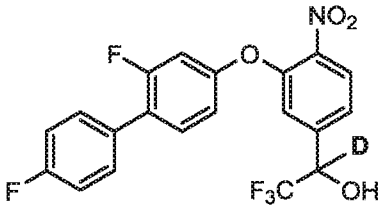
II-1



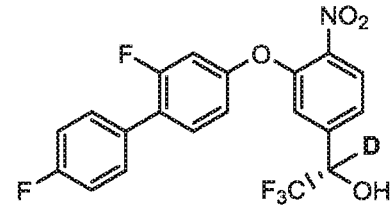
II-2



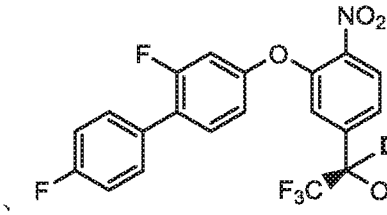
II-3



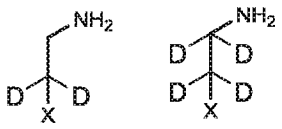
II-1a



II-2a



II-3a



VI-1 VI-2

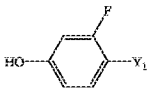
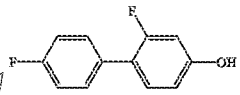
其中，化合物VI-1或VI-2中的X原子各自独立地为氟、氯、溴、碘，且与化合物IV-1至IV-21中的X原子具有对应关系；

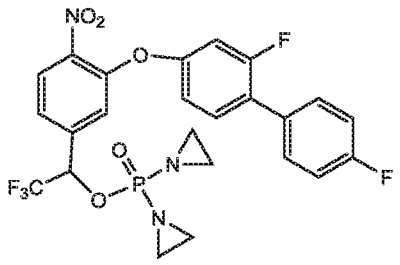
三卤氧磷选自三氟氧磷、三氯氧磷、三溴氧磷、三碘氧磷，优选为三氯氧磷；

三卤氧磷中的卤素与任一化合物IV-1至IV-21中的两个X原子、化合物VI-1或VI-2中的X原子可以相同也可以不同；

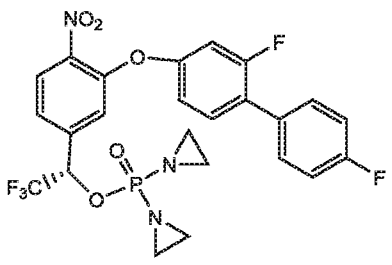
所述氘代卤代乙胺氢卤酸盐中氢卤酸盐中的卤素与氘代卤代乙胺中的卤素相同；

优选地，卤代乙胺为溴代乙胺，卤代乙胺氢卤酸盐为溴代乙胺氢溴酸盐。

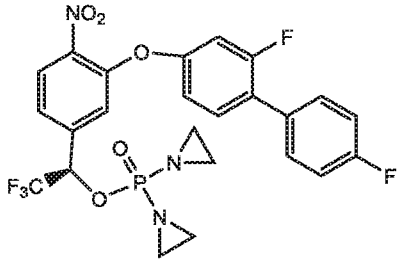
本发明提供制备以下结构的任一化合物的方法，其包括以下步骤：以化合物  为起始原料，反应得到化合物 ，然后与式I-7-1、I-7-2或I-7-3分别反应得到相应的式A、B或C化合物。



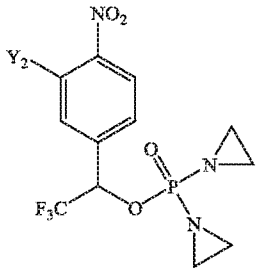
A



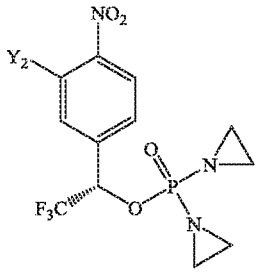
B



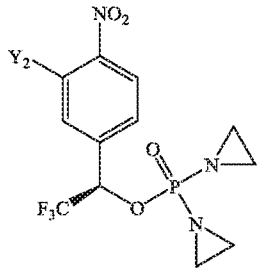
C



I-7-1



I-7-2



I-7-3

特别地，化合物结构中的 Y_1 和 Y_2 为卤素或OM，M为氢、钠、钾、镁或钙，卤素优选为溴。

特别地，在M为镁或钙时，化合物结构中其他基团的量是M为氢、钠、钾时的两倍。

关于本文所述药品，所制得的药品包含特定剂量范围的所示化合物或其盐或溶剂合物或同位素变体，和/或所制得的药物为特定剂型、特定给药方式施用。

关于本文所述用途，所制得的药物还可包含药学上可接受的辅料或赋形剂。所述药物可以为临床施用的任何剂型，例如片剂、栓剂、分散片、肠溶片、咀嚼片、口崩片、胶囊、糖衣剂、颗粒剂、干粉剂、口服溶液剂、注射用小针、注射用冻干粉针或大输液。根据具体剂型和施用方式，所述药物中的药学上可接受的辅料或赋形剂可以包括下述的一种或多种：稀释剂、增溶剂、崩解剂、悬浮剂、润滑剂、粘合剂、填充剂、矫味剂、甜味剂、抗氧化剂、表面活性剂、防腐剂、包裹剂和色素等。

优选地，所述患者是哺乳动物，更优选是人。

附图说明

图 1 为化合物 A 的高效液相色谱分析图谱。

图 2 为化合物 A 分离后得到的化合物 A-P1 的高效液相色谱分析图谱。

图 3 为化合物 A 分离后得到的化合物 A-P2 的高效液相色谱分析图谱。

图 4 为具体化合物 V-10 的 ^{1}HNMR 图谱。

图 5 为不同浓度化合物 A、B、C 及 AST-3424 在常氧条件下对 H460 细胞的抑制率曲线，其中，Log.con（nM）表示 nmol/L 单位下浓度数值的 10 为底数的对数值。

图 6 为不同浓度化合物 A、B、C 在不同的肝癌细胞系的抑制率曲线，其中，Log.con（nM）表示 nmol/L 单位下浓度数值的 10 为底数的对数值。

图 7 为不同浓度化合物 A、B、C 在是否存在 AKR1C3 抑制剂 AST3021 的情况下对 H460 癌细胞的抑制率曲线，其中，Log.con（nM）表示 nmol/L 单位下浓度数值的 10 为底数的对数值。

图 8 为化合物 A 对 10 株非小细胞肺癌的 AKR1C3 依赖曲线，其中 FPKM 为 RNA-seq 的每千百万碱基片段数，然后取以 2 为底的对数得到 Log_2FPKM，IC_{50} 为 50%抑制浓度即细胞存活量为对照样本一半时所对应的浓度。

图 9 为化合物 AST-3424 对 10 株非小细胞肺癌的 AKR1C3 依赖曲线，其中 FPKM 为 RNA-seq 的每千百万碱基片段数，然后取以 2 为底的对数得到 Log_2FPKM，IC_{50} 为 50%抑制浓度即细胞存活量为对照样本一半时所对应的浓度。

图 10 为化合物 A 和索拉非尼在肝癌 LI6280 PDX 模型的 AKR1C3 依赖的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 11 为化合物 A、AST-3424 和异环磷酰胺在胃癌 GA6201 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 12 为化合物 A、AST-3424 在胃癌 GA6201 PDX 模型的体内药效模型中在第 14 天停止给药后的不同天数肿瘤体积变化曲线。

图 13 为化合物 A、AST-3424 和异环磷酰胺在胃癌 GA6201 PDX 模型的体内药效模型中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 14 为化合物 A 和卡铂在人源非小细胞肺癌 NCI-H460 皮下异种移植模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 15 为化合物 A 和卡铂在人源非小细胞肺癌 NCI-H460 皮下异种移植模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 16 为化合物 A 和索拉非尼在人肝癌 LI6652 皮下异种移植 PDX 模型中的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 17 为化合物 A 和索拉非尼在人肝癌 LI6652 皮下异种移植 PDX 模型中的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 18 为化合物 A 和紫杉醇在人源非小细胞肺癌 NCI-H460-Luc2 颅内接种 CDX 模型的体内药效实验中不同天数的生物荧光值变化曲线，生物荧光值大表示肿瘤体积大。

图 19 为化合物 A 和紫杉醇在人源非小细胞肺癌 NCI-H460-Luc2 颅内接种 CDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 20 为化合物 A 和吉西他滨在胰腺癌 PA1222 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 21 为化合物 A 和吉西他滨在胰腺癌 PA1222 PDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 22 为化合物 A 和紫杉醇在肺癌 LU2505 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 23 为化合物 A 和紫杉醇在肺癌 LU2505 PDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 24 为索拉非尼和 0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg 化合物 A、不同浓度 AST-3424 在肝癌 LI6643 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 25 为索拉非尼和 1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg 化合物 A 在肝癌 LI6643 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 26 为索拉非尼和 1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg 化合物 A 在肝癌 LI6643 PDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 27 为化合物 A 和索拉非尼在肝癌 LI1005 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 28 为化合物 A 和索拉非尼在肝癌 LI1005 PDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 29 为化合物 A 和索拉非尼在肝癌 HepG2 CDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 30 为化合物 A 和索拉非尼在肝癌 HepG2 CDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 31 为化合物 A 和紫杉醇在肺癌 LU0884 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 32 为化合物 A 和紫杉醇在肺癌 LU0884 PDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 33 为化合物 A、AST-3424 和索拉非尼在肝癌 LI6664 PDX 模型的体内药效实验中不同天数的肿瘤体积变化曲线。

图 34 为化合物 A、AST-3424 和索拉非尼在肝癌 LI6664 PDX 模型的体内药效实验中在不同天数小鼠体重变化率曲线。

图 35 为化合物 A 在血浆和脑组织中浓度与时间变化曲线图。

图 36 为化合物 A 在血浆和脑组织中浓度的比率与时间变化曲线图。

图 37 为化合物 AST-2870 在血浆和脑组织中浓度与时间变化曲线图。

图 38 为化合物 AST-2870 在血浆和脑组织中浓度的比率与时间变化曲线图。

图 39 为化合物 A 在添加 NADPH、未添加 NADPH、添加 AKR1C3 抑制剂以及对照药黄体酮条件下在小鼠、猴、大鼠、人的肝细胞质溶液中反应后的剩余量随时间变化的曲线图，其中，Remaining 表示代谢剩余率，Time 表示时间，AST 表示化合物 A，Progesterone 表示黄体酮。

图 40 为化合物 AST-3424 在添加 NADPH、未添加 NADPH、添加 AKR1C3 抑制剂以及对照药黄体酮条件下在小鼠、猴、大鼠、人的肝细胞质溶液中反应后的剩余量随时间变化的曲线图，其中，Remaining 表示代谢剩余率，Time 表示时间，Progesterone 表示黄体酮。

具体实施方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

“前药”是指投与或施用之后经新陈代谢或以其他方式转化为关于至少一种性质的生物学活性或活性更高的化合物(或药物）的化合物。相对于药物，前药以使其相对于药物活性较低或无活性的方式进行化学修饰，但化学修饰使得在前药投与之后通过代谢或其他生物

过程产生相应药物。前药可相对于活性药物具有改变的代谢稳定性或输送特征、较少副作用或较低毒性或经改良的风味。前药可使用除相应药物以外的反应物来合成。

向患者“投与”(“administering”或“administration of”)药物(及此词组的语法等效形式)是指直接投与(其可由医学专业人士向患者投与或可自投与)及/或间接投与(其可是开处方药物的行为)。举例而言,指示患者自投与药物及/或将药物的处方提供给患者的医师是向患者投与药物。

“癌症”是指可通过侵袭而局部扩展且通过转移而全身扩展的潜在无限制生长的白血病、淋巴瘤、癌及其他恶性肿瘤(包括实体肿瘤)。癌症的实例包括(但不限于)肾上腺、骨、脑、乳房、支气管、结肠及/或直肠、胆囊、头及颈、肾、喉、肝、肺、神经组织、胰脏、前列腺、副甲状腺、皮肤、胃及甲状腺的癌症。癌症的某些其他实例包括急性及慢性淋巴细胞及粒细胞肿瘤、腺癌、腺瘤、基底细胞癌、子宫颈上皮分化不良及原位癌、尤文氏肉瘤(Ewing’s sarcoma)、表皮样癌、巨细胞瘤、多型性神经胶母细胞瘤、毛细胞肿瘤、肠神经节细胞瘤、增生性角膜神经肿瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤(Kaposi’s sarcoma)、平滑肌瘤、白血病、淋巴瘤、恶性类癌瘤、恶性黑色素瘤、恶性高钙血症、马方样体型肿瘤(marfanoid habitus tumor)、髓样上皮癌、转移性皮肤癌、黏膜神经瘤、骨髓瘤、蕈状肉芽肿、神经胚细胞瘤、骨肉瘤、骨原性及其他肉瘤、卵巢瘤、嗜铬细胞瘤、真性红血球增多症、原发性脑瘤、小细胞肺癌、溃疡型及乳头型二者的鳞状细胞癌、增生、精原细胞瘤、软组织肉瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、肾细胞肿瘤、局部皮肤病灶、网状细胞肉瘤及威尔姆氏肿瘤(Wilm’s tumor)。

“患者”及“个体”可互换使用,是指需要癌症治疗的哺乳动物。通常,患者是人类。通常,患者是诊断患有癌症的人类。在某些实施例中,“患者”或“个体”可指用于筛选、表征及评估药物及疗法的非人类哺乳动物,例如非人类灵长类动物、狗、猫、兔、猪、小鼠或大鼠。

“实体肿瘤”是指包括(但不限于)骨、脑、肝、肺、淋巴结、胰脏、前列腺、皮肤及软组织(肉瘤)中的转移肿瘤的实体肿瘤。

药物的“治疗有效量”是指当向患有癌症的患者投与时,具有预期的治疗效应(例如患者中一或多种癌症的临床表现的缓和、改善、缓解或消除)的药物的量。治疗效应不必通过投与一个剂量而出现,且可仅在投与一系列剂量后出现。因此,治疗有效量可以一或多次投与来投与。

病况或患者的“治疗”(“Treating”、“treatment of”或“therapy of”)是指采取步骤以获得有益或期望结果(包括临床结果)。出于本发明的目的,有益或期望临床结果包括(但不限于)一或多种癌症症状的缓和或改善;疾病程度的减弱;疾病进展的延迟或减缓;疾病状态的改善、缓解或稳定;或其他有益结果。

“肿瘤细胞”是指任何适当物种(例如,哺乳动物,例如鼠类、犬、猫、马或人类)的肿瘤细胞。

“治疗”或“治疗患者”是指向患者投与、使用或施用本发明相关的治疗有效量的药物。

向患者“投与”或“施用”“使用”药物是指直接投与或施用(其可由医学专业人士向患者投与或施用或者可自投与或施用)及/或间接投与或施用(其可是开处方药物的行为)。举例而言,指示患者自投与或施用药物及/或将药物的处方提供给患者的医师是向患者投与或施用药物。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

一、化合物的合成、制备和结构确证

英文缩写说明：

简称	全称
THF	四氢呋喃
DCM	二氯甲烷
EA	乙酸乙酯
TEA	三乙胺
MTBE	甲基叔丁基醚
DMAP	4-二甲氨基吡啶
DBAD	偶氮二甲酸二叔丁酯
TFA	三氟乙酸
EtOH	乙醇
t-BuOH	叔丁醇
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
PE	石油醚(petroleum ether)
DMF-DMA	N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛
TBAF	四丁基氟化铵
DIPEA 或 DIEA	N,N-二异丙基乙胺
DIAD	偶氮二甲酸二异丙酯
t-BuOK	叔丁醇钾
MS	质谱
HPLC	高效液相色谱仪
Calculated	质谱理论计算值
found	质谱实测值
eq	当量

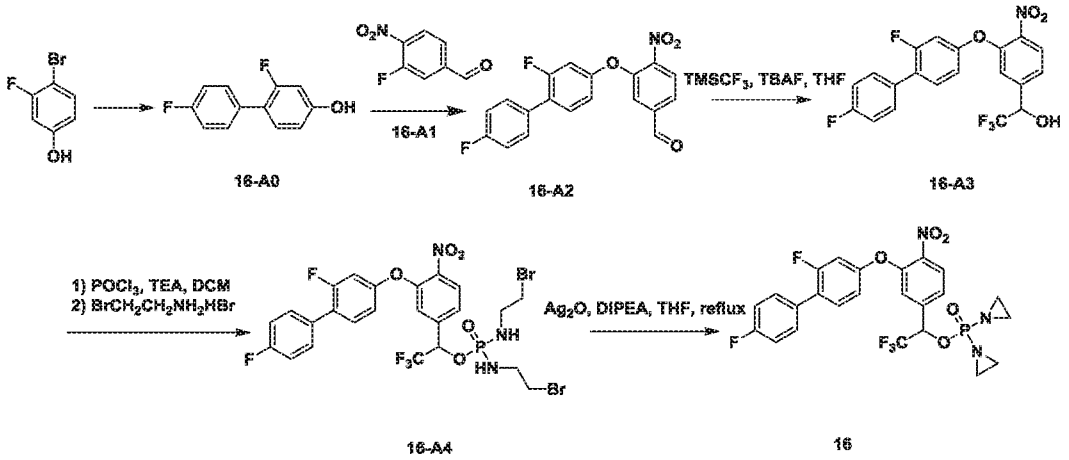
其他未说明的缩写或术语均按照有机化学或有机合成手册中的定义或说明来解释或进行操作。

相关试剂药品未说明的均为商业购买。

^{1}H-NMR 核磁如未说明则测试使用 400MHz 仪器测定，MS 质谱测试使用 LC-MS 液质联用仪器测定。

1.1 化合物 A（即 16 号化合物）的合成

方法 1：

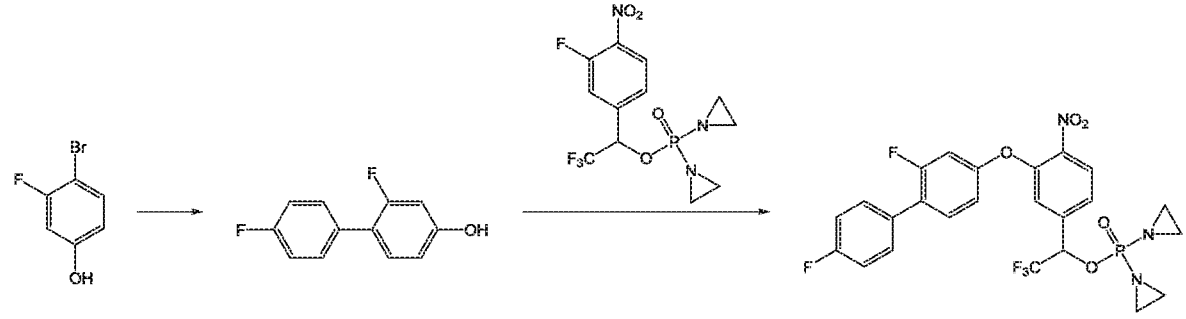


化合物 A 合成路线

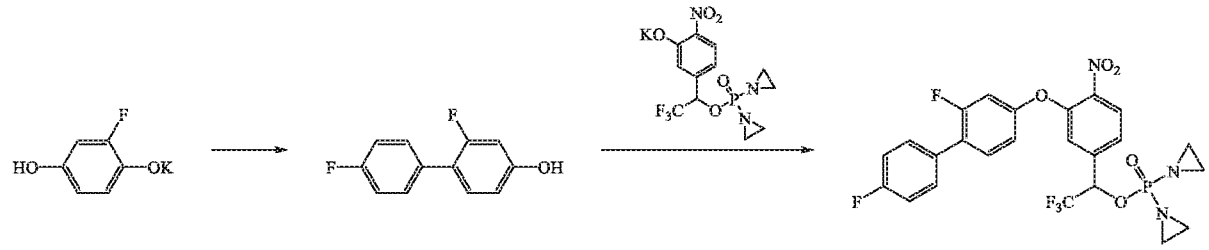
化合物 A 的合成方法与专利 PCT/CN2020/089692 中 16 号化合物合成方法相同，在此将该专利中 16 号化合物合成方法引用于此。

方法 2：

以 3-氟-4-溴-苯酚为起始原料，经两步反应得到目标化合物 A。



方法 3：



1.2 化合物 A 的手性拆分

将化合物 A 纯品进行手性分析

HPLC 手性分析条件为：

色谱柱	CHIRALPAK AD-H(AD00CD-UE022)
色谱柱尺寸	0.46cm 内径 × 15cm 长
进样体积	0.2ul
流动相	乙醇=100%
流速	0.5 ml/min
检测波长	UV 254nm
柱温	35℃

测试得到的 HPLC 谱图如图 1，具体结果如下表。

化合物	分离峰	Ret. Time（保留时间）	Area（面积）	Area%（面积比）
A-P1	1 号	4.808	3436401	51.036%
A-P2	2 号	5.791	3296947	48.964%

取 4.4814g 的化合物 A，溶于色谱级的乙醇中，使用下列的手性分离制备方法和手性分离制备条件进行手性分离制备。

HPLC 手性分离制备方法：采用 HPLC 法，使用 HPLC 制备设备和手性柱分离上述手性外消旋体（即化合物 A），收集相应组分。旋转蒸发除去溶剂，得到光学异构体的纯品。

HPLC 手性分离制备条件为：

拆分色谱柱	CHIRALPAK AD
色谱柱尺寸	5.0 cm 内径，25 cm 长, 10 μm 的填料粒径
流动相	乙醇=100%
Flow rate 流速	40 ml/min
Wave length 检测波长	UV 254 nm
Temperature 柱温	35℃

经过分离制备后，得到 1 号峰对应的光学异构体的纯品 2.1432g，测得 ee 值为 99.2%；2 号峰对应的光学异构体的纯品 2.0840g，测得 ee 值为 99.5%。

进一步对手性分离制备好的 1 号峰对应的光学异构体、2 号峰对应的光学异构体使用 HPLC 手性分析条件进行分析，得到如图 2、3 的结果。

1 号峰对应的光学异构体的 HPLC 分析结果如下表：

化合物	分离峰	Ret. Time（保留时间）	Area （面积）	Area%（面积比）
A-P1	1 号	4.807	5645223	99.639%
A-P2	2 号	5.777	20453	0.361%

2 号峰对应的光学异构体的 HPLC 分析结果如下表：

化合物	分离峰	Ret.Time（保留时间）	Area （面积）	Area%（面积比）
A-P1	1 号	4.835	12783	0.216%
A-P2	2 号	5.801	5918040	99.784%

1.3 化合物 A 和其异构体 A-P1、A-P2 的手性稳定性研究

长期和加速条件下的异构体稳定性研究。

分别对化合物 A 和其异构体 A-P1、A-P2 在-20±5℃、5℃±3℃、25℃±2℃（60%±5%RH）、40℃±2℃（75%±5%RH）条件下进行性状和异构体稳定性考察，结果如下表：

化合物	异构体峰	异构体结果（%）										
		0月	-20±5℃	5℃±3℃			25℃±2℃/60%±5%RH			40℃±2℃/75%±5%RH		
			3月	1月	3月	6月	1月	3月	6月	1月	3月	6月
A	性状	淡黄色固体	NA	NA	NA	淡黄色固体	NA	NA	淡黄色固体	NA	NA	淡黄色固体
	A-P1	49.8	NA	NA	NA	49.9	NA	NA	49.9	NA	NA	49.9
	A-P2	50.2	NA	NA	NA	50.1	NA	NA	50.1	NA	NA	50.1
	异构体转化	**NA**	**NA**	**NA**	**NA**	**0.1**	**NA**	**NA**	**0.1**	**NA**	**NA**	**0.1**
A-P1	性状	淡黄色固体	淡黄色固体	淡黄色固体	淡黄色固体	/	淡黄色粘稠液体	淡黄色粘稠液体	/	淡黄色粘稠液体	NA	NA
	A-P1	99.92	99.92	99.92	99.92	/	99.92	99.92	/	99.91	NA	NA
	A-P2	0.08	0.08	0.08	0.08	/	0.08	0.08	/	0.09	NA	NA
	异构体转化	**NA**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**/**	**0.00**	**0.00**	**/**	**0.01**	**NA**	**NA**
A-P2	性状	淡黄色固体	淡黄色固体	淡黄色固体	淡黄色固体	/	淡黄色粘稠液体	淡黄色粘稠液体	/	淡黄色粘稠液体	NA	NA
	A-P1	0.25	0.26	0.25	0.25	/	0.25	0.25	/	0.26	NA	NA
	A-P2	99.75	99.74	99.75	99.75	/	99.75	99.75	/	99.74	NA	NA
	异构体转化	**NA**	**-0.01**	**0.00**	**0.00**	**/**	**0.00**	**0.00**	**/**	**0.01**	**NA**	**NA**

注：1.表中的数据根据原始图谱中的峰面积按公式“含量%=单个异构体峰面积÷（P1峰面积+P2峰面积）×100%”进行计算获得。2.NA表示不适用，/表示未进行。

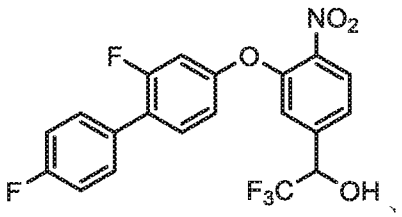
上表数据表明，化合物 A 分别在 5℃±3℃、25℃±2℃（60%±5%RH）及 40℃±2℃（75%±5%RH）条件下放置 6 个月，其性状和手性基本无变化，说明化合物 A 中两个单一异构体比例稳定，化合物 A 手性稳定。

化合物 A-P1 和 A-P2 分别在-20℃±5℃、5℃±3℃、25℃±2℃（60%±5%RH）条件下放置 3 个月，40℃±2℃（75%±5%RH）条件下放置 1 个月，样品颜色和手性基本无变化，说明在以上条件下单一异构体 A-P1 和 A-P 不会相互转化，手性稳定。

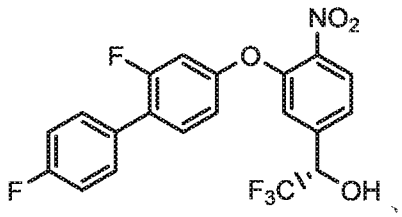
1.4 氘代化合物制备

采用以下合成路线或步骤制备式 IV-1 至 IV-21 氘代化合物：

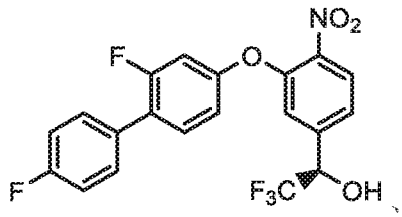
步骤一，制备化合物 IV-1 至 IV-21，其包括以化合物 II-1、II-2、II-3 或其氘代物 II-1a、II-2a、II-3a 作为起始反应物分别与三氯氧磷 $POCl_3$ 发生第一次反应得到中间体，然后该中间体与对应的氘代卤代乙胺 VI-1 或 VI-2 或氘代卤代乙胺 VI-1 或 VI-2 的氢卤酸盐发生第二次反应，最后得到对应的化合物 IV-1 至 IV-21；



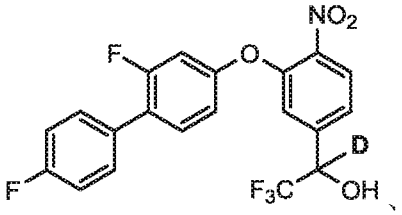
II-1



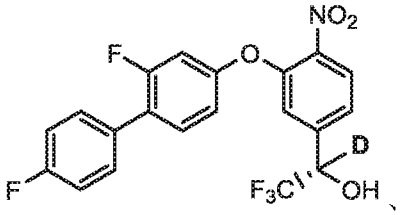
II-2



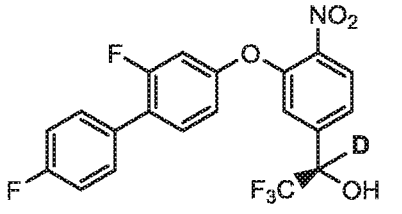
II-3



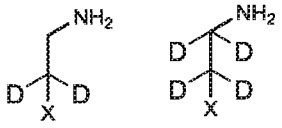
II-1a



II-2a



II-3a



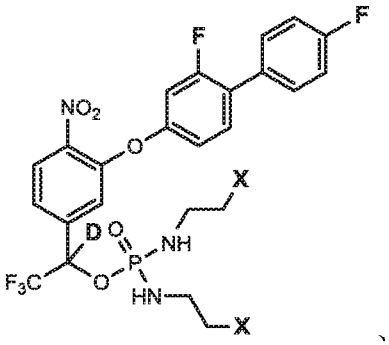
VI-1 VI-2

其中，X 各自独立地为氟、氯、溴、碘；

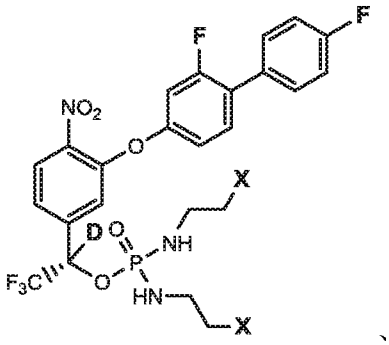
所述氘代卤代乙胺氢卤酸盐中氢卤酸盐中的卤素与氘代卤代乙胺中的卤素相同；

优选的，卤代乙胺为溴代乙胺，卤代乙胺氢卤酸盐为溴代乙胺氢溴酸盐。

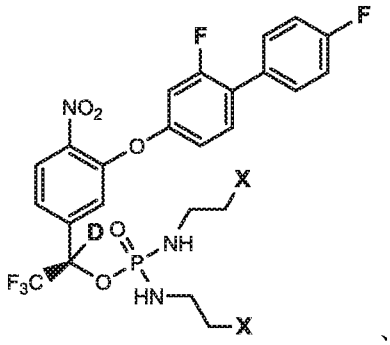
步骤二，制备以下任一结构的氘代化合物 V-1 至 V-15 的方法，其包括使化合物 IV-1 至 IV-21 分别发生关环反应得到对应的氘代化合物 V-1 至 V-15；



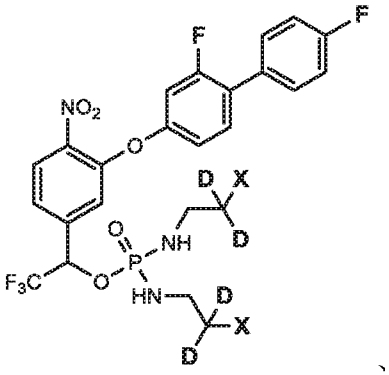
IV-1



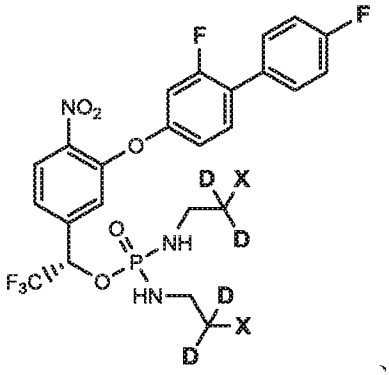
IV-2



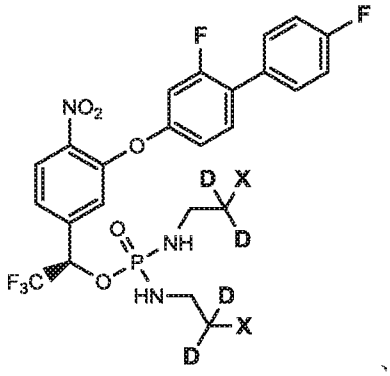
IV-3



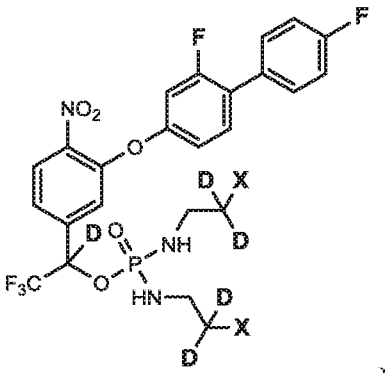
IV-4



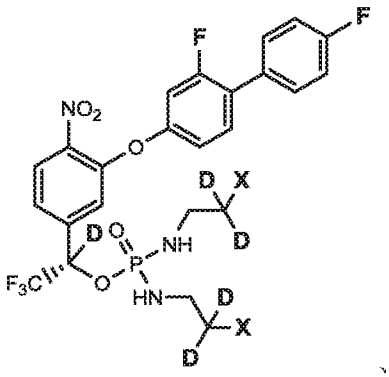
IV-5



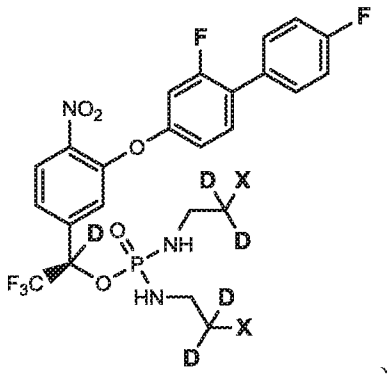
IV-6



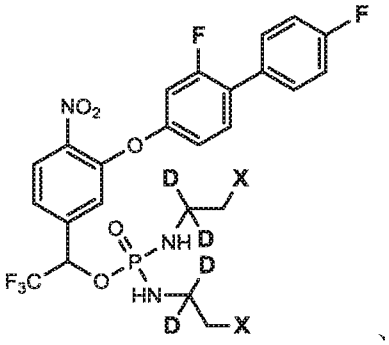
IV-7



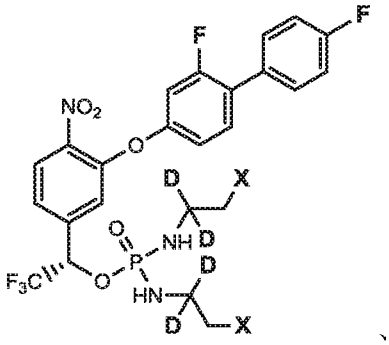
IV-8



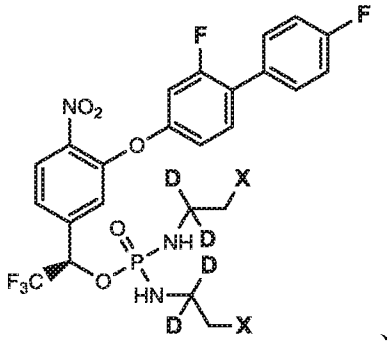
IV-9



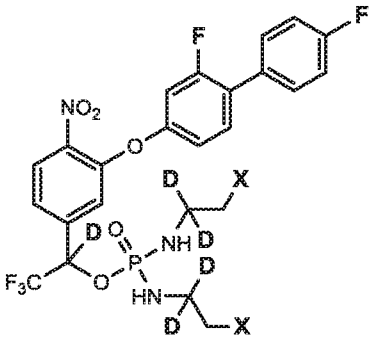
IV-10



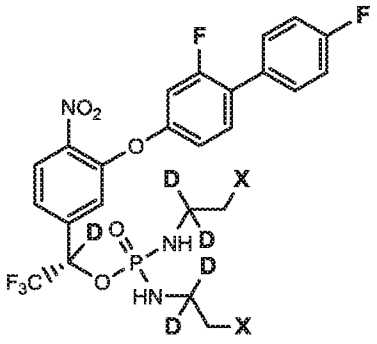
IV-11



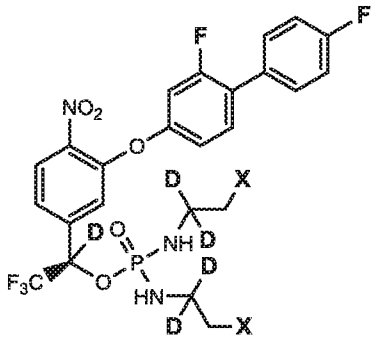
IV-12



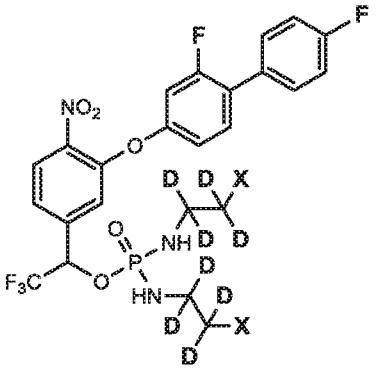
IV-13



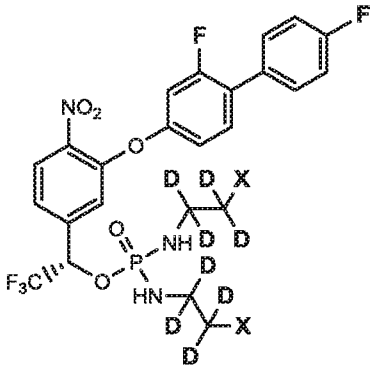
IV-14



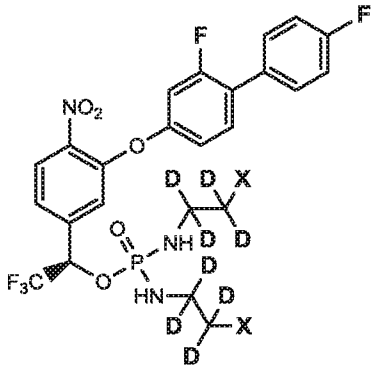
IV-15



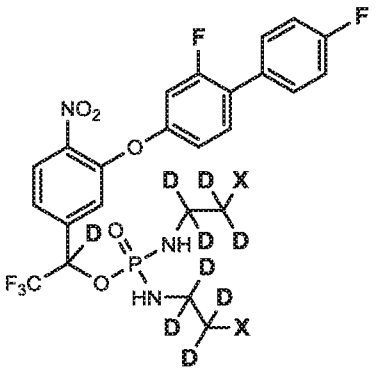
IV-16



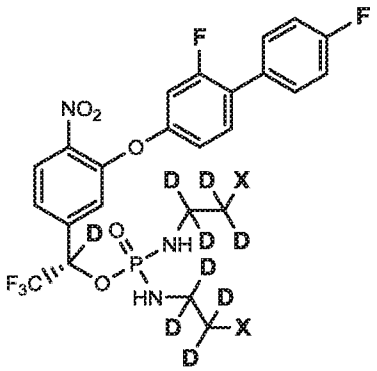
IV-17



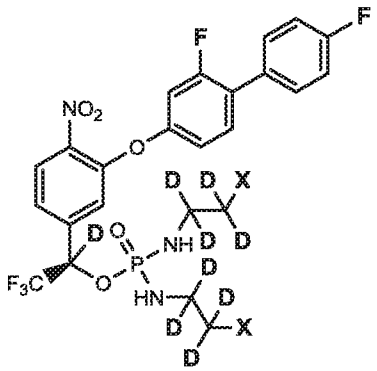
IV-18



IV-19



IV-20



IV-21

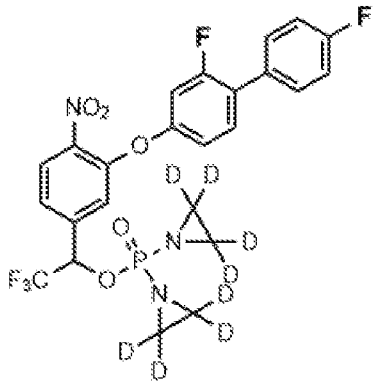
其中，X各自独立地为氟、氯、溴、碘，优选为溴；

所述关环反应使用氧化银或硝酸银作为催化剂，反应中加入或不加入碱。

具体地，参照上述1.1中化合物A合成方法的反应条件和物料比例，选择适当的氘代中间体或起始物料即可以完成上述15个氘代化合物（V-1至V-15）的合成制备。

制备所得式V-10中的下式氘代化合物为浅黄色固体，^{1}HNMR图谱如图4所示，其解析数据为：

1H NMR (400 MHz, CD3OD) δ ppm 8.13 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.60-7.51 (m, 4H), 7.45 (s, 1H), 7.19 (t, J = 8.7 Hz, 2H), 6.99-6.96 (m, 2H), 6.10-6.05 (m, 1H). HPLC (retention time: 9.817 min). MS: Calculated MS, 563.2, found, 564.2 ([M+H] +)。



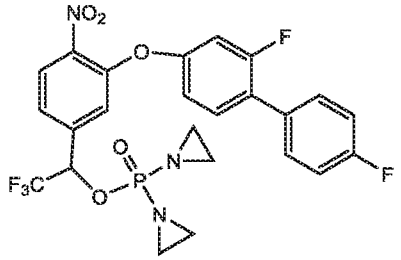
I-4-1

以下第二节至第七节的体内、体外实验中涉及的外文缩写或词汇的含义均根据药物化学、生物化学、生理学或药理学、医学的教科书中的词汇含义进行解释。

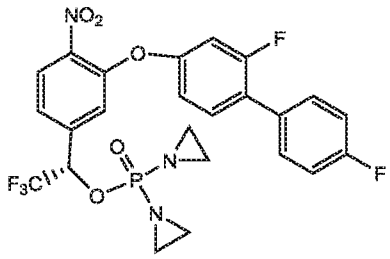
二、化合物对癌细胞抑制实验

2.1 化合物 A、B、C 及 AST-3424 的 H460 癌细胞抑制试验

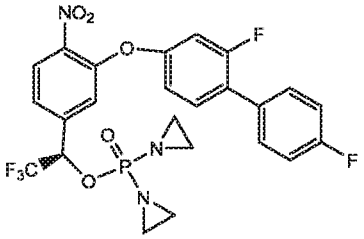
化合物 AST-3424 是申请人开发的以过表达醛酮还原酶 1C3（AKR1C3）为靶标的 DNA 烷化癌症治疗药物（DNA 烷化剂，PCT 申请号 PCT/US2016/021581，公开号 WO2016145092A1，对应中国申请号 CN201680015078.8，公告号 CN107530556B），现在已进入临床二期阶段，其结构式如下所示。



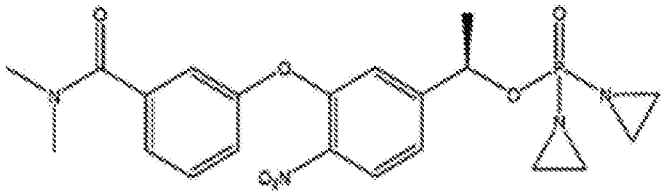
A



B



C



AST-3424

使用活体外人类肿瘤细胞系细胞毒性的量化值 IC_{50} 来比较化合物 A、B、C 及 AST-3424 的癌细胞增殖抑制作用。

如无特别说明，IC_{50} 值通过以下实验方法测得：

（1）细胞培养

a）H460细胞培养于RPMI-1640培养基中，加10% FBS和1%双抗，置于37℃、5%CO_2条件下培养。

（2）细胞铺板

a）细胞常规培养至细胞饱和度为80%-90%，数量到达要求时，收取细胞。

b）用相应的培养基重悬，计数，配制成合适密度的细胞悬液。

c）将细胞悬液加入96孔板，每孔100μL，细胞密度为2000/孔。

d）细胞在37℃，5%CO_2培养箱中培养过夜。

（3）化合物的准备

a）化合物按照实验要求准备。

b）空白对照孔为细胞加0.5%DMSO，作为高读值对照孔。

c）无细胞只有培养基的孔作为低读值对照孔。

（4）化合物处理细胞

a）细胞铺板24小时以后，化合物单独作用，每孔补99μL的生长培养基，然后加入1μL的200X化合物，轻轻震荡确保混合均匀，然后放入37℃，5%CO_2培养箱中。

b）将细胞板放置培养箱72小时。

（5）CTG方法检测

a）将细胞待测板放置室温平衡30分钟，每孔弃掉100μL培养基。

b）每孔加100μL CTG试剂(CelltiterGlo试剂盒)，放置快速振荡器振荡2分钟，室温避光放置30分钟。

c）用Envision仪器读取化学发光信号值。

（6）数据分析

用GraphPad Prism 8 software计算IC_{50}，利用以下非线性拟合公式来得到化合物的IC50（半数抑制浓度）：

Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^((LogIC50-X)*HillSlope))

X:化合物浓度log值，Y:抑制率（%inhibition）

抑制率（%inhibition）=（高读值对照读数-化合物孔读值）/（高读值对照读数-低读值对照读数）×100

经过上述实验方法测得的待测化合物A、B、C及AST-3424的IC_{50}值列示于下表1中。

表 1：化合物 A、B、C 及 AST-3424 对 H460 癌细胞抑制作用 IC_{50} 数据

化合物	IC_{50}（nmol/L）
A	6.87
B	8.77
C	23.37
AST-3424	0.11

化合物 A、B、C 及 AST-3424 测试所得的 IC_{50} 曲线如图 5 所示。

测试结果表明，两个光学异构体（化合物 B、C）具有与消旋体（化合物 A）相似的 H460 抑制毒性。A、B、C 三个化合物 IC_{50} 均高于 AST-3424。

2.2 化合物 A、B、C 对不同肝癌（HCC）细胞系 SNU354、SNU886、MHCC97H、huH-1 的细胞抑制试验

用上述同样的实验方法，进一步测试化合物 A、B、C 对不同肝癌（HCC）细胞系 SNU354、SNU886、MHCC97H、huH-1 的细胞毒性，结果如下表 2：

表 2：化合物 A、B、C 对不同的肝癌细胞 HCC 抑制作用 IC_{50} 数据

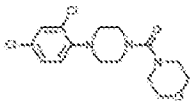
细胞系	IC_{50}（nM）			比值		
	A	B	C	A/B	A/C	C/B
SNU354	962.3	754	1519	1.28	0.63	2.01
SNU886	628.5	377.8	843.4	1.66	0.75	2.23
MHCC97H	395.8	242.4	563.1	1.63	0.70	2.32
huH-1	305.7	257.8	269.3	1.19	1.14	1.49

化合物 A、B、C 测试对应的 IC_{50} 曲线如图 6 所示，测试结果表明，两个光学异构体（化合物 B、C）具有与消旋体（化合物 A）相似的肝癌（HCC）细胞系增殖抑制活性。

三、AKR1C3 活化依赖的细胞增殖抑制活性实验

3.1 化合物 A、B、C 及 AST-3424 在 AKR1C3 抑制剂存在与否时对 H460 癌细胞的抑制实验

特定而言，以 4×10^3 个细胞/孔密度将指数生长的细胞接种于 96 孔板中且在 37℃下在 5%CO_2、95%空气及 100%相对湿度中培育 24 小时，然后添加测试化合物。将化合物以 200 倍的期望最终测试浓度溶解于 100%DMSO 中。在添加药物时，使用完全培养基将化合物进一步稀释至 4 倍的期望终浓度。将 50μl 特定浓度的化合物的等份试样添加至已含有 150μl 培养基的微量孔中，得到所报告的最终药物浓度。在药物添加之后，将板在 37℃、5%CO_2、95%空气及 100%相对湿度下再培育 2 小时，然后将药物洗掉且添加新鲜培养基且将板在 37℃、5%CO_2、95%空气及 100%相对湿度下再培育 70 小时。在此培育结束时，使用阿尔玛蓝试剂（AlamarBlue）分析来量化活细胞。使用计算机软件计算导致 50%生长抑制的药物浓度(IC_{50})。

为了进一步验证化合物为人 AKR1C3(醛固酮类还原酶家族 1 成员 C3)所特异性活化，化合物对 H460 癌细胞增殖试验是在存在或者不存在(3 微摩尔浓度)特异性 AKR1C3 酶抑制剂 AST-3021 的情况下进行的。在进行化合物处理前 2 小时，将添加了 AKR1C3 酶抑制剂 AST-3021 的化合物溶液添加至细胞培养物中。所用抑制剂为 Flanagan 等人，文献 BioorganicandMedicinalChemistry(2014)第 962-977 页中的化合物 36 即 ，本专利中简称为 AST-3021 或 TH-3021。

化合物 A、B、C 及 AST-3424 对 H460 癌细胞在 AKR1C3 抑制剂 AST-3021 存在与否情况下的抑制作用 IC_{50} 数据，如表 3 所示，对应的 IC_{50} 曲线图如图 7 所示。

表 3：化合物 A、B、C 及 AST-3424 对 H460 癌细胞在 AKR1C3 抑制剂存在与否情况下抑制作用 IC_{50} 数据

化合物	IC_{50}（nmol/L）		倍数
	未添加 AST-3021	添加 AST-3021	
A	5.818	2136	367.13
B	3.727	1913	513.28
C	7.657	3329	434.76
AST-3424	0.3486	44.87	128.71

测试结果表明，虽然 A、B、C 三个化合物在是否添加 AST-3021 的情况下其 IC_{50} 均较化合物 AST-3424 高，但是 AST-3021 抑制 A、B、C 这三个化合物 IC_{50} 的倍数却比 AST-3424 高许多，这显示新设计的 A、B、C 三个化合物的体外活性与 AKR1C3 酶的关系更为紧密。

3.2 化合物 A 和 AST-3424 对 10 株非小细胞肺癌的 AKR1C3 依赖实验

对 10 株非小细胞肺癌测定 IC_{50} 的实验方法与 3.1 中对 H460 癌细胞实验方法相同，另外，同时用下述方法测定其 AKR1C3 酶对应 RNA 的表达量，以 Log_2FPKM 计，可参考专利 PCT/CN2021/079299。将化合物 A 和 AST-3424 的 Log_2FPKM 和 IC_{50} 记录于表格中，实验结果如表 4 和表 5 所示。

表 4：化合物 A 的 Log_2FPKM 和 IC_{50} 数据

非小细胞肺癌细胞系	AKR1C3 RNA 表达水平（Log_2 FPKM）	化合物 A 的 IC_{50} (nM)
NCI-H1944	11.06	71.27
NCI-H2228	9.25	12.76
NCIH1755	9.00	570
NCI-H1563	8.61	454.4
NCI-H2110	8.2334	67.77
NCI-H1792	8.07	375.2
CAL12T	3.86	8076
NCIH2106	2.68	6858
NCI-H522	-1.88	14147
NCI-H23	-1.98	11941

表 5：化合物 AST-3424 的 Log_2FPKM 和 IC_{50} 数据

NSCLC	AKR1C3 RNA 表达水平 (Log_2 FPKM)	化合物 AST-3424 的 IC_{50} (nM)
NCI-H1944	11.06	2.3
NCI-H2228	9.25	0.21
NCIH1755	9	8.2
NCI-H1563	8.61	2.5
NCI-H2110	8.23	1.1
NCI-H1792	8.07	4.5
CAL12T	3.86	29.1
NCIH2106	2.68	>1000
NCI-H23	-1.98	>1000
NCI-H522	-1.88	>1000

对 AKR1C3 酶对应的 RNA 表达量与 IC_{50} 进行相关性分析，分别得到化合物 A 和 AST-3424 的关系图，如图 8 和图 9 所示。

实验结果表明，化合物 A 和 AST-3424 的体外细胞毒性与 AKR1C3 表达呈正相关。具有高 AKR1C3 表达的细胞株，化合物 A 和 AST-3424 均表现出较强的体外细胞毒性；具有低 AKR1C3 表达的细胞株则显示出很低的化合物 A 和 AST-3424 介导的细胞毒性。和 AST-3424 相比(R^2=0.796)，化合物 A 和 AKR1C3 表达水平相关性更加紧密(R^2=0.952)，说明化合物 A 的活化对 AKR1C3 的特异性更强。

3.3 化合物 A 和索拉非尼在肝癌 LI6280 PDX 模型的 AKR1C3 依赖的体内药效实验

实验说明：BALB/c 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 LI6280 瘤块，建立人肝癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药索拉非尼 30 mg/kg 组、测试药化合物 A 4.5 mg/kg 组，以及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组，共 3 组，每组 6 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组尾静脉给药，每周给药一次，连续给药 3 周；测试药化合物 A 4.5 mg/kg 组尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给 3 周；测试药索拉非尼 30 mg/kg 组灌胃给药，每天给药一次，连续给药 21 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。具体每组的给药方案和 TGI(%)如表 6 所示。

表 6：在 HuPrime®肝癌 LI6280 模型中各组药效分析表

实验组	首次给药后的第 17 天（即 Day 17）				
	肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	相对肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）	2113.82±170.66	20.5±0.73	-	-	-
第 2 组 Sorafenib (30 mg/kg)	1076.45±230.21	10.18±1.86	50.35	49.65	p< 0.001
第 3 组 化合物 A (4.5 mg/kg)	2201.20±287.44	20.79±1.15	-1.41%	101.41	0.987

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示，即$\bar{x}$±S；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100% 或 T/C % = T_{TV} / C_{TV} × 100%（T_{RTV}：治疗组平均 RTV ；C_{RTV}：溶媒对照组平均 RTV；RTV=V_t/V_0，V_0 为分组时该动物的瘤体积，V_t 为治疗后该动物的瘤体积，下同）；TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的平均相对肿瘤体积（RTV），下同）。

记录不同天数肿瘤的体积大小，结果如表 7 所示。

表 7：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	3 天	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	24 天	28 天	31 天
第 1 组	103.74	169.79	401.62	775.57	1319.18	2113.82	2641.70	3149.10		
第 2 组	103.93	168.82	269.83	439.29	731.99	1076.45	1241.19	1504.89	2218.52	2313.01
第 3 组	103.98	150.33	318.74	683.99	1404.42	2201.20	2739.12	3311.77	3362.07	

对应的肿瘤体积随时间变化的曲线图如图 10 所示。

测试药索拉非尼 30 mg/kg 治疗组在首次给药后的第 17 天有明显的抑瘤作用，相较对照组统计学上有显著性差异（p< 0.001），相对肿瘤抑制率 TGI（%）为 50.35%。测试药化合物 A 4.5 mg/kg 治疗组在首次给药后的第 17 天没有抑瘤作用，相较对照组统计学上没有显著性差异（p=0.987），相对肿瘤抑制率 TGI(%)为-1.41%。

用上述同样的方法测定该模型中 AKR1C3 酶对应 RNA 的表达量，以 Log_2FPKM 计，计算得到 Log_2 FPKM=-0.943。

可以从上述实验数据看出，在肝癌 LI6280 PDX 模型中，AKR1C3 对应 RNA 表达水平比较低（Log_2 FPKM=-0.943），化合物 A 的药效与溶媒对照组的药效几乎无差别，而非 AKR1C3 依赖的索拉非尼有一定的药效，因此，化合物 A 要发挥显著的抗癌活性，需要 AKR1C3 酶特异性激活，结合章节 3.2 中的结论，说明化合物 A 是 AKR1C3 酶活化的抗癌前药。

四、PDX、CDX 动物模型实验

4.1 化合物 A、AST-3424 及异环磷酰胺在胃癌 GA6201 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 GA6201 瘤块，建立人胃癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药异环磷酰胺 60mg/kg 组、测试药 AST-3424 5 mg/kg 组、测试药 A 化合物 2.5 mg/kg 和 5 mg/kg 组、及生理盐水（pH 7.0-7.6）溶媒对照组，共 5 组，每

组 5 只小鼠。其中，生理盐水（pH 7.0-7.6）溶媒对照组，每周给药一次，共给药三周，观察四周；测试药 AST-3424 5 mg/kg、测试药 A 化合物 2.5 mg/kg 和 5 mg/kg 组是尾静脉注射给药，每周给药一次，共给药 2 周，观察 7 周；测试药异环磷酰胺 60mg/kg 组，腹腔注射给药，每周连续给五天停两天，共给药 2 周，观察 7 周。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。具体每组的给药方案和 TGI(%)如表 8 所示。

表 8：胃癌 GA6201 模型中各组药效分析表

实验组	所有给药结束后的第 3 天（即 Day38）				
	肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	相对肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 生理盐水，pH 7.0-7.6	905.75±252.4	9.34±2.42	-	-	-
第 2 组 异环磷酰胺 60 mg/kg	371.02±75.96	3.85±0.63	58.83	41.17	0.857
第 3 组 AST-3424 5 mg/kg	12.65±7.91	0.11±0.07	98.79	1.21	0.00000265
第 4 组 化合物 A 5 mg/kg	19.97±10.18	0.19±0.08	97.96	2.04	0.0000182
第 5 组 化合物 A 2.5 mg/kg	28.69±8.2	0.29±0.08	96.85	3.15	0.000135

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示，即$\bar{x}$±S；

2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ 或 $T/C\% = T_{TV} / C_{TV} \times 100\%$（$T_{RTV}$：治疗组平均 RTV；$C_{RTV}$：溶媒对照组平均 RTV；$RTV=V_t/V_0$，$V_0$ 为分组时该动物的瘤体积，V_t 为治疗后该动物的瘤体积，下同）；TGI% =（1-T/C）× 100%（T 和 C 分别为治疗组和对照组在某一特定时间点的平均相对肿瘤体积（RTV））。

上述给药方案中，异环磷酰胺是根据文献（Jessica D. Sun, Qian Liu, Dharmendra Ahluwalia, Damien J. Ferraro, Yan Wang, Don Jung, Mark D. Matteucci,and Charles P. Hart. Comparison of hypoxia-activated prodrug evofosfamide (TH-302) and ifosfamide in preclinical non-small cell lung cancer models[J]. Cancer Biology & Therapy, 2016, 17(4): 371-380.）中记载的最佳的给药方案且最大的安全药量来设计的。

记录不同天数肿瘤的体积大小，结果如表 9 所示。

表 9：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	3 天	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	24 天	28 天	31 天	35 天	38 天	42 天	45 天	49 天
第 1 组	94.22	123.26	161.08	182.31	242.26	297.28	398.37	479.52	579.90	648.12	831.15	905.75	1026.01	1130.43	1283.11
第 2 组	94.15	122.22	129.39	175.00	190.74	189.23	217.96	225.66	247.04	265.76	324.51	371.02	403.47	484.83	578.60
第 3 组	94.19	114.98	84.33	77.04	63.59	52.08	45.81	40.55	30.28	23.24	18.55	12.65	13.42	10.82	8.15
第 4 组	94.36	118.42	101.91	97.17	74.20	59.77	46.21	44.03	38.50	35.92	22.70	19.97	5.05	11.14	9.96
第 5 组	94.61	120.19	118.33	118.65	96.08	76.14	71.72	57.94	45.51	43.44	32.04	28.69	23.49	25.00	17.72

对应的肿瘤体积随时间变化的曲线图如图 11 所示。

实验结果表明，至少在 49 天里，AST-3424 5mg/kg 组、测试药化合物 A 2.5mg/kg 和 5mg/kg 组具有很好的癌细胞抑制活性，并且都优于传统的 DNA 烷化剂异环磷酰胺，化合物 A 的相对肿瘤抑制率（TGI）超过了 96%。

上述实验过程中，在第 14 天给药后，停止给药，测量肿瘤体积，绘制成曲线图，如图 12 所示。该实验结果说明，即使在停止治疗 1 个月后，化合物 A 的两个给药剂量仍然有抑瘤作用，肿瘤体积继续减小，并且保持较小的体积或体积无法被测量。这显示化合物 A 的治疗效果良好，与 AST-3424 相当。

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，记录小鼠体重变化数据并计算小鼠体重变化率，小鼠体重变化率如图 13 所示。上述动物实验的体重变化数据说明，两个剂量的化合物 A 给药组，与生理盐水对照组、异环磷酰胺给药组、AST-3424 给药组类似，对实验动物的体重没有影响。同剂量下化合物 A 和 AST-3424 有同等抑制肿瘤功效且无毒性作用。

4.2 化合物 A、卡铂在人源非小细胞肺癌 NCI-H460 皮下异种移植模型中的体内药效实验对比

BALB/c 裸小鼠皮下接种人肺癌 NCI-H460 细胞，建立人肺癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药卡铂（Carboplatin）100 mg/kg 组、测试单药化合物 A 5 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg 组及 10%乙醇+10%聚氧乙烯蓖麻油+80%葡萄糖注射液 D5W(pH7.4) 溶媒对照组，共 5 组，每组 6 只小鼠。其中，10%乙醇+10%聚氧乙烯蓖麻油+80%葡萄糖注射液 D5W(pH7.4) 溶媒对照组、测试药化合物 A 5 mg/kg、10 mg/kg 和 15 mg/kg 组是尾静脉注射给药，每周给药一次，共给药三周，观察一周。测试药卡铂（Carboplatin）100 mg/kg 组是腹腔注射给药，每周给药一次，共给药三周，观察一周。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

肿瘤细胞接种后的第 31 天对 NCI-H460 CDX 模型中各组药效进行分析，其结果如表 10 所示。记录不同天数肿瘤的体积大小，结果如表 11 所示。对应的肿瘤体积随时间变化关系绘制成曲线图如图 14 所示。

表 10：人源肺癌 NCI-H460 模型中各组药效分析表

实验组	肿瘤细胞接种后的第 31 天（即 Day31，首次给药后的第 24 天）				
	肿瘤体积 $(\bar{x}\pm S)$	相对肿瘤体积 $(\bar{x}\pm S)$	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 10%乙醇, 10%聚氧乙烯蓖麻油, 80%葡萄糖注射液 D5W(pH7.4) QWx3, i.v.	1818.22±235.32	13.24±2.49	-	-	-
第 2 组 Carboplatin, 100mg/kg, QWx3, i.p.	1230.93±258.17	8.58±1.16	35.19	64.81	0.683
第 3 组 化合物 A, 5mg/kg, QWx3, i.v.	337.78±54.37	2.45±0.29	81.49	18.51	0.0000233
第 4 组 化合物 A, 10mg/kg, QWx3, i.v.	164.13±34.01	1.18±0.27	91.06	8.94	0.0000000000975

第 5 组 化合物 A, 15mg/kg, QWx3, i.v.	125.90±25.46	0.92±0.22	93.06	6.94	0.00000000000988

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示，即 $\bar{x} \pm S$；

2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ 或 $T/C\% = T_{TV} / C_{TV} \times 100\%$；$TGI\% =$（1-T/C）× 100%；

3. 第 3 组 vs. 第 4 组, p=0.168; 第 3 组 vs. 第 5 组, p=0.0317; 第 4 组 vs. 第 5 组, p=0.998。

表 11：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	24 天	28 天	31 天	35 天
第 1 组	144.68	226.31	339.60	493.01	774.49	977.77	1370.47	1818.22	2299.37
第 2 组	145.46	262.15	409.97	529.44	761.56	960.42	1073.28	1230.93	1577.99
第 3 组	144.35	183.15	198.80	228.87	253.30	310.83	279.31	337.78	452.75
第 4 组	144.21	164.75	151.95	140.29	138.66	144.36	149.16	164.13	168.68
第 5 组	145.41	171.22	167.54	161.80	157.66	151.20	134.73	125.90	108.70

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 15 所示。

上述实验数据表明，在连续的 31 天观察里，化合物 A 显示出比卡铂（carboplatin）更优良的抑瘤作用，化合物 A 的 5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg 三个给药剂量的相对肿瘤抑制率 TGI（%）分别达到 81.49%、91.06%、93.06%。化合物 A 的三个给药剂量至少在 31 天里对实验动物的体重没有明显影响，显示出在拥有优良抑瘤作用的同时，无毒副作用。

4.3 化合物 A 和索拉非尼在人肝癌 LI6652 皮下异种移植 PDX 模型中的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c 裸小鼠皮下接种人肝癌 LI6652 瘤块，建立人肝癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg（每天给药一次，连续给 21 天）组、测试药化合物 A 1.25 mg/kg（每天给药，连续给 5 天，停 2 天后，再停 2 周，共 2 个给药周期）、2.5mg/kg（每天给药，连续给 5 天，停 2 天后，再停 2 周，共 2 个给药周期）、5mg/kg（每天给药，连续给 5 天，停 2 天后，再停 2 周，共 2 个给药周期）单药组以及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+80%葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）对照组，共 5 组，每组 6 只小鼠。测试药化合物 A 1.25 mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg 单药组以及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+80% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）对照组都是腹腔注射给药，每天给药，连续给 5 天，停 2 天后，再停 2 周，共 2 个给药周期。测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组是灌胃给药，每天给药一次，连续给药 21 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 31 天对肝癌 LI6652 模型中各组药效进行分析，其结果如表 12 所示。记录不同天数肿瘤的体积大小，结果如表 13 所示。对应的肿瘤体积随时间变化关系绘制成曲线图如图 16 所示。

表 12：肝癌 LI6652 模型中各组药效分析表

实验组	所有给药结束后的第 3 天（即 Day28）

	肿瘤体积（$\bar{x}\pm S$）	相对肿瘤体积（$\bar{x}\pm S$）	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）	1590.50±470.81	14.67±3.14	-	-	-
第 2 组 索拉非尼 30mg/kg	315.93±81.35	2.50±0.57	82.96	17.04	0.108
第 3 组 化合物 A 1.25mg/kg	24.72±9.57	0.18±0.07	98.77	1.23	0.00000291
第 4 组 化合物 A 2.5mg/kg	18.28±8.14	0.17±0.10	98.84	1.16	0.000000535
第 5 组 化合物 A 5mg/kg	3.38±3.38	0.02±0.02	99.86	0.14	0.00000000575

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示，即 $\bar{x}\pm S$；

2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ or $T/C\% = T_{TV} / C_{TV} \times 100\%$；$TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$。

表 13：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	3 天	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	24 天	28 天	31 天
第 1 组	125.10	219.19	322.75	504.30	740.03	925.35	1284.19	1658.67	1590.50	2112.46
第 2 组	125.84	146.95	196.51	212.41	217.19	191.72	178.69	209.42	315.93	441.67
第 3 组	126.30	184.11	194.19	135.63	51.98	28.94	29.42	28.38	24.72	18.12
第 4 组	126.29	179.46	189.33	145.19	43.64	29.90	21.49	17.91	18.28	5.56
第 5 组	124.83	174.91	190.90	130.55	34.29	19.84	13.80	12.20	3.38	2.62

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 17 所示。

上述实验结果表明，化合物 A 的三个给药剂量均表现出优良的抑瘤作用，其相对肿瘤抑制率 TGI（%）均超过 98%，且优于索拉非尼（Sorafenib）的抑瘤作用。化合物 A 的三个给药剂量至少在 28 天里对实验动物的体重没有明显影响，显示出在拥有优良抑瘤作用的同时，无毒副作用。

4.4 化合物 A 和紫杉醇在人源非小细胞肺癌 NCI-H460-Luc2 颅内接种 CDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c 裸小鼠颅内接种人肺癌 NCI-H460-Luc2 细胞，建立人肺癌颅内移植肿瘤模型。实验分为测试药紫杉醇（Paclitaxel）20mg/kg 组、化合物 A 2mg/kg 组、4mg/kg 和 8mg/kg 组及 10%乙醇+10%聚氧乙烯蓖麻油+80%葡萄糖注射液 D5W(pH7.42)溶媒对照组（Vehicle 组），每组 6 只小鼠。其中，10%乙醇+10%聚氧乙烯蓖麻油+80%葡萄糖注射液 D5W(pH7.42)溶媒对照组、测试药化合物 A 2mg/kg 组、4mg/kg 和 8mg/kg 组都是尾静脉注射给药，每周给药一次，给药 3 周。阳性药紫杉醇（Paclitaxel）20 mg/kg 组是腹腔注射

给药，每周给药一次，给药 3 周。根据肿瘤生物荧光值计算相对肿瘤抑制率 TGI（%）并进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 11 天，根据测定的生物荧光值，对人源 NCI-H460-luc 颅内接种模型中各组药效进行分析，其结果如表 14 所示。

表 14：人源 NCI-H460-Luc2 颅内接种模型中各组药效分析表

组别	生物荧光值 ($\times 10^5$ photon/second)[a]（第 11 天）	TGI [b] (%)	T/C [c] (%)	*p* 值 [d]
Vehicle (n=5)	2576.80 ± 680.69	--	--	--
紫杉醇 20 mg/kg, i.p.(n=5)	4184.52 ± 1679.77	-62.45	130.82	0.2278
化合物 A 2 mg/kg, i.v.(n=6)	7.62 ± 2.10	99.80	0.24	0.0089
化合物 A 4 mg/kg, i.v.(n=6)	1.62 ± 0.30	100.03	0.05	0.0087
化合物 A 8 mg/kg, i.v.(n=6)	1.78 ± 0.42	100.03	0.06	0.0087

根据各治疗组和对照组测定的生物荧光值绘制成关于治疗天数的曲线图，如图 18 所示。化合物 A 的三组给药剂量的生物荧光值均较低，且明显低于紫杉醇给药剂量，说明化合物 A 能够透过血脑屏障进入脑部发挥抑瘤作用，这是紫杉醇所不能起到的药效。

另外，为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 19 所示。图中两个对照组的小鼠体重下降明显，说明紫杉醇不能透过血脑屏障进入脑部发挥抑瘤作用，反观化合物 A 的三组给药剂量对应的体重变化率，其小鼠体重变化不大，说明化合物 A 在进入脑部发挥抑瘤作用的同时，几乎没有毒副作用，从侧面也说明其穿过了血脑屏障，并且发挥了抑瘤作用。

4.5 化合物 A 和吉西他滨在胰腺癌 PA1222 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 PA1222 瘤块，建立人胰腺癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药吉西他滨（Gemcitabine）120mg/kg 组、测试药化合物 A 10 mg/kg 及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组，共 3 组，每组 5 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组、测试药化合物 A 10 mg/kg 组是尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药三周。测试药吉西他滨（Gemcitabine）120mg/kg 组腹腔注射给药，每周给药一次，连续给药 3 周。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 28 天对胰腺癌 PA1222 模型中各组药效进行分析，其结果如表 15 所示。记录不同天数肿瘤的体积大小，结果如表 16 所示。

表 15：HuPrime®胰腺癌 PA1222 模型中各组药效分析表

实验组	首次给药后的第 28 天（即 Day28）				
	肿瘤体积 $\bar{x}\pm S$	相对肿瘤体积 $\bar{x}\pm S$	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%	395.45±76.89	3.49±0.62	-	-	-

聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4），0mg/kg, QWx3, i.v.					
第 2 组 吉西他滨, 120mg/kg, QWx3, i.p.	166.11±24.40	1.49±0.19	57.17%	42.83%	7.78e-4
第 3 组 化合物 A, 10mg/kg, QWx3, i.v.	12.51±5.25	0.10±0.04	97.14%	2.86%	9.14e-7

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示，即 $\bar{x} \pm S$；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%。

表 16：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	3 天	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	24 天	28 天
第 1 组	112.01	139.75	177.43	199.20	249.21	306.79	339.57	362.58	395.45
第 2 组	111.91	136.17	153.75	157.55	147.44	136.71	138.01	153.69	166.11
第 3 组	111.50	117.62	113.91	107.17	66.08	42.94	23.22	21.20	12.51

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 20 所示。

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 21 所示。

该模型为吉西他滨敏感模型。上述实验结果表明，10mg/kg 给药剂量的化合物 A 具有良好的抗肿瘤活性，其抑瘤活性优于 120mg/kg 给药剂量的吉西他滨（Gemcitabine）。同时，与对照组的实验动物体重变化情况对比来看，化合物 A 在显示出优良抑瘤作用的同时，无毒副作用。

4.6 化合物 A 和紫杉醇在肺癌 LU2505 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c Nude 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 LU2505 瘤块，建立人肺癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药紫杉醇（Paclitaxel）20 mg/kg 组、测试药化合物 A 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg 和 5 mg/kg 组及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组，共 5 组，每组 5 只小鼠。其中测试药紫杉醇（Paclitaxel）20 mg/kg 组是腹腔注射给药，每四天给药一次，共给药四个周期，观察 13 天。7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组、测试药化合物 A 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg 和 5 mg/kg 组是尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药三周，观察 8 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 28 天对肺癌 LU2505 模型中各组药效进行分析，其结果如表 17 所示。记录不同天数肿瘤的体积大小，结果如表 18 所示。

表 17：HuPrime®肺癌 LU2505 模型中各组药效分析表

实验组	3 周给药周期结束后的第 8 天（即 Day28）				
	肿瘤体积 $\bar{x}\pm S$	相对肿瘤体积 $\bar{x}\pm S$	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 溶媒对照组	1126.00±354.60	10.68±3.44	-	-	-
第 2 组 紫杉醇 20 mg/kg	250.47±157.81	2.29±1.37	78.60	21.40	0.0322
第 3 组 化合物 A 1.25 mg/kg	485.95±175.25	4.61±1.57	56.86	43.14	0.7120
第 4 组 化合物 A 2.5 mg/kg	102.06±47.51	1.11±0.56	89.57	10.43	0.0322
第 5 组 化合物 A 5 mg/kg	19.00±8.08	0.17±0.07	98.40	1.60	0.00112

表 18：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	4 天	7 天	11 天	14 天	18 天	21 天	25 天	28 天
第 1 组	103.58	196.01	291.37	390.10	486.55	670.52	824.93	902.96	1126.00
第 2 组	103.12	133.63	133.14	132.14	164.42	207.89	238.63	231.63	250.47
第 3 组	103.28	156.32	231.55	242.12	291.72	383.24	434.92	478.15	485.95
第 4 组	103.26	149.02	131.34	109.62	116.57	113.09	103.18	92.38	102.06
第 5 组	103.23	139.41	111.31	62.41	42.40	34.32	30.63	20.52	19.00

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 22 所示。

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 23 所示。

上述实验结果表明，1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg 给药剂量的化合物 A 对肺癌 LU2505 PDX 模型具有良好的抗肿瘤活性，并且 2.5mg/kg、5mg/kg 给药剂量的化合物 A 的抗肿瘤活性高于 20mg/kg 给药剂量的紫杉醇（Paclitaxel）。化合物 A（1.25mg/kg，2.5 mg/kg 和 5 mg/kg）的治疗作用具有剂量依赖性，化合物 A（5 mg/kg）治疗组相较化合物 A（1.25 mg/kg）治疗组统计学上有显著差异（p=0.0192），其余各组间无统计学差异。同时，与对照组的实验动物体重变化情况对比来看，化合物 A 在显示出优良抑瘤作用的同时，无毒副作用。

4.7 化合物 A、索拉非尼和 AST-3424 在肝癌 LI6643 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 LI6643 瘤块，建立人肝癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组，测试药 AST-3424 0.3 mg/kg、1 mg/kg、1.25 mg/kg 组，测试药化合物 A 0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg 组，以及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 生理盐水（pH7.5）溶媒对照组，共 8 组，每组 6 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85%生理盐水（pH7.5）溶媒对照组尾静脉给药，每周给药一次，连续给药 3 周；测试药 AST-3424 0.3 mg/kg 和 1 mg/kg 组尾静脉注射给药，每天给药一次，连续给 5 天，停两天，停两周，再连续给药 5 天；测试药 AST-3424 1.25 mg/kg 组尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药两周，停一周，再连续给药两周；化合物 A 0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg 组是尾静脉注射给药，每天给药一次，连续给药 5 天，停两天，停两周，再连续给药 5 天。测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组灌胃给药，每天给药一次，连续给药 21 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 21 天对肝癌 LI6643 模型中各组药效进行分析，其结果如表 19 所示。记录不同天数肿瘤体积大小，结果如表 20 所示。

表 19：HuPrime®肝癌 LI6643 模型中各组药效分析表

实验组	首次给药后的第 21 天（即 Day 21）				
	肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	相对肿瘤体积（$\bar{x}$±S）	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85%生理盐水	605.52±161.19	4.82±1.36	-	-	-
第 2 组 Sorafenib (30 mg/kg)	214.75±31.53	1.83±0.2	62.12%	37.88%	0.29
第 3 组 AST-3424 (0.3 mg/kg)	250.47±44.00	1.92±0.2	60.16%	39.84%	0.403
第 4 组 AST-3424 (1 mg/kg)	75.89±21.82	0.66±0.22	86.32%	13.68%	<0.001
第 5 组 AST-3424 (1.25 mg/kg)	169.64±41.89	1.36±0.22	71.86%	28.14%	<0.01
第 6 组 化合物 A (0.5 mg/kg)	242.85±50.74	1.84±0.25	61.88%	38.12%	0.29
第 7 组 化合物 A (1 mg/kg)	174.86±17.43	1.44±0.16	70.09%	29.91%	<0.01
第 8 组	116.38±20.17	0.97±0.14	79.81%	20.19%	<0.001

化合物 A (2 mg/kg)					

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100% or T/C % = T_{TV} / C_{TV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%。

表 20：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	3 天	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	24 天	28 天
第 1 组	124.93	190.19	249.09	351.57	421.67	493.35	605.52	796.73	996.53
第 2 组	124.67	170.03	185.13	193.95	189.87	171.25	214.75	238.48	309.08
第 3 组	124.74	210.50	242.31	227.43	208.00	223.43	250.47	302.15	386.93
第 4 组	124.32	156.70	144.82	110.44	90.12	97.62	75.89	89.34	98.43
第 5 组	124.62	205.56	217.23	216.04	187.94	176.52	169.64	174.54	146.31
第 6 组	124.86	239.56	282.74	266.35	231.35	241.82	242.85	173.56	188.68
第 7 组	124.32	205.79	246.90	225.40	195.33	191.98	174.86	217.19	231.64
第 8 组	124.40	182.25	182.74	162.65	137.87	117.10	116.38	122.78	95.87

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 24 所示。

上述实验结果表明，0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg 给药剂量的化合物 A 与 0.3mg/kg、1mg/kg、1.25mg/kg 给药剂量的 AST-3424 对人源 LI6643 PDX 模型具有类似的良好的抗肿瘤活性，并且与 20mg/kg 给药剂量的索拉非尼（Sorafenib）的抗肿瘤活性相当。

4.8 化合物 A 和索拉非尼在肝癌 LI6643 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c Nude 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 LI6643 瘤块，建立人肝癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药索拉非尼（Sorafenib）20-30 mg/kg 组、化合物 A 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 组及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85%葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组，共 6 组，每组 5 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组、测试药化合物 A 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg 组是腹腔注射给药，每天给药，连续给 5 天，停 2 天后，再停 2 周，共 2 个给药周期，观察 28 天。测试药化合物 A 10 mg/kg 组尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药 2 周，停 1 周，共 2 个给药周期，观察 25 天。索拉非尼（Sorafenib）20-30 mg/kg 组灌胃给药，在 day0-day11 期间，30mg/kg 给药剂量，每天给药一次，连续给 12 天，在 day12-day20 期间，由于小鼠体重下降明显，剂量从 30mg/kg 调整到 20mg/kg，每天给药一次，连续给 9 天，观察 33 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 35 天对肝癌 LI6643 模型中各组药效进行分析，其结果如表 21 所示。记录不同天数肿瘤体积大小，结果如表 22 所示。

表 21：HuPrime®肝癌 LI6643 模型中各组药效分析表

实验组	所有给药结束后的第 7 天（即 Day35）				
	肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$)	相对肿瘤体积 ($\bar{x}\pm S$)	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油 +85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）	1780.45±371.56	14.15±2.84	-	-	-
第 2 组 索拉非尼 20-30mg/kg	392.20±64.05	3.09±0.45	78.19%	21.81%	0.174
第 3 组 化合物 A 10mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.	0±0	0±0	100.00%	0.00%	0.00000000138
第 4 组 化合物 A 1.25mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	35.61±18.63	0.27±0.14	98.11%	1.89%	0.000000555
第 5 组 化合物 A 2.5mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	56.62±9.62	0.45±0.07	96.81%	3.19%	0.0000895
第 6 组 化合物 A 5mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	7.12±7.12	0.05±0.05	99.66%	0.34%	0.00000000613

表 22：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	4 天	7 天	11 天	14 天	18 天	21 天	25 天
第 1 组	127.06	184.53	321.39	445.25	595.14	856.01	1053.14	1249.58
第 2 组	126.16	163.51	205.85	235.50	279.42	291.41	287.76	326.85
第 3 组	126.11	160.85	216.99	94.21	72.94	59.48	25.80	21.28
第 4 组	126.02	181.97	270.85	264.04	197.40	177.65	102.13	90.41
第 5 组	125.92	199.12	278.32	191.74	167.14	154.33	100.94	103.28
第 6 组	126.93	178.97	214.95	132.13	63.74	60.36	40.93	24.91

实验室	28 天	32 天	35 天	39 天	42 天	46 天	49 天	53 天
第 1 组	1445.52	1574.72	1780.45	2218.93	1938.47	2147.64	/	/
第 2 组	346.56	385.09	392.20	431.87	451.48	521.44	585.72	622.46
第 3 组	10.93	7.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
第 4 组	73.75	49.39	35.61	31.79	25.59	19.34	12.51	9.04
第 5 组	93.12	74.85	56.62	39.85	27.34	14.83	12.00	12.86
第 6 组	21.48	8.71	7.12	6.77	5.57	4.27	4.12	3.81

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 25 所示。为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 26 所示。

上述实验结果表明，1.25mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg 给药剂量的化合物 A 对 LI6643 细胞具有良好的抗肿瘤活性，并且其抗肿瘤活性均高于 30mg/kg 给药剂量的索拉非尼（Sorafenib）。同时，与对照组的实验动物体重变化情况对比来看，化合物 A 在显示出优良抑瘤作用的同时，无毒副作用。

4.9 化合物 A 和索拉非尼在肝癌 LI1005 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c Nude 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 LI1005 瘤块，建立人肝癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组、化合物 A 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 组及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组，共 6 组，每组 5 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组、测试药化合物 A 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg 组是腹腔注射给药，每天给药，连续给 5 天，停 2 天后，再停 2 周，共 2 个给药周期，观察 10 天。化合物 A 10 mg/kg 组尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药 2 周，停 1 周，共 2 个给药周期，观察 7 天。索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组灌胃给药，每天给药一次，连续给 21 天，观察 15 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 35 天对肝癌 LI1005 模型中各组药效进行分析，其结果如表 23 所示。记录不同天数肿瘤体积的大小，结果如表 24 所示。

表 23：HuPrime®肝癌 LI1005 模型中各组药效分析表

实验组	给药后第 35 天（即 Day35，9/29/2020）				
	肿瘤体积 ($\bar{x}$±S)	相对肿瘤体积 ($\bar{x}$±S)	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W	1090.50±293.57	10.09±1.78	-	-	-

（pH7.4）					
第 2 组 索拉非尼 30mg/kg	294.09±60.93	2.85±0.49	71.74%	28.26%	5.06E-02
第 3 组 化合物 A 10mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.	179.97±51.38	1.87±0.54	81.47%	18.53%	9.15E-04
第 4 组 化合物 A 1.25mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	334.61±61.24	3.28±0.53	67.53%	32.47%	1.20E-01
第 5 组 化合物 A 2.5mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	178.69±65.98	1.60±0.42	84.12%	15.88%	3.21E-04
第 6 组 化合物 A 5mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	85.00±26.32	0.77±0.18	92.38%	7.62%	4.65E-06

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100% or T/C % = T_{TV} / C_{TV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%。

表 24：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	3 天	7 天	10 天	14 天	17 天	21 天	24 天	28 天	31 天	35 天
第 1 组	102.76	180.44	290.97	342.24	413.26	516.71	630.34	736.61	923.45	1008.22	1090.50
第 2 组	102.89	121.64	136.21	136.21	136.89	140.09	142.56	161.17	200.97	227.65	294.09
第 3 组	102.58	127.72	172.58	138.61	127.60	132.95	151.00	181.36	191.25	186.25	179.97
第 4 组	102.66	157.94	198.68	188.83	196.25	204.85	228.87	256.49	246.26	282.93	334.61
第 5 组	103.02	156.63	197.27	156.39	147.34	148.94	173.92	180.83	178.96	182.98	178.69
第 6 组	103.15	160.80	167.82	120.93	97.35	90.25	106.81	115.29	110.01	102.22	85.00

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 27 所示。为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 28 所示。

实验结论：化合物 A 在 10 mg/kg、2.5mg/kg 和 5mg/kg 剂量下，对 HuPrime®肝癌 LI1005 具有显著抑制肿瘤生长的作用，相较对照组统计学上有显著性差异，药效优于索拉非尼。化合物 A 在 1.25 mg/kg 和索拉非尼在 30 mg/kg 剂量下，对 HuPrime®肝癌 LI1005 具有抑制肿瘤生长的作用，相较对照组统计学上无显著性差异，药效与索拉非尼组无差异。荷瘤小鼠对化合物 A 10 mg/kg、1.25 mg/kg、2.5mg/kg 和 5mg/kg 测试剂量下耐受良好。索拉非尼在 30 mg/kg 测试剂量下引起小鼠一定的体重下降，给药期结束后，体重逐渐恢复正常。同时，化合物 A 与对照组的实验动物体重变化情况对比来看，化合物 A 在显示出优良抑瘤作用的同时，无毒副作用。

4.10 化合物 A 和索拉非尼在肝癌 HepG2 CDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c nude 裸小鼠皮下接种人肝癌 HepG2 细胞，建立人肝癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组、测试药化合物 A 5 mg/kg (QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.)、10 mg/kg (QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.)、1.25 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.)、2.5 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.)、5 mg/kg(QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.)单药组及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯(35)蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W(pH7.4)溶媒对照组，共 7 组，每组 6 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯(35)蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W(pH7.4)溶媒对照组、测试药化合物 A 1.25 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.)、2.5 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.)和 5 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.)组是腹腔注射给药，每天给药一次，连续给药 5 天，停 2 天和 2 周，再每天给药一次，连续给药 5 天，之后观察 9 天。测试药化合物 A 5 mg/kg (QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.)、10 mg/kg (QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.)组是尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药 2 周，停一周，再每周给药一次，连续给药 2 周，末次给药后观察 6 天。测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组是灌胃给药，每天给药一次，连续给药 21 天，之后观察 14 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在细胞接种后的第 53 天对肝癌 HepG2 模型中各组药效进行分析，其结果如表 25 所示。记录不同天数肿瘤体积的大小，结果如表 26 所示。

表 25：人肝癌 HepG2 模型中各组药效分析表

实验组	肿瘤细胞接种后的第 53 天（即 Day53，首次给药后的第 34 天）				
	肿瘤体积 ($\bar{x}$±S)	相对肿瘤体积 ($\bar{x}$±S)	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯(35)蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W(pH7.4) QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	2293.53±358.48	11.85±1.76	-	-	-
第 2 组 索拉非尼, 30mg/kg, QDx21 Days, p.o.	1484.78±304.89	7.82±1.58	34.05	65.95	0.833
第 3 组 化合物 A, 5mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.	136.44±66.47	0.70±0.34	94.08	5.92	0.0000000978
第 4 组 化合物 A, 10mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.	88.20±29.95	0.45±0.15	96.17	3.83	0.00000000582
第 5 组 化合物 A, 1.25mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	1066.23±252.18	5.57±1.26	52.97	47.03	0.192
第 6 组 化合物 A, 2.5mg/kg, QDx5;	417.76±105.16	2.19±0.52	81.54	18.46	0.000184

2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.					
第 7 组 化合物 A, 5mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.	189.84±72.81	0.99±0.38	91.67	8.33	0.000000381

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100% or T/C % = T_{TV} / C_{TV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%。

表 26：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	19 天	22 天	24 天	27 天	31 天	36 天	39 天	42 天	46 天	49 天	53 天
第 1 组	192.64	336.01	345.38	430.57	617.10	771.64	969.06	1325.75	1574.22	1939.71	2293.53
第 2 组	189.76	291.62	311.64	340.46	398.84	491.06	509.41	657.51	816.63	1012.20	1484.78
第 3 组	191.48	315.19	360.12	390.21	373.82	314.44	283.08	276.88	233.11	145.58	136.44
第 4 组	191.97	314.32	375.81	427.75	386.68	347.85	312.31	252.78	197.45	142.21	88.20
第 5 组	189.54	315.41	351.74	383.10	366.64	416.27	586.80	782.39	886.97	975.41	1066.23
第 6 组	189.31	292.03	360.14	373.23	405.67	392.90	342.04	399.84	417.54	456.60	417.76
第 7 组	189.64	259.29	280.24	286.22	290.75	293.88	247.49	224.58	215.32	234.89	189.84

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 29 所示。

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 30 所示。

实验结论：化合物 A 的药效优于索拉非尼。由于 HepG2 是恶病质模型，该模型特点是荷瘤小鼠的体重会自发的下降。化合物 A 在 10mg/kg (QWx2; 1 week off; QWx2, i.v., Group 4)和 2.5 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p., Group 6)剂量下，对人肝癌 HepG2 模型具有显著抑制肿瘤生长的作用，相较对照组统计学上均有显著性差异。化合物 A 在上述 2 个测试剂量和给药方式下，荷瘤小鼠没有发生严重的体重下降或者死亡。测试单药化合物 A 在 5 mg/kg (QWx2; 1 week off; QWx2, i.v., Group 3)剂量下，对人肝癌 HepG2 模型具有显著抑制肿瘤生长的作用，相较对照组统计学上有显著性差异，该组在给药周期内有一只小鼠发生死亡。化合物 A 在 5 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p., Group 7)剂量下，对人肝癌 HepG2 模型具有显著抑制肿瘤生长的作用，相较对照组统计学上有显著性差异，该组有一只小鼠在给药周期内由于 BWL>20%而被安乐死。化合物 A 的 5 mg/kg 组中有一只小鼠完全治愈。并且，化合物 A 的 1.25 mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p., Group 5)，2.5mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p., Group 6)和 5mg/kg (QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p., Group 7)治疗组表现出剂量依赖性的量效关系。Group3、4、7 组中各有一只小鼠完全治愈，Sorafenib 在 30mg/kg 测试剂量下，对人肝癌 HepG2 模型具有抑制肿瘤生长的作用，相较对照组统计学上没有显著性差异，并且在测试剂量下引起小鼠明显的体重下降。

4.11 化合物 A 和紫杉醇在肺癌 LU0884 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c Nude 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 LU0884 瘤块，建立人肺癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药紫杉醇（Paclitaxel）20 mg/kg 组、化合物 A 2.5 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 组及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组，共 6 组，每组 6 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组、化合物 A 2.5 mg/kg、5 mg/kg 和 10mg/kg 组是尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给 3 周，观察 8 天。测试药 Paclitaxel

20 mg/kg 组是腹腔注射给药，每 4 天给药一次，连续给药 4 次，观察 13 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 28 天对肺癌 LU0884 模型中各组药效进行分析，其结果如表 27 所示。记录不同天数肿瘤体积的大小，结果如表 28 所示。

表 27：HuPrime®肺癌 LU0884 模型中各组药效分析表

实验组	所有给药周期结束后的第 8 天（即 Day28）				
	肿瘤体积 ($\bar{x}$±S)	相对肿瘤体积 ($\bar{x}$±S)	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯(35)蓖麻油+85%葡萄糖注射液 D5W（pH7.4），0 mg/kg, QWx3, i.v.	664.59±121.31	5.99±0.80	-	-	-
第 2 组 紫杉醇, 20mg/kg, Q4Dx4, i.p.	528.88±147.69	4.72±1.26	21.21%	78.79%	0.957
第 4 组 化合物 A, 2.5mg/kg, QWx3, i.v.	360.43±44.42	3.47±0.56	42.15%	57.85%	0.560
第 5 组 化合物 A, 5mg/kg, QWx3, i.v.	291.60±103.85	2.61±0.94	56.38%	43.62%	0.252
第 6 组 化合物 A, 10mg/kg, QWx3, i.v.	434.80±160.03	3.78±1.19	36.98%	63.02%	0.687

1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ or $T/C\% = T_{TV} / C_{TV} \times 100\%$；$TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$。

表 28：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	4 天	7 天	11 天	14 天	18 天	21 天	25 天	28 天
第 1 组	109.73	180.12	262.62	314.65	366.16	476.97	510.27	599.15	664.59
第 2 组	110.11	157.57	229.87	250.46	292.52	381.53	402.62	492.50	528.88
第 4 组	109.86	138.21	177.96	194.38	216.81	261.94	287.79	328.61	360.43
第 5 组	110.67	173.28	221.81	229.45	236.47	260.75	271.59	289.40	291.60
第 6 组	109.04	202.09	257.40	283.55	293.14	343.92	359.85	411.01	434.80

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 31 所示。

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 32 所示。

实验结论：测试药紫杉醇（Paclitaxel）（20mg/kg, Group 2）在测试剂量下，对 HuPrime® 肺癌 LU0884 具有微弱的抑瘤作用，相较对照组统计学上没有显著性差异。化合物 A 2.5mg/kg（Group 4）、5mg/kg（Group 5）和 10mg/kg（Group 6）在测试剂量下，对 HuPrime® 肺癌 LU0884 均具有一定的抑瘤作用，相较对照组统计学上均没有显著性差异。因此测试药紫杉醇（Paclitaxel）和化合物 A 在该模型中的药效没有显著差异。荷瘤小鼠对 Paclitaxel 在 20mg/kg（Group 2）、化合物 A 在 2.5mg/kg（Group 4）、5mg/kg（Group 5）和 10mg/kg（Group 6）测试剂量下耐受良好，没有明显的体重下降的现象发生。

4.12 化合物 A、AST-3424 和索拉非尼在肝癌 LI6664 PDX 模型的体内药效实验对比

实验说明：BALB/c 裸小鼠皮下接种 HuPrime®模型 LI6664 瘤块，建立人肝癌皮下移植肿瘤模型。试验分为测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 组、测试药 AST-3424 0.3 mg/kg、1 mg/kg、1.25 mg/kg 组、化合物 A 0.5 mg/kg、1.5 mg/kg、4. 5 mg/kg 组，以及 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组，共 8 组，每组 6 只小鼠。其中，7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）溶媒对照组尾静脉给药，每周给药一次，连续给药 3 周；测试药 AST-3424 0.3 mg/kg 和 1 mg/kg 组尾静脉注射给药，每天给药一次，连续给 5 天，停两天，停两周，再连续给药 5 天；测试药 AST-3424 1.25 mg/kg 组尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药两周，停一周，再连续给药两周；化合物 A 0.5 mg/kg、1.5 mg/kg、4.5 mg/kg 组是尾静脉注射给药，每周给药一次，连续给药三周，停一周，再连续给药三周。测试药 Sorafenib 30 mg/kg 组灌胃给药，每天给药一次，连续给药 21 天。根据相对肿瘤抑制率 TGI（%）进行疗效评价，根据动物体重变化和死亡情况进行安全性评价。

在给药后的第 28 天对肝癌 LI6664 PDX 模型中各组药效进行分析，其结果如表 29 所示。记录不同天数肿瘤体积的大小，如表 30 所示。

表 29：HuPrime®肝癌 LI6664 模型中各组药效分析表

实验组	首次给药后的第 28 天（即 Day 28）				
	肿瘤体积 $(\bar{x}\pm S)$	相对肿瘤体积 $(\bar{x}\pm S)$	TGI (%)	T/C (%)	P 值（相较于对照组）
第 1 组 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）	1506.35±457.93	12.91±2.94	-	-	-
第 2 组 索拉非尼 (30 mg/kg)	1003.42±128.88	9.17±0.47	28.99%	71.01%	1
第 3 组 AST-3424 (0.3 mg/kg)	746.71±130.55	6.99±1.31	45.85%	54.15%	0.79
第 4 组 AST-3424 (1 mg/kg)	463.09±99.32	4.51±1.21	65.05%	34.95%	0.0329

第 5 组 AST-3424 (1.25 mg/kg)	687.95±147.16	6.14±0.94	52.42%	47.58%	0.479
第 6 组 化合物 A (0.5 mg/kg)	920.46±215.96	8.51±2.07	34.07%	65.93%	0.855
第 7 组 化合物 A (1.5 mg/kg)	466.31±77.63	4.31±0.54	66.57%	33.43%	0.0457
第 8 组 化合物 A (4.5 mg/kg)	320.72±40.03	2.96±0.27	77.05%	22.95%	0.000856

注：1. 数据以“平均值 ± 标准误差”表示；

2. T/C % = T_{RTV} / C_{RTV} × 100% or T/C % = T_{TV} / C_{TV} × 100%；TGI% =（1-T/C）× 100%。

表 30：不同实验组在不同天数的肿瘤体积大小（mm^3）

实验组	0 天	4 天	7 天	11 天	14 天	18 天	21 天	25 天
第 1 组	108.31	224.91	303.09	414.35	597.93	762.00	892.78	1214.79
第 2 组	107.93	170.15	197.93	218.34	321.83	391.52	481.85	730.68
第 3 组	108.20	162.32	177.51	208.59	306.95	391.40	499.34	631.08
第 4 组	107.53	131.59	145.23	158.03	233.54	291.97	371.35	438.00
第 5 组	108.46	174.65	210.25	222.97	291.02	361.03	467.94	581.63
第 6 组	108.44	201.76	277.38	301.39	347.30	434.18	518.23	746.19
第 7 组	108.25	127.56	152.00	161.35	206.44	225.71	287.02	398.93
第 8 组	108.26	125.30	142.58	150.82	176.69	180.29	201.42	282.76
实验组	28 天	32 天	35 天	39 天	42 天	46 天	49 天	/
第 1 组	1506.35	1441.57	1671.99	2081.93	1409.66	649.08	695.40	/
第 2 组	1003.42	1333.07	1595.00	2102.94	2729.04	2892.15	2600.00	/
第 3 组	746.71	958.09	1059.71	1226.51	1094.69	1268.82	1486.77	/
第 4 组	463.09	622.48	748.13	929.60	1226.79	1496.83	1717.60	/
第 5 组	687.95	746.71	871.84	1081.64	1307.36	1675.14	1923.31	/
第 6 组	920.46	1036.44	1258.05	1426.66	1661.81	2037.97	1746.71	/
第 7 组	466.31	543.94	643.84	805.84	1060.20	1179.82	1407.10	/
第 8 组	320.72	339.73	360.45	391.38	417.79	451.01	538.20	/

分别在不同天数对不同组别的小鼠的肿瘤体积进行测量，并取得平均值，并绘制成曲线图，如图 33 所示。

为了验证化合物 A 对实验动物体重变化的影响，基于上述实验方法，在不同时间点记录实验动物的体重变化情况，并计算其体重增长率，绘制成曲线图，如图 34 所示。

实验结论：测试药索拉非尼（Sorafenib）30 mg/kg 治疗组在首次给药后的第 28 天没有抑瘤作用，相对肿瘤抑制率 TGI（%）为 28.99%。测试药 AST-3424 0.3 mg/kg（每天给药一次，连续给 5 天，停两天，停两周，再连续给药 5 天）治疗组在首次给药后的第 28 天（Day 28）有一定的抑瘤作用，相较对照组统计学上没有显著性差异（p=0.79），相对肿瘤抑制率 TGI(%)为 45.85%。测试药 AST-3424 1 mg/kg（每天给药一次，连续给 5 天，停两天，停两周，再连续给药 5 天）治疗组在首次给药后的第 28 天（Day 28）有显著的抑瘤

作用，相较对照组统计学上有显著性差异（p=0.0329），相对肿瘤抑制率 TGI(%)为 65.05%。AST-3424 1.25 mg/kg（每周给药一次，连续给药两周，停一周，再连续给药两周）治疗组在首次给药后的第 28 天（Day 28）有一定的抑瘤作用，相较对照组统计学上没有显著性差异（p=0.479），相对肿瘤抑制率 TGI(%)为 52.42%。

化合物 A 0.5 mg/kg（每周给药一次，连续给药三周，停一周，再连续给药三周）治疗组在首次给药后的第 28 天（Day 28）有轻微的抑瘤作用，相较对照组统计学上有没显著性差异（p= 0.855），相对肿瘤抑制率 TGI(%)为 34.07%。化合物 A 1.5 mg/kg 和 4.5 mg/kg（每周给药一次，连续给药三周，停一周，再连续给药三周）治疗组在首次给药后的第 28 天（Day 28）有显著的抑瘤作用，相较对照组统计学上有显著性差异（p 值分别为 0.0457 和 0.000856），相对肿瘤抑制率 TGI(%)分别为 66.57%和 77.05%。化合物 A 的抑瘤效果具有剂量依赖性，并且测试药化合物 A 4.5 mg/kg 治疗组（Group 8）相较 0.5 mg/kg 治疗组（Group 6）统计学上有显著性差异（p=0.0428）。化合物 A 和 AST-3424 有相近的抑瘤效果，且均优于索拉非尼的抑瘤效果。

索拉非尼 30 mg/kg 治疗组出现个别小鼠体重下降的现象。AST-3424 和化合物 A 各治疗组在治疗期间没有出现小鼠体重下降的现象，耐受良好。

五、Pgp 抑制实验及 BBB 血脑屏障实验

P-糖蛋白（P-GP，也称为多药耐药蛋白）是在多药抗药性肿瘤细胞质膜上发现的一种高分子量蛋白质,具有转运泵样的结构。它将多种化疗药物泵出细胞外，降低细胞内的药物浓度,与临床化疗的抗药性关系密切。

化疗药物在治疗脑部等中枢神经系统的肿瘤或癌症中的作用受到了限制，这主要是由于血脑屏障（ blood brain barrier，BBB），血脑屏障使得化疗药物对肿瘤系统或肿瘤组织的渗透性差，也就是化疗药物无法穿过血脑屏障进入到脑内来杀灭癌细胞。

化疗药物等小分子穿越血脑屏障的过程比较复杂。血脑屏障位于全身血液循环和脑脊液之间，是由专门的脑微血管内皮细胞，连同周围细胞和血管周围的星形细胞通过相邻细胞间的紧密连接而形成的，其迫使大多数分子通过时形成选择性障碍，而不是围绕血管内皮细胞构成一个物理屏障。血脑屏障的膜的运输系统容许亲水性小分子通过，而大型亲水性分子，包括许多化疗药物和大分子药物都将被排除出中枢神经系统，除非他们能被某些蛋白主动运输。更重要的是，血脑屏障具有的保护脑组织的“药物外排泵”，如 P-糖蛋白，能积极主动从大脑中排除一些化疗药物和大分子药物。因此，即使具有一定亲水性的小分子化疗药物（包括小分子靶向抗肿瘤药物分子）能穿越血脑屏障进入大脑发挥作用，但在 P -糖蛋白的作用下也依然会被排除出中枢神经系统而无法真正起效。也就是说，Pgp 的跨膜结构具有能量依赖性“药泵”功能，能将流水亲脂性的药物，如长春新碱(VCR)、阿霉素(Dox)或足叶乙甙(VP-16)等泵出细胞外，造成细胞内药物浓度下降，细胞毒作用降低或完全丧失。

为此 PGP 糖蛋白与化合物的作用实验数据即可以用来评价这些化合物对中枢神经系统肿瘤细胞增殖抑制的真正有效作用程度。

5.1 以 MDCKII-MDR1 细胞为模型，维拉帕米为抑制剂评估化合物 A 作为 P-gp 底物的潜能

5.1.1 穿透试验用细胞的制备

1）MDCKII-MDR1 细胞培养于细胞培养瓶。培养箱设置为 37°C、5% CO_2、保证相对湿度 95%。细胞汇合度达到 70 - 90%时可用于接种迁移小室（Transwell）。

2）细胞接种前，向迁移小室上室每孔中加入 50 μL 细胞培养基，下层培养板内加入 25 mL 细胞培养基。将培养板置于 37℃, 5%CO_2 培养箱内孵育 1 小时后可用于接种细

胞。

3）细胞孵育后，吸取细胞混悬液转移至圆底离心管，于 120 g 离心 5 分钟。

4）使用培养基重悬细胞，终浓度为 1.56×10^6 cells/mL。将细胞悬液以 50 μL 每孔加入到 96 孔迁移小室培养板上室中，最终接种密度为 5.45×10^5 cells/cm²。

5）接种后 48 小时开始换液，培养 4-8 天，隔一天换一次培养基。

6）更换培养基过程如下，将迁移小室与接收板分开，先弃掉接收板中培养基然后再弃掉迁移小室培养基，最后每个小室加入 75 μL 新鲜培养基，接收板加入 25 mL 新鲜培养基。

5.1.2 细胞单层膜完整性的评价

1）MDCKII-MDR1 细胞经过 4-8 天培养后，应完全汇合并完成分化。此时，可应用于穿透试验。

2）用电阻仪（Millipore）测量单层膜电阻，记录每孔电阻。

3）测定结束后，将迁移小室培养板放回培养箱。

4）电阻值的计算：测定电阻值(ohms) × 膜面积 (cm^2) = TEER 值 (ohm· cm^2)，若 TEER 值< 42 ohms· cm^2，则该孔不能用于穿透试验。

5.1.3 药物穿透试验

1）从培养箱中取出 MDCKII-MDR1 迁移小室培养板。使用缓冲液润洗细胞单层膜两次，37℃条件下孵育 30 分钟。

2）测定化合物由顶端到基底端的转运速率。向上层小室（顶端）每孔加入 75μL 含受试物的冲液，下层小室（基底端）每孔加入 235μL 缓冲液。

3）测定化合物由基底端到顶端的转运速率。向上层小室（顶端）每孔加入 75μL 缓冲液，下层小室（基底端）每孔加入 235μL 含受试物的缓冲液。

4）从工作液配制板中转移 50μL 样品加到 200μL 含内标的乙腈（100nM 阿普唑仑，200nM 拉贝洛尔, 200nM 咖啡因和 2μM 酮洛芬）中作为 0 分钟给药样品进行检测。

5）为测定受试物在加 P-gp 抑制剂维拉帕米条件下的转运，需要在 MDCKII-MDR1 迁移小室板给药端的缓冲盐和接收端的缓冲盐中均需加维拉帕米，且终浓度为 100μM。

6）将上下的转运合并后，37℃条件下孵育 2 小时。

7）孵育完成后，分别从迁移小室培养板上室和下室每孔取样 50μL 加入到新的样品管中。向样品管内加入 200ul 含内标的乙腈（100nM 阿普唑仑, 200nM 拉贝洛尔, 200nM 咖啡因 和 2 μM 酮洛芬），涡旋 10 分钟后，于 3220g 离心 30 分钟。吸取上清液 100μL，与等体积水稀释之后进行 LC-MS/MS 分析。各样品均采用三平行孵育。

8）用荧光黄的渗漏评价评价孵育 2 小时后细胞单层膜的完整性，使用缓冲液稀释荧光黄储备液至最终浓度 100μM。在上侧的 Transwell 插板的每个孔中加入荧光黄溶液 100μL，下侧接收板的每个孔中加 300μL 缓冲液。37℃下孵育 30 分钟后，分别从每孔上下层吸出 80 μL 溶液至一个新的 96 孔板中。使用酶标仪，激发波长 480nm 和发射波长 530nm 条件下进行荧光测定。

5.1.4 数据分析

峰面积由离子色谱结果计算得出。化合物的表观渗透系数(Papp，单位：cm/s×10-6)用以下公式计算得出：

$$P_{app} = \frac{V_A}{Area \times time} \times \frac{[drug]_{acceptor}}{[drug]_{initial,donor}}$$

公式中：VA 为接收端溶液的体积(Ap→Bl 是 0.235 mL，Bl→Ap 是 0.075 mL)，Area 为 Transwell-96 孔板膜面积(0.143 cm2)；time 为孵育时间(单位：s)，[drug]acceptor 表示孵育结束后接收端的药物浓度，[drug]initial,donor 表示孵育前的给药初始浓度。

外排率 Efflux Ratio 使用以下的公式计算得出：

$$Efflux\ Ratio = \frac{P_{app\ (B-A)}}{P_{app\ (A-B)}}$$

公式中：Papp (B-A)为由基底端到顶端的表观渗透系数；Papp (A-B)为由顶端到基底端的表观渗透系数。

回收率 Recovery 使用以下的公式计算得出：

$$Recovery\% = \frac{[drug]_{acceptor} \times V_A + [drug]_{donor} \times V_D}{[drug]_{initial,donor} \times V_D} \times 100$$

公式中：VA 为接收端的溶液体积(单位：mL)；VD 为给予端的溶液体积(单位：mL)。[drug]acceptor 表示孵育结束后接收端的药物浓度，[drug]donor 表示孵育结束后给药端的药物浓度，[drug]initial, donor 表示孵育前的给药初始浓度。

细胞单层膜的荧光值 LY Leakage 使用以下的公式计算得出：

$$\text{LY Leakage} = \left(\frac{I_{acceptor} \times 0.3}{I_{acceptor} \times 0.3 + I_{donor} \times 0.1}\right) \times 100$$

公式中：Iacceptor 是指接收孔(0.3 mL)的荧光密度，Idonor 是指加药孔(0.1 mL)的荧光密度，用%LY 表示。LY<1.5%表示单层细胞膜完好。

分别对制备的部分化合物进行测试得到不同化合物在有无 P-糖蛋白抑制剂维拉帕米存在时的外排率，实验数据如表 31 所示。

表 31：药物穿透实验数据

化合物	维拉帕米 (μM)	$P_{app\ (A-B)}$ (10^{-6}, cm/s)	$P_{app\ (B-A)}$ (10^{-6}, cm/s)	Efflux Ratio	Recovery (%)	
					AP-BL	BL-AP
美托洛尔	0	27.57	26.51	0.96	96.18	98.46
哌唑嗪	0	10.99	31.84	2.90	90.69	78.53
哌唑嗪	100	30.36	17.65	0.58	94.19	88.52
伊马替尼	0	1.89	30.49	16.13	79.04	63.40
伊马替尼	100	21.14	19.68	0.93	83.02	87.60
A	0	0.18	0.24	1.36	5.03	4.34
A	100	0.27	0.31	1.12	5.70	12.56
AST-3424	0	1.95	34.51	17.71	79.11	90.60
AST-3424	100	7.50	21.51	2.87	92.56	96.29

实验结论:化合物 A 在有、无 P-gp 抑制剂维拉帕米存在的情况下，其 Papp (A-B)、Papp (B-A)、Efflux Ratio 这三个关键的参数都是十分接近的，因此化合物 A 不是 Pgp 底物，血脑屏障对其药效影响甚微。

作为对比，同为 AKR1C3 酶活化的 AST-3424，其测试得到的 Papp (A-B)、Papp (B-A)、Efflux Ratio 这三个关键的参数差异较大，显示 AST-3424 是 Pgp 底物，血脑屏障对其药效有较大影响。

5.2 血脑屏障实验

5.2.1 化合物 A 血脑屏障实验

每个时间点 3 个 CD-1 鼠静脉给予 1mg/kg 测试化合物 A。给药后 5min、15min、1h、2h、4h 和 8h 取血及脑组织，用 LC/MS 方法检测样品中的测试物的浓度，结果如表 32 所示。

表 32：不同时间点，化合物 A 静脉给药到 CD-1 小鼠后不同时间点血及脑组织中测试物的浓度

Route	Time (h)	Animal ID	Brain (ng/g)	Plasma (ng/mL)	Ratio (Brain/ Plasma)	Mean	SD	CV (%)
IV	0.083	1	538.05	459.53	1.17	1.28	0.10	7.51
		2	540.75	400.55	1.35			
		3	549.95	416.19	1.32			
	0.25	4	419.34	371.76	1.13	1.15	0.19	16.87
		5	489.60	362.24	1.35			
		6	371.38	384.54	0.97			
	1	7	180.29	226.51	0.80	0.76	0.06	8.49
		8	188.66	238.84	0.79			
		9	169.85	249.07	0.68			
	2	10	107.09	150.39	0.71	0.67	0.07	10.32
		11	94.27	134.42	0.70			
		12	77.59	131.84	0.59			
	4	13	71.20	96.41	0.74	0.78	0.12	15.87
		14	68.47	74.91	0.91			
		15	42.73	63.17	0.68			
	8	16	23.60	48.84	0.48	0.52	0.10	18.78
		17	21.85	49.05	0.45			
		18	18.85	29.91	0.63			

将化合物 A 在血液和脑组织中浓度与时间的对应结果制作成曲线图，如图 35 所示。

将在脑组织和血液中化合物 A 浓度的比例与时间的对应测试结果制作成曲线图，如图 36 所示。

将上述实验中测试得到的 PK（药物代谢动力学）参数列表如下，如表 33、表 34 所示。

表 33~表 34 中相关术语解释如下：

PK parameters，药物代谢动力学参数。

T1/2，半衰期。

Cl-obs，血浆清除率。

C0，起始浓度。

AUClast，从给药时间开始到最后一个点的这段时间的药时曲线线下面积。

AUCInf，从给药开始到无穷远的时间的药时曲线线下面积。

Tmax，达峰时间。

Cmax，达峰浓度。

MRTInf-obs，代表从给药开始到理论外推无穷远的时间的平均驻留时间。

AUCInf Ration(Brain/Plasma)，从给药开始到无穷远的时间的血清和脑组织中药时曲线线下面积的比例。

Unit，单位。

Mean，平均值。

表 33：血浆中测试得到的 PK 参数

PK parameters	Unit	Mean
Cl_obs	mL/min/kg	13.85
T1/2	h	3.64
C0	ng/mL	453.48
AUClast	h*ng/mL	979.51
AUCInf	h*ng/mL	1202.97
MRTInf_obs	h	4.37
Vss_obs	L/kg	3.63

表 34：脑组织中测试得到的 PK 参数

PK parameters	Unit	Mean
T1/2	h	2.80
Tmax	h	0.08
Cmax	ng/g	543.00
AUClast	h*ng/g	785.85
AUCInf	h*ng/g	872.43
MRTInf_obs	h	2.99
AUCInf Ratio (Brain/Plasma)	-	0.80

上述实验结果表明，化合物 A 可在脑组织中检测到，化合物 A 可穿越血脑屏障，进行正常的生理代谢，发挥抑瘤作用。

5.2.2 化合物 AST-2870 血脑屏障实验

化合物 AST-2870 是化合物 AST-3424 的外消旋体，具有与 AST-3424 类似的抑瘤活性。

每个时间点 3 个 CD-1 腹腔注射给予 10mg/kg 测试化合物 AST-2870。给药后 5min、15min、30min、1h、1.5h 和 2h 取血液及脑组织，用 LC/MS 方法检测样品中的测试物的浓度。将化合物 AST-2870 在血液和脑组织中浓度与时间的对应结果制作成曲线图，如图 37 所示。将在脑组织和血液中化合物 AST-2870 浓度的比例与时间的对应测试结果制作成曲线图，如图 38 所示。

将上述实验中测试得到的 PK（药物代谢动力学）参数列表如下，如表 35、表 36 所示。

表 35：血浆中测试得到的 AST-2870 PK 参数

PK parameters	Unit	Mean
Cl_obs	mL/min/kg	NC
T1/2	h	0.15
Cmax	ng/mL	4023
AUClast	h*ng/mL	725
AUCInf	h*ng/mL	725
MRTInf_obs	h	NC
Vss_obs	L/kg	NC

表 36：脑组织中测试得到的 AST-2870 PK 参数

PK parameters	Unit	Mean
T1/2	h	0.0747
Tmax	h	0.08
Cmax	ng/g	88.7
AUClast	h*ng/g	16.3
AUCInf	h*ng/g	16.5
MRTInf_obs	h	NC
AUCInf Ratio (Brain/Plasma)	-	0.0227

实验结论:结合 5.2.1 中实验数据，从中可以得出，化合物 A 的半衰期明显长于

AST-2870; 化合物 A 在检测的 8 小时内脑组织中浓度与血浆浓度类似，显示这个化合物可有效穿透血脑屏障；而 AST-2870 在脑中检测到的浓度明显低于血浆浓度，给药 30 分钟后，已低于定量下限，说明 AST-2870 不能穿过血脑屏障。

六、代谢稳定性评价实验

6.1 细胞质溶液稳定实验

（一）溶液配制

1）配制化合物 A 供试品、黄体酮阳性对照和 AST-3021 抑制剂 100mM 储备液，并于冷冻冰箱（-10℃～-30℃）保存。

2）配制 2.5mM 供试品或者阳性对照品中间液和 1.5mM 的抑制剂中间液。

3）配制 10mg/mL 的猴细胞溶质溶液。

4）配制含 7.5μM 阳性对照品的 1.5 mg/mL 肝细胞溶质混悬液。

5）配制含 7.5μM 供试品的 1.5 mg/mL 肝细胞溶质混悬液。

6）配制含 7.5μM 供试品和 4.5μM 抑制剂的 1.5 mg/mL 肝细胞溶质混悬液。

7）称取适量的 NADPH 粉末，然后用磷酸钾缓冲液溶解，配制成 6 mM 的 NADPH 工作液，并于 37℃预热。

（二）孵育实验

1）阴性对照组：按不同的时间点（0 and 60 min），在 96 孔板中分装 30 μL/孔的含 7.5 μM 供试品的肝细胞溶质混悬液。平行制备三个复孔。

2）阳性对照组：按不同的时间点（0、5、15、30、45 and 60 min），在 96 孔板中分装 30 μL/孔的含 7.5 μM 阳性对照的肝细胞溶质混悬液。平行制备三个复孔。

3）正常反应组：按不同的时间点（0、5、15、30、45 and 60 min），在 96 孔板中分装 30 μL/孔的含 7.5 μM 供试品的肝细胞溶质混悬液。平行制备三个复孔。

4）抑制反应组：按不同的时间点（0、5、15、30、45 and 60 min），在 96 孔板中分装 30 μL/孔的含 7.5 μM 供试品和 4.5 μM 抑制剂的肝细胞溶质混悬液。平行制备三个复孔。

5)将 96 孔板在 37 度水浴中孵育 5 min。

6)0 min 样品：先加入 150 μL/孔含内标的乙腈后，然后正常反应组、抑制反应组和阳性对照组样品加入 15 μL/孔预热的 NADPH 工作溶液，阴性对照组样品加入 15 μL/孔预热的磷酸钾缓冲液。

7)其他样品（5、15、30、45 and 60 min）：对于正常反应组、抑制反应组和阳性对照组，加入 15 μL/孔预热的 NADPH 工作溶液起始反应；对于阴性对照组，加入 15 μL/孔预热的磷酸钾缓冲液。然后反应板在 37℃水浴中继续孵育，并在对应的时间点（5、15 、30、45 和 60 min）加入 150μL/孔的终止液终止反应。最终孵育体系如下表 25。

8)全部反应终止后，封板，600 rpm 震摇混匀约 10 min，然后冷冻保存（-10℃～-30℃）直至分析。

表 37：孵育体系数据

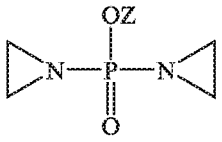
种属	组别	底物	底物浓度 (μM)	抑制剂(AST-3021) (μM)	NADPH (mM)	细胞溶质 (mg/mL)	孵育时间
小鼠、大鼠、猴和人	阴性对照	化合物A	5	0	0	1	0 and 60 min
	正常反应	化合物A	5	0	2	1	0, 5, 15, 30, 45 and 60 min
	抑制反应	化合物A	5	3	2	1	0, 5, 15, 30, 45 and 60 min

种属	组别	底物	底物浓度 (μM)	抑制剂(AST-3021) (μM)	NADPH (mM)	细胞溶质 (mg/mL)	孵育时间
	阳性对照	黄体酮	5	0	2	1	0, 5, 15, 30, 45 and 60 min

（三）样品分析

样品于 4℃，4000rpm 离心 15min，取上清和等体积的超纯水混合，然后用 LC-MS/MS 分析化合物 A、AST-2660 和黄体酮的浓度。

AST-2660 是前药化合物 A 经过 AKR1C3 酶代谢后释放的能够有效杀死肿瘤细胞的 NDA 烷化剂，其结构式如下：



，

其中，Z 可以是氢、钠或钾。

（四）数据分析

各样品中的分析物浓度用峰面积比（峰面积$_{分析物}$/峰面积$_{内标}$）来表示，然后以 0 分钟的峰面积比为参照，计算各孵育时间点的原形剩余率(%Remaining)，将剩余率的 ln 对数值与孵育时间线性拟合，并根据以下公式计算半衰期。

剩余率，%Remaining =$PAR_{appointed\ time}/PAR_{0\text{-}min}$ 均值 x 100 (PAR：峰面积比)；

消除速率常数（k）=（-斜率）；

半衰期($t_{1/2}$)(minutes)=0.693/k。

本实验体外考察了在存在或缺少 AKR1C3 抑制剂（AST-3021）情况下，待测化合物（化合物 A 和化合物 AST-3424）在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、食蟹猴及人肝细胞溶质中的代谢稳定性：在存在或缺少 AST-3021 的情况下，5 μM 的待测化合物（化合物 A 和化合物 AST-3424）与 2 mM 的 NADPH 和 1 mg/mL 的肝细胞溶质共同孵育 0-60 min。此外，在缺少 NADPH 和 AST-3021 的情况下，5 μM 的待测化合物（化合物 A 和化合物 AST-3424）与 1 mg/mL 的肝细胞溶质共同孵育 0，60 min 作为阴性对照。在缺少 AST-3021 的情况下，5 μM 的黄体酮与 2 mM 的 NADPH 和 1 mg/mL 的肝细胞溶质共同孵育 0-60 min 作为阳性对照。然后用 LC-MS/MS 检测孵育后样品中的阳性对照黄体酮、待测化合物（化合物 A 和化合物 AST-3424）和 AST-2660 的参数，实验数据如表 38 和表 39 所示。

表38：在不同种属肝细胞溶质中基于化合物A消除的代谢参数

底物	底物浓度（μM）	种属	组别	分析物	平均剩余率						代谢参数	
					0min	5min	15min	30min	45min	60min	k	$t_{1/2}$ (min)
化合物A	5	小鼠	阴性对照组	化合物A	100.00%	NA	NA	NA	NA	83.01%	0.0031	223.40
化合物A	5	大鼠		化合物A	100.00%	NA	NA	NA	NA	68.42%	0.0063	109.60
化合物A	5	猴		化合物A	100.00%	NA	NA	NA	NA	78.57%	0.0040	172.44
化合物A	5	人		化合物A	100.00%	NA	NA	NA	NA	38.96%	0.0157	44.12
化合物A	5	小鼠	正常反应组	化合物A	100.00%	99.18%	109.17%	95.86%	95.38%	88.89%	0.0014	511.07
化合物A	5		抑制反应组	化合物A	100.00%	90.76%	87.29%	85.00%	82.33%	74.94%	0.0041	168.42
化合物A	5	大鼠	正常反应组	化合物A	100.00%	90.07%	90.26%	84.80%	81.99%	71.72%	0.0053	130.84
化合物A	5		抑制反应组	化合物A	100.00%	88.10%	86.23%	83.84%	78.06%	63.81%	0.0068	101.55
化合物A	5	猴	正常反应组	化合物A	100.00%	98.89%	94.52%	89.81%	83.43%	73.28%	0.0046	151.55
化合物A	5		抑制反应组	化合物A	100.00%	96.83%	101.19%	90.97%	88.36%	69.52%	0.0045	155.47
化合物A	5	人	正常反应组	化合物A	100.00%	88.27%	79.04%	70.02%	52.35%	43.34%	0.0139	49.88
化合物A	5		抑制反应组	化合物A	100.00%	83.74%	78.58%	67.01%	66.39%	53.65%	0.0107	64.94
黄体酮	5	小鼠	阳性对照组	黄体酮	100.00%	89.61%	78.52%	62.61%	44.84%	31.03%	0.0184	37.71
黄体酮	5	大鼠		黄体酮	100.00%	84.80%	69.77%	45.51%	21.61%	4.70%	0.0311	22.28
黄体酮	5	猴		黄体酮	100.00%	82.47%	59.82%	28.19%	10.01%	3.26%	0.0525	13.20
黄体酮	5	人		黄体酮	100.00%	80.76%	55.69%	20.59%	7.72%	0.46%	0.0543	12.76

表 39：在不同种属肝细胞溶质中代谢产物 AST-2660 的平均峰面积比

底物	底物浓度（μM）	种属	组别	分析物	代谢产物平均峰面积比					
					0min	5min	15min	30min	45min	60min
化合物 A	5	小鼠	阴性对照组	AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	大鼠		AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	猴		AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	人		AST-2660	0.00E+00	NA	NA	NA	NA	0.00E+00
化合物 A	5	小鼠	正常反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5		抑制反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5	大鼠	正常反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5		抑制反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
化合物 A	5	猴	正常反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.24E-05	2.71E-05	4.27E-05
化合物 A	5		抑制反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.68E-06
化合物 A	5	人	正常反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	8.73E-06	2.29E-05	6.26E-05	8.33E-05
化合物 A	5		抑制反应组	AST-2660	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

用上述实验方法分别测试化合物 A 和 AST-3424，将实验结果数据进行分析做图，得到化合物 A 在添加 NADPH、未添加 NADPH、添加 AKR1C3 抑制剂以及对照药黄体酮条件下在小鼠、猴、大鼠、人的肝细胞质溶液中反应后的剩余量随时间变化的曲线图 39。得到 AST-3424 在添加 NADPH、未添加 NADPH、添加 AKR1C3 抑制剂以及对照药黄体酮条件下在小鼠、猴、大鼠、人的肝细胞质溶液中反应后的剩余量随时间变化的曲线图 40。

对化合物 A 的实验分析：

1. 在缺少 NADPH，又缺少 AST-3021 的情况下，与小鼠、大鼠、猴和人肝细胞溶质共同预孵 60 min 后，化合物 A 的平均剩余率分别为 83.01%、68.42%、78.57% 和 38.96%（见表 38），该数据表明化合物 A 可能存在非 NADPH 依赖的代谢途径。在所有样品中均未检测到代谢产物 AST-2660（见表 39）。

2.在缺少 AST-3021 的情况下，与小鼠、大鼠、猴和人肝细胞溶质及 NADPH 共同预孵 60 min 后，化合物 A 的平均剩余率分别为 88.89%、71.72%、73.28% 和 43.34%（见表 38），对应的半衰期分别为 511.07 min、130.84 min、151.55 min 和 49.88 min，在小鼠和大鼠样品中未检测到 AST-2660，在猴和人样品中检测到少量 AST-2660。

3. 在存在 AKR1C3 抑制剂 AST-3021 情况下，化合物 A 在小鼠、大鼠、猴和人肝细胞溶质中的剩余率分别为 74.94%、63.81%、69.52% 和 53.65%，对应的半衰期分别为 140.38 min,、101.55 min、155.47min 和 64.94 min（见表 38），在小鼠、大鼠和人样品中未检测到 AST-2660，只在一个猴 60min 样品中检测到 AST-2660。在小鼠、大鼠和猴肝细胞溶质中，AST-3021 未对化合物 A 的代谢产生明显抑制，但是在人肝细胞溶质中，AST-3021 对化合物 A 的代谢产生轻微的抑制。在存在 AST-3021 情况下，在小鼠和大鼠细胞溶质中未检测到 AST-2660。但是多数猴和人细胞溶质样品中，存在 AST-3021 时，AST-2660 浓度减少至无法检测的水平。

以上实验证明：

i.化合物 A 与 AST-3424 的代谢机理类似：在细胞质内代谢；在 NADPH、AKR1C3 酶存在下代谢释放出 DNA 烷化剂 AST-2660；在没有 NADPH 或没有 AKR1C3 酶时，也会代谢，但不会代谢释放 DNA 烷化剂 AST-2660。

ii.在人和猴的肝细胞溶质中，化合物 A 的正常组代谢稳定性优于 AST-3424，其半衰期更长，在作用于癌细胞时，化合物 A 能够发挥出比 AST-3424 更持久的抑癌效果。

6.2 肝微粒体稳定性实验

1）进行两个单独的实验。

1a）使用 NADPH：将 10μL 的 20mg/mL 肝微粒体和 40μL 的 10mM NADPH 加入培养液中。微粒体和 NADPH 的终浓度分别为 0.5mg/mL 和 1mM。

1b）没有 NADPH：将 10μL 的 20mg/mL 肝微粒体和 40μL 的超纯 H_2O 加入培养液。微粒体的终浓度为 0.5mg/mL。

2）加入终浓度为 2μM 的 4μL 200μM 测试化合物溶液或对照化合物溶液（维拉帕米）开始反应，并在 37℃下孵育。

3）在 0 和 30 分钟时从反应溶液中取出 50μL 等分试样。通过添加 4 体积的冷乙腈和四种内标（IS，100nM 阿普唑仑，200nM 咖啡因，200nM 拉贝洛尔和 2μM 酮洛芬）来终止反应溶液。将样品以 3,220 x g 离心 40 分钟。将等份的 100μL 上清液与 100μL 超纯 H_2O 混合，然后用于 LC-MS/MS 分析。所有实验一式两份进行。测试结果如下表 40。

表 40：化合物 A 在肝微粒体稳定性实验中 30 分钟后的剩余量

化合物	30 分钟后的剩余百分比				
	人	猴	狗	大鼠	小鼠

	加入NADPH	不加入NADPH	加入NADPH	不加入NADPH	加入NADPH	不加入NADPH	加入NADPH	不加入NADPH	加入NADPH	不加入NADPH
维拉帕米	15.55	98.27	0.19	92.44	15.73	97.58	1.13	89.24	2.91	93.95
化合物A	115.25	111.93	82.29	81.30	-	-	92.10	114.62	98.59	104.30
AST-3424	10.65	-	0.03	-	-	-	8.79	-	3.1	-

上述实验结果表明，化合物A在人、猴和小鼠肝微粒体中相对稳定，在大鼠肝微粒体中相对不稳定。通过化合物A与AST-3424数据对比，发现化合物A在人、猴、大鼠和小鼠肝微粒体中均比AST-3424更稳定。

6.3 血浆稳定性实验

1）血浆准备

立即将冷冻的血浆在37℃水浴中融化。将血浆以3,220g离心10分钟以去除血块，并将上清液收集到新的试管中。检查并记录血浆的pH。注意：a自到达以来，仅使用融化不超过两次的血浆； b仅使用pH7至pH8范围内的血浆。

2）准备实验溶液

在DMSO中制备了1mM的测试化合物和对照化合物mevinolin的工作溶液。在乙腈中制备1mM的对照化合物丙烷溶液的工作溶液。将4μL的工作溶液加至796μL的预孵育血浆中，以达到5μM的最终浓度。溶剂的最终浓度为0.5%。

3）血浆稳定性的测试步骤

将50μL加标血浆的等分试样加到新试管中，并在37℃水浴中以大约60rpm的转速孵育2小时。该测定一式两份进行。在两小时温育结束时，将300μL室温淬灭溶液（含有内标（乙腈，100nM Alprazolam，500nM Labetalol和2μM酮洛芬）的乙腈）终止，以终止反应。通过将50μL加标血浆添加到装有300μL室温淬灭溶液的新管中，制备时间为0的样品。涡旋混合5分钟。将板中的样品在4℃下以3,220 x g离心30分钟以沉淀蛋白质。将100μL上清液转移至新板中。上清液用100μL水稀释，充分混合并使用LC-MS/MS分析。

化合物A在不同物种血浆中2小时后的测试结果如下表41。

表41：不同物种血浆中2小时后的剩余百分比

化合物	种属	剩余百分比
化合物A	人	60.06
化合物A	大鼠	33.03
化合物A	小鼠	38.19
化合物A	猴	79.20

上述实验结果表明，化合物A在猴和人血浆中在2小时后仍然有79.20%和60.06%的剩余，其稳定性优于在大鼠和小鼠血浆中的稳定性。

七、最大耐受剂量(Maximal tolerance dose, MTD)实验

7.1 化合物A的MTD实验

评估食蟹猴单次30分钟静脉输注给予化合物A后的毒性反应及其毒代动力学特征。

7.1.1 实验过程：

8只健康适用的食蟹猴，雌雄各半，按照性别和体重随机分为4组，每组每性别1只动物。第1组是溶媒对照组，第2~4组分别是化合物A低（1 mg/kg）、中（3 mg/kg）、高（6 mg/kg）剂量组。所有动物单次静脉输注30分钟给药，观察14天，第15天进行剖检。

所有动物在给药前进行1次详细临床观察和体检。除计划解剖日进行1次外，适应期

和实验期间每天进行2次笼边观察（上、下午各1次）。实验期间，第1~4组所有动物每天进行1~2次详细临床观察；分别于分组前、D1（给药前）、D3、D7、D10、D14称量一次体重，并在D15解剖前称量一次体重；除D3和D14外，每天测定一次24±1小时的耗食量；分别于适应期、D1给药前、给药后2~4h、给药后6~8h、D2（给药后24±1 h）测量体温1次；分别于适应期和给药后2～4h各测一次心电图；分别于适应期、给药后2~4h和D14各测量一次血压。

临检血液样本采集前动物禁食过夜但不禁水。分别于适应期、D4和D15（计划解剖前）通过股静脉采集1次血样（约5mL）进行血液学、凝血和血清生化分析。同时提前一天收集尿液用于尿液分析。

第1组动物在给药前和给药后1h采集毒代样品，第2~4组动物在0h（给药前）、0.5h（给药后即刻）、0.75h、1h、1.25h、1.5h、2h、2.5h、4.5h和8.5h采集毒代样品。经股静脉采集约0.5mL/只/时间点血液样品，采集后置于含有肝素钠的抗凝管中，并保存在湿冰上。采集后2小时内在2~8℃条件下，6800g离心6min分离血浆。由研究机构生物分析实验室运用已建立的LC-MS/MS方法对血浆样品中的化合物A的浓度进行测定。使用WinNonlin 7.0非房室模型计算Cmax、Tmax、AUC（0-t）、AUC（0-∞）、t1/2、Vss、Vz和Cl。

所有动物在计划解剖日（D15）通过静脉注射戊巴比妥钠实施安乐死，通过股动脉/静脉放血的方式确保动物死亡，然后进行大体解剖检查。

7.1.2 实验结果：

在本试验条件下，食蟹猴单次静脉输注给予0mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg化合物A后，所有动物均存活至计划解剖日。3mg/kg和6mg/kg化合物A组雌性动物在给药部位出现轻微红斑。6mg/kg化合物A组雌雄动物均可见软便。观察期间上述症状均恢复正常。化合物A的暴露量与剂量成正比。化合物A表现出中等至高的全身清除率，范围为1.34~2.72 L/hr/kg；中等稳态分布容积，范围为1.80~3.64 L/kg。综上，化合物A在本试验条件下的MTD（最大耐受剂量）大于6 mg/kg。

7.2 化合物AST-3424的MTD实验

评价食蟹猴单次30分钟静脉滴注给予AST-3424注射液的最大耐受剂量

7.2.1 实验过程：

8只健康适用的食蟹猴，雌雄各半，按照性别和体重随机分为4组，每组每性别1只动物。第1组是溶媒对照组，第2~4组分别是AST-3424（含3.75%乙醇/1.25%丙二醇）低（0.5mg/kg）、中（1.0 mg/kg）、高（1.5mg/kg）剂量组。所有动物单次静脉输注30分钟给药，观察28天，第29天进行剖检。

试验期间对以下参数进行评价：濒死死亡情况，临床观察，体重，摄食量，血液学、凝血和血清生化分析，ECG，体温，大体解剖和镜下组织病理学检查。

7.2.2 实验结果：

给予1.5 mg/kg和1.0 mg/kg剂量的AST-3424的雄性食蟹猴，分别在第8天和第16天有测试物相关的死亡现象出现。动物死亡前可见体瘦和稀便。此外，1.0 mg/kg剂量组的雄性食蟹猴在处死前有以下表现：活动减少、体凉、体重下降、电解质紊乱（Na^+下降、K^+升高）、CK和BUN升高，大体解剖可见该动物心包膜内见淡黄色渗出物，结肠局部粘膜见暗红色斑块，肺脏左侧肺叶见两个白色斑块，斑块处质硬。该动物镜下可见肺脏及心脏明显的炎症反应，结肠的粘膜及粘膜下层出血及淋巴细胞坏死。在雌性猴中，没有发生供试品相关的死亡。但1.5mg/kg AST-3424组的雌猴出现体重减低、食物消耗减少、腹泻和呕吐。

雌猴在给予1.5 mg/kg剂量的AST-3424后，血液学指标发生变化，包括红细胞（RBC）、血红蛋白和红细胞比容减少，网织红细胞百分比增加。网织红细胞百分比增加被认为是对

红细胞减少的再生反应。雄猴在给予 1.0 mg/kg 剂量的 AST-3424 后白细胞计数（嗜中性粒细胞百分比）和纤维蛋白原增加，淋巴细胞百分比降低；以上现象与包括心脏和肺在内多种器官的炎症相关。此外，1.5mg/kg 剂量组的雌猴在第 14 天可见总蛋白和白蛋白减少，并在第 28 天恢复。

综上所述，食蟹猴单次 30 分钟静脉滴注给予 0.5、1.0 和 1.5 mg/kg 的 AST-3424 注射液，当剂量≥1.0 mg/kg 时可见雄猴出现死亡。因此，在本实验条件下，雄性和雌性食蟹猴单剂量给药最大耐受剂量分别为 0.5 mg/kg 和 1.5 mg/kg。

通过上述一系列的实验，对比化合物 A 和 AST-3424，可以发现：

（1）化合物 A 是固体，相较于 AST-3424 是液体，其具有便于储存和运输、计量，在制剂操作中更方便；

（2）化合物 A 具有与 AST-3424 相差不大的癌细胞杀灭作用，而且对 AKR1C3 酶活化具有更高的敏感性，特异性更强，实际上在 PDX 动物模型中，两者具有相近的治疗效果；

（3）相对于 AST-3424 是 P-gp 的底物，不能透过血脑屏障，新的 AKR1C3 活化的化合物 A 不是 P-gp 的底物，能透过血脑屏障，因此，新化合物 A 具有治疗中枢神经系统特别是原发性脑部肿瘤或癌症以及转移至脑的转移性癌症、肿瘤的作用，实施例中提供的脑部肿瘤模型（NCI-H460-Luc2 颅内接种的 CDX 模型）实验数据也证实 A 化合物具有治疗脑部肿瘤（脑转移）的效果，而 AST-3424 对于相同的模型没有治疗效果；

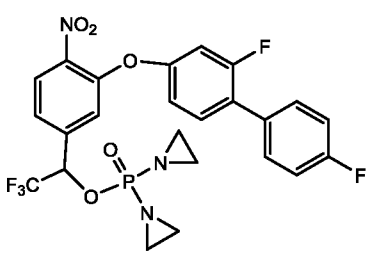
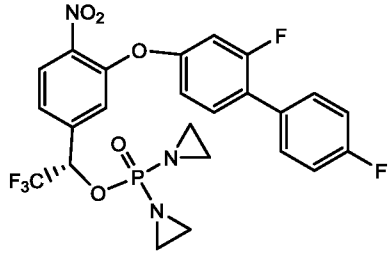
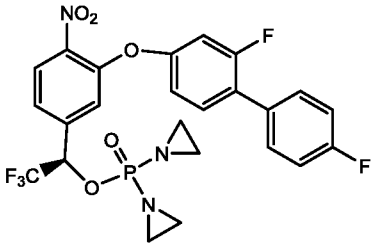
（4）化合物 A 在血浆和脑组织中的半衰期均较 AST-3424 长，因此，新化合物 A 在给药周期与剂量的设计等方面更优于 AST-3424，而且能在脑组织中存在一定的时间而发挥药效；

（5）化合物 A 的最大耐受剂量（MTD）比 AST-3424 要大，显示化合物 A 可能具有更宽的给药剂量，患者更耐受；

（6）化合物 A 的 R/S 异构体化合物 B 和 C 具有与 A 相当的体外癌细胞增殖抑制活性，而且化合物 A、B、C 经 AKR1C3 酶的作用后释放出 DNA 烷化剂的作用机理相同，与 R/S 构型无关，因此可以判定化合物 B、C 同化合物 A 一样，也可以透过血脑屏障，进入中枢神经系统特别是原发性脑部肿瘤或癌症组织以及转移至脑的转移性癌症、肿瘤组织而发挥抑癌疗效。

权利要求书

1．具有以下任一结构式的化合物，或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体：

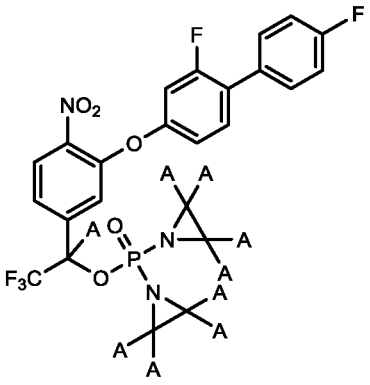
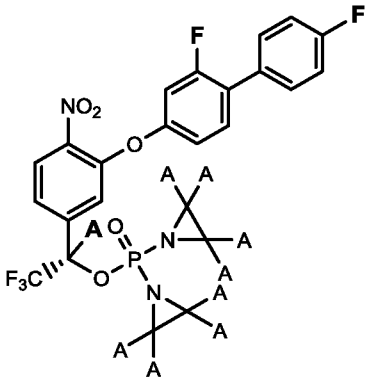
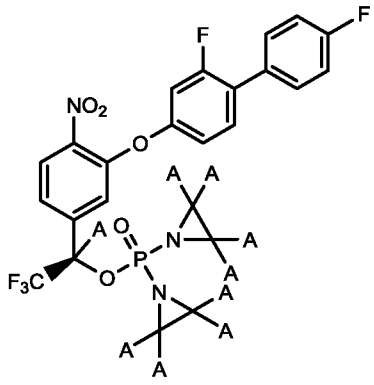

、

、

，

A B C。

2．根据权利要求1所述的化合物，其中，所述盐为碱式盐或酸式盐，所述溶剂合物为水合物或醇合物。

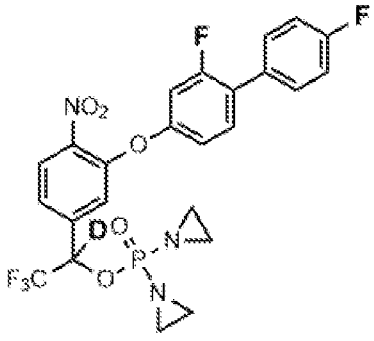
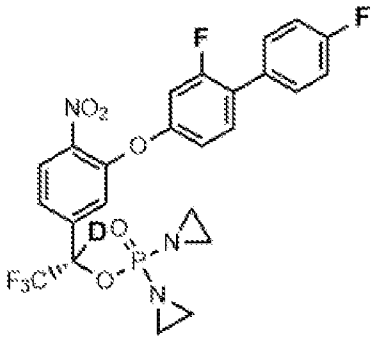
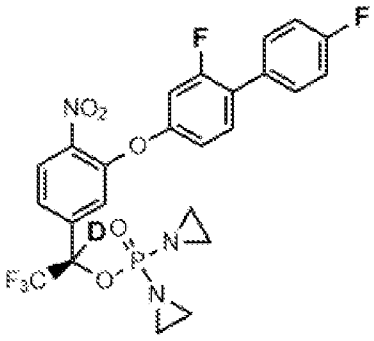
3．根据权利要求2所述的化合物，其中，所述醇合物为乙醇合物。

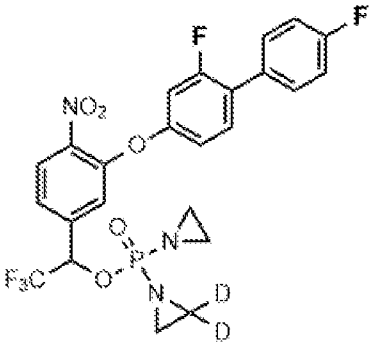
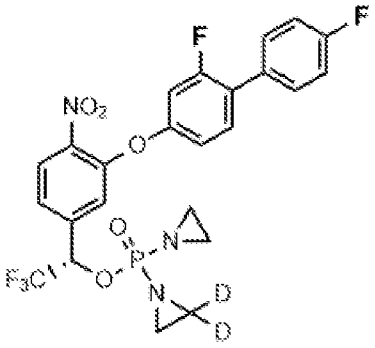
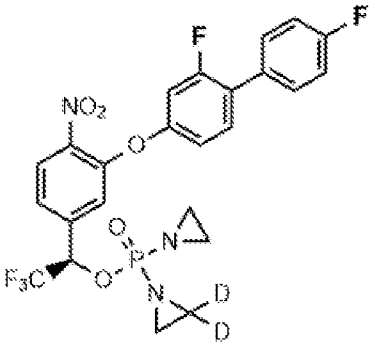
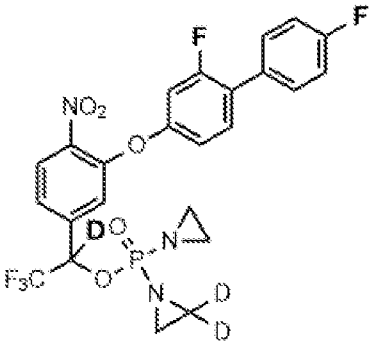
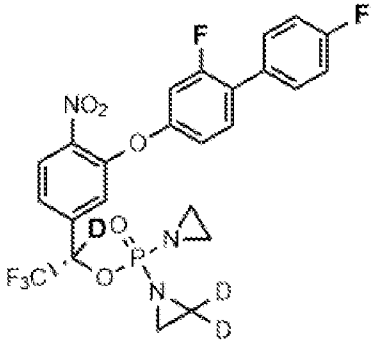
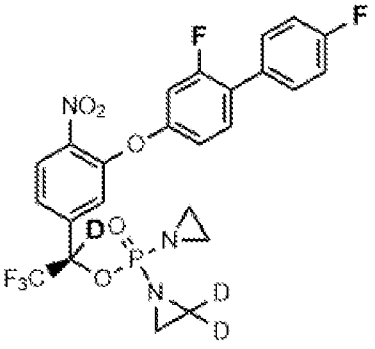
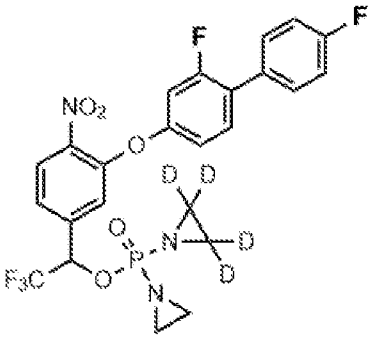
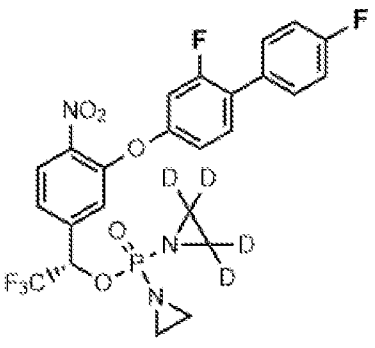
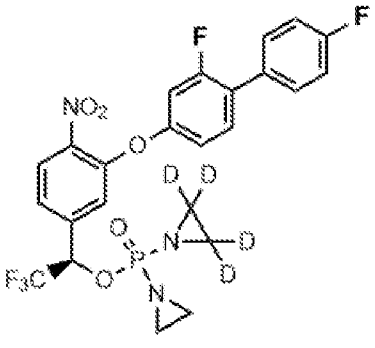
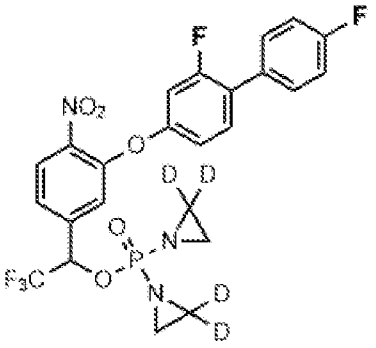
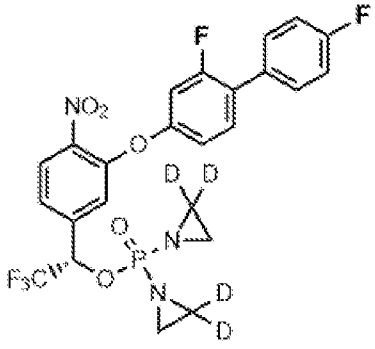
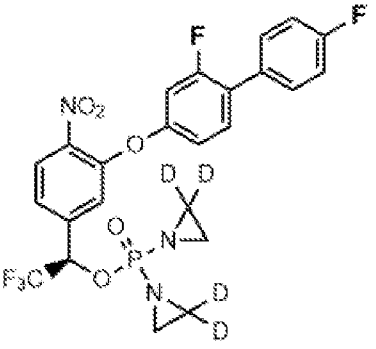
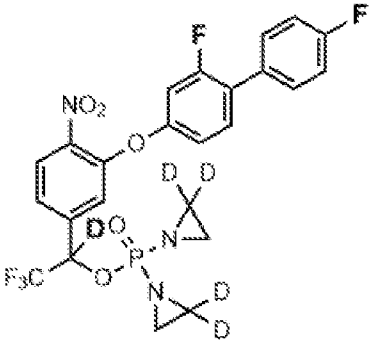
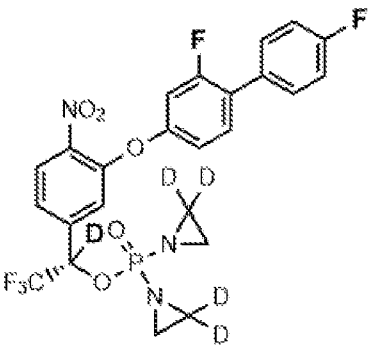
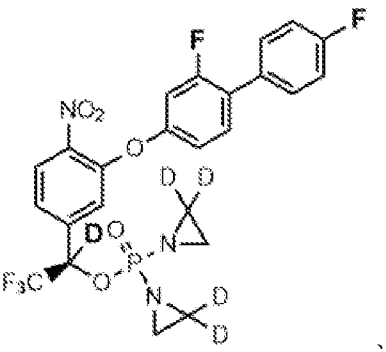
4．根据权利要求1所述的化合物，其中，所述同位素变体的结构式如下：

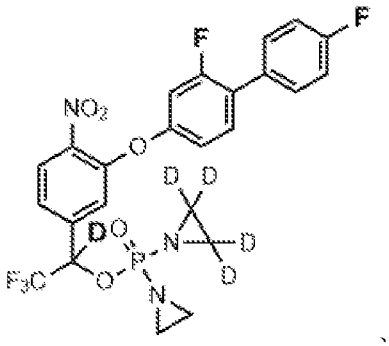
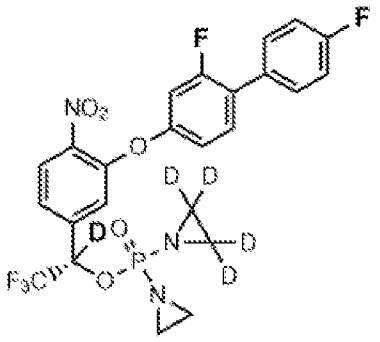
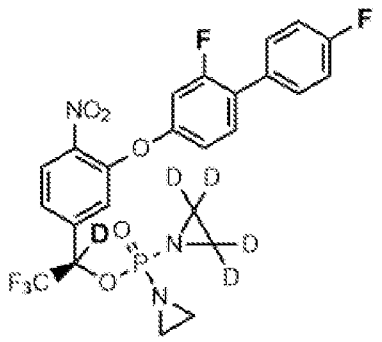
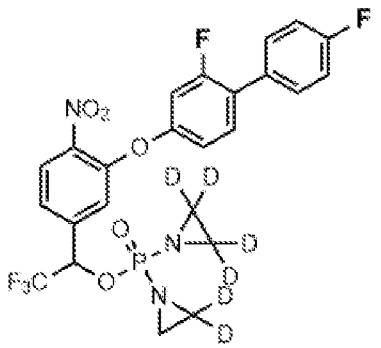
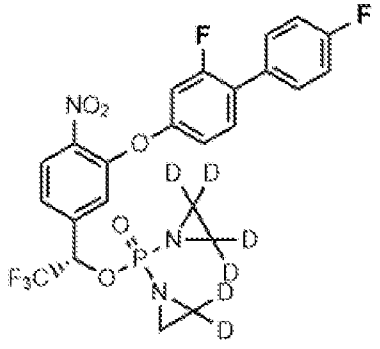
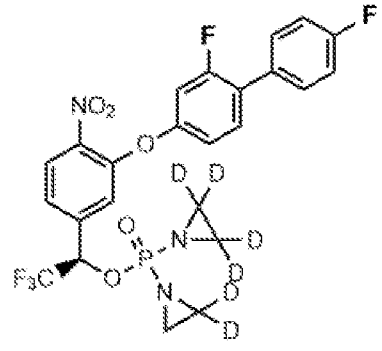
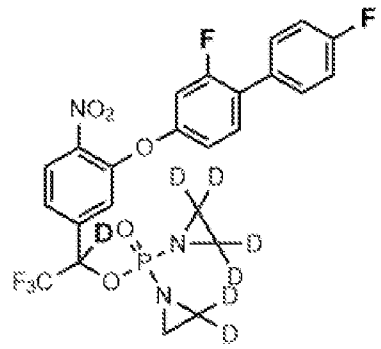
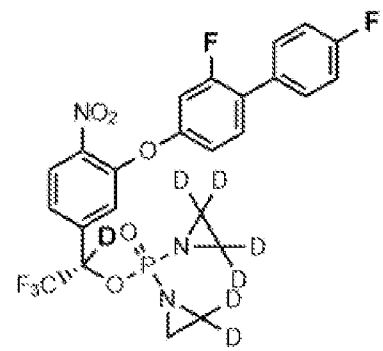
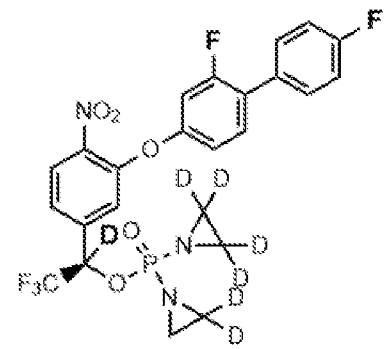
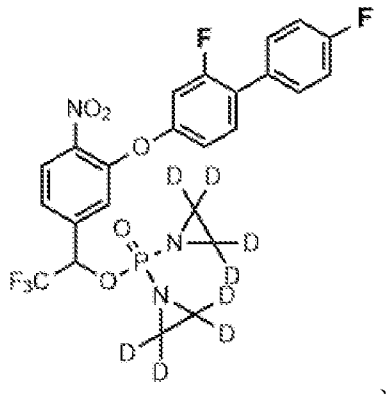
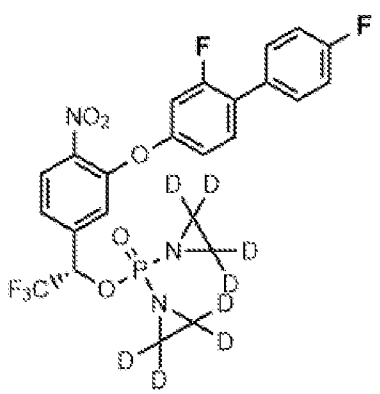
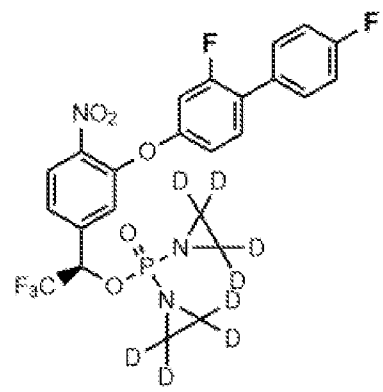

、

、

，

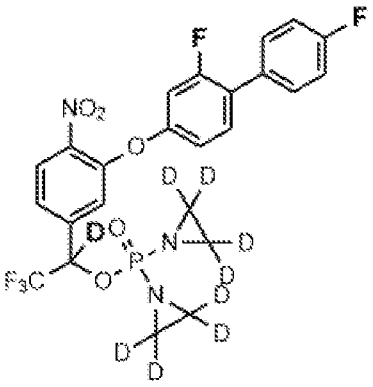
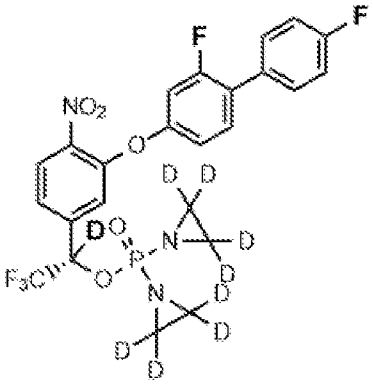
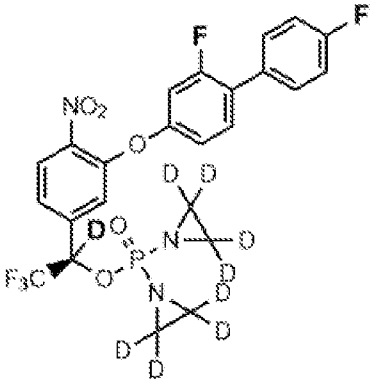
其中，A各自独立地为H或D，且9个A中至少一个为D。

5．根据权利要求1或4所述的化合物，其中，所述同位素变体对应选自以下结构的氘代化合物：


、

、

、


、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、


、

、

。

6．含有权利要求1-5中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体的药物。

7．权利要求6所述的药物或权利要求1-5任一项所述的化合物用于治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的用途。

8．根据权利要求7所述的用途，其中所述癌症或肿瘤为肺癌、胰腺癌、肝癌、胃癌。

9．根据权利要求7所述的用途，其中所述癌症或肿瘤为原发性脑癌、脑肿瘤或转移至脑的转移性癌症或肿瘤。

10．权利要求1-5中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐或前药或溶剂合物或同位素变体在制备治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的药物中的用途。

11．根据权利要求10所述的用途，其中所述癌症或肿瘤为肺癌、胰腺癌、肝癌、胃癌。

12．根据权利要求8或11所述的用途，其中所述肺癌为非小细胞肺癌。

13．根据权利要求10所述的用途，其中所述癌症或肿瘤为原发性脑癌、脑肿瘤或转移至脑的转移性癌症或肿瘤。

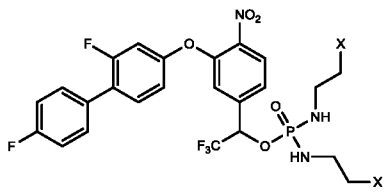
14．治疗癌症或肿瘤的方法，其包含a或b的步骤：

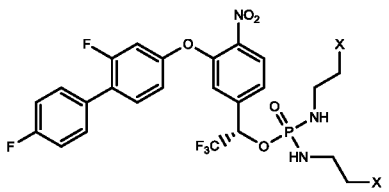
a. 测定患者癌细胞或组织的AKR1C3还原酶含量，如测得该AKR1C3还原酶含量等于或大于预定值，则向该患者投与权利要求6所述的药物；

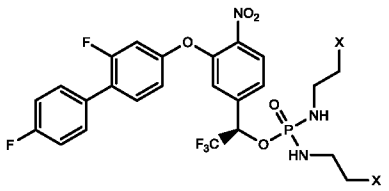
b. 测定患者癌细胞或组织的AKR1C3还原酶对应RNA的表达水平，如测得该RNA的表达水平在预定值范围内，则向该患者投与权利要求6所述的药物。

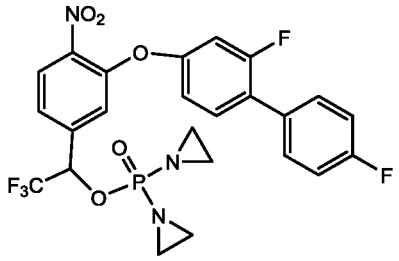
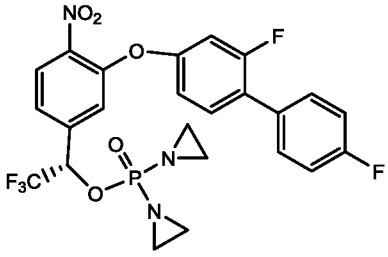
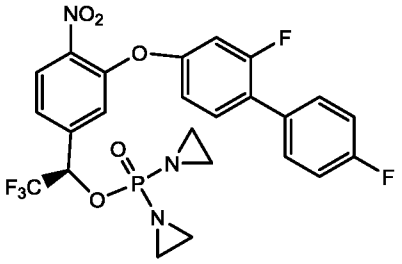
15．治疗癌症或肿瘤的方法，其包含AKR1C3还原酶含量或表达水平调节步骤，当调节使得该AKR1C3还原酶含量或表达水平等于或大于预定值，则向该患者投与权利要求6所述的药物。

16．一种制备以下结构的任一化合物的方法，其包括使化合物I-1、I-2或I-3分别发生关环反应得到对应的化合物A、B或C：


I-1


I-2


I-3


、

、


A B C 。

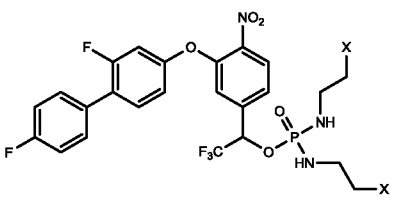
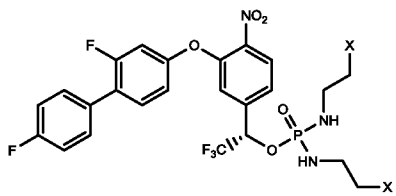
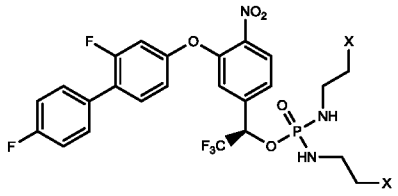
其中，X各自独立地为氟、氯、溴、碘。

17．根据权利要求16所述的方法，其中，所述关环反应使用氧化银或硝酸银作为催化剂，反应中加入或不加入有机碱。

18．根据权利要求16所述的方法，其中，X均为溴。

19．根据权利要求17所述的方法，其中，所述有机碱为N,N-二异丙基乙胺或三乙胺。

20．具有以下任一结构的化合物：

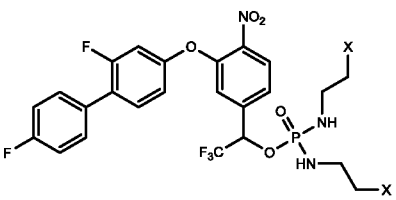
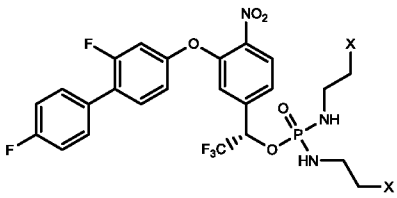
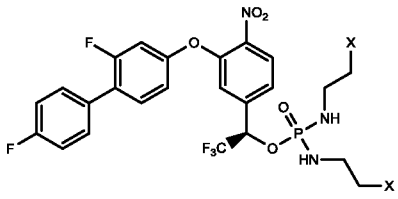




I-1 I-2 I-3

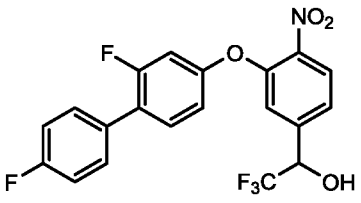
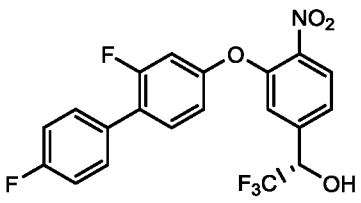
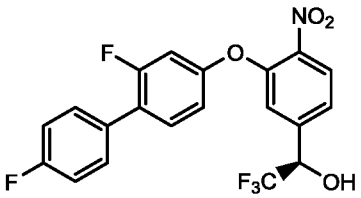
其中，X各自独立地为氟、氯、溴、碘。

21．权利要求20所述化合物的用途，其作为合成权利要求1所述化合物的中间体或用于制备治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的药物的用途。

22．一种制备以下结构的任一化合物的方法，其包括以化合物II-1、II-2或II-3作为起始反应物分别与三卤氧磷发生第一次反应得到中间体，然后该中间体与卤代乙胺或卤代乙胺的氢卤酸盐发生第二次反应，最后分别得到对应的化合物I-1、I-2或I-3：

I-1 I-2 I-3

II-1 II-2 II-3

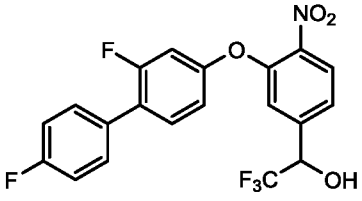
其中，化合物I-1、I-2或I-3中的两个X各自独立地为氟、氯、溴、碘；

三卤氧磷选自三氟氧磷、三氯氧磷、三溴氧磷、三碘氧磷，优选为三氯氧磷；

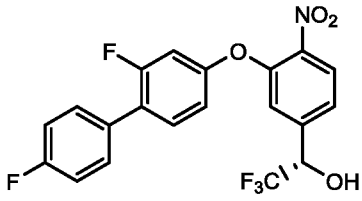
三卤氧磷中的卤素原子与化合物I-1、I-2或I-3中的两个X可以相同也可以不同。

23．根据权利要求22所述的方法，其中，化合物I-1、I-2或I-3中的X均为溴，卤代乙胺为溴代乙胺，卤代乙胺的氢卤酸盐为溴代乙胺的氢溴酸盐。

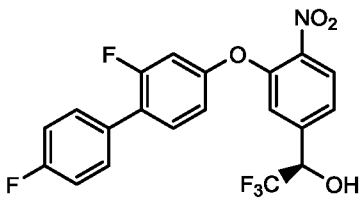
24．具有以下任一结构的化合物：



II-1

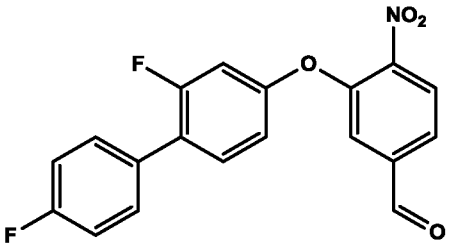


II-2

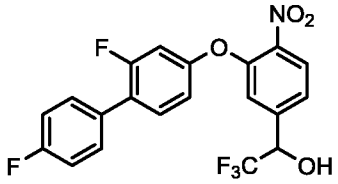


II-3 。

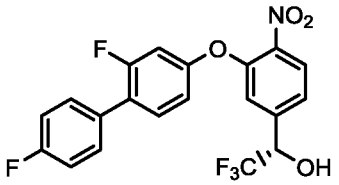
25．一种制备以下结构的任一化合物的方法，将化合物III-3与$TMSCF_3$接触反应，并经脱保护操作后水解得到消旋的醇II-1，对消旋的醇II-1进行手性拆分操作分别得到手性醇II-2和手性醇II-3。



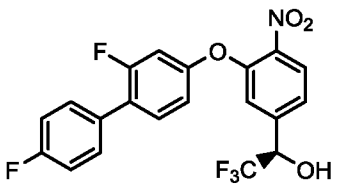
III-3



II-1



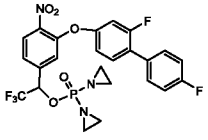
II-2



II-3 。

26．根据权利要求25所述的方法，其中，脱保护操作使用的脱保护试剂为四丁基氟化铵，水解操作使用的是氟化铵、氯化铵水溶液或盐酸。

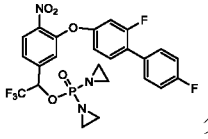
27．根据权利要求25所述的方法，其中，手性拆分的方法包括结晶法和化学拆分法。

28．一种用于将如权利要求1所述的化合物的外消旋体：分离以得到其中一种对映异构体或在化合物中增浓该外消旋体的任一对映异构体过量的方法，其包含以下步骤：使该外消旋体化合物经过光学解析处理，其中通过包含固定相及流动相的手性层析法，其中该固定相包含以官能化多糖浸渍的硅胶，且其中该流动相包含醇及另一溶剂；

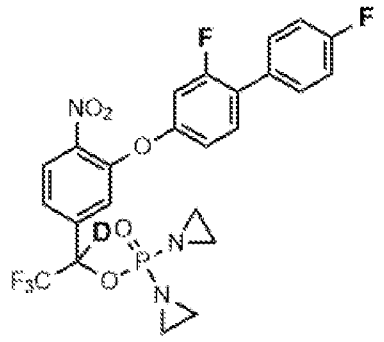
所述醇为乙醇，另一溶剂为正己烷；

所述手性层析法的操作过程中色谱柱的温度为38°C；

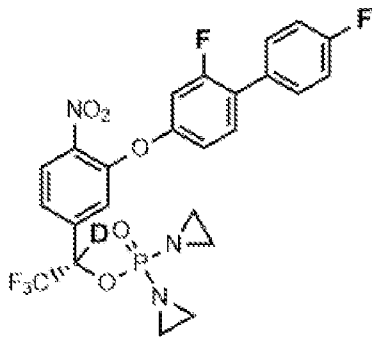
所述官能化多糖为直链淀粉-三（3，5-二甲苯基氨基甲酸酯）。

29．一种用于将如权利要求1所述的化合物的外消旋体：分离以得到其中一种对映异构体或在化合物中增浓该外消旋体的任一对映异构体过量的HPLC方法，其中，色谱柱为CHIRALPAK AD，流动相为乙醇，柱温为35℃。

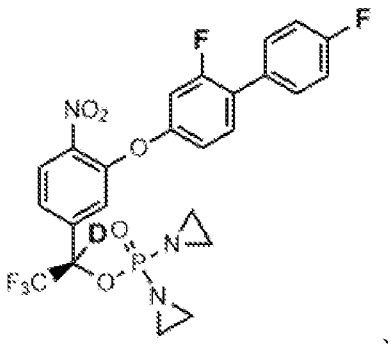
30. 制备以下结构的任一氘代化合物的方法，其包括使化合物IV-1至IV-21分别发生关环反应得到对应的氘代化合物V-1至V-15：



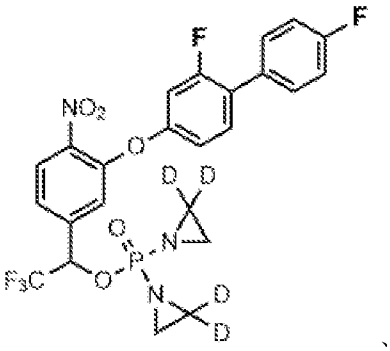
V-1、



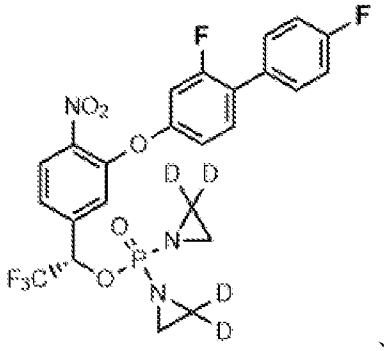
V-2、



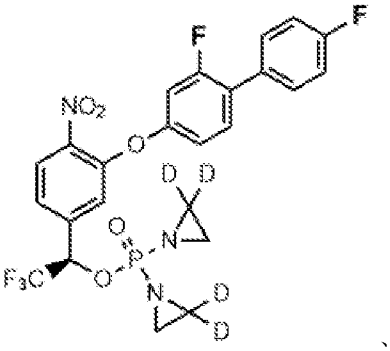
V-3、



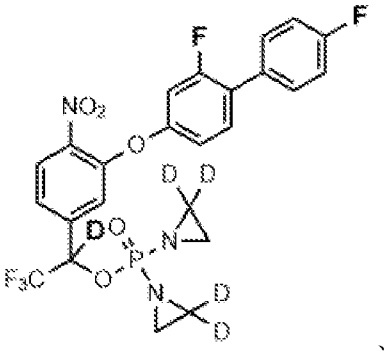
V-4、



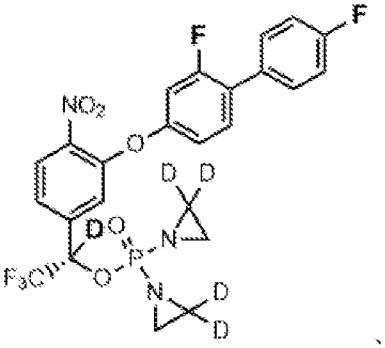
V-5、



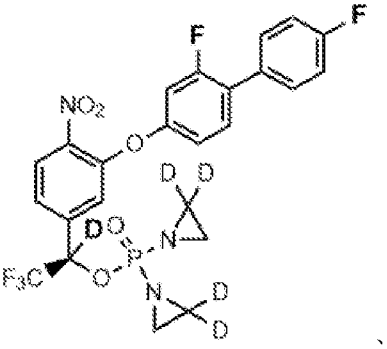
V-6、



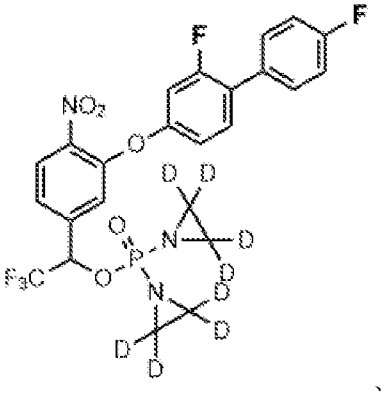
V-7、



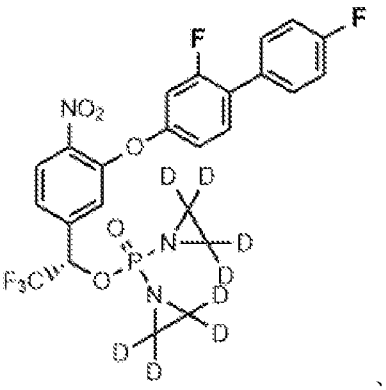
V-8、



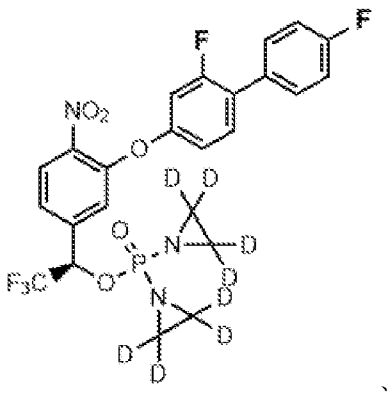
V-9、



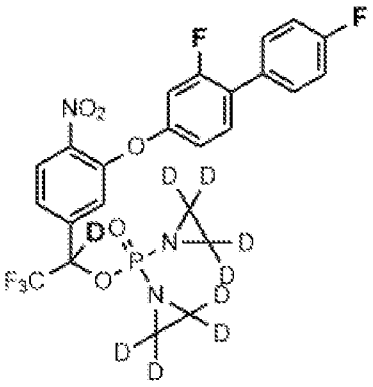
V-10、



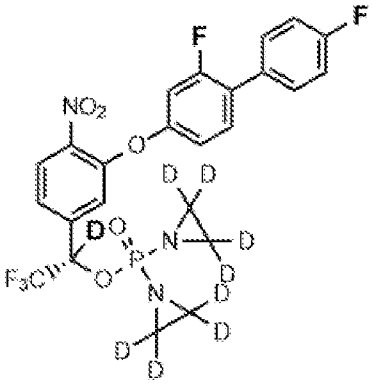
V-11、



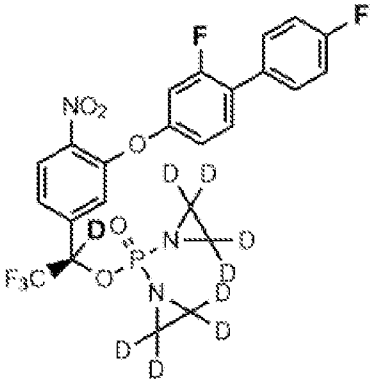
V-12、



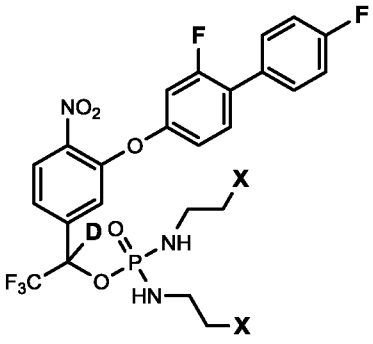
V-13



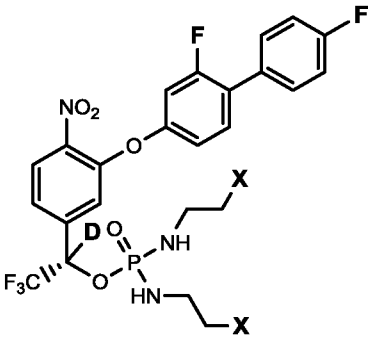
V-14



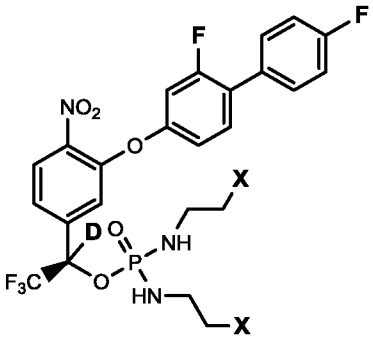
V-15



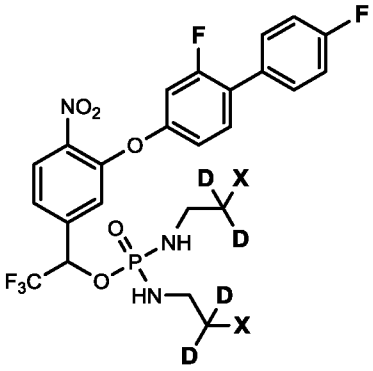
IV-1



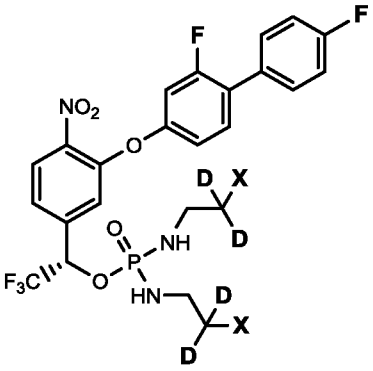
IV-2



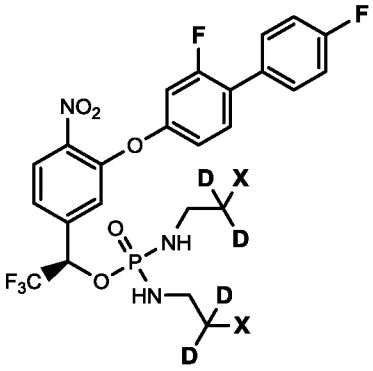
IV-3



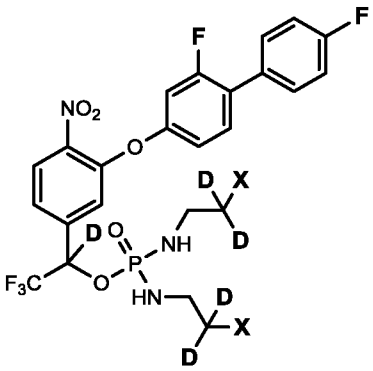
IV-4



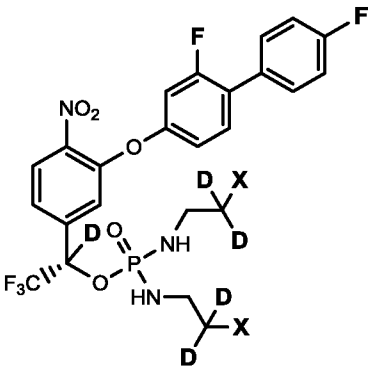
IV-5



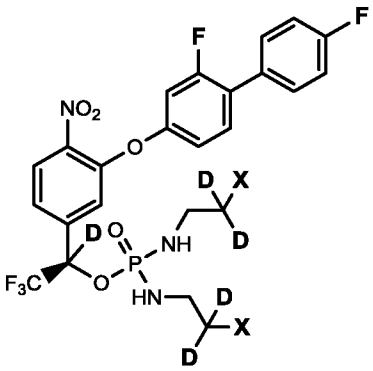
IV-6



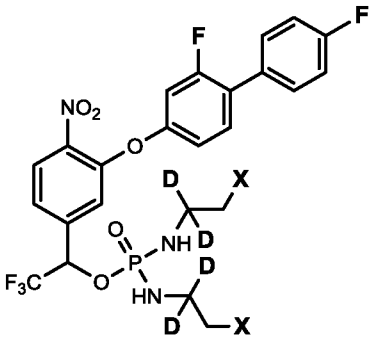
IV-7



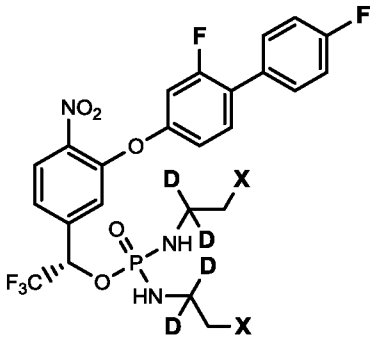
IV-8



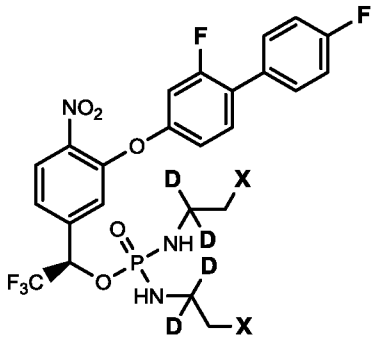
IV-9



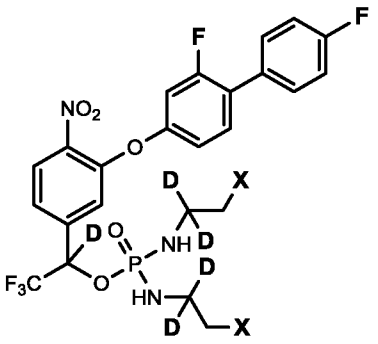
IV-10



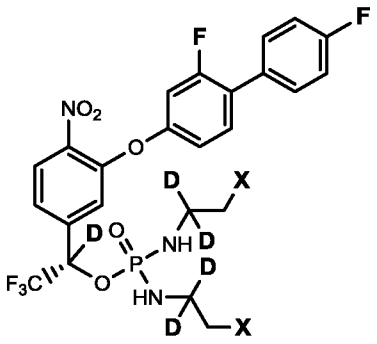
IV-11



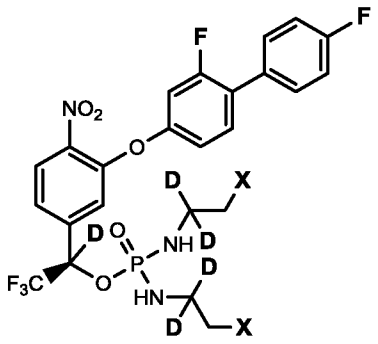
IV-12



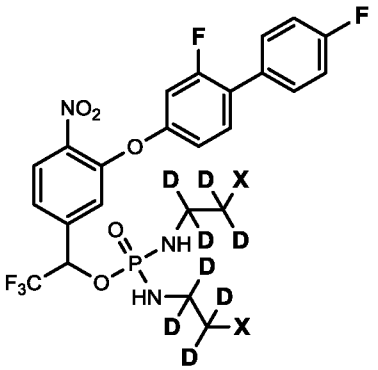
IV-13



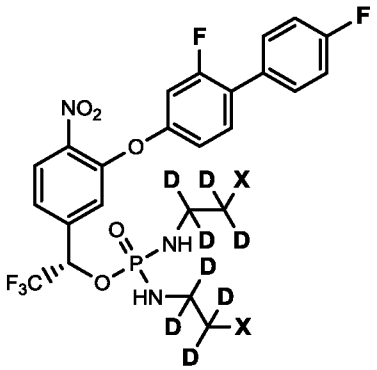
IV-14



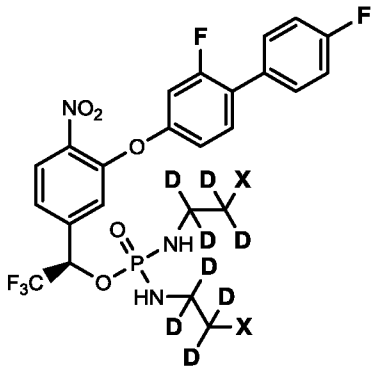
IV-15



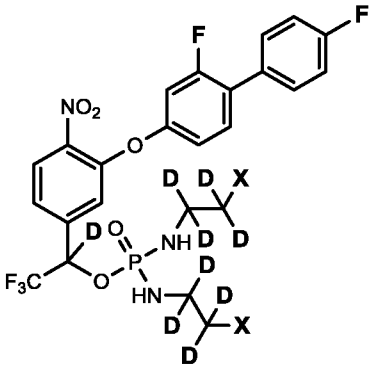
IV-16



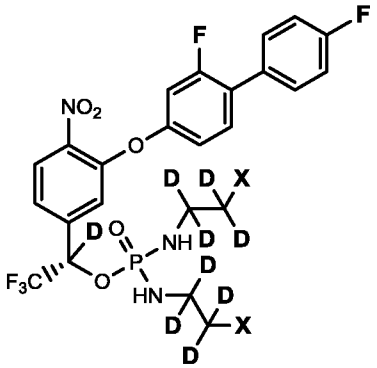
IV-17



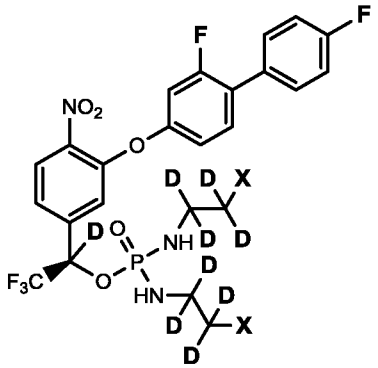
IV-18



IV-19



IV-20

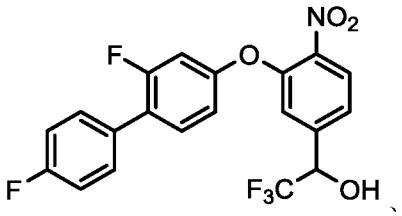


IV-21

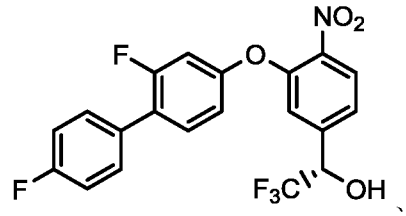
其中，IV-1至IV-21任一化合物中的两个X原子各自独立地为氟、氯、溴、碘，优选为溴；

所述关环反应使用氧化银或硝酸银作为催化剂，反应中加入或不加入碱。

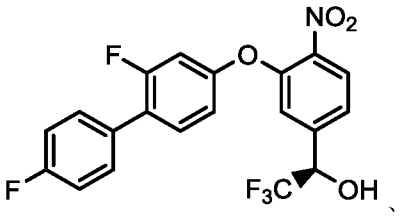
31．制备权利要求30所述IV-1至IV-21中任一化合物的方法，其包括以化合物II-1、II-2、II-3或其氘代物II-1a、II-2a、II-3a作为起始反应物分别与三卤氧磷发生第一次反应得到中间体，然后该中间体与对应的氘代卤代乙胺VI-1或VI-2，或氘代卤代乙胺VI-1或VI-2的氢卤酸盐发生第二次反应，最后得到对应的化合物IV-1至IV-21：



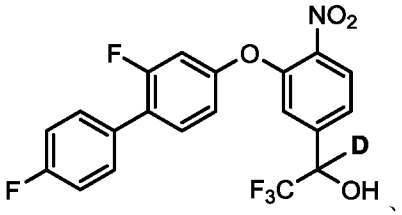
II-1



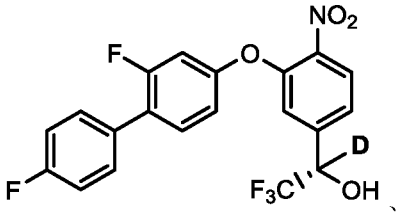
II-2



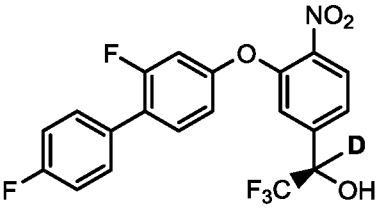
II-3



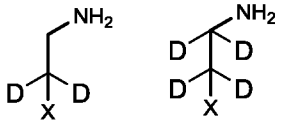
II-1a



II-2a



II-3a



VI-1 VI-2

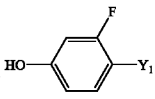
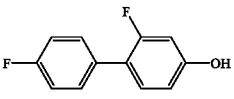
其中，化合物VI-1或VI-2中的X原子各自独立地为氟、氯、溴、碘，且与化合物IV-1至IV-21中的X原子具有对应关系；

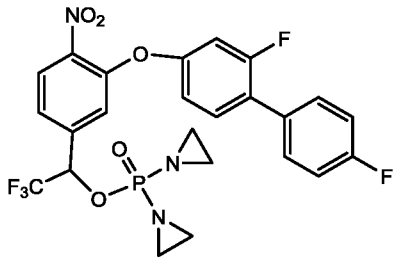
三卤氧磷选自三氟氧磷、三氯氧磷、三溴氧磷、三碘氧磷，优选为三氯氧磷；

三卤氧磷中的卤素与任一化合物IV-1至IV-21中的两个X原子、化合物VI-1或VI-2中的X原子可以相同也可以不同；

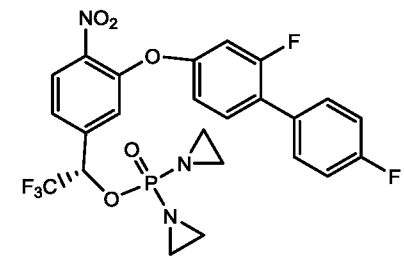
所述氘代卤代乙胺氢卤酸盐中氢卤酸盐中的卤素与氘代卤代乙胺中的卤素相同；

优选地，卤代乙胺为溴代乙胺，卤代乙胺氢卤酸盐为溴代乙胺氢溴酸盐。

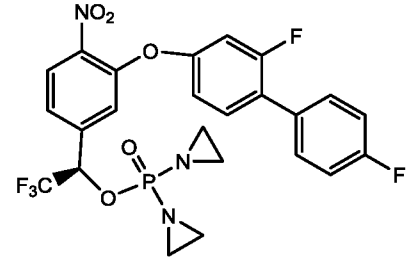
32．制备以下结构的任一化合物的方法，其包括以下步骤：以化合物为起始原料，反应得到化合物，然后与式I-7-1、I-7-2或I-7-3分别反应得到相应的式A、B或C化合物：



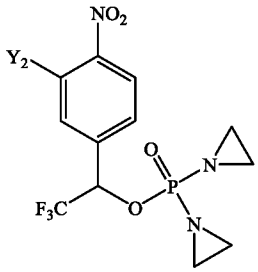
A

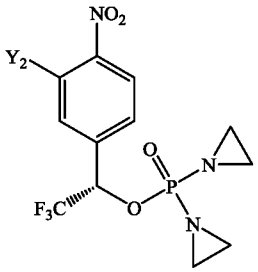


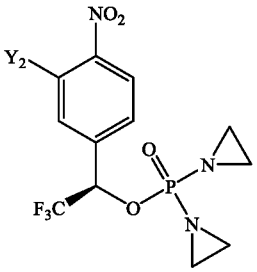
B



C



、


、


I-7-1 I-7-2 I-7-3

其中，Y_1和Y_2为卤素或OM，M为氢、钠、钾、镁或钙，卤素优选为溴。

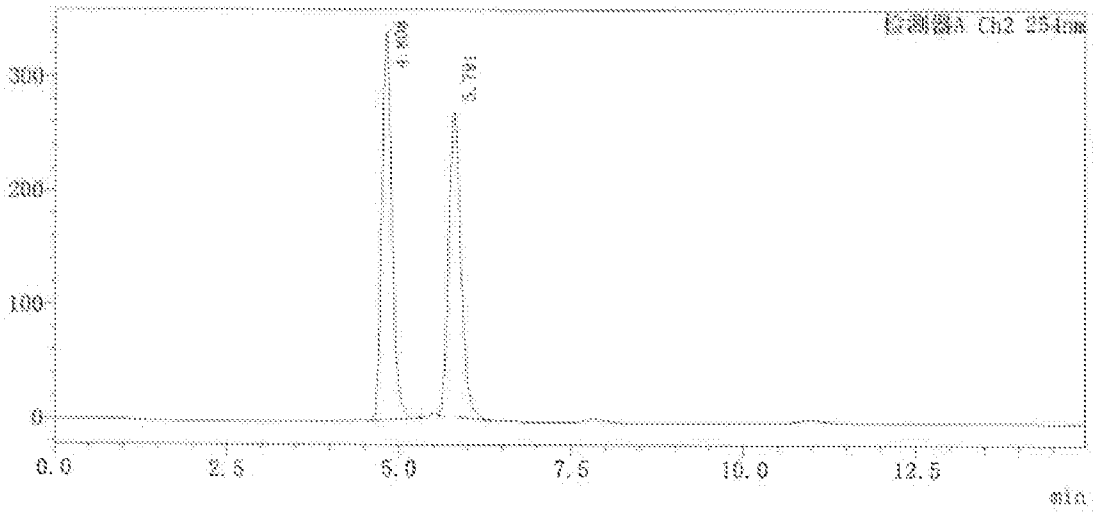

300
200
100
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

图 1

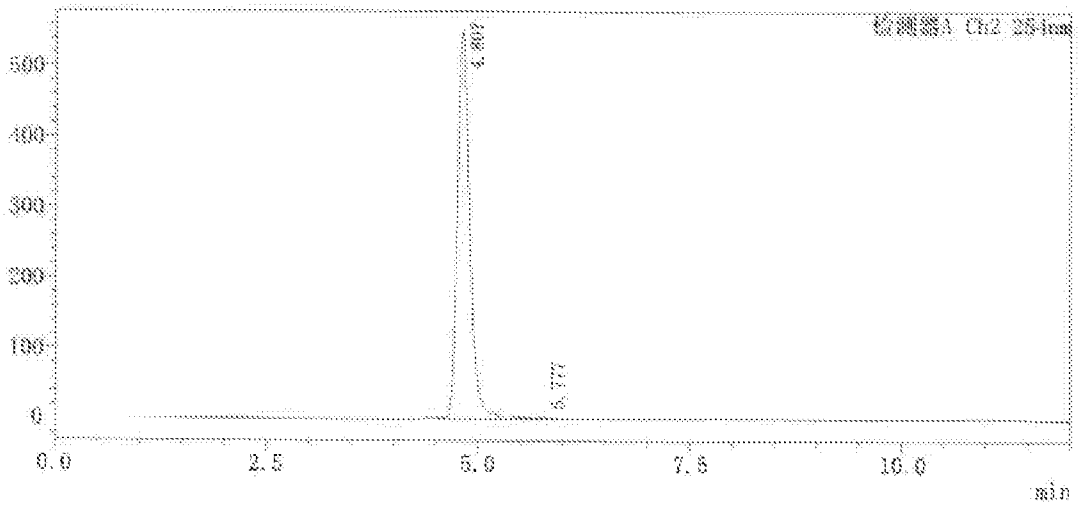

500
400
300
200
100
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
min

图 2

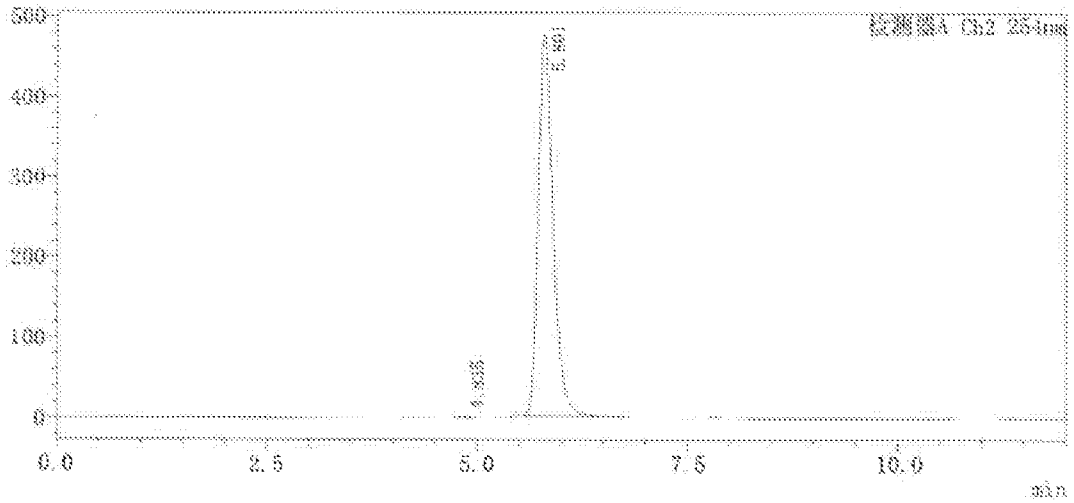

500
400
300
200
100
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
min

图 3

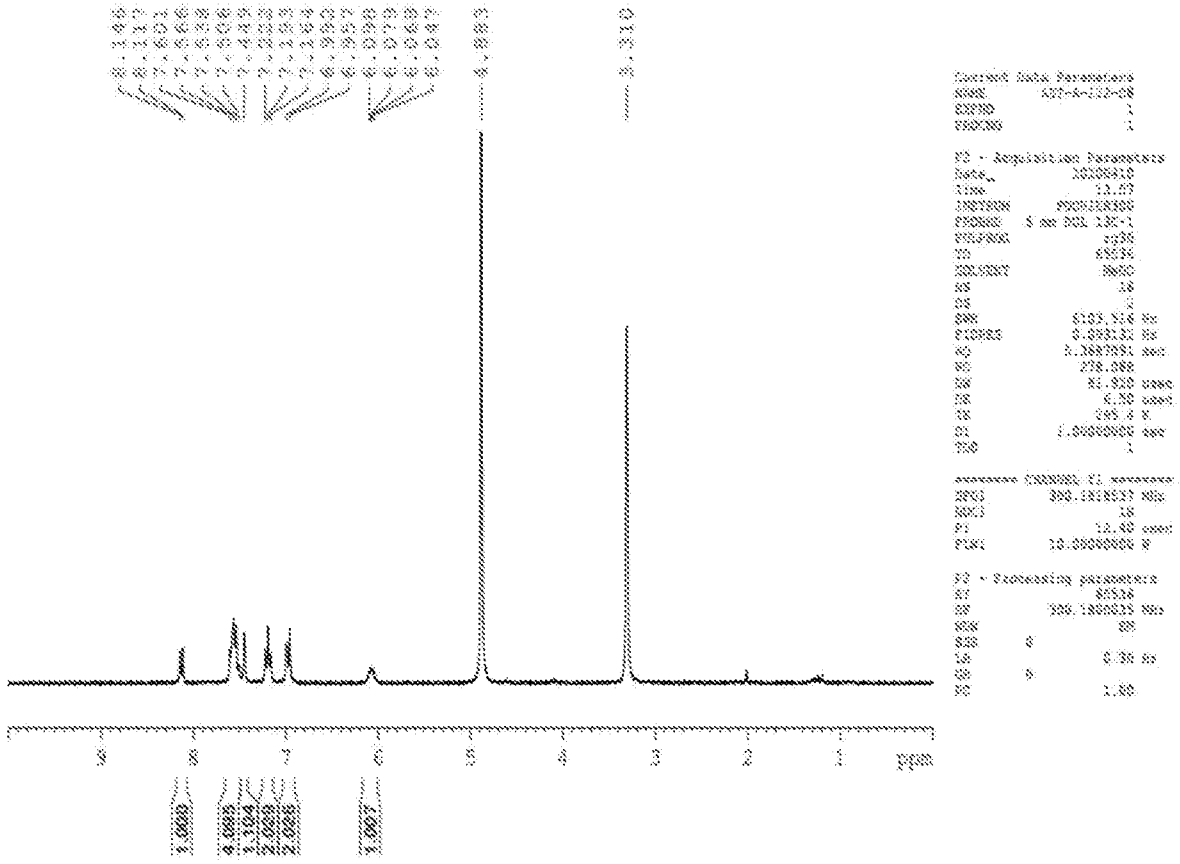


图 4

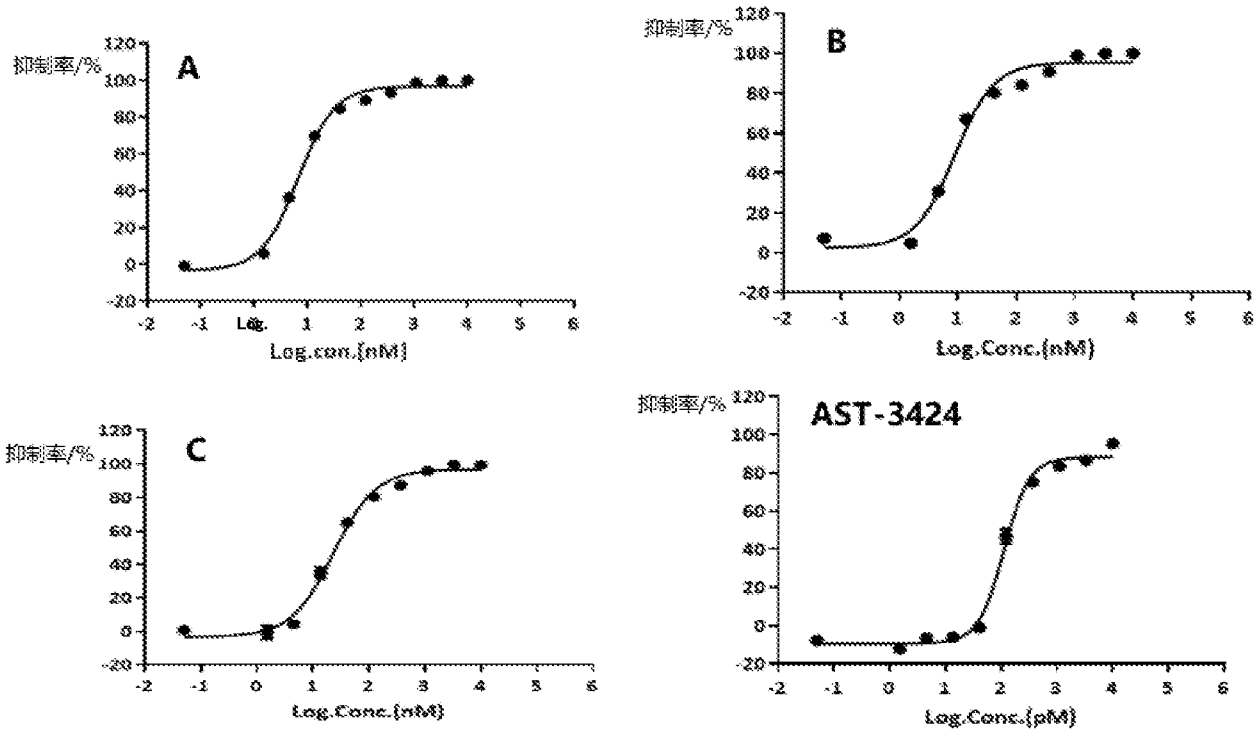


图 5

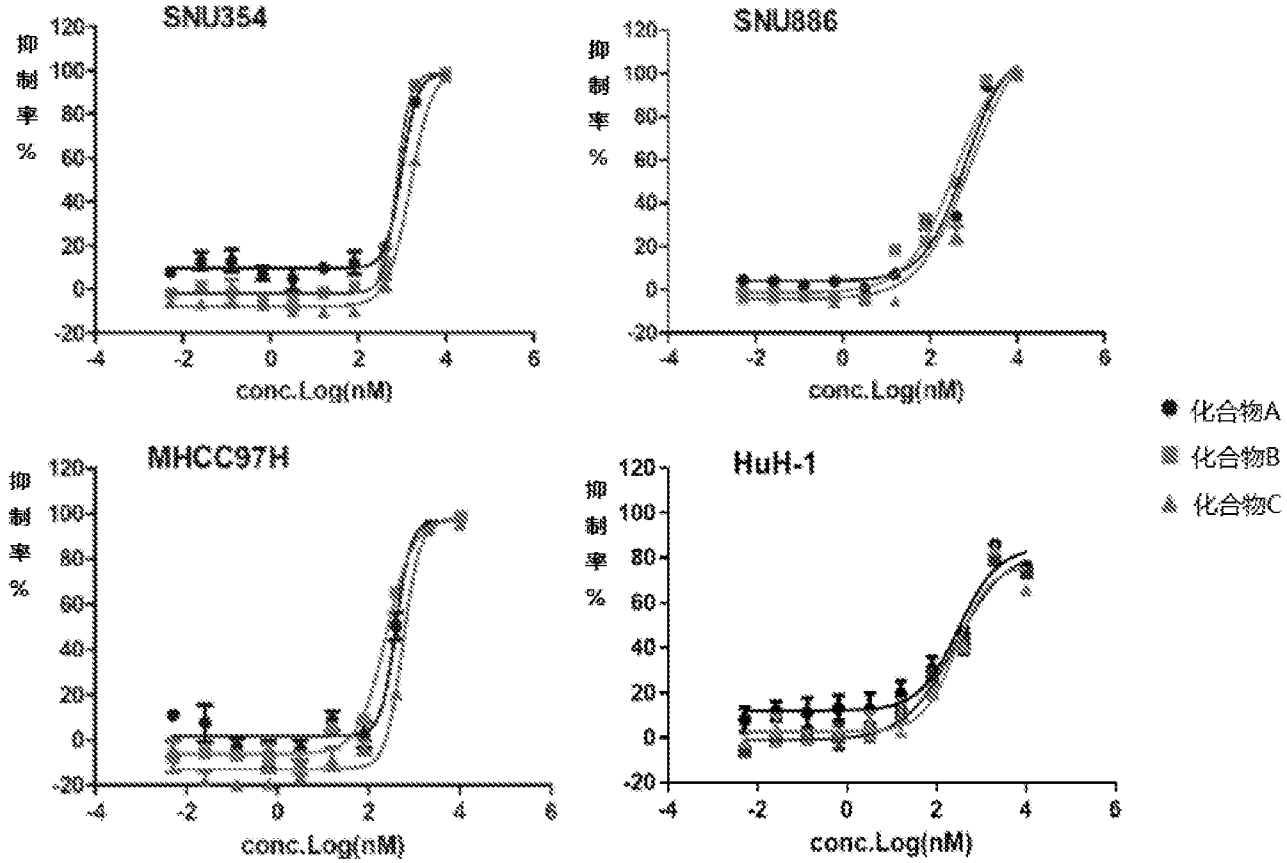

SNU354
SNU886
MHCC97H
HuH-1
抑制率%
conc.Log(nM)
化合物A
化合物B
化合物C

图 6

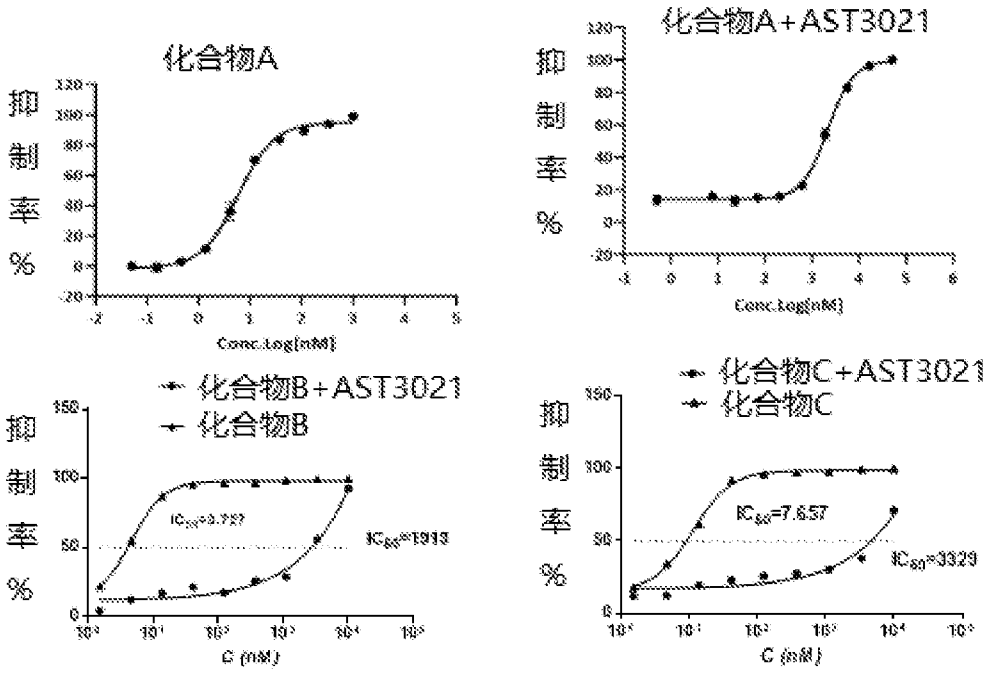

化合物A
化合物A+AST3021
化合物B+AST3021
化合物B
化合物C+AST3021
化合物C
抑制率%
Conc.Log(nM)
C (nM)
IC50=7.657
IC50=3329

图 7

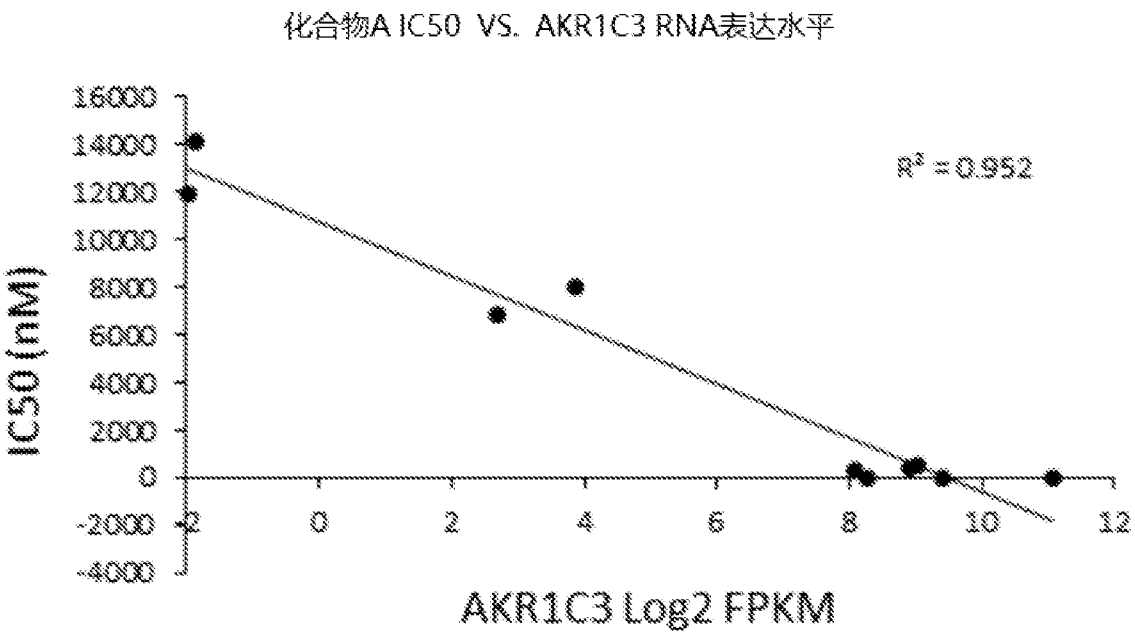

化合物A IC50 VS. AKR1C3 RNA表达水平
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
IC50 (nM)
R² = 0.952
-2
0
2
4
6
8
10
12
AKR1C3 Log2 FPKM

图 8

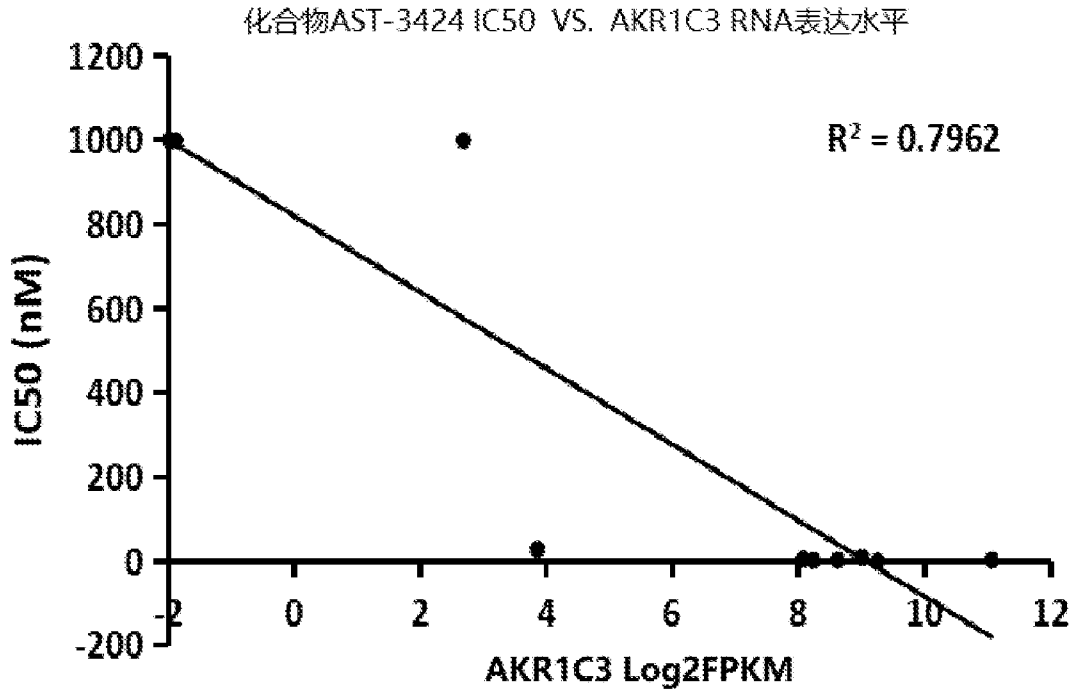

化合物AST-3424 IC50 VS. AKR1C3 RNA表达水平
1200
1000
800
600
400
200
0
-200
IC50 (nM)
R² = 0.7962
-2
0
2
4
6
8
10
12
AKR1C3 Log2FPKM

图 9

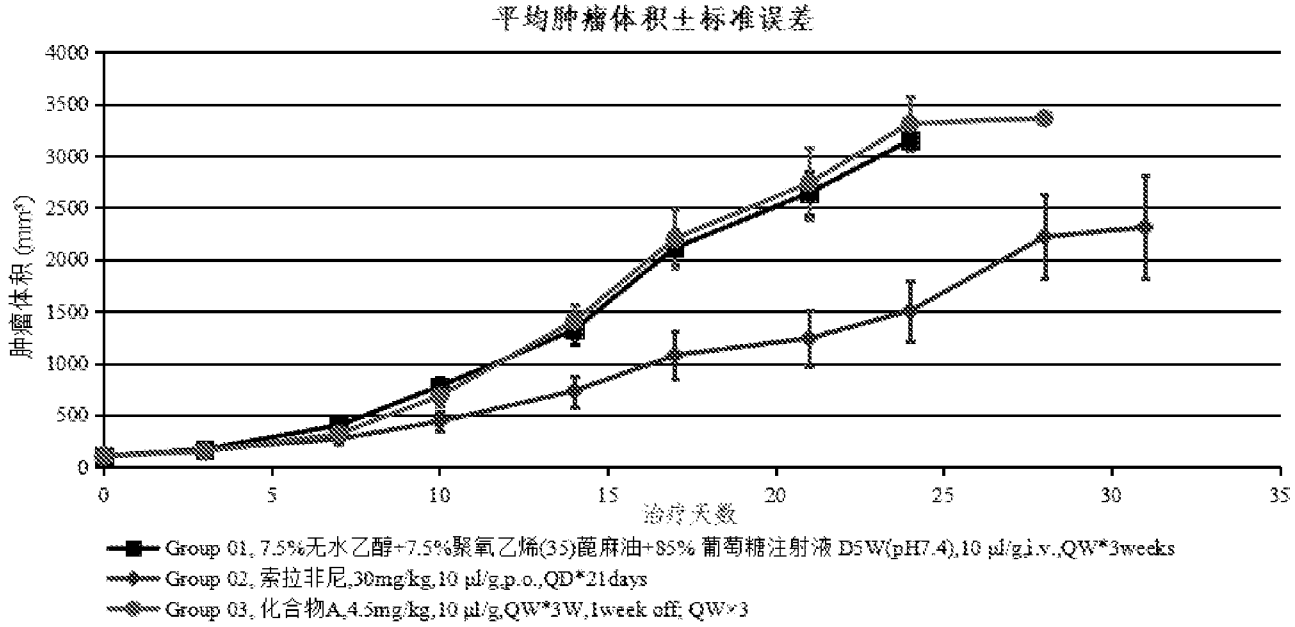

平均肿瘤体积±标准误差
肿瘤体积 (mm³)
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯(35)蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W(pH7.4),10 μl/g,i.v.,QW*3weeks
Group 02, 索拉非尼,30mg/kg,10 μl/g,p.o.,QD*21days
Group 03, 化合物A,4.5mg/kg,10 μl/g,QW*3W,1week off, QW×3

图 10

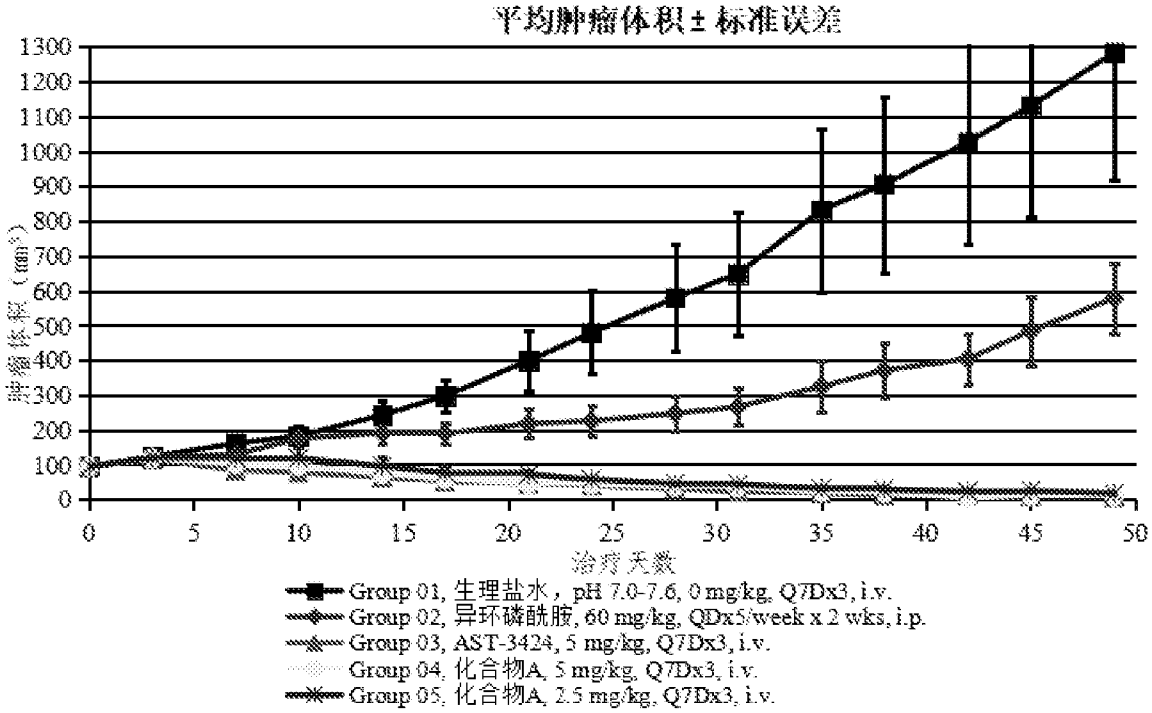

平均肿瘤体积 ± 标准误差
肿瘤体积 (mm³)
治疗天数
Group 01, 生理盐水，pH 7.0-7.6, 0 mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 02, 异环磷酰胺, 60 mg/kg, QDx5/week x 2 wks, i.p.
Group 03, AST-3424, 5 mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 04, 化合物A, 5 mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 2.5 mg/kg, Q7Dx3, i.v.

图 11

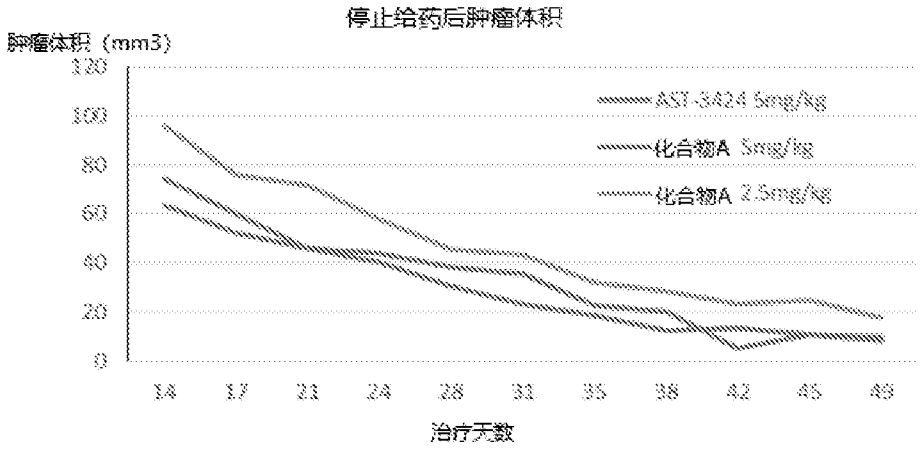

停止给药后肿瘤体积
肿瘤体积（mm3）
120
100
80
60
40
20
0
14
17
21
24
28
31
35
38
42
45
49
治疗天数
AST-3424 5mg/kg
化合物A 5mg/kg
化合物A 2.5mg/kg

图 12

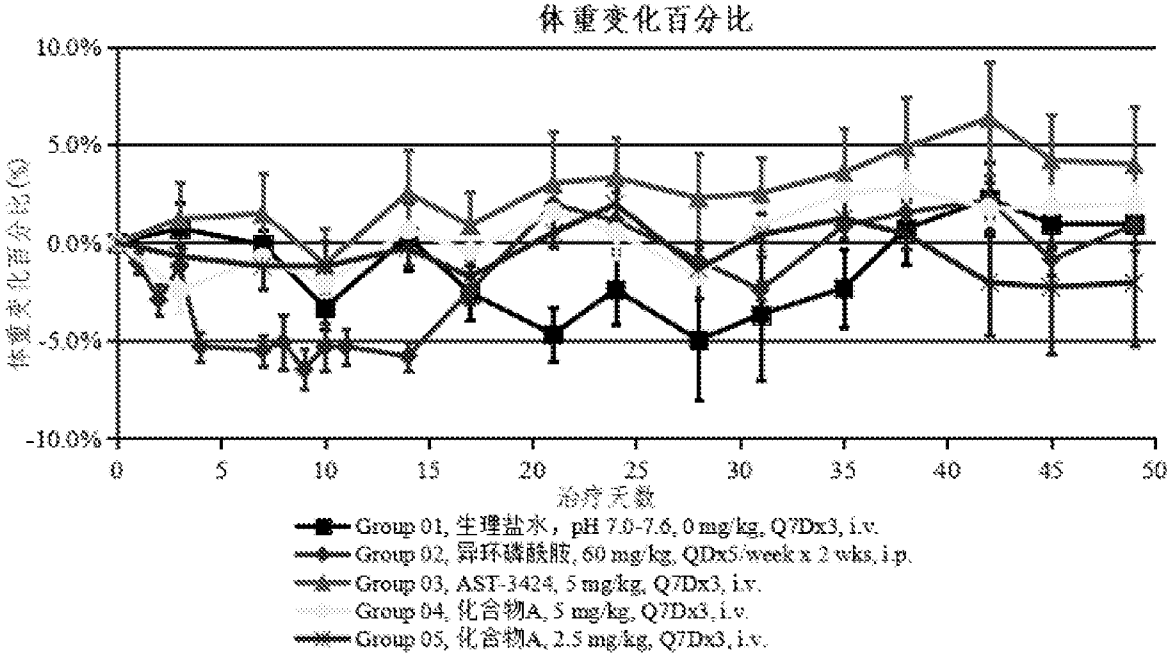

体重变化百分比
体重变化百分比(%)
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
治疗天数
Group 01, 生理盐水，pH 7.0-7.6, 0 mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 02, 异环磷酰胺, 60 mg/kg, QDx5/week x 2 wks, i.p.
Group 03, AST-3424, 5 mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 04, 化合物A, 5 mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 2.5 mg/kg, Q7Dx3, i.v.

图 13

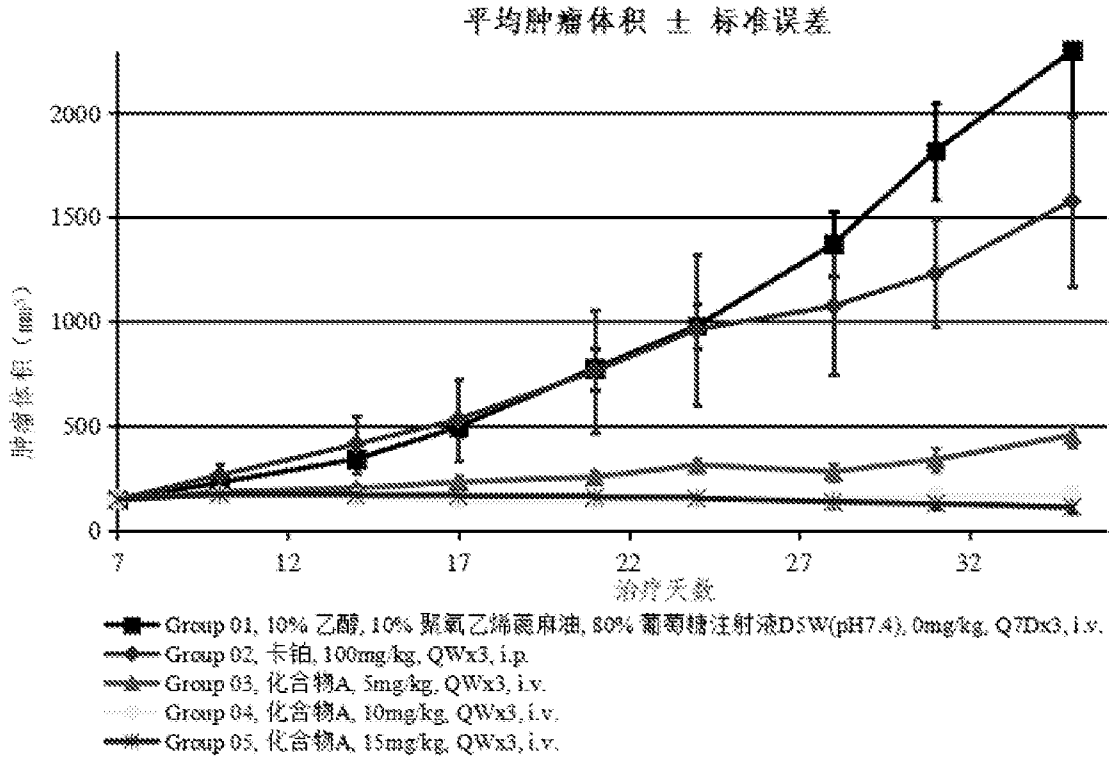

平均肿瘤体积 ± 标准误差
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
7
12
17
22
27
32
治疗天数
Group 01, 10% 乙醇, 10% 聚氧乙烯蓖麻油, 80% 葡萄糖注射液D5W(pH7.4), 0mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 02, 卡铂, 100mg/kg, QWx3, i.p.
Group 03, 化合物A, 5mg/kg, QWx3, i.v.
Group 04, 化合物A, 10mg/kg, QWx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 15mg/kg, QWx3, i.v.

图 14

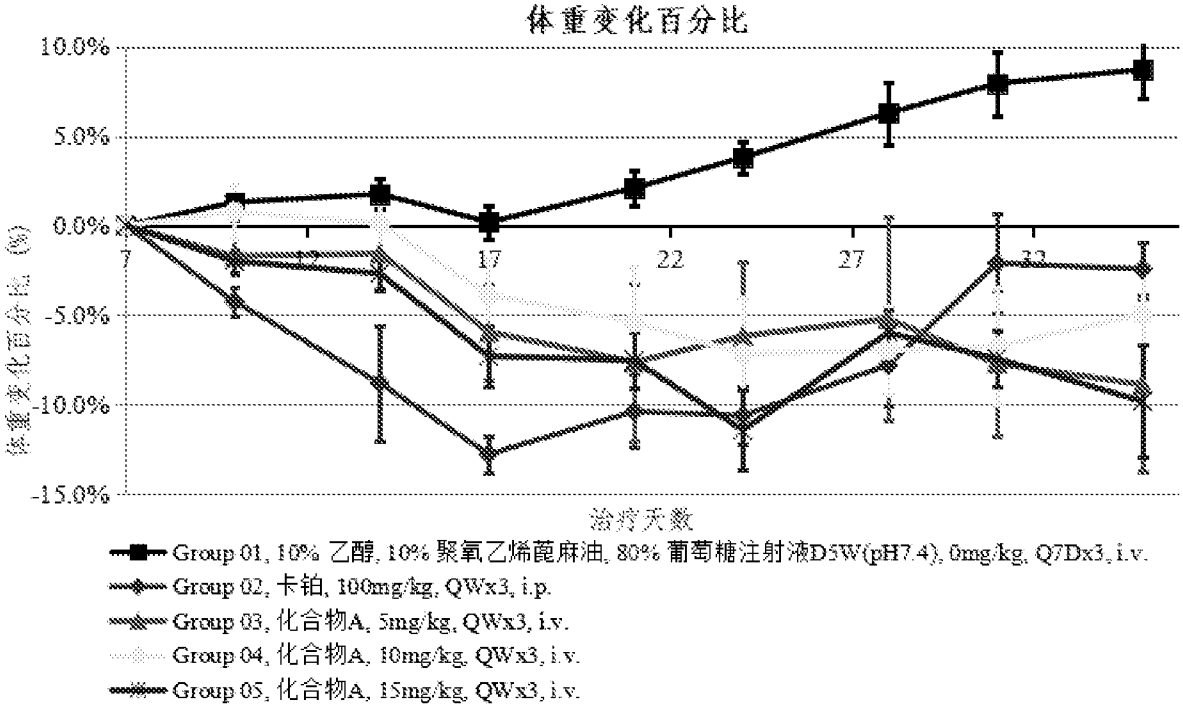

体重变化百分比
体重变化百分比（%）
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
7
17
22
27
治疗天数
Group 01, 10% 乙醇, 10% 聚氧乙烯蓖麻油, 80% 葡萄糖注射液D5W(pH7.4), 0mg/kg, Q7Dx3, i.v.
Group 02, 卡铂, 100mg/kg, QWx3, i.p.
Group 03, 化合物A, 5mg/kg, QWx3, i.v.
Group 04, 化合物A, 10mg/kg, QWx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 15mg/kg, QWx3, i.v.

图 15

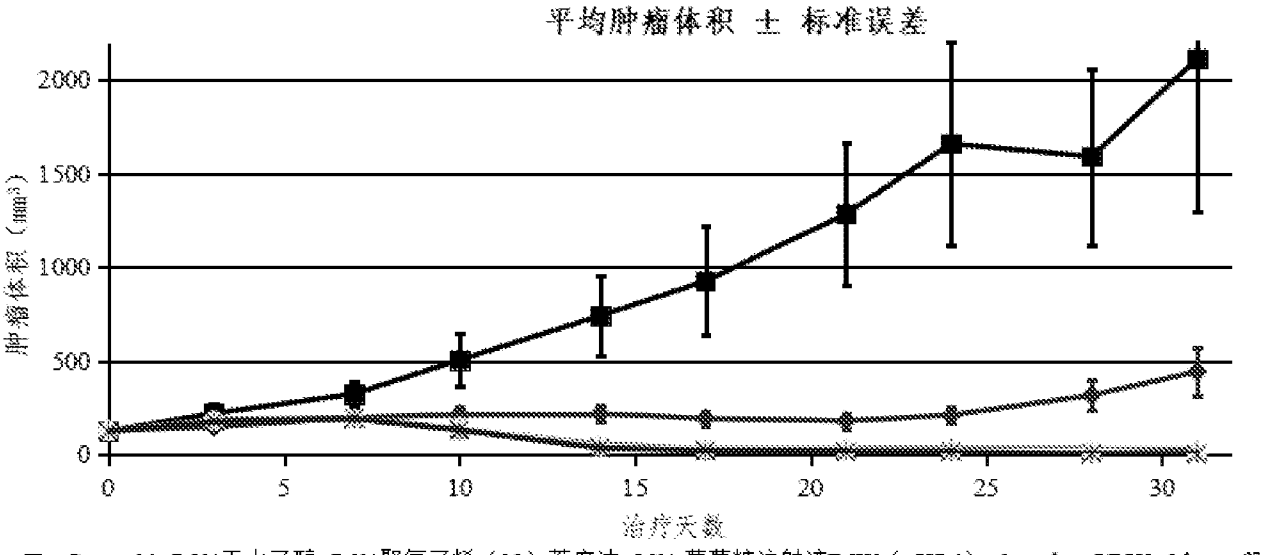

平均肿瘤体积 ± 标准误差
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4），0 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, QDx21 Days, p.o.
Group 03, 化合物A, 1.25 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.
Group 04, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.
Group 05, 化合物A, 5 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.

图 16

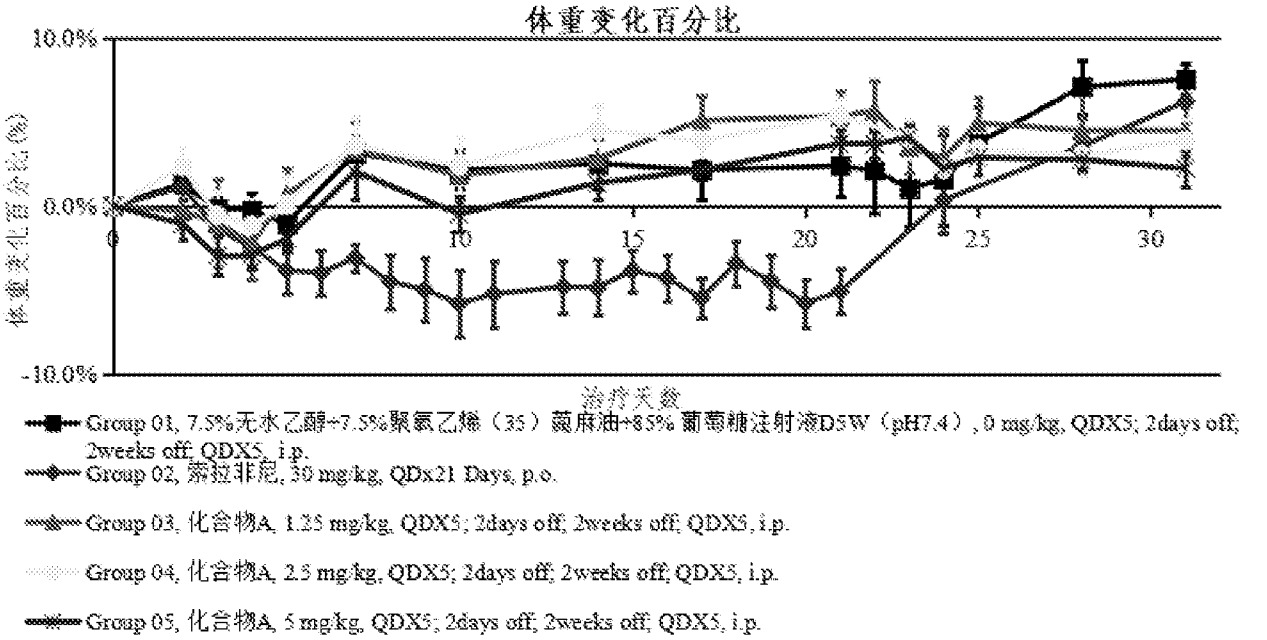

体重变化百分比
体重变化百分比(%)
10.0%
0.0%
-10.0%
0
10
15
20
25
30
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4），0 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, QDx21 Days, p.o.
Group 03, 化合物A, 1.25 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.
Group 04, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.
Group 05, 化合物A, 5 mg/kg, QDX5; 2days off; 2weeks off; QDX5, i.p.

图 17

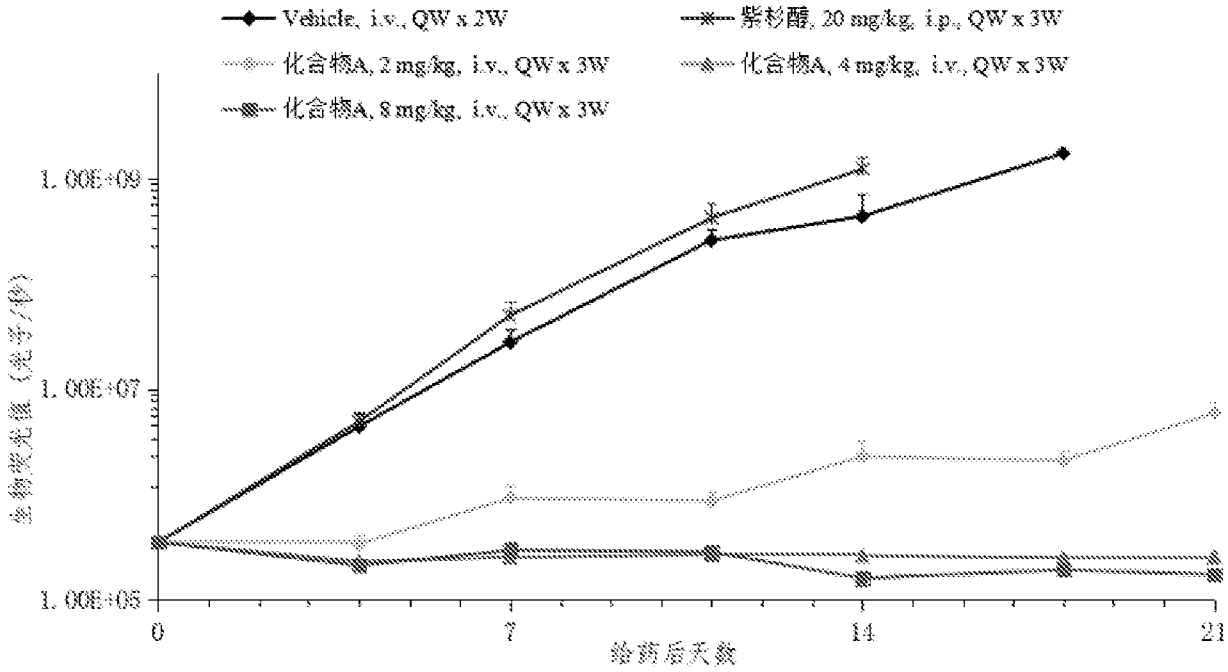

Vehicle, i.v., QW x 2W
紫杉醇, 20 mg/kg, i.p., QW x 3W
化合物A, 2 mg/kg, i.v., QW x 3W
化合物A, 4 mg/kg, i.v., QW x 3W
化合物A, 8 mg/kg, i.v., QW x 3W
1.00E+09
1.00E+07
1.00E+05
生物发光值（光子/秒）
0
7
14
21
给药后天数

图 18

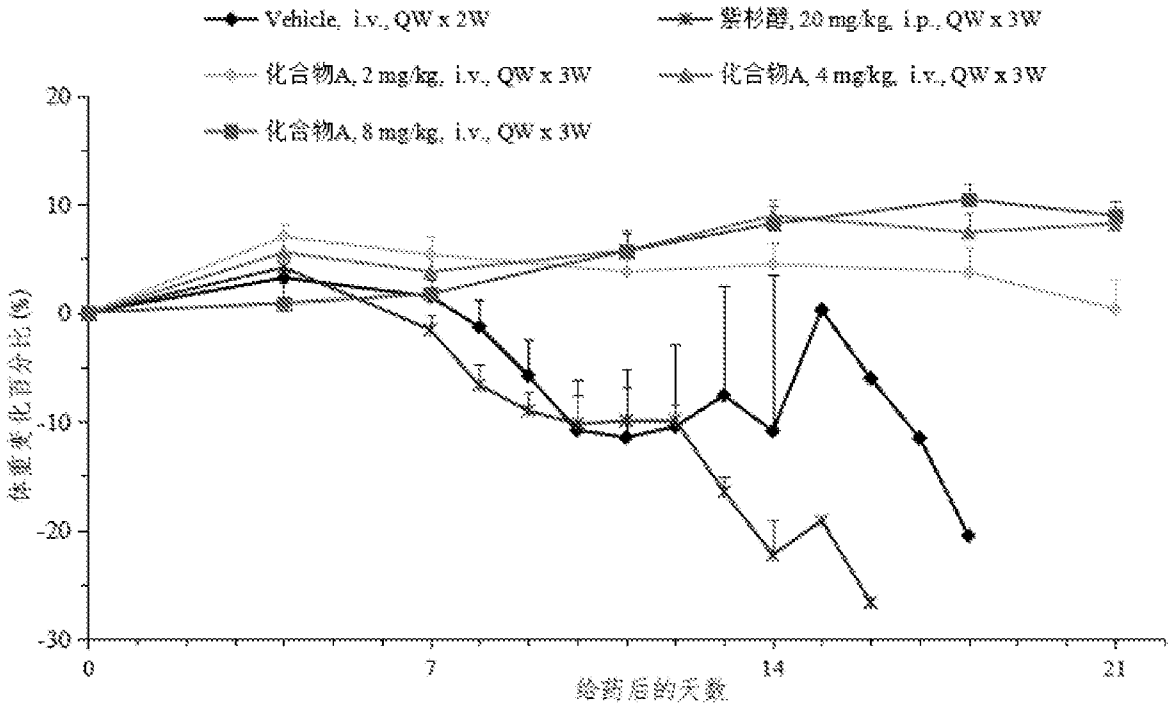

Vehicle, i.v., QW x 2W
紫杉醇, 20 mg/kg, i.p., QW x 3W
化合物A, 2 mg/kg, i.v., QW x 3W
化合物A, 4 mg/kg, i.v., QW x 3W
化合物A, 8 mg/kg, i.v., QW x 3W
20
10
0
-10
-20
-30
体重变化百分比 (%)
0
7
14
21
给药后的天数

图 19

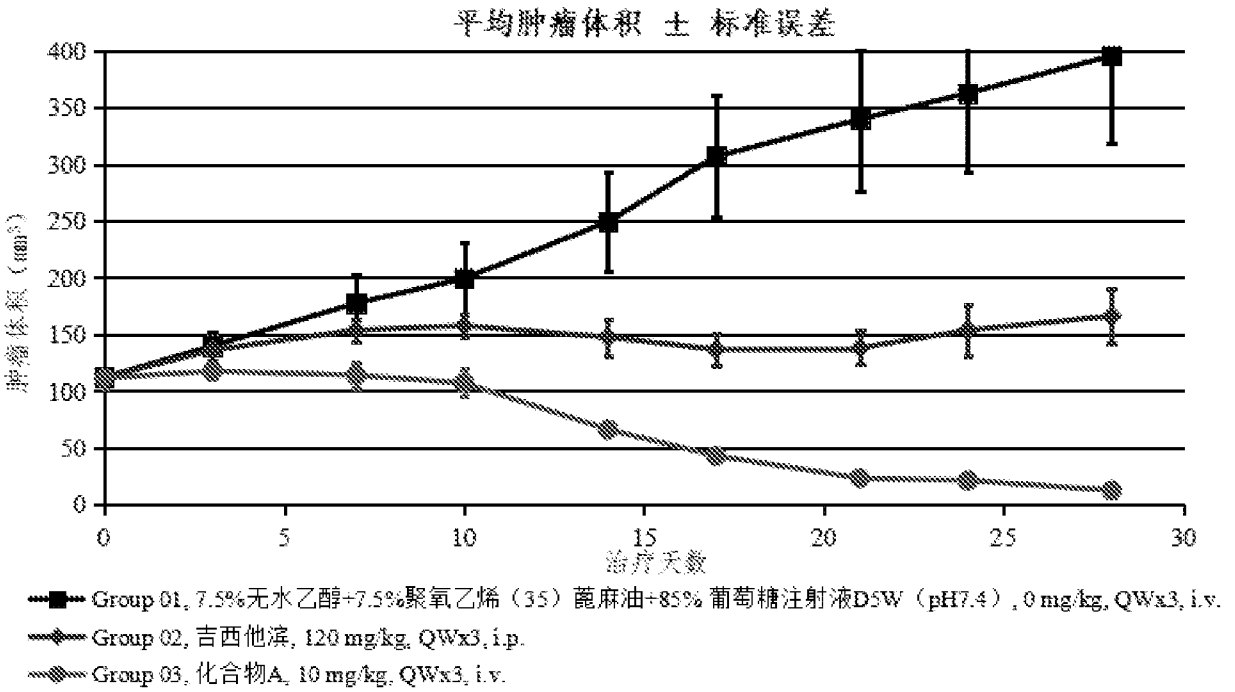

平均肿瘤体积 ± 标准误差
肿瘤体积（mm³）
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 02, 吉西他滨, 120 mg/kg, QWx3, i.p.
Group 03, 化合物A, 10 mg/kg, QWx3, i.v.

图 20

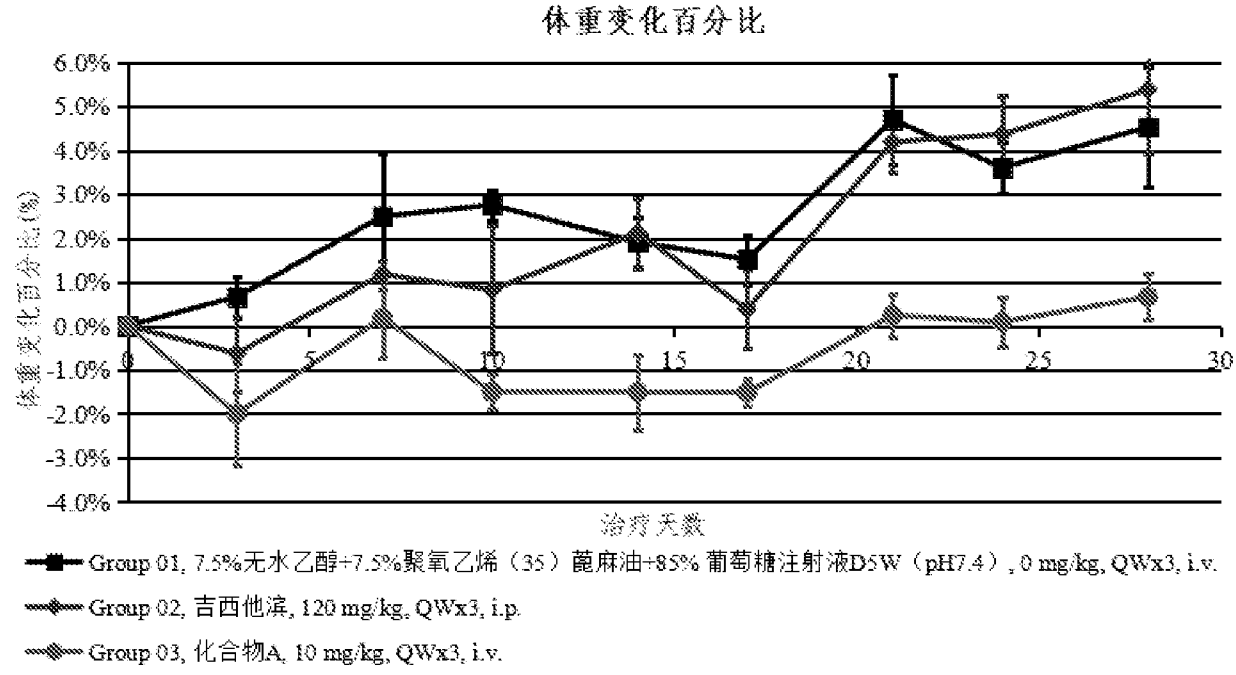

体重变化百分比
体重变化百分比(%)
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 02, 吉西他滨, 120 mg/kg, QWx3, i.p.
Group 03, 化合物A, 10 mg/kg, QWx3, i.v.

图 21

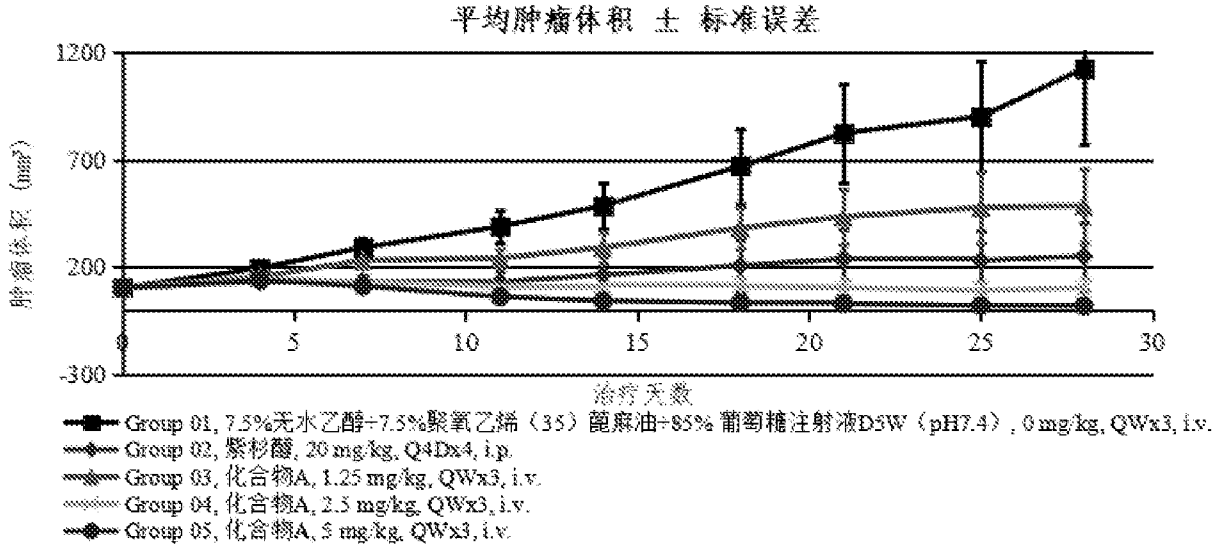

平均肿瘤体积 ± 标准误差
肿瘤体积（mm³）
1200
700
200
-300
0
5
10
15
20
25
30
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 02, 紫杉醇, 20 mg/kg, Q4Dx4, i.p.
Group 03, 化合物A, 1.25 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 04, 化合物A, 2.5 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 5 mg/kg, QWx3, i.v.

图 22

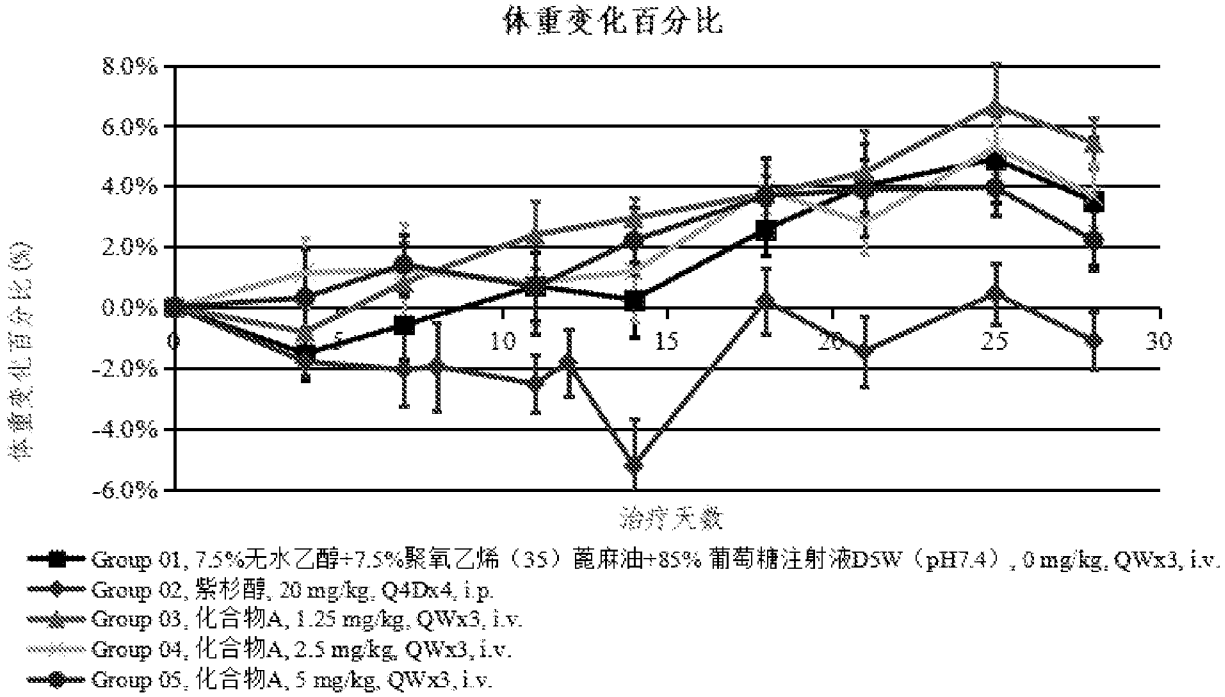

体重变化百分比
体重变化百分比 (%)
8.0%
6.0%
4.0%
2.0%
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
0
5
10
15
20
25
30
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 02, 紫杉醇, 20 mg/kg, Q4Dx4, i.p.
Group 03, 化合物A, 1.25 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 04, 化合物A, 2.5 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 5 mg/kg, QWx3, i.v.

图 23

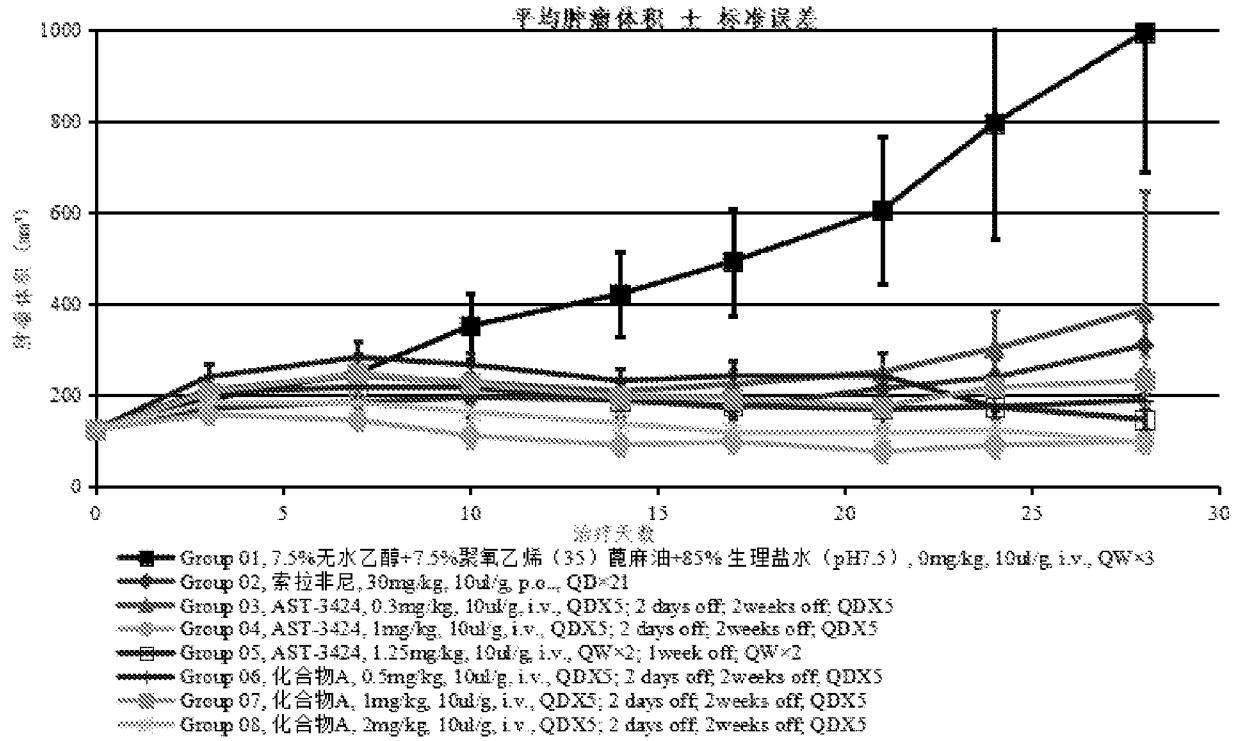

平均肿瘤体积 ± 标准误差
肿瘤体积（mm³）
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 生理盐水（pH7.5）, 0mg/kg, 10ul/g, i.v., QW×3
Group 02, 索拉非尼, 30mg/kg, 10ul/g, p.o., QD×21
Group 03, AST-3424, 0.3mg/kg, 10ul/g, i.v., QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 04, AST-3424, 1mg/kg, 10ul/g, i.v., QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 05, AST-3424, 1.25mg/kg, 10ul/g, i.v., QW×2; 1week off; QW×2
Group 06, 化合物A, 0.5mg/kg, 10ul/g, i.v., QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 07, 化合物A, 1mg/kg, 10ul/g, i.v., QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 08, 化合物A, 2mg/kg, 10ul/g, i.v., QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5

图 24

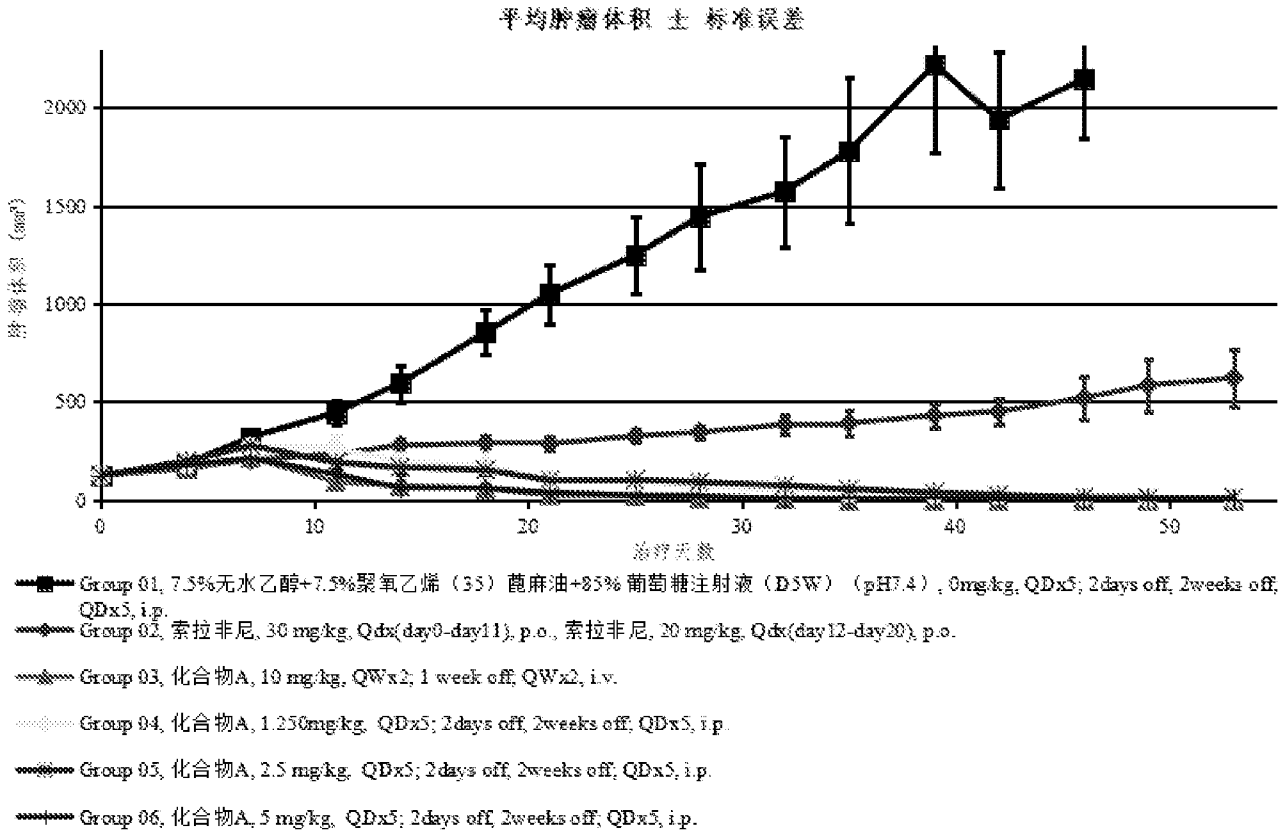

平均肿瘤体积 ± 标准误差
肿瘤体积（mm³）
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液（D5W）（pH7.4）, 0mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, Qdx(day0-day11), p.o., 索拉非尼, 20 mg/kg, Qdx(day12-day20), p.o.
Group 03, 化合物A, 10 mg/kg, QWx2; 1 week off, QWx2, i.v.
Group 04, 化合物A, 1.250mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 05, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 06, 化合物A, 5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.

图 25

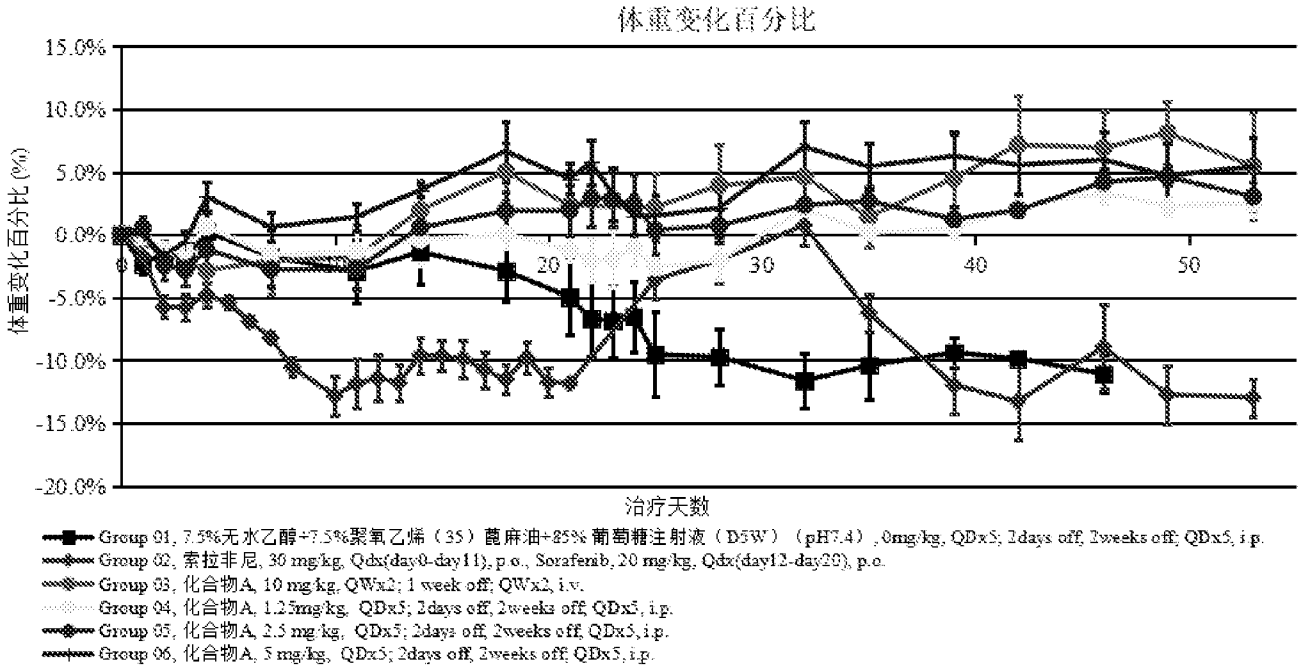

体重变化百分比
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
体重变化百分比 (%)
20
30
40
50
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液（D5W）（pH7.4）, 0mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, Qdx(day0-day11), p.o., Sorafenib, 20 mg/kg, Qdx(day12-day29), p.o.
Group 03, 化合物A, 10 mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.
Group 04, 化合物A, 1.25mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 05, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 06, 化合物A, 5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.

图 26

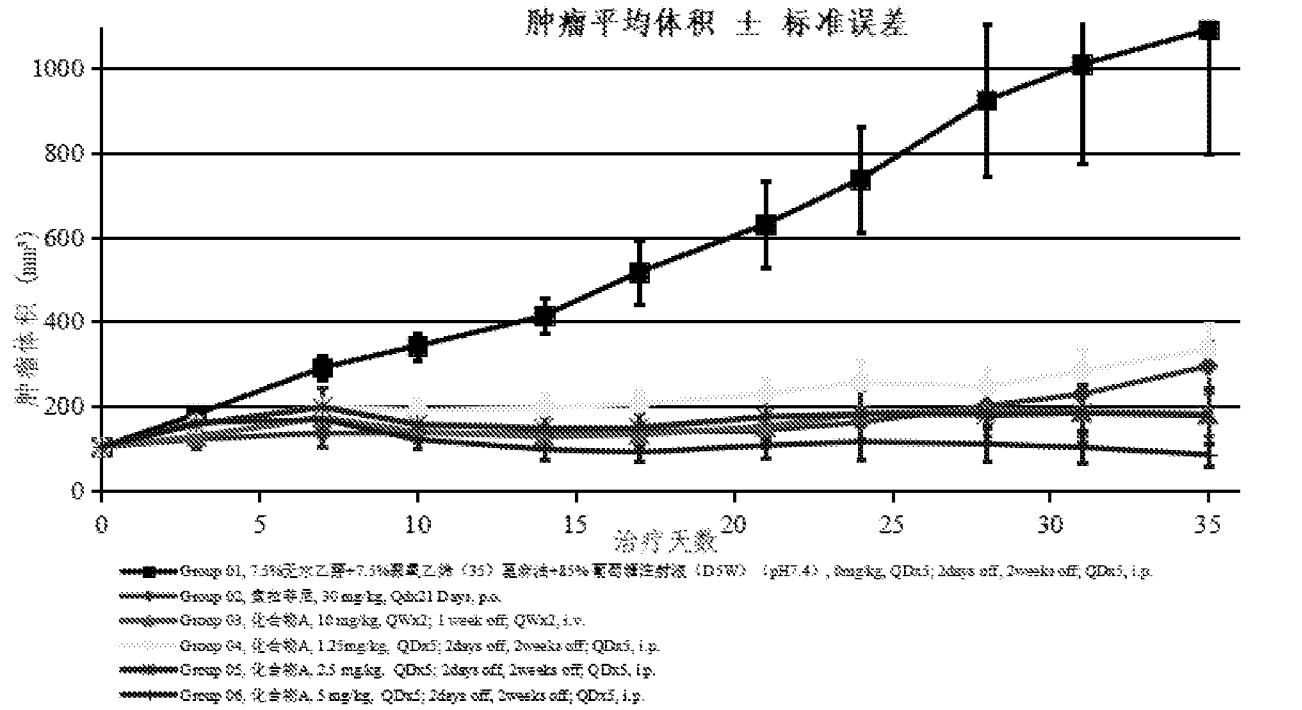

肿瘤平均体积 ± 标准误差
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 (mm³)
0
5
10
15
20
25
30
35
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液（D5W）（pH7.4）, 0mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, Qdx21 Days, p.o.
Group 03, 化合物A, 10 mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.
Group 04, 化合物A, 1.25mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 05, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 06, 化合物A, 5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.

图 27

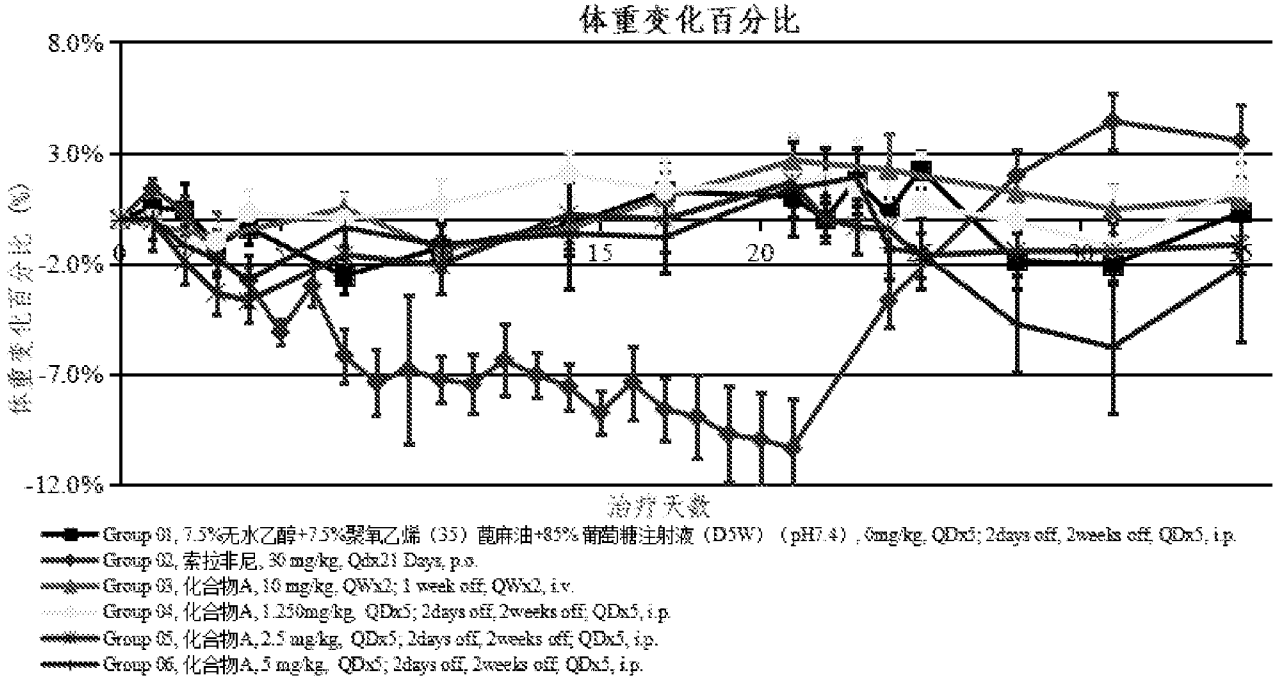

体重变化百分比
8.0%
3.0%
-2.0%
-7.0%
-12.0%
体重变化百分比（%）
0
15
20
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85%葡萄糖注射液（D5W）（pH7.4）, 0mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, Qdx21 Days, p.o.
Group 03, 化合物A, 10 mg/kg, QWx2; 1 week off, QWx2, i.v.
Group 04, 化合物A, 1.250mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.
Group 05, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.
Group 06, 化合物A, 5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.

图 28

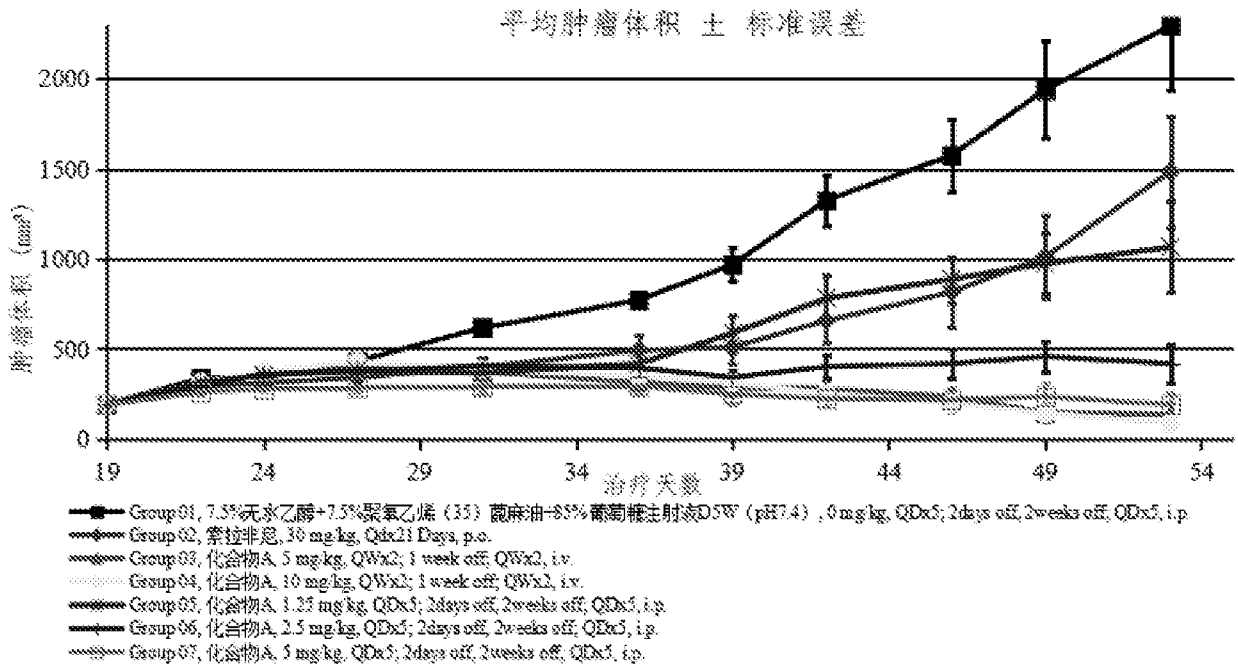

平均肿瘤体积 ± 标准误差
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积（mm³）
19
24
29
34
39
44
49
54
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85%葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, Qdx21 Days, p.o.
Group 03, 化合物A, 5 mg/kg, QWx2; 1 week off, QWx2, i.v.
Group 04, 化合物A, 10 mg/kg, QWx2; 1 week off, QWx2, i.v.
Group 05, 化合物A, 1.25 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.
Group 06, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.
Group 07, 化合物A, 5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off, QDx5, i.p.

图 29

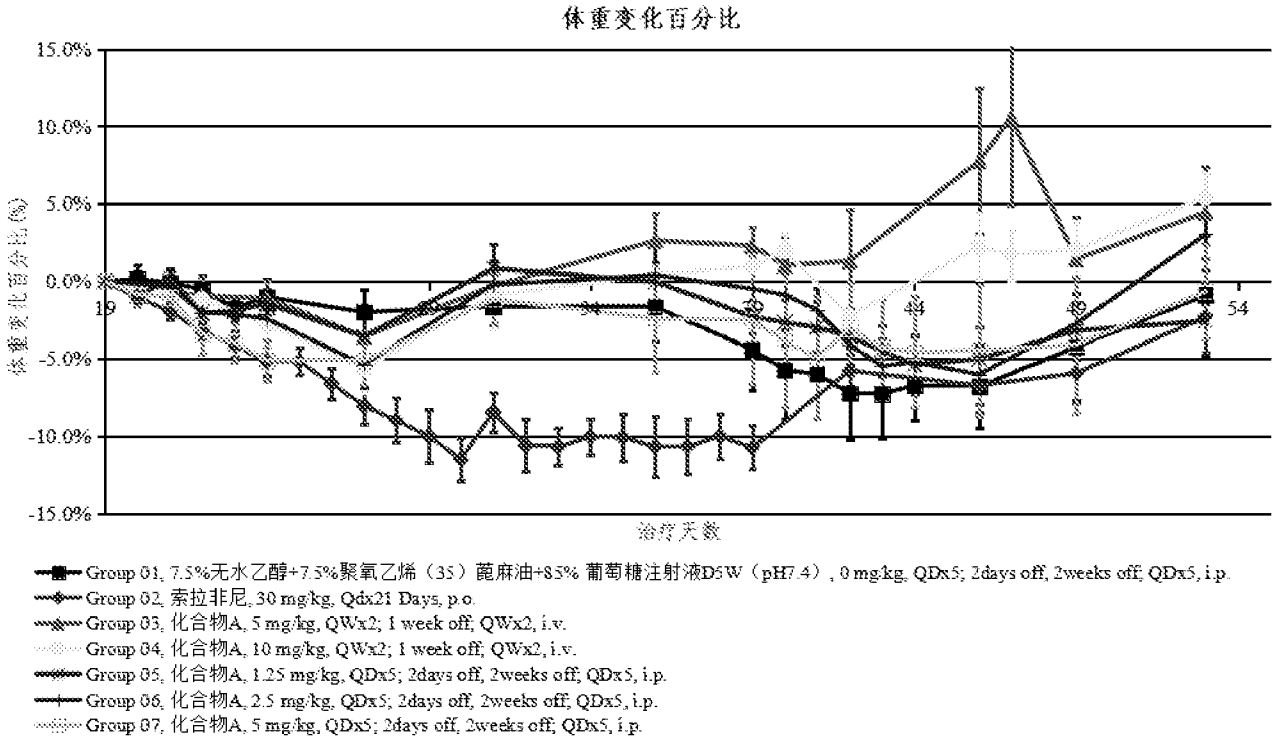

体重变化百分比
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
体重变化百分比 (%)
19
54
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 02, 索拉非尼, 30 mg/kg, Qdx21 Days, p.o.
Group 03, 化合物A, 5 mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.
Group 04, 化合物A, 10 mg/kg, QWx2; 1 week off; QWx2, i.v.
Group 05, 化合物A, 1.25 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 06, 化合物A, 2.5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.
Group 07, 化合物A, 5 mg/kg, QDx5; 2days off, 2weeks off; QDx5, i.p.

图 30

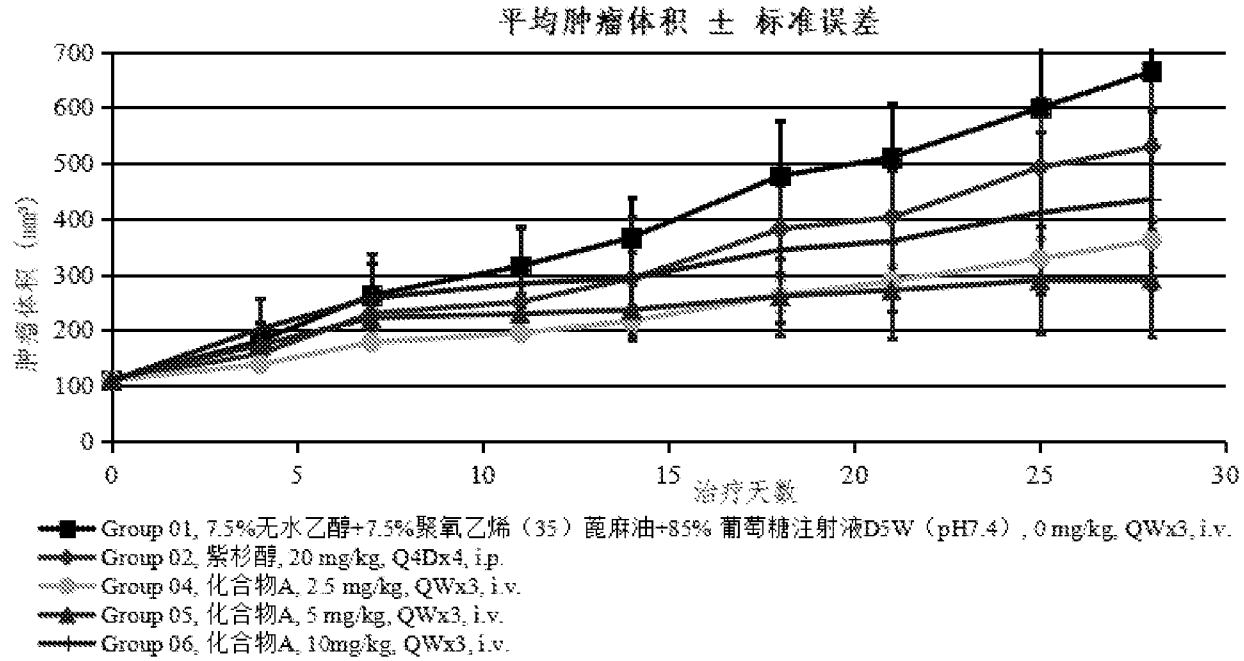

平均肿瘤体积 ± 标准误差
700
600
500
400
300
200
100
0
肿瘤体积 (mm³)
0
5
10
15
20
25
30
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 02, 紫杉醇, 20 mg/kg, Q4Dx4, i.p.
Group 04, 化合物A, 2.5 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 5 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 06, 化合物A, 10mg/kg, QWx3, i.v.

图 31

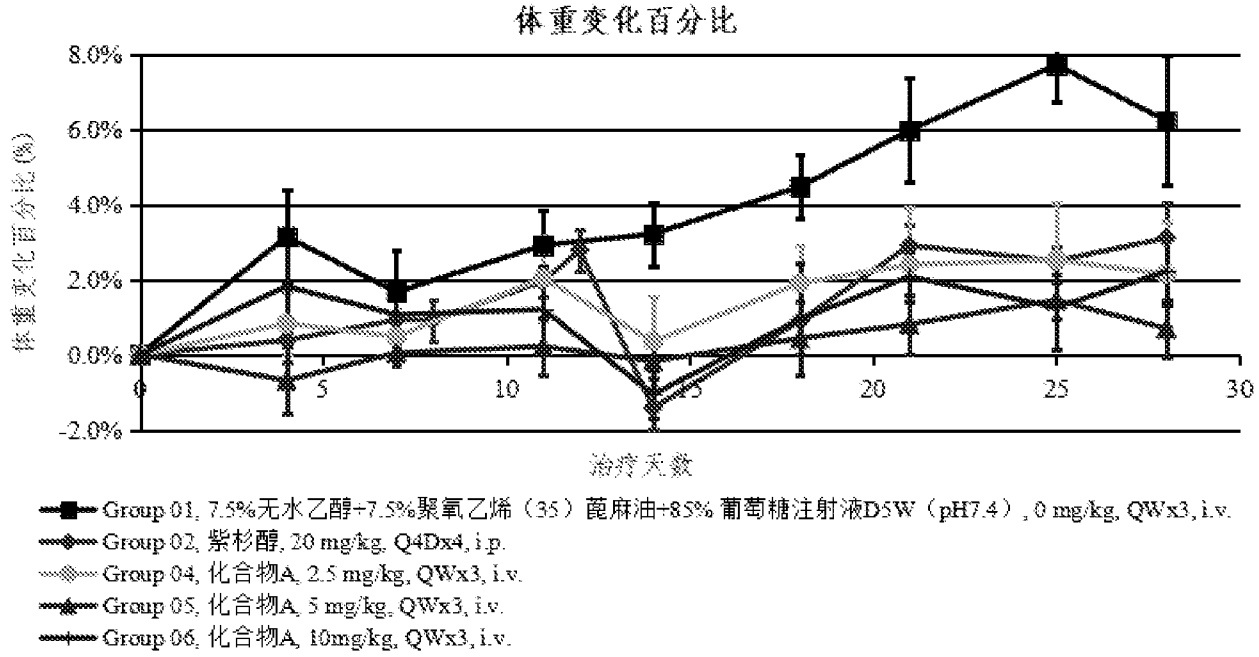

体重变化百分比
8.0%
6.0%
4.0%
2.0%
0.0%
-2.0%
体重变化百分比 (%)
0
5
10
15
20
25
30
治疗天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液D5W（pH7.4）, 0 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 02, 紫杉醇, 20 mg/kg, Q4Dx4, i.p.
Group 04, 化合物A, 2.5 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 05, 化合物A, 5 mg/kg, QWx3, i.v.
Group 06, 化合物A, 10mg/kg, QWx3, i.v.

图 32

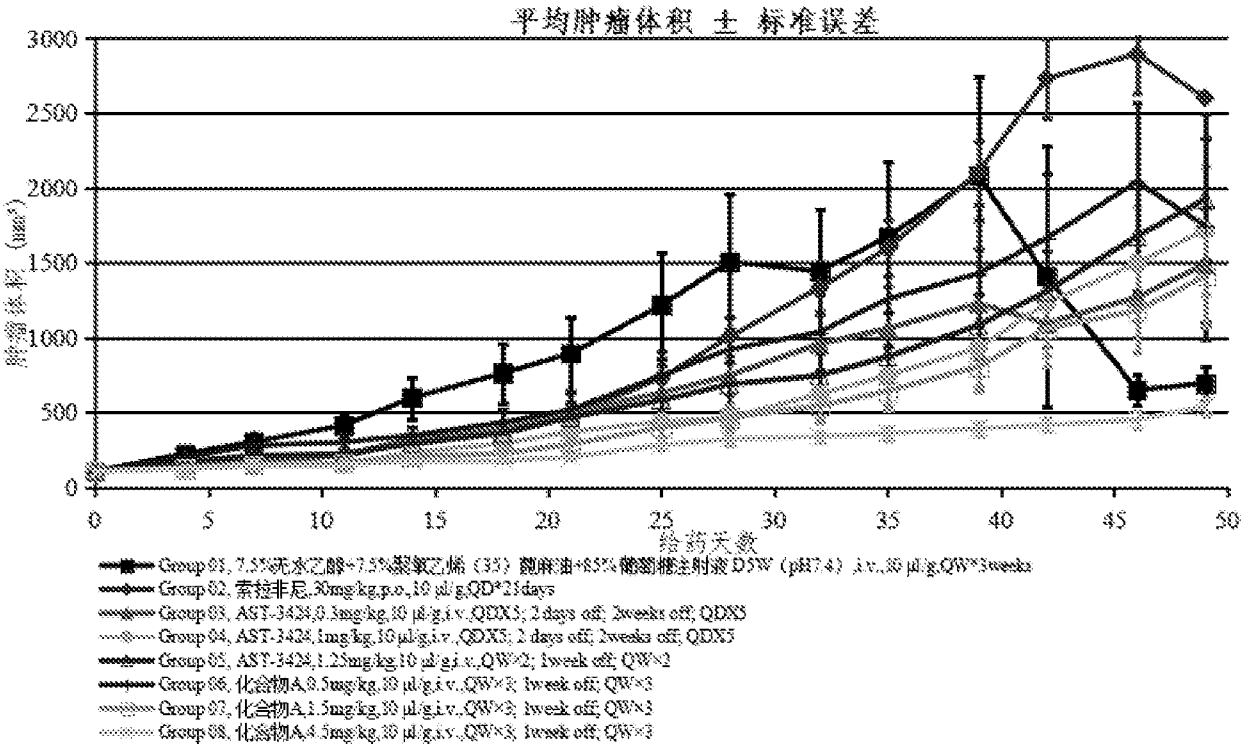

平均肿瘤体积 ± 标准误差
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm³)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
给药天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85%葡萄糖注射液D5W（pH7.4）,i.v.,10 μl/g,QW*3weeks
Group 02, 索拉非尼,30mg/kg,p.o.,10 μl/g,QD*21days
Group 03, AST-3424,0.3mg/kg,10 μl/g,i.v.,QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 04, AST-3424,1mg/kg,10 μl/g,i.v.,QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 05, AST-3424,1.25mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×2; 1week off; QW×2
Group 06, 化合物A,0.5mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×3; 1week off; QW×3
Group 07, 化合物A,1.5mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×3; 1week off; QW×3
Group 08, 化合物A,4.5mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×3; 1week off; QW×3

图 33

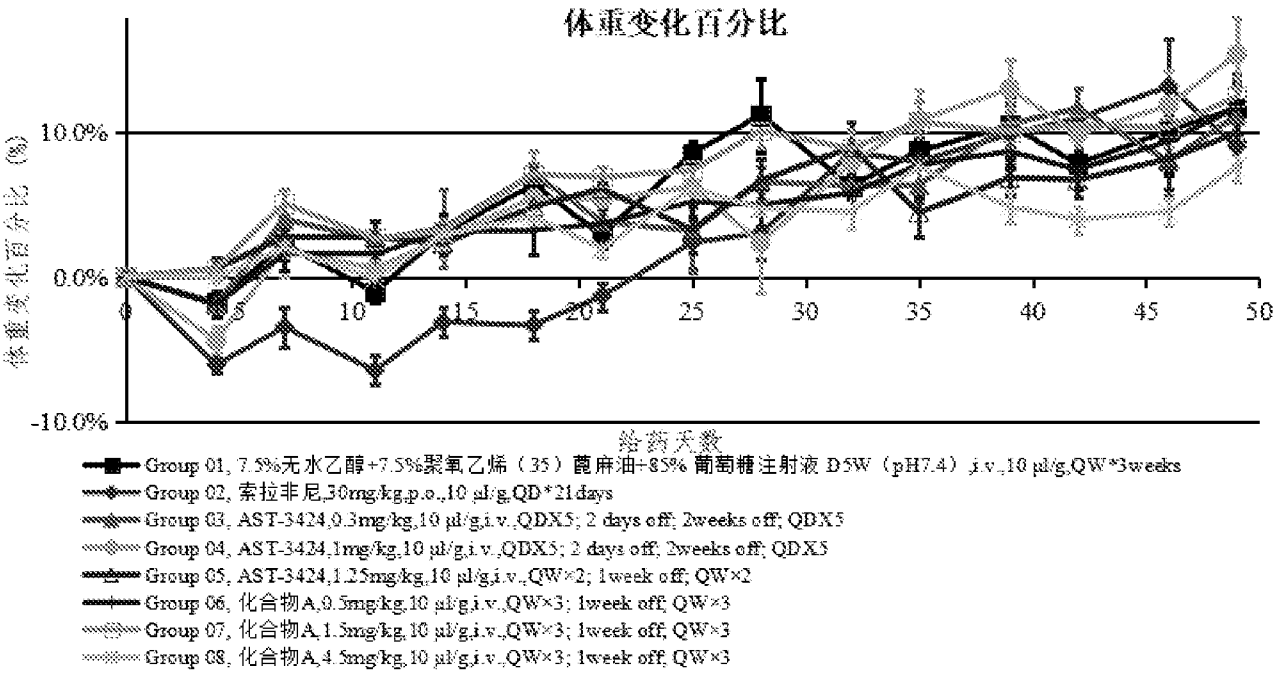

体重变化百分比
体重变化百分比（%）
10.0%
0.0%
-10.0%
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
给药天数
Group 01, 7.5%无水乙醇+7.5%聚氧乙烯（35）蓖麻油+85% 葡萄糖注射液 D5W（pH7.4）,i.v.,10 μl/g,QW*3weeks
Group 02, 索拉非尼,30mg/kg,p.o.,10 μl/g,QD*21days
Group 03, AST-3424,0.3mg/kg,10 μl/g,i.v.,QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 04, AST-3424,1mg/kg,10 μl/g,i.v.,QDX5; 2 days off; 2weeks off; QDX5
Group 05, AST-3424,1.25mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×2; 1week off; QW×2
Group 06, 化合物A,0.5mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×3; 1week off; QW×3
Group 07, 化合物A,1.5mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×3; 1week off; QW×3
Group 08, 化合物A,4.5mg/kg,10 μl/g,i.v.,QW×3; 1week off; QW×3

图 34

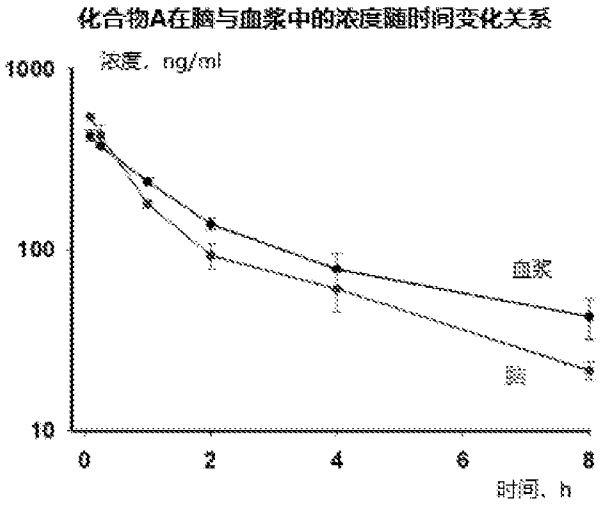

化合物A在脑与血浆中的浓度随时间变化关系
浓度，ng/ml
1000
100
10
血浆
脑
0
2
4
6
8
时间，h

图 35

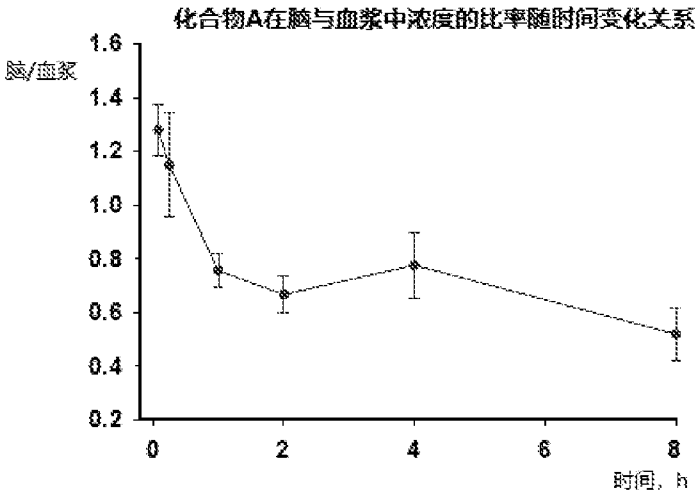

化合物A在脑与血浆中浓度的比率随时间变化关系
脑/血浆
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
2
4
6
8
时间，h

图 36

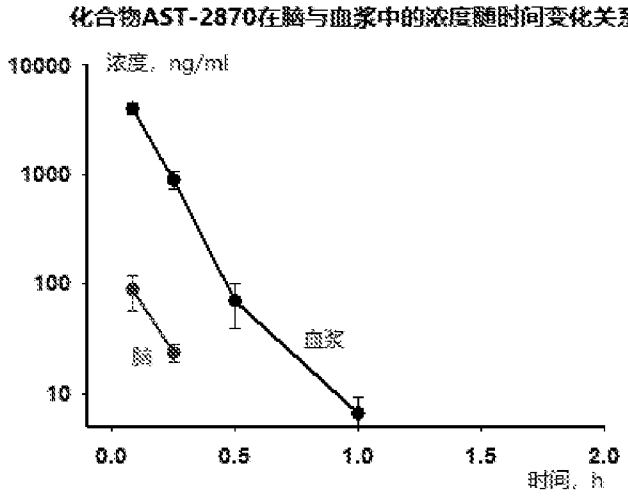

化合物AST-2870在脑与血浆中的浓度随时间变化关系
浓度，ng/ml
10000
1000
100
10
血浆
脑
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
时间，h

图 37

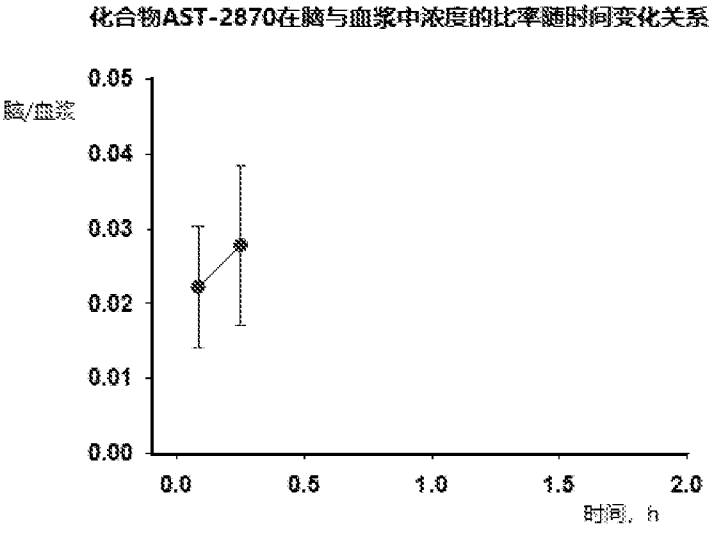

化合物AST-2870在脑与血浆中浓度的比率随时间变化关系
脑/血浆
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
时间，h

图 38

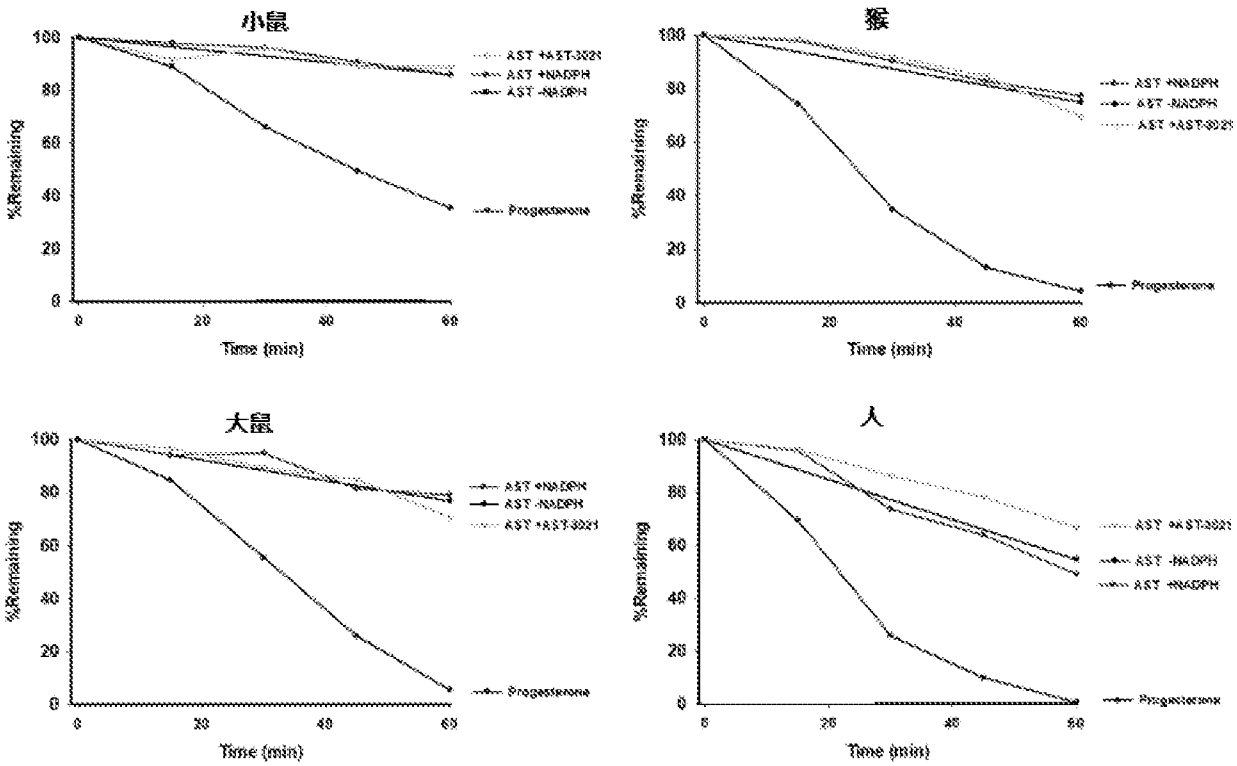

小鼠
猴
大鼠
人
%Remaining
Time (min)
Progesterone

图 39

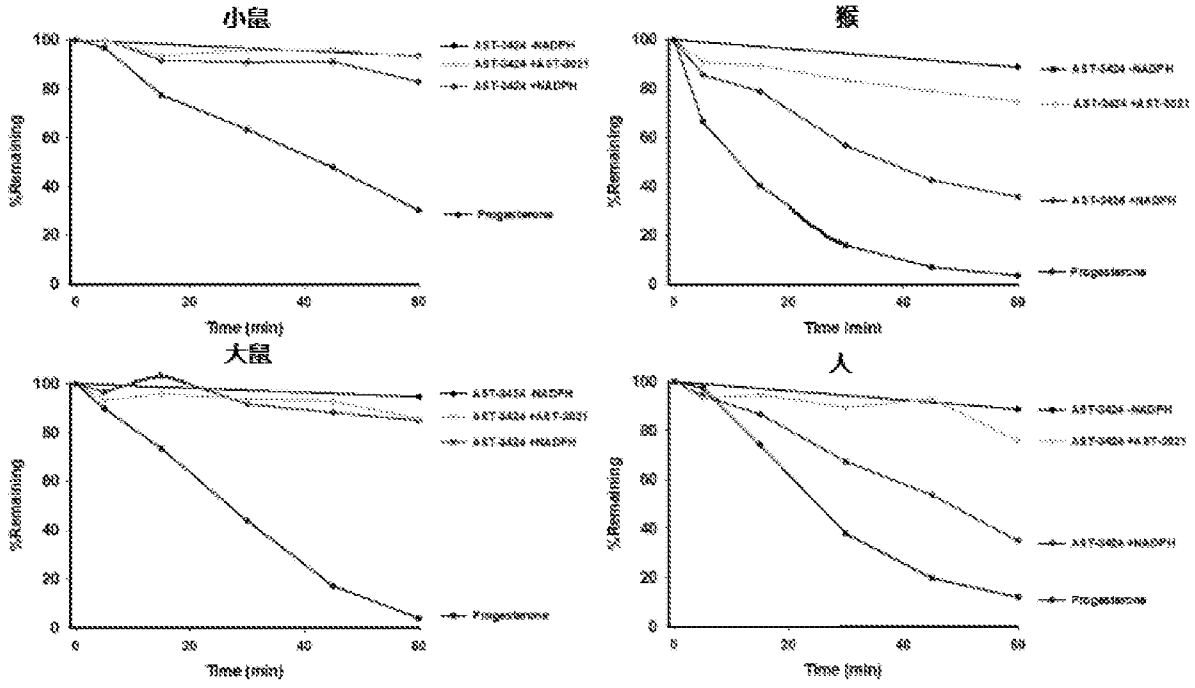

小鼠
猴
大鼠
人
%Remaining
Time (min)
Progesterone

图 40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/129077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F 9/24(2006.01)i; C07F 9/564(2006.01)i; A61K 31/664(2006.01)i; A61K 31/396(2006.01)i; A61K 31/04(2006.01)i; A61K 31/06(2006.01)i; A61P 35/00(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)

C07F; A61K; A61P

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)

CNABS, CNTXT, DWPI, VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI: 深圳艾欣达伟, 李安蓉, 段建新, 孟繁英, 齐天阳, 孟腾, 张梦云, 醛基酮还原酶1C3, 醛酮还原酶1C3, DNA烷化剂, p-糖蛋白, 多药耐药蛋白, 血脑屏障, 同位素变体, 外消旋体, 颅内, 脑癌, 脑肿瘤, 脑转移, 肝癌, 肺癌, 胃癌, 胰腺癌, 直链淀粉-三(3, 5-二甲苯基氨基甲酸酯), Ascentawits, AKR1C3, aldo-keto reductase 1C3, DNA alkylating agent, p-gp, pgp, P-glycoprotein, blood brain barrier, BBB, racemate, brain, cancer, tumour, brain metastasis, AST-2660, AST-3424, TH2870, OBI-3424, TH-3424, CHIRALPAK, TGI, 2553207-65-9, 2553207-92-2, 2553207-66-0, 2553207-61-5, 2553207-58-0

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021083310 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 06 May 2021 (2021-05-06) description, page 1, lines 21-33, page 4, lines 15-16, page 7, line 1 to page 13, line 9, and page 32, line 8 to page 37, line 5	1-13, 16-27, 30-32
X	WO 2020228685 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 19 November 2020 (2020-11-19) description, page 2, line 14, page 5, line 4, and page 7, lines 15-21	1-15
Y	WO 2021083310 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 06 May 2021 (2021-05-06) description, page 1, lines 21-33, page 4, lines 15-16, page 7, line 1 to page 13, line 9, and page 32, line 8 to page 37, line 5	14, 15, 28, 29
Y	WO 2020228685 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 19 November 2020 (2020-11-19) description, page 2, line 14, page 5, line 4, and page 7, lines 15-21	14, 15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ 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	Date of mailing of the international search report
13 June 2022	**24 June 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

International application No.
PCT/CN2021/129077

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021120717 A1 (ASCENTAWITS PHARMACEUTICALS, LTD.) 24 June 2021 (2021-06-24) embodiments 1 and 23	28, 29
A	CN 107530556 A (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 02 January 2018 (2018-01-02) entire document	1-32
A	CN 108136214 A (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 08 June 2018 (2018-06-08) entire document	1-32
A	CN 108290911 A (THRESHOLD PHARMACEUTICALS, INC.) 17 July 2018 (2018-07-17) entire document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/129077

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **7-9**, **12**, **14**, **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 7-9 and 12 relate to a use of the drug according to claim 6 or the compound according to any one of claims 1-5 for the treatment of a cancer patient or tumor patient or a condition induced by cancer or a tumor, or a hyperplasia disease. Claims 14 and 15 relate to a method for the treatment of cancer or a tumor. The use or method relates to a method for the treatment of a disease, and therefore, said claims do not comply with PCT Rule 39.1(iv). The search report was made on the basis that the title of the subject matter of claims 7-9 and 12 is amended to be "a use of the drug according to claim 6 or the compound according to any one of claims 1-5 for in the preparation of a drug for treating a cancer patient or tumor patient or a condition induced by cancer or a tumor, or a hyperplasia disease" and that the title of the subject matter of claims 14 and 15 is amended to be "a use of the drug according to claim 6 in the preparation of a drug for treating cancer or a tumor".

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/129077

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2021083310 A1	06 May 2021	CN 114555614 A	27 May 2022
WO 2020228685 A1	19 November 2020	US 2022119429 A1	21 April 2022
		AU 2020275818 A1	25 November 2021
		CA 3140070 A1	19 November 2020
		EP 3971194 A1	23 March 2022
		KR 20220012274 A	03 February 2022
		CN 113853379 A	28 December 2021
WO 2021120717 A1	24 June 2021	TW 202128188 A	01 August 2021
		TW 202135831 A	01 October 2021
		WO 2022052564 A1	17 March 2022
CN 107530556 A	02 January 2018	KR 20190072689 A	25 June 2019
		US 2019225633 A1	25 July 2019
		IL 254377 D0	30 November 2017
		CA 2979251 A1	15 September 2016
		US 2018044360 A1	15 February 2018
		KR 20210095231 A	30 July 2021
		EP 3277380 A1	07 February 2018
		SG 11201707293V A	30 October 2017
		TW 201706262 A	16 February 2017
		ES 2828026 T3	25 May 2021
		EP 3747508 A1	09 December 2020
		ES 2896960 T3	28 February 2022
		KR 20170128280 A	22 November 2017
		BR 112017019287 A2	02 May 2018
		KR 20190072688 A	25 June 2019
		WO 2016145092 A1	15 September 2016
		AU 2016229136 A1	05 October 2017
		JP 2018513876 A	31 May 2018
		SG 10201913462 X A	30 March 2020
CN 108136214 A	08 June 2018	JP 2019178172 A	17 October 2019
		US 2021017120 A1	21 January 2021
		KR 20170127463 A	21 November 2017
		SG 10201913709 Q A	30 March 2020
		WO 2016161342 A2	06 October 2016
		HK 1250959 A1	18 January 2019
		JP 2018511612 A	26 April 2018
		US 2018086693 A1	29 March 2018
		CA 2981494 A1	06 October 2016
		EP 3277381 A2	07 February 2018
		SG CN 11201707375 U A	30 October 2017
		IL 254769 D0	31 December 2017
		TW 201706267 A	16 February 2017
		AU 2016244000 A1	12 October 2017
		CN 112142692 A	29 December 2020
		BR 112017021167 A2	03 July 2018
		KR 20190075145 A	28 June 2019
CN 108290911 A	17 July 2018	JP 2018517710 A	05 July 2018
		TW 201726695 A	01 August 2017
		ES 2781398 T3	01 September 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/129077

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		EP	3390415	A1	24 October 2018
		IL	256569	D0	28 February 2018
		CA	2990696	A1	26 May 2017
		KR	20170130615	A	28 November 2017
		AU	2016357728	A1	30 November 2017
		WO	2017087428	A1	26 May 2017
		BR	112017025778	A2	14 August 2018
		HK	1250988	A1	18 January 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/129077

A. 主题的分类

C07F 9/24(2006.01)i; C07F 9/564(2006.01)i; A61K 31/664(2006.01)i; A61K 31/396(2006.01)i; A61K 31/04(2006.01)i; A61K 31/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07F; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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）)

CNABS, CNTXT, DWPI, VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, CNKI, 深圳艾欣达伟，李安蓉，段建新，孟繁英，齐天阳，孟腾，张梦云，醛基酮还原酶1C3，醛酮还原酶1C3，DNA烷化剂，p-糖蛋白，多药耐药蛋白，血脑屏障，同位素变体，外消旋体，颅内，脑癌，脑肿瘤，脑转移，肝癌，肺癌，胃癌，胰腺癌，直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)，Ascentawits, AKR1C3, aldo-keto reductase 1C3, DNA alkylating agent, p-gp, pgp, P-glycoprotein, blood brain barrier, BBB, racemate, brain, cancer, tumour, brain metastasis, AST-2660, AST-3424, TH2870, OBI-3424, TH-3424, CHIRALPAK, TGI, 2553207-65-9, 2553207-92-2, 2553207-66-0, 2553207-61-5, 2553207-58-0

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2021083310 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2021年5月6日 (2021-05-06) 说明书第1页第21-33行，第4页第15-16行，第7页第1行至第13页第9行，第32页第8行至第37页第5行	1-13, 16-27, 30-32
X	WO 2020228685 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2020年11月19日 (2020-11-19) 说明书第2页第14行，第5页第4行，第7页第15-21行	1-15
Y	WO 2021083310 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2021年5月6日 (2021-05-06) 说明书第1页第21-33行，第4页第15-16行，第7页第1行至第13页第9行，第32页第8行至第37页第5行	14, 15, 28, 29
Y	WO 2020228685 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2020年11月19日 (2020-11-19) 说明书第2页第14行，第5页第4行，第7页第15-21行	14, 15

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"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）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"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

"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

"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

"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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年6月13日	2022年6月24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 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 传真号 (86-10)62019451	受权官员 韩松 电话号码 (86-10)53961906

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2021120717 A1 (深圳艾欣达伟医药科技有限公司) 2021年6月24日 (2021-06-24) 实施例1和23	28，29
A	CN 107530556 A (深圳艾衡昊医药科技有限公司) 2018年1月2日 (2018-01-02) 全文	1-32
A	CN 108136214 A (深圳艾衡昊医药科技有限公司) 2018年6月8日 (2018-06-08) 全文	1-32
A	CN 108290911 A (深圳艾衡昊医药科技有限公司) 2018年7月17日 (2018-07-17) 全文	1-32

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/129077

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 7-9，12，14，15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求7-9，12涉及权利要求6所述的药物或权利要求1-5任一项所述的化合物用于治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的用途，权利要求14，15涉及治疗癌症或肿瘤的方法，该用途或方法属于疾病的治疗方法，不符合PCT实施细则第39.1(iv)的规定。本检索报告是基于权利要求7-9，12的主题名称修改为“权利要求6所述的药物或权利要求1-5任一项所述的化合物用于制备治疗癌症患者或肿瘤患者或由癌症或肿瘤引发的病症或细胞增生性疾病的药物的用途”，权利要求14，15的主题名称修改为“权利要求6所述的药物在制备治疗癌症或肿瘤的药物的用途”作出的。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/129077

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	2021083310	A1	2021年5月6日	CN	114555614	A	2022年5月27日
WO	2020228685	A1	2020年11月19日	US	2022119429	A1	2022年4月21日
				AU	2020275818	A1	2021年11月25日
				CA	3140070	A1	2020年11月19日
				EP	3971194	A1	2022年3月23日
				KR	20220012274	A	2022年2月3日
				CN	113853379	A	2021年12月28日
WO	2021120717	A1	2021年6月24日	TW	202128188	A	2021年8月1日
				TW	202135831	A	2021年10月1日
				WO	2022052564	A1	2022年3月17日
CN	107530556	A	2018年1月2日	KR	20190072689	A	2019年6月25日
				US	2019225633	A1	2019年7月25日
				IL	254377	D0	2017年11月30日
				CA	2979251	A1	2016年9月15日
				US	2018044360	A1	2018年2月15日
				KR	20210095231	A	2021年7月30日
				EP	3277380	A1	2018年2月7日
				SG	11201707293V	A	2017年10月30日
				TW	201706262	A	2017年2月16日
				ES	2828026	T3	2021年5月25日
				EP	3747508	A1	2020年12月9日
				ES	2896960	T3	2022年2月28日
				KR	20170128280	A	2017年11月22日
				BR	112017019287	A2	2018年5月2日
				KR	20190072688	A	2019年6月25日
				WO	2016145092	A1	2016年9月15日
				AU	2016229136	A1	2017年10月5日
				JP	2018513876	A	2018年5月31日
				SG	10201913462X	A	2020年3月30日
CN	108136214	A	2018年6月8日	JP	2019178172	A	2019年10月17日
				US	2021017120	A1	2021年1月21日
				KR	20170127463	A	2017年11月21日
				SG	102019137090	A	2020年3月30日
				WO	2016161342	A2	2016年10月6日
				HK	1250959	A1	2019年1月18日
				JP	2018511612	A	2018年4月26日
				US	2018086693	A1	2018年3月29日
				CA	2981494	A1	2016年10月6日
				EP	3277381	A2	2018年2月7日
				SG	11201707375U	A	2017年10月30日
				IL	254769	D0	2017年12月31日
				TW	201706267	A	2017年2月16日
				AU	2016244000	A1	2017年10月12日
				CN	112142692	A	2020年12月29日
				BR	112017021167	A2	2018年7月3日
				KR	20190075145	A	2019年6月28日
CN	108290911	A	2018年7月17日	JP	2018517710	A	2018年7月5日
				TW	201726695	A	2017年8月1日
				ES	2781398	T3	2020年9月1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/129077

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)
		EP	3390415	A1	2018年10月24日
		IL	256569	D0	2018年2月28日
		CA	2990696	A1	2017年5月26日
		KR	20170130615	A	2017年11月28日
		AU	2016357728	A1	2017年11月30日
		WO	2017087428	A1	2017年5月26日
		BR	112017025778	A2	2018年8月14日
		HK	1250988	A1	2019年1月18日