



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113336768 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 19

(21) 申请号 202010099747.2  
 (22) 申请日 2020.02.18  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 113336768 A  
 (43) 申请公布日 2021.09.03  
 (73) 专利权人 深圳海王医药科技研究院有限公司  
 地址 518000 广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城  
 (72) 发明人 栾升霖 唐田 黄汉敏 吴婧  
 冯贻东 石涛 冯汉林 于琳  
 (74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006  
 专利代理师 黄韧敏

(51) Int. Cl.  
 C07D 495/04 (2006.01)  
 C07F 9/6561 (2006.01)  
 A61K 31/4365 (2006.01)  
 A61K 31/496 (2006.01)  
 A61K 31/5377 (2006.01)  
 A61K 31/675 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)  
 A61P 35/02 (2006.01)

(56) 对比文件  
 CN 101796055 A, 2010.08.04  
 CN 108530464 A, 2018.09.14  
 CN 109384799 A, 2019.02.26  
 审查员 吴永英

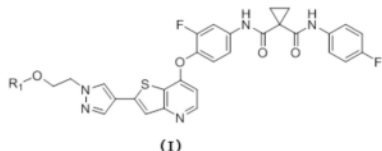
权利要求书4页 说明书19页 附图3页

(54) 发明名称

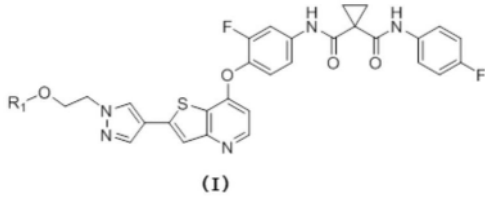
一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 其为具有式 (I) 所示的蛋白激酶抑制活性的化合物, 所述化合物体内代谢转化成抑制肿瘤生长的活性小分子td32-4, 从而发挥抗肿瘤作用。与td32-4相比, 本发明化合物具有显著提高的溶解度和口服生物利用度, 在动物体内实验中表现出强效抗肿瘤活性。本发明涉及式 (I) 化合物的合成方法与其在制药领域的应用。

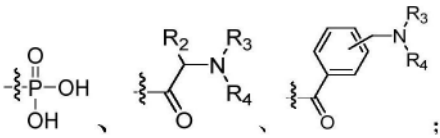


1. 一种化合物或其药学可接受的盐,其特征在于所述化合物具有通式(I)所示的结构:



其中,

R<sub>1</sub>任选自以下取代基:3-羧基丙酰基、4-羧酸丁酰基、5-羧基戊酰基、6-羧基己酰基或



当R<sub>1</sub>为 时,R<sub>2</sub>任选自以下基团:氢、R<sub>5</sub>取代的C<sub>1</sub>~C<sub>8</sub>烷基,R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>选自氢、或R<sub>3</sub>、

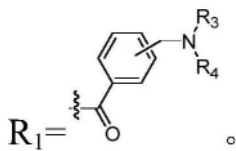
R<sub>4</sub>构成吗啉,R<sub>5</sub>任选自以下基团:氢、C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷氧基;

当R<sub>1</sub>为 时,R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>构成吗啉。

2. 如权利要求1所述的化合物或其药学可接受的盐,其特征在于:R<sub>1</sub>为 。

3. 如权利要求2所述的一种化合物或其药学可接受的盐,其特征在于,R<sub>2</sub>任选自以下基团:氢、甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基;R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>任选自以下基团:氢或R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>构成吗啉。

4. 如权利要求1所述的化合物或其药学可接受的盐,其特征在于:



5. 一种化合物或其药学可接受的盐,其特征在于,所述化合物为:

	结构式	化学式
1		C <sub>33</sub> H <sub>27</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S

2		$C_{29}H_{24}F_2N_5O_7PS$
3		$C_{33}H_{30}F_2N_6O_5S$
4		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_5S$
5		$C_{35}H_{32}F_2N_6O_6S$
6		$C_{31}H_{26}F_2N_6O_5S$
7		$C_{32}H_{28}F_2N_6O_5S$
8		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_5S$
9		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_5S$
10		$C_{34}H_{32}F_2N_6O_5S$
11		$C_{34}H_{32}F_2N_6O_5S_2$
12		$C_{38}H_{32}F_2N_6O_5S$
13		$C_{34}H_{30}F_2N_6O_5S$

14		$C_{33}H_{29}F_2N_7O_6S$
15		$C_{34}H_{31}F_2N_7O_6S$
16		$C_{40}H_{33}F_2N_7O_5S$
17		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_7S$
18		$C_{34}H_{32}F_2N_6O_5S$
19		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_6S$
20		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_6S$
21		$C_{42}H_{39}F_2N_7O_5S$
22		$C_{42}H_{39}F_2N_7O_5S$
23		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_5S$
24		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_5S$

6. 一种药物组合物, 含有如权利要求1或5所述的化合物或其药学可接受的盐。

7. 如权利要求1或5所述的化合物或其药学可接受的盐在制备治疗肿瘤药物中的应用, 所述肿瘤为: 宫颈癌、精原细胞瘤、睾丸淋巴瘤、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、直肠癌、乳腺癌、皮

肤鳞状细胞癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、食管癌、甲状腺癌、和/或膀胱移行上皮癌、白血病。

## 一种多靶点酪氨酸激酶抑制剂

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体地说,涉及一种以2-取代吡唑基吡啶并[3,2-b]噻吩为母核的多靶点酪氨酸激酶抑制剂及其在医药领域的应用。

### 背景技术

[0002] 细胞内许多重要的生命活动都与蛋白质的磷酸化密切相关,例如细胞的增殖、分化与凋亡。在肿瘤细胞中广泛存在蛋白激酶活性异常的现象,随着医药科技的进步,越来越多的蛋白激酶已经成为行之有效的药物靶点,激酶抑制剂药物成为肿瘤靶向治疗领域研究不可或缺的策略。

[0003] 受体酪氨酸激酶c-Met是肝细胞生长因子(HGF)的唯一已知受体,HGF/c-Met通路在胚胎形成过程中具有重要作用。HGF、c-Met在多种肿瘤中均发现异常表达现象,c-Met的过度激活能促进肿瘤细胞生长和存活,新血管系统的生成,以及侵袭和转移。

[0004] 临床上,在许多不同肿瘤病人体内均发现了HGF和(或)Met的异常表达现象,包括神经胶质瘤、黑色素瘤、肝细胞癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胃癌、肾细胞癌等,而且通常伴随着预后不良。

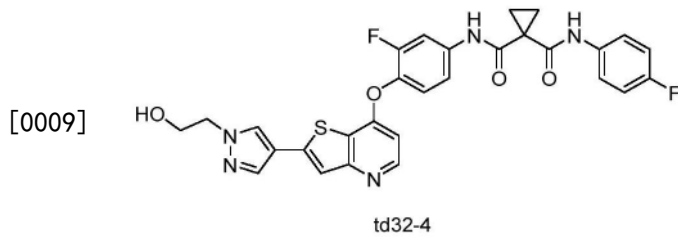
[0005] 新血管系统的生成被认为是肿瘤发生发展的重要步骤,目前有许多药物靶向血管生成因子VEGF或其受体VEGFR,通过抑制肿瘤细胞的血管生成来抑制肿瘤生长,例如贝伐单抗、舒尼替尼、索拉菲尼等药物均有上述药理作用。但是临床上发现,这类药物在发挥药效数周后,抗癌效果明显下降。机制研究发现,低氧诱导因子HIF- $\alpha$ 诱导Met的高表达,导致机体对VEGF/VEGFR通路的抑制产生耐受。最新研究表明,一些VEGFR抑制剂(如舒尼替尼)以及VEGF单抗,能够增加肿瘤细胞的侵袭和迁移能力,而这些肿瘤细胞中伴随着更高水平的Met表达。因此,同时抑制VEGFR和c-Met可能对肿瘤的抑制更好,也会减少肿瘤细胞侵袭和转移的发生。

[0006] c-kit激酶也是一个重要的抗肿瘤治疗靶标,在胃肠道间质瘤(GIST)中,约有80%存在c-kit激活型突变。在黑色素瘤、系统性肥大细胞增多症、急性髓性细胞白血病中,也伴随c-kit的突变。

[0007] 中国专利申请CN108530464A中涉及一种新的化合物td32-4(N-3-氟-4-(2-(1-(2-羟乙基)-1H-吡唑-4-基)噻吩并[3,2-b]吡啶-7-基)氧基)苯基)-N-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺),其对VEGFR/c-Met/c-Kit三个靶点表现出强效抑制活性,同时在多个肿瘤细胞模型中表现出强效的抗增殖活性。在低剂量( $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )给药剂量下,表现出良好的口服生物利用度( $F=71.6\%$ )。尽管该化合物表现出良好的生物活性,但是td32-4极差的溶解性限制了该化合物被进一步开发为良好的靶向抗肿瘤药。主要体现在以下几个方面:①化合物水溶性极差,小剂量时可以溶液形式给药,能够达到较好的吸收,但是在治疗剂量增大( $>60\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时,以固体制剂/混悬溶液形式给药,药物在动物/人体内无法有效释放,血药浓度极低,口服生物利用度很差( $F=3\% \sim 15\%$ );②难溶性药物在个体间的吸收差异巨大,在进行药物的临床前/临床安全性评价时存在较大风险与困难;③大剂量给药时,药物具有

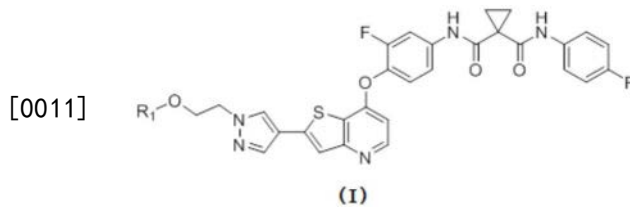
吸收饱和现象,无论如何提高给药量,血药浓度仍然无法提升。

[0008] 为解决上述问题,本发明对td32-4进行结构修饰,提出以下列式(I)为代表的系列化合物,既能够解决td32-4的溶解度难题,又保持其强效的体内抗肿瘤活性,有望开发成为新一代VEGFR/c-Met/c-Kit多靶点激酶抑制剂药物。



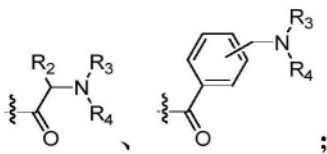
### 发明内容

[0010] 本发明涉及一种化合物或其药学可接受的盐、异构体、消旋体,其特征在于所述化合物具有通式(I)所示的结构:



[0012] 其中,

[0013] R1任选自以下取代基:羧基取代的C3~C8烷基酰基、取代或未取代的膦酰基、

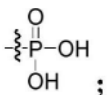


[0014] R2任选自以下基团:氢、卤素、R5取代的C1~C8烷基、R5取代的C6~C12芳基;

[0015] R3、R4任选自以下基团:氢、R5取代的C1~C6烷基,或R3、R4构成五元~十二元脂肪杂环;

[0016] R5任选自以下基团:氢、1~3个卤素、羟基、C1~C6烷氧基、C6~C12芳基;

[0017] 进一步地,R1可选自3-羧基丙酰基、4-羧酸丁酰基、5-羧基戊酰基、6-羧基己酰基、

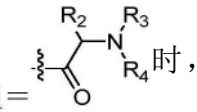


[0018] 再进一步地,当  $R_1 = \text{---} \text{C}(\text{R}_2) \text{---} \text{C}(\text{R}_3) \text{---} \text{N}(\text{R}_4) \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---}$  时,

[0019] R2任选自以下基团:氢、卤素、R5取代的C1~C8烷基、R5取代的C6~C12芳基;

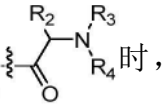
[0020] R3、R4任选自以下基团:氢、R5取代的C1~C6烷基,或R3、R4构成五元~十二元脂肪杂环;

[0021] R5任选自以下基团:氢、1~3个卤素、羟基、C1~C6烷氧基、C6~C12芳基;

[0022] 进一步地,当  时,

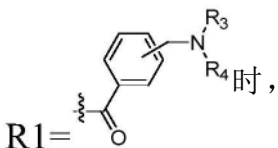
[0023] R2任选自以下基团:氢、氟、氯、溴、甲基、-CH<sub>2</sub>F、-CHF<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、乙基、丙基、异丙基、环丙基、丁基、异丁基、苄基、4-羟基苄基、苯基、4-氟苯基;

[0024] R3、R4任选自以下基团:氢、甲基、乙基、2,2-二甲氧基乙基、丙基、丁基,或R3、R4构成吗啉、吡啶、吡咯、哌啶、哌啶基哌啶、N-甲基哌啶;

[0025] 进一步地,  时,

[0026] R2优选自以下基团:氢、甲基、-CH<sub>2</sub>F、-CHF<sub>2</sub>、-CF<sub>3</sub>、乙基、丙基、异丙基、异丁基、苄基、4-羟基苄基、苯基;

[0027] R3、R4优选自以下基团:氢、甲基、乙基、2,2-二甲氧基乙基,或R3、R4构成吗啉、N-甲基哌啶;

[0028] 当  时,

[0029] R3、R4任选自以下基团:氢、甲基、乙基、2,2-二甲氧基乙基、丙基、丁基,或R3、R4构成吗啉、吡啶、吡咯、哌啶、哌啶基哌啶、N-甲基哌啶。

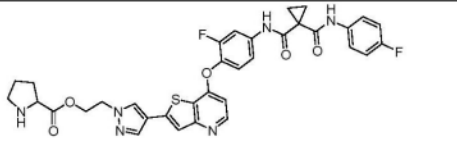
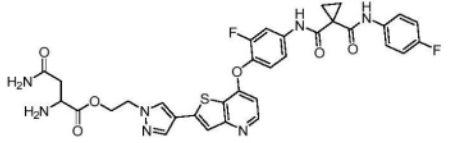
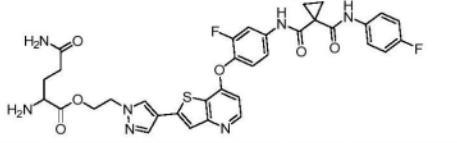
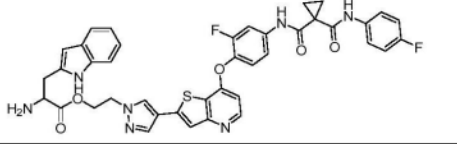
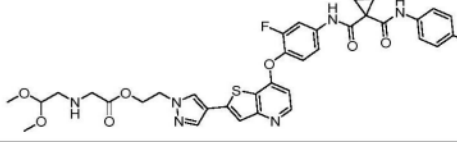
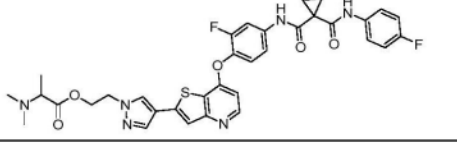
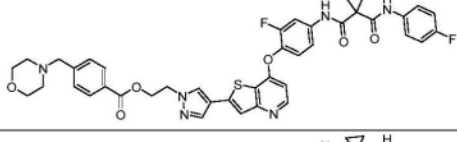
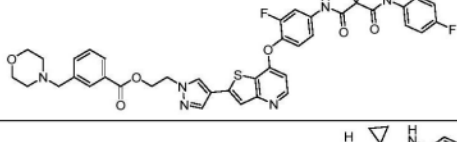
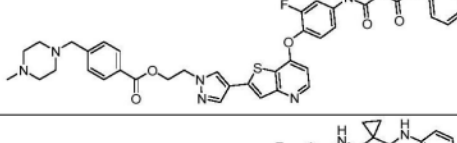
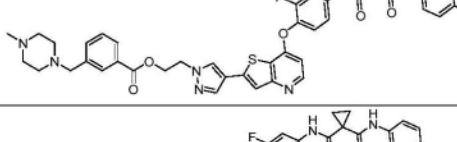
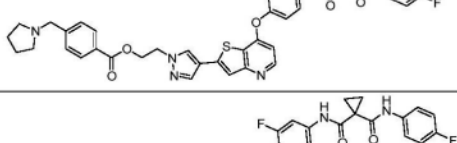
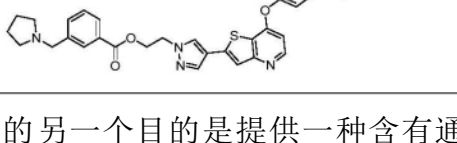
[0030] 在本发明的具体实施方式中,优选的具有式I的化合物如下:

[0031] 

	结构式	化学式

[0032]

1		$C_{33}H_{27}F_2N_5O_7S$
2		$C_{29}H_{24}F_2N_5O_7PS$
3		$C_{33}H_{30}F_2N_6O_5S$
4		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_5S$
5		$C_{35}H_{32}F_2N_6O_6S$
6		$C_{31}H_{26}F_2N_6O_5S$
7		$C_{32}H_{28}F_2N_6O_5S$
8		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_5S$
9		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_5S$
10		$C_{34}H_{32}F_2N_6O_5S$
11		$C_{34}H_{32}F_2N_6O_5S_2$
12		$C_{38}H_{32}F_2N_6O_5S$

13		$C_{34}H_{30}F_2N_6O_5S$
14		$C_{33}H_{29}F_2N_7O_6S$
15		$C_{34}H_{31}F_2N_7O_6S$
16		$C_{40}H_{33}F_2N_7O_5S$
17		$C_{35}H_{34}F_2N_6O_7S$
18		$C_{34}H_{32}F_2N_6O_5S$
[0033]		
19		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_6S$
20		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_6S$
21		$C_{42}H_{39}F_2N_7O_5S$
22		$C_{42}H_{39}F_2N_7O_5S$
23		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_5S$
24		$C_{41}H_{36}F_2N_6O_5S$

[0034] 本发明的另一个目的是提供一种含有通式 (I) 所述化合物或其药学上可接受的盐、异构体、消旋体, 作为活性成分制备的药物组合物。

[0035] 本发明的又一目的是提供一种含有通式(I)所述化合物或其药学上可接受的盐、异构体、消旋体在用于制备治疗肿瘤药物中的应用,所述肿瘤包括:宫颈癌、精原细胞瘤、睾丸淋巴瘤、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、直肠癌、乳腺癌、皮肤鳞状细胞癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、胃癌、食管癌、甲状腺癌、和/或膀胱移行上皮癌、白血病。

[0036] 本发明提供的化合物通过对td32-4的结构进行修饰,获得明显提高的溶解度,克服了对td32-4进行药代动力学研究、安全性评价、分析方法的开发、制剂处方的研究等存在的困难。除此之外,由于td32-4水溶性极差,其在大鼠药代动力学研究中表现出的口服生物利用度极差,限制了该化合物的进一步开发。本发明的化合物通过实验验证,在口服进入体内后,可转化为td32-4发挥药理作用,同时和直接口服td32-4相比,大大提高了口服生物利用度,尤其是在高剂量( $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )给药时。经验证,本发明化合物在动物体内经口服给药,具有强效的肿瘤抑制作用,而td32-4在同等剂量直接口服给药时对肿瘤抑制没有明显的作用。

### 附图说明

[0037] 图1td32-4在 $5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静脉注射给药和 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 口服给药的血药浓度-时间曲线。

[0038] 图2td32-4P3及其体内转化而成的td32-4、td32-4直接口服给药的血药浓度-时间曲线,剂量均为 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0039] 图3td32-4P3及其体内转化而成的td32-4、td32-4直接口服给药的血药浓度-时间曲线,剂量均为 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0040] 图4td32-4P10及其体内转化而成的td32-4、td32-4直接口服给药的血药浓度-时间曲线,剂量均为 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0041] 图5td32-4P10及其体内转化而成的td32-4、td32-4直接口服给药的血药浓度-时间曲线,剂量均为 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

[0042] 图6td32-4P3、td32-4P6、td32-4P9、td32-4P10的小鼠体内肿瘤抑制作用。

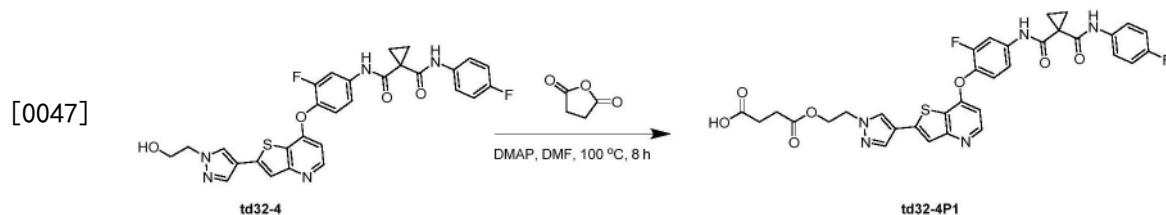
### 具体实施方式

[0043] 以下将结合部分实施例进一步地说明本发明的技术方案,下述实施例不构成对本发明的任何限制。

[0044] 本发明的试剂材料均为市售产品。

[0045] 实施例1

[0046] 化合物4-(2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙氧基)-4-氧代丁酸(td32-4P1)的合成

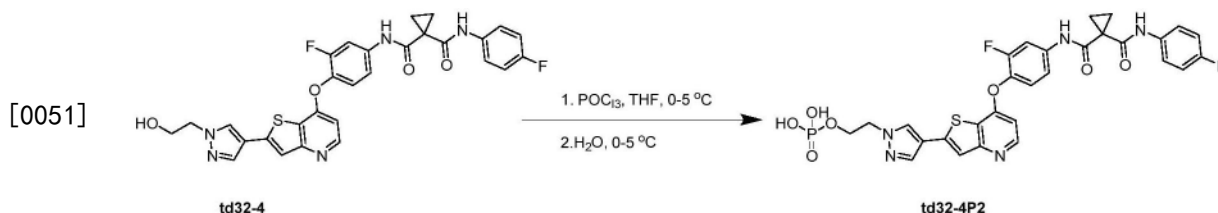


[0048] 将td32-4(化学名:N-3-氟-4-((2-(1-(2-羟乙基)-1H-吡唑-4-基)噻吩并[3,2-b]

吡啶-7-基)氧基)苯基)-N-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺)(5g, 8.7mmol), 4-DMAP (0.21g, 1.7mmol), 丁二酸酐(4.34g, 43.5mmol)溶于50mL DMF中, 100°C加热反应8小时。将反应液倒入500mL水中, 搅拌析出固体, 抽滤, 200mL水洗涤滤饼。滤饼烘干后, 将产物与20% (w%) 碳酸钠水溶液加热搅拌, 逐渐溶解, 加入5%活性炭回流1小时, 趁热抽滤, 滤液用2mol/L稀盐酸调节pH至1~2, 析出大量白色固体, 抽滤, 55°C烘箱中干燥, 得白色固体4.82g, 收率:82.1%, HPLC纯度:98.0%, LC-MS:675.4[M-H]<sup>-</sup>。

#### [0049] 实施例2

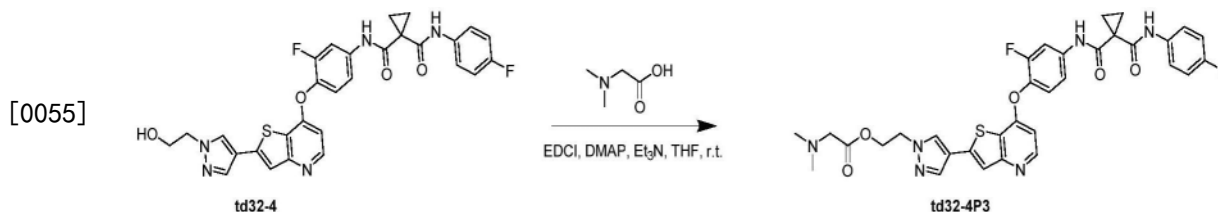
[0050] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基磷酸酯(td32-4P2)的合成



[0052] 室温下将td32-4(5g, 8.7mmol)与三乙胺(1.05g, 10.4mmol)加入60mL四氢呋喃中, 冷却至0°C, 滴加三氯氧磷的四氢呋喃溶液, 滴毕, 反应体系于0~5°C继续搅拌反应3小时。将上述反应液滴加至100mL冰水中, 搅拌析出固体。抽滤, 水洗滤饼至滤液成中性, 烘干样品。滤饼烘干后, 将产物与20% (w%) 碳酸钠水溶液加热搅拌, 逐渐溶解, 加入5%活性炭回流1小时, 趁热抽滤, 滤液用2mol/L稀盐酸调节pH至1~2, 析出大量白色固体, 抽滤, 55°C烘箱中干燥, 得白色固体3.56g, 收率:62.5%, HPLC纯度:96.1%, LC-MS:654.1[M-H]<sup>-</sup>。

#### [0053] 实施例3

[0054] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基二甲基甘氨酸酯(td32-4P3)的合成

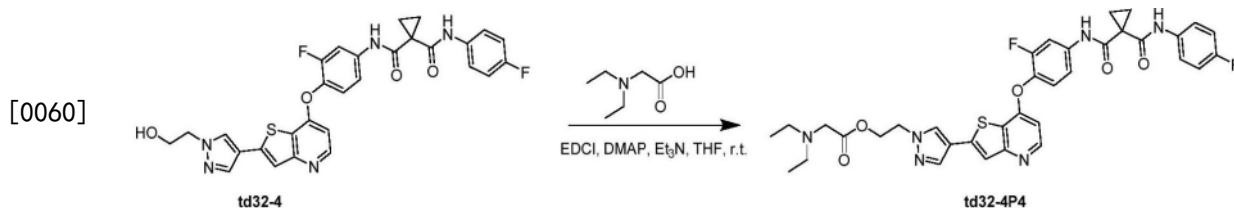


[0056] 0°C条件下, 将N,N-二甲基甘氨酸(1.79g, 17.4mmol)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(缩写EDCI, 4g, 20.9mmol)、4-二甲氨基吡啶(缩写DMAP, 1.59g, 13.0mmol)加入到60mL的无水四氢呋喃中, 反应30分钟后, 将td32-4(5g, 8.7mmol)加入反应体系, 转移至室温, 反应24小时。反应液过滤, 向滤液中加入200mL 1mol/L的稀盐酸溶液, 搅拌, 抽滤, 滤液用饱和碳酸钠溶液调节pH至10, 析出大量白色固体, 抽滤, 100mL水洗滤饼, 滤饼烘干得粗品。

[0057] 将粗品溶于2mol/L的稀盐酸100mL中, 过滤除去不溶物, 滤液再用饱和碳酸钠调节pH至10, 析出大量白色固体, 抽滤, 100mL水洗滤饼, 滤饼烘干。将固体溶于80mL无水丙酮中, 加入浓盐酸2mL, 室温搅拌过夜, 析出产品盐酸盐, 抽滤, 滤饼用50mL无水丙酮洗涤, 滤饼于55°C烘箱中干燥。得白色固体3.75g, 收率:65.3%, HPLC纯度:98.8%, LC-MS:661.3[M+H]<sup>+</sup>。

#### [0058] 实施例4

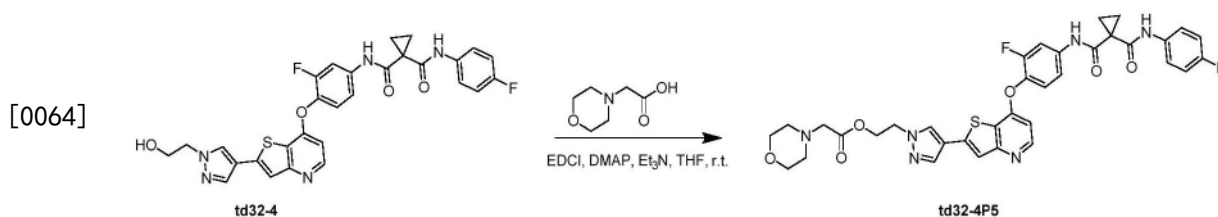
[0059] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基二乙基甘氨酸酯(td32-4P4)的合成



[0061] 以N,N-二乙基甘氨酸(2.28g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体4.49g,收率:75.1%,HPLC纯度:97.9%,LC-MS:689.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0062] 实施例5

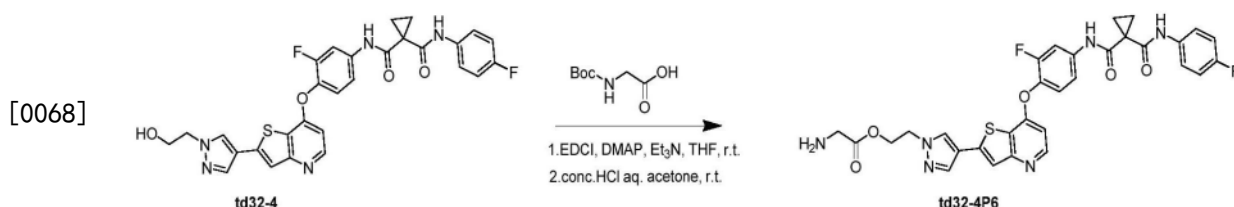
[0063] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基2-吗啉乙酸酯(td32-4P5)的合成



[0065] 以2-吗啉基乙酸(2.523g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体5.02g,收率:82.2%,HPLC纯度:96.3%,LC-MS:703.4[M+H]<sup>+</sup>。

[0066] 实施例6

[0067] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基甘氨酸酯(td32-4P6)的合成



[0069] 1) 化合物6A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)甘氨酸酯的合成

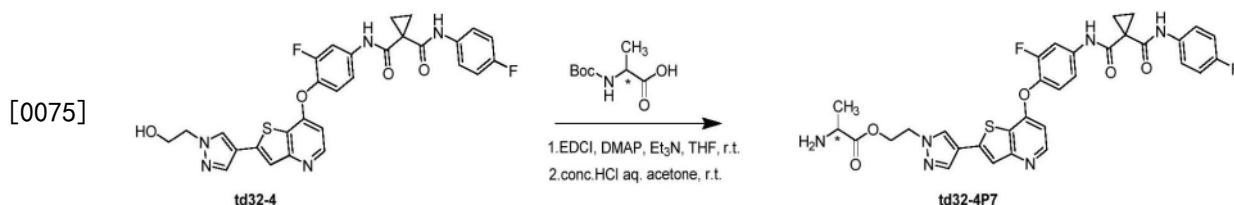
[0070] 0℃条件下,将Boc-甘氨酸(3.04g,17.4mmol)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(缩写EDCI,4g,20.9mmol)、4-二甲氨基吡啶(缩写DMAP,1.59g,13.0mmol)加入到60mL的无水四氢呋喃中,反应30分钟后,将td32-4(5g,8.7mmol)加入反应体系,转移至室温,反应24小时。反应液过滤,向滤液中加入200mL 1mol/L的稀盐酸溶液,搅拌析出白色固体,抽滤,烘干固体。中间体粗品用水/乙醇(V/V=1/1)体系重结晶处理,得到中间体6A,白色固体4.81g,收率:75.5%。

[0071] 2) 化合物td32-4P6的合成

[0072] 将中间体6A,溶于30mL无水丙酮中,加入浓盐酸2mL,40℃反应5小时,产生白色沉淀,抽滤,用20mL无水丙酮洗涤沉淀,真空干燥得到td32-4P6的盐酸盐。白色固体3.97g,收率:95.1%,HPLC纯度:98.5%,LC-MS:632.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0073] 实施例7

[0074] 2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基丙氨酸酯(td32-4P7)



[0076] 1) 化合物7A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)丙氨酸酯的合成

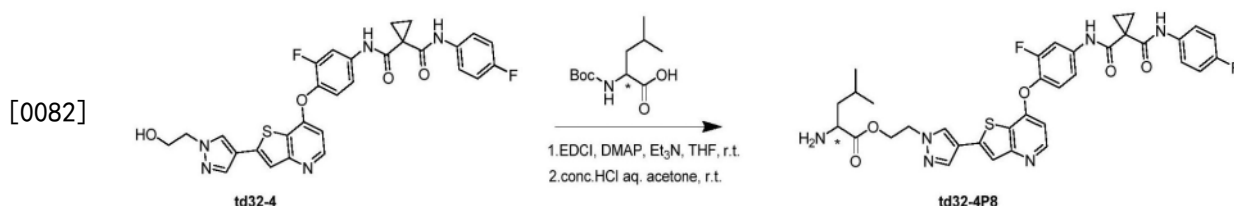
[0077] 以Boc-丙氨酸(3.29g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物7A,白色固体5.21g,收率:80.2%。

[0078] 化合物td32-4P7的合成

[0079] 以化合物7A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基丙氨酸酯(td32-4P7)盐酸盐。白色固体4.29g,收率:90.1%, HPLC纯度:98.1%, LC-MS:647.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0080] 实施例8

[0081] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基亮氨酸酯(td32-4P8)的合成



[0083] 1) 化合物8A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)亮氨酸酯的合成

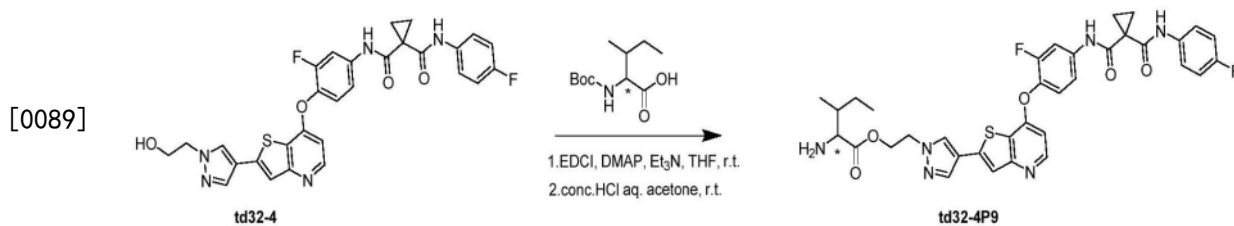
[0084] 以Boc-亮氨酸(4.02g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物8A,白色固体4.47g,收率:65.1%。

[0085] 2) 化合物td32-4P8的合成

[0086] 以化合物8A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基亮氨酸酯(td32-4P8)。白色固体3.66g,收率:89.2%, HPLC纯度:99.0%, LC-MS:689.8[M+H]<sup>+</sup>。

[0087] 实施例9

[0088] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基异亮氨酸酯(td32-4P9)的合成



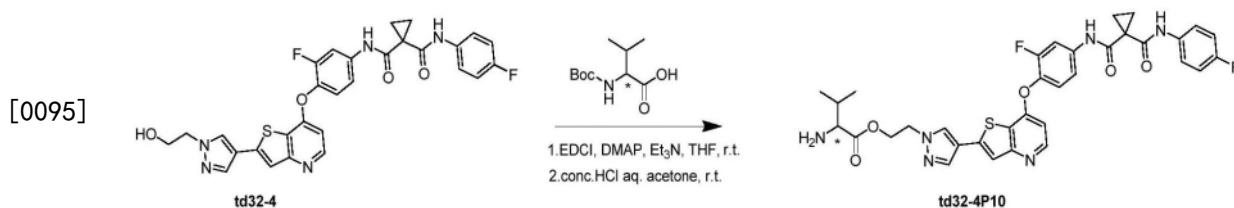
[0090] 1) 化合物9A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)异亮氨酸酯的合成

[0091] 以Boc-异亮氨酸(4.02g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物9A,白色固体4.88g,收率:71.2%。2) 化合物td32-4P9的合成

[0092] 以化合物9A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基异亮氨酸酯(td32-4P9)。白色固体3.85g,收率:85.7%,HPLC纯度:97.3%,LC-MS:689.7[M+H]<sup>+</sup>。

[0093] 实施例10

[0094] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基缬氨酸酯(td32-4P10)的合成



[0096] 1) 化合物10A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)缬氨酸酯的合成

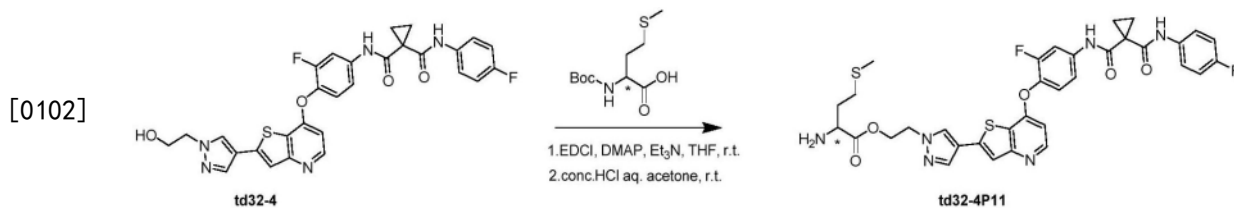
[0097] 以Boc-缬氨酸(3.77g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物10A,白色固体5.33g,收率:79.1%。

[0098] 2) 化合物td32-4P10的合成

[0099] 以化合物10A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基缬氨酸酯(td32-4P10)。白色固体4.46g,收率:91.1%,HPLC纯度:97.2%,LC-MS:675.8[M+H]<sup>+</sup>。

[0100] 实施例11

[0101] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基甲硫氨酸酯(td32-4P11)的合成



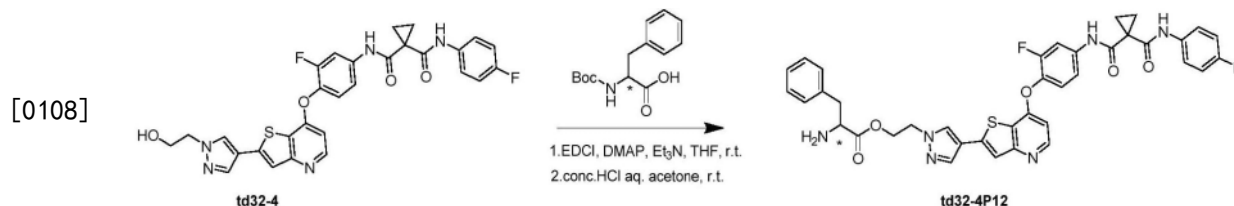
[0103] 1) 化合物11A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)甲硫氨酸酯的合成

[0104] 以Boc-甲硫氨酸(4.33g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物11A,白色固体4.64g,收率:66.1%。2)化合物td32-4P11的合成

[0105] 以化合物11A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基L-甲硫氨酸酯(td32-4P11)。白色固体4.03g,收率:94.3%,HPLC纯度:97.3%,LC-MS:707.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0106] 实施例12

[0107] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基L-苯丙氨酸酯(td32-4P12)的合成



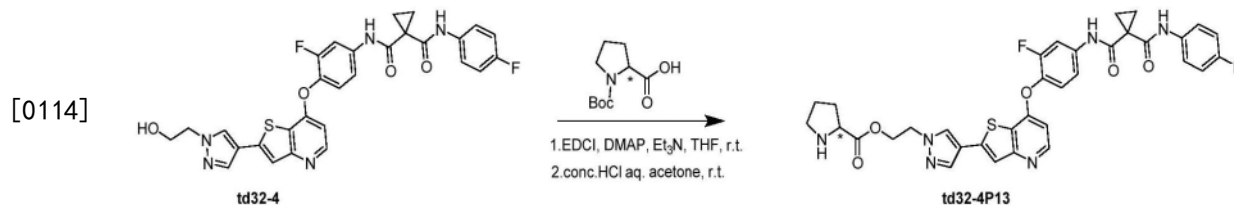
[0109] 1) 化合物12A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)苯丙氨酸酯的合成

[0110] 以Boc-苯丙氨酸(4.61g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物12A,白色固体5.07g,收率:70.8%。2)化合物td32-4P12的合成

[0111] 以化合物12A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基L-苯丙氨酸酯(td32-4P12)的盐酸盐。白色固体4.38g,收率:93.6%,HPLC纯度:98.1%,LC-MS:723.8[M+H]<sup>+</sup>。

[0112] 实施例13

[0113] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基脯氨酸酯(td32-4P13)的合成



[0115] 1) 化合物13A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)脯氨酸酯的合成

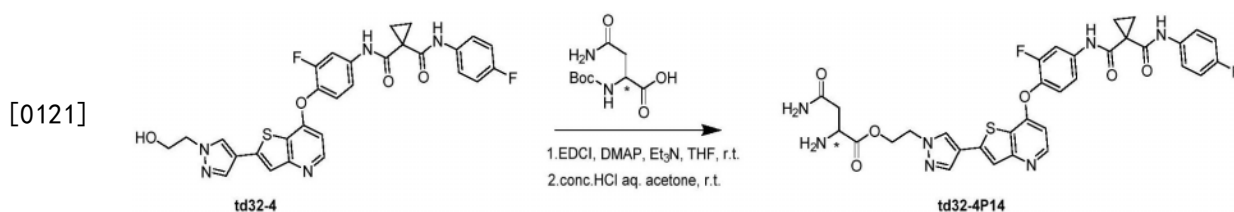
[0116] 以Boc-脯氨酸(3.74g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物13A,白色固体6.72g,收率:77.4%。

[0117] 2) 化合物td32-4P13的合成

[0118] 以化合物13A为原料,参考实施例6中td32-4P6合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基L-脯氨酸酯(td32-4P13)盐酸盐。白色固体4.27g,收率:89.4%,HPLC纯度:95.1%,LC-MS:673.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0119] 实施例14

[0120] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基天冬酰胺酯(td32-4P15)的合成



[0122] 1) 化合物14A的合成

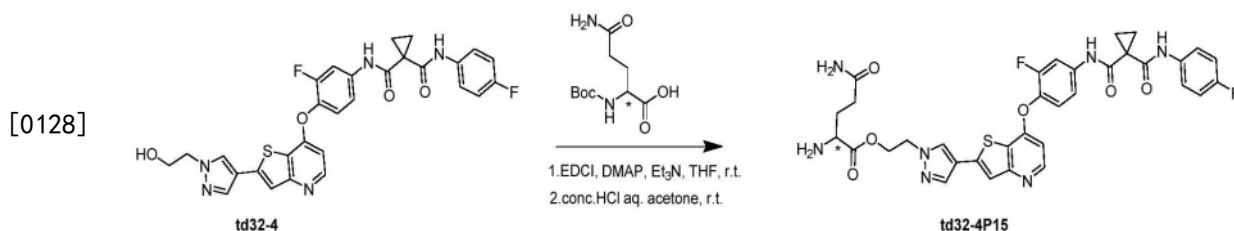
[0123] 2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)天冬酰胺酯

[0124] 以Boc-天冬酰胺(4.03g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物14A,白色固体4.05g,收率:58.9%。2) 化合物td32-4P14的合成

[0125] 以化合物14A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基天冬酰胺酯(td32-4P14)盐酸盐。白色固体3.17g,收率:85.3%,HPLC纯度:97.9%,LC-MS:691.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0126] 实施例15

[0127] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基谷氨酰胺酯(td32-4P15)的合成



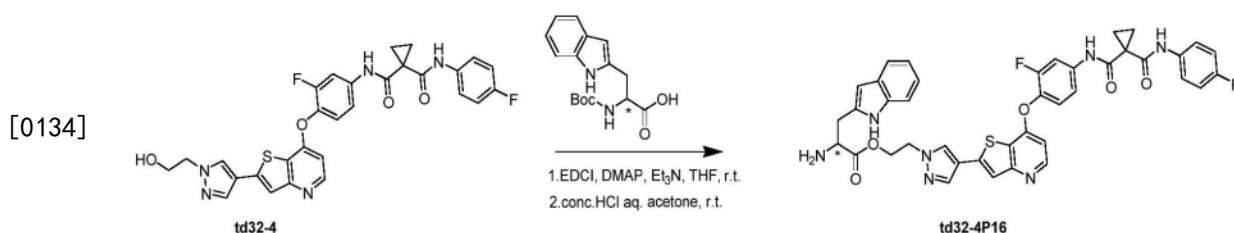
[0129] 1) 化合物15A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)谷氨酰胺酯的合成

[0130] 以Boc-谷氨酰胺(4.28g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物15A,白色固体3.90g,收率:55.8%。2) 化合物td32-4P15的合成

[0131] 以化合物15A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基L-谷氨酰胺酯(td32-4P15)盐酸盐。白色固体2.99g,收率:83.3%,HPLC纯度:99.0%,LC-MS:704.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0132] 实施例16

[0133] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基色氨酸酯(td32-4P16)的合成



[0135] 1) 化合物16A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(叔丁氧羰基)色氨酸酯的合成

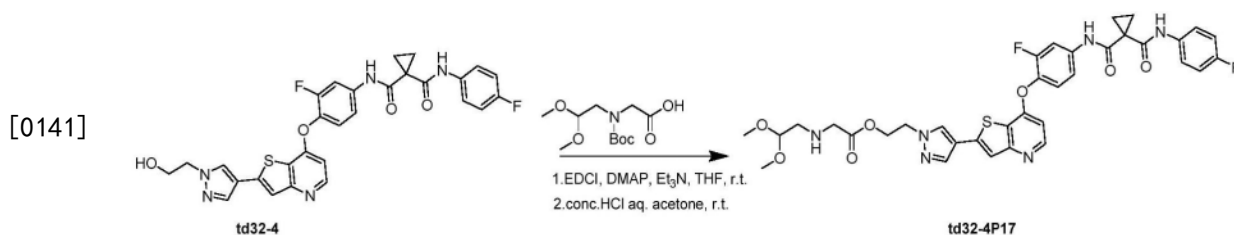
[0136] 以Boc-色氨酸(5.29g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物16A,白色固体4.89g,收率:65.3%。

[0137] 2) 化合物td32-4P16的合成

[0138] 以化合物16A为原料,参考实施例7中td32-4P7的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基L-色氨酸酯(td32-4P16)盐酸盐。白色固体3.48g,收率:76.7%, HPLC纯度:94.6%, LC-MS:762.7[M+H]<sup>+</sup>。

[0139] 实施例17

[0140] 2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(2,2-二甲氧乙基)甘氨酸酯(td32-4P17)



[0142] 1) 化合物17A:2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(2,2-二甲氧乙基)(叔丁氧羰基)甘氨酸酯的合成

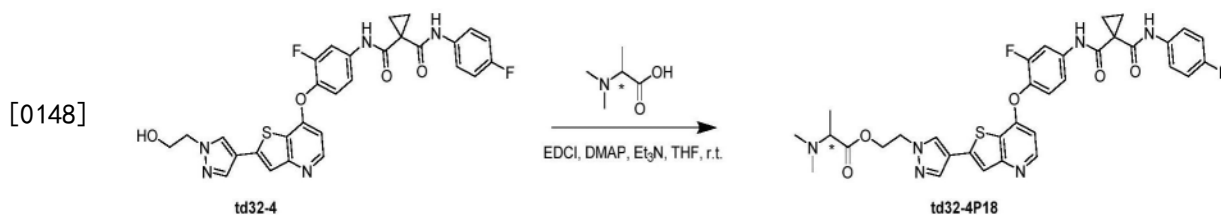
[0143] 以N-Boc-N-(2,2-二甲氧乙基)甘氨酸(4.57g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例6中6A的合成方法,得到化合物17A,白色固体5.50g,收率:77.1%。

[0144] 2) 化合物td32-4P17的合成

[0145] 以化合物17A为原料,参考实施例6中td32-4P6的合成方法,得到化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基(2,2-二甲氧乙基)甘氨酸酯(td32-4P17)盐酸盐。白色固体4.53g,收率:89.3%, HPLC纯度:93.5%, LC-MS:721.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0146] 实施例18

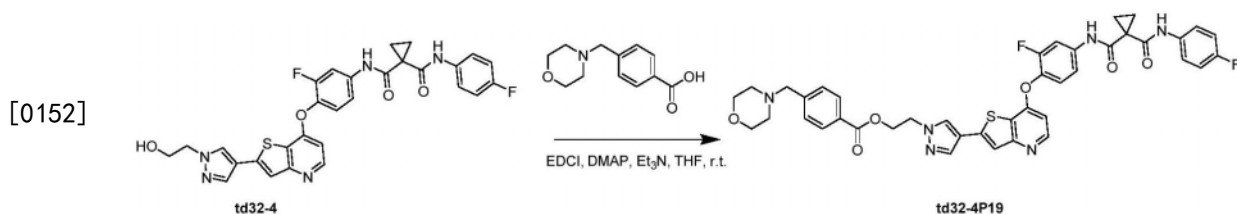
[0147] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基N,N-二甲基丙氨酸酯(td32-4P18)的合成



[0149] 以N,N-二甲基丙氨酸(2.03g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体5.86g,收率:76.1%,HPLC纯度:93.3%,LC-MS:675.3[M+H]<sup>+</sup>。

[0150] 实施例19

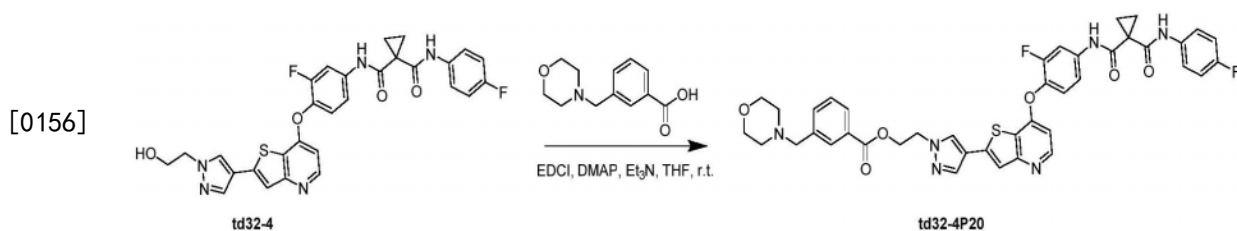
[0151] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基4-(吗啉基甲基)苯甲酸酯(td32-4P19)的合成



[0153] 以4-(吗啉基甲基)苯甲酸(3.84g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体4.50g,收率:66.5%,HPLC纯度:95.9%,LC-MS:780.1[M+H]<sup>+</sup>。

[0154] 实施例20

[0155] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基3-(吗啉基甲基)苯甲酸酯(td32-4P20)的合成

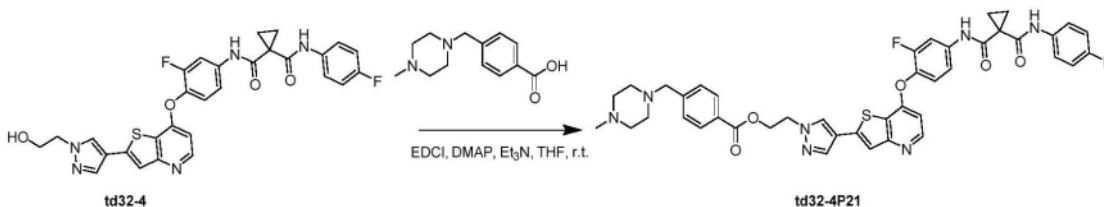


[0157] 以3-(吗啉基甲基)苯甲酸(3.84g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体4.68g,收率:69.1%,HPLC纯度:95.2%,LC-MS:779.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0158] 实施例21

[0159] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基4-((甲基哌嗪-1-基)甲基)苯甲酸酯(td32-4P21)的合成

[0160]

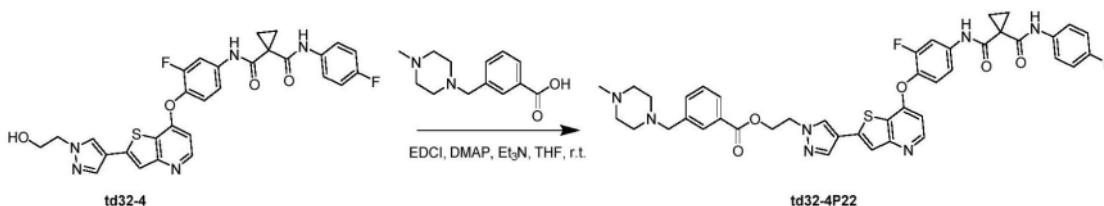


[0161] 以4-((甲基哌嗪-1-基)甲基)苯甲酸(4.07g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体4.14g,收率:60.1%,HPLC纯度:96.4%,LC-MS:793.0[M+H]<sup>+</sup>。

[0162] 实施例22

[0163] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基3-((甲基哌嗪-1-基)甲基)苯甲酸酯(td32-4P22)的合成

[0164]

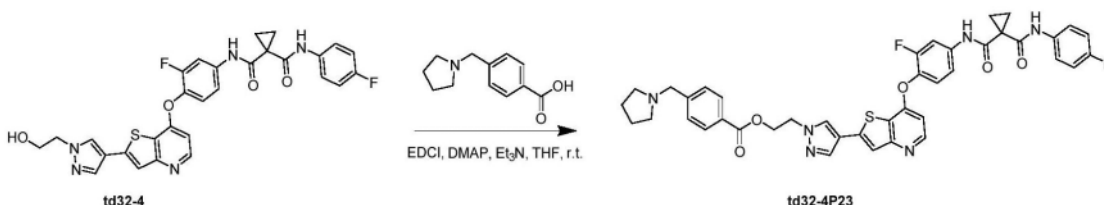


[0165] 以3-((甲基哌嗪-1-基)甲基)苯甲酸(4.07g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体3.91g,收率:56.8%,HPLC纯度:93.9%,LC-MS:792.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0166] 实施例23

[0167] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基4-(吡咯-1-基甲基)苯甲酸酯(td32-4P23)的合成

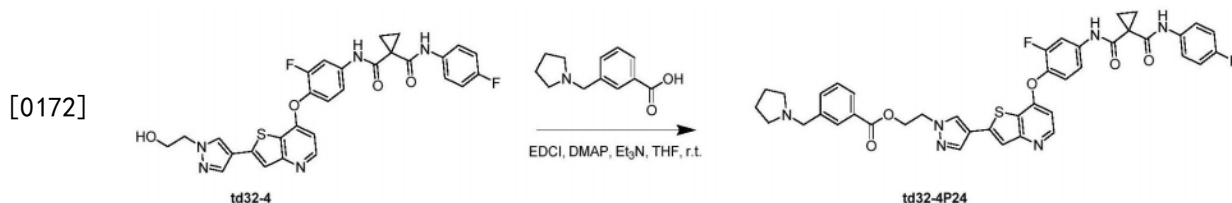
[0168]



[0169] 以4-(吡咯-1-基甲基)苯甲酸(3.57g,17.4mmol)、td32-4(5g,8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体3.67g,收率:55.4%,HPLC纯度:96.6%,LC-MS:763.9[M+H]<sup>+</sup>。

[0170] 实施例24

[0171] 化合物2-(4-(7-(2-氟-4-(1-((4-氟苯基)氨基甲酰基)环丙烷-1-甲酰胺)苯氧基)噻吩并[3,2-b]吡啶-2-基)-1H-吡唑基-1-基)乙基3-(吡咯-1-基甲基)苯甲酸酯(td32-4P24)的合成



[0173] 以3-(吡咯-1-基甲基)苯甲酸(3.57g, 17.4mmol)、td32-4(5g, 8.7mmol)为原料,参照实施例3的合成方法,得到白色固体3.04g,收率:45.8%,HPLC纯度:97.5%,LC-MS:763.8[M+H]<sup>+</sup>。

[0174] 实施例25溶解度测试

[0175] 对实施例1-24所合成的系列化合物进行溶解度测试(水),溶解度测试方法参考2015版《中国药典》。具体试验操作与评价标准如下:

[0176] 称取研磨成细粉状的化合物粉末适量(1mg~10mg),置于25℃±2℃,一定容量的溶剂中,每隔5分钟强力振摇30秒;观察30分钟内的溶解情况,如无目视可见的溶质颗粒或液滴时,即视为完全溶解。

[0177]	A 极易溶解	溶质 1g 能在溶剂不到 1mL 中溶解
	B 易溶	溶质 1g 能在 1~10 mL 溶剂中溶解
	C 溶解	溶质 1g 能在 10~30 mL 溶剂中溶解
	D 略溶	溶质 1g 能在 30~100 mL 溶剂中溶解
[0178]	E 微溶	溶质 1g 能在 100~1000 mL 溶剂中溶解
	F 极微溶解	溶质 1g 能在 1000~10000 mL 溶剂中溶解
	G 几乎不溶或不溶	溶质 1g 在 10000 mL 溶剂中不溶解

[0179] 化合物水中溶解性测试结果如表1所示:

[0180] 表1化合物在水中的溶解度测试

[0181]

Compd.	Result	Compd.	Result	Compd.	Result
td32-4P1	F	td32-4P10	C	td32-4P19	F
td32-4P2	F	td32-4P11	E	td32-4P20	F
td32-4P3	C	td32-4P12	F	td32-4P21	D
td32-4P4	C	td32-4P13	E	td32-4P22	D
td32-4P5	C	td32-4P14	D	td32-4P23	D
td32-4P6	C	td32-4P15	D	td32-4P24	D
td32-4P7	D	td32-4P16	F	td32-4	G
td32-4P8	E	td32-4P17	E		
td32-4P9	D	td32-4P18	D		

[0182] 实验结果表明,本发明涉及的化合物水溶解性均明显好于td32-4,能够解决td32-4低溶解度引起的口服吸收差等问题,有望开发为新型多靶点酪氨酸激酶抑制剂抗肿瘤药物。

[0183] 实施例26体内转化实验

[0184] 本发明涉及的化合物将亲水性官能团通过酯键的方式引入到td32-4结构中来增加化合物的溶解度。在口服进入体内后,需要在体内物理、化学环境下转化为td32-4发挥药理作用。本实施例选择部分代表性化合物,进行SD大鼠体内药动学实验研究,并与直接口服td32-4作比对。实验选用高( $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、低( $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )两种剂量进行。

[0185] 实验材料:

[0186] SD雄性鼠,SPF级。上海西普尔-必凯实验动物有限公司。其它试剂均为市售产品。

[0187] 1) 溶液配制:

[0188] 静脉溶媒:DMA+PEG400+Saline

[0189] 称取供试品5mg至玻璃瓶中。加入1mL的DMA(二甲基乙酰胺),涡旋振荡,使固体物质完全溶解。加入1.5mL的PEG400,涡旋振荡,混匀。加入2.5mL的注射用生理盐水,涡旋振荡,混匀,使用过滤膜(PALL,Nylon,0.45 $\mu\text{m}$ )过滤,得无色澄清溶液。供试品以 $5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ( $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )剂量经尾静脉注射给予实验动物( $n=3$ )。

[0190] 口服溶媒:PEG400

[0191] 称取供试品适量至玻璃瓶中。加入PEG400,涡旋振荡,混匀。超声得澄清溶液。供试品以 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量经灌胃给予实验动物( $n=3$ )。

[0192] 2) 试验方法:

[0193] 给药前称重SD大鼠,根据体重,计算给药量。通过静脉注射或灌胃口服给药。按0,0.083,0.25,0.5,1,2,4,8,12,24小时间隔,经颌下静脉或其他合适方式采血,每个样品采集约0.20mL,EDTA-K2抗凝,采集后放置冰上。并于1小时之内离心分离血浆(离心条件:6800g,6分钟,2-8 $^{\circ}\text{C}$ )。血浆样本在分析前存放时则放于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。使用LC-MS/MS进样分析各样品的血药浓度。通过不同时间点的血药浓度数据,运用Phoenix WinNonlin7.0计算药代动力学参数,提供AUC<sub>0-t</sub>、AUC<sub>0- $\infty$</sub> 、MRT<sub>0- $\infty$</sub> 、C<sub>max</sub>、T<sub>max</sub>、和T<sub>1/2</sub>等参数及其平均值和标准差。本发明涉及的化合物,静脉给药4小时候后全部转化为td32-4,其数据视为100%生物利用度,用作计算口服利用度。

[0194] 3) 代表性实验结果如下:

[0195] 化合物td32-4:

[0196] 在 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的血药浓度数据如下,通过计算可以得出,在低浓度下,化合物td32-4的口服生物利用度达83.96%,但在高浓度下急剧下降,仅18.6%。很可能是高浓度下化合物在胃肠道聚集沉淀,导致无法吸收入血液循环,结果见图1所示。

[0197] 化合物td32-4P3低浓度:

[0198] 如图2所示,td32-4P3在按照 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量口服给药时,在体内能够转化成td32-4,且由td32-4P3体内转化的td32-4的暴露量(药时曲线下面积AUC)与直接口服化合物td32-4接近,表明td32-4P3在体内快速转化为td32-4。按照td32-4的暴露量计算其口服生物利用度 $F=70.2\%$ 。

[0199] 化合物td32-4P3高浓度:

[0200] 如图3所示,化合物td32-4P3在按照 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量口服给药时,在体内能够转化成td32-4,转化得到的td32-4的暴露量(药时曲线下面积AUC)高于直接高剂量口服化合物td32-4。td32-4P3在体内18小时几乎完全转化为td32-4,按照td32-4的暴露量计算口服

生物利用度 $F=60.1\%$ ，远高于直接口服td32-4的 $F=18.6\%$ 。

[0201] 化合物td32-4P10低浓度：

[0202] 如图4所示，td32-4P10在按照 $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量口服给药时，在体内能够转化成td32-4，转化而来的td32-4的暴露量(药时曲线下面积AUC)与直接口服td32-4接近。td32-4P3在体内快速转化为td32-4。按照转化而来的td32-4的暴露量计算口服生物利用度 $F=48.9\%$ 。

[0203] 化合物td32-4P10高浓度：

[0204] 如图5所示，td32-4P10在按照 $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量口服给药时，在体内能够转化成td32-4，转化成的td32-4的暴露量(药时曲线下面积AUC)高于高剂量口服td32-4。td32-4P10在体内18小时几乎完全转化为td32-4。按照转化成的td32-4的暴露量计算口服生物利用度 $F=44.8\%$ 。(直接口服td32-4的 $F=18.6\%$ )

[0205] 实验结果汇总如下(表2)：

[0206] 表2:部分化合物的口服生物利用度(按照血浆中td32-4计算)

[0207]

Compd.	F% (10 mpk)	F% (200 mpk)	Compd.	F% (10 mpk)	F% (200 mpk)
td32-4	83.4%	18.6%	td32-4P10	48.9%	44.8%
td32-4P1	50.2%	20.1%	td32-4P13	48.7%	19.9%
td32-4P2	45.1%	15.3%	td32-4P19	45.1%	20.0%
td32-4P3	70.2%	60.1%	td32-4P21	38.9%	17.3%
td32-4P5	66.9%	45.6%	td32-4P22	41.1%	21.2%
td32-4P6	71.3%	55.7%	td32-4P23	30.8%	25.1%
td32-4P9	45.1%	41.9%	td32-4P24	35.1%	22.6%

[0208] 通过代表性化合物td32-4P3、td32-4P10的药代动力学实验数据可以看出，本发明申请中的化合物能够在体内表现出明显优于td32-4的药动力学性质，特别是在大剂量( $200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )时，其口服生物利用度大幅度提高，提高了td32-4的血药浓度。本发明的化合物通过改善了化合物的溶解度，能够一定程度上解决td32-4类化合物药性差的难题。

[0209] 实施例27体内药效学测试

[0210] 选用化合物(td32-4、td32-4P3、td32-4P6、td32-4P9、td32-4P10)进行单浓度体内活性评价，动物模型选能用胃癌细胞MKN45异种移植瘤模型。

[0211] 试验方法： $5\times 10^6$ 个MKN-45胃癌细胞接种于裸鼠右侧肋部脂肪垫下，观察成瘤情况，接种两周后，对荷瘤小鼠进行分组，分别给药td32-4和td32-4P3、td32-4P6、td32-4P9、td32-4P10，口服给药，给药剂量为 $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，每天给药一次共14天。用游标卡尺测量肿瘤体积并记录。

[0212] 实验结果表明td32-4P3/9/10在裸鼠模型中均表现出强效的肿瘤抑制作用。td32-4P6表现出中等抑制活性,而相同剂量下,由于溶解度限制了生物利用度,td32-4并未表现出明显活性,数据结果见图6所示。

[0213] 本发明对化合物td32-4进行结构修饰,引入亲水结构片段,能够显著提高化合物的水溶性,实验证明化合物经口服吸收后,能够转化为td32-4,发挥抗肿瘤活性。经过药代动力学实验验证,能够克服td32-4固有的口服吸收差的缺陷。在荷瘤小鼠中表现出强效的肿瘤抑制活性,有望开发成为新型多靶点抗肿瘤药物。

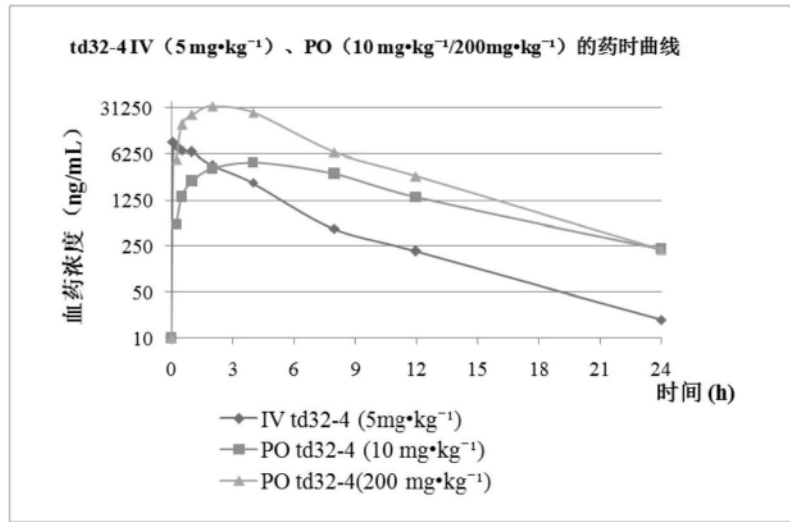


图1

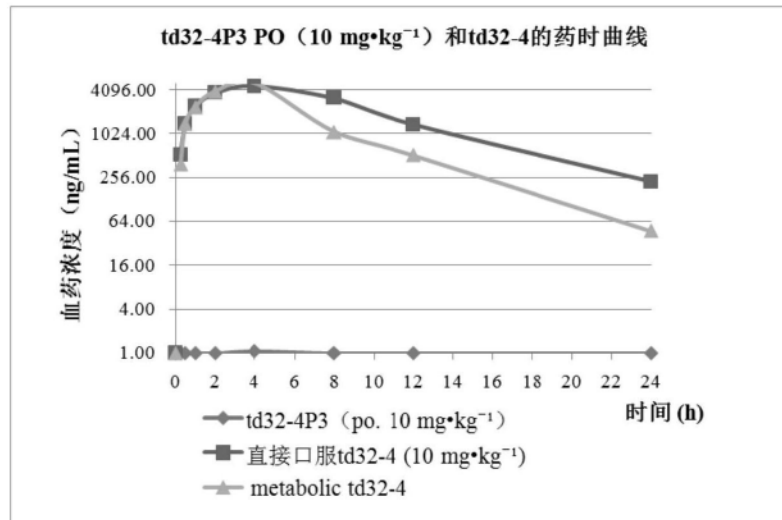


图2

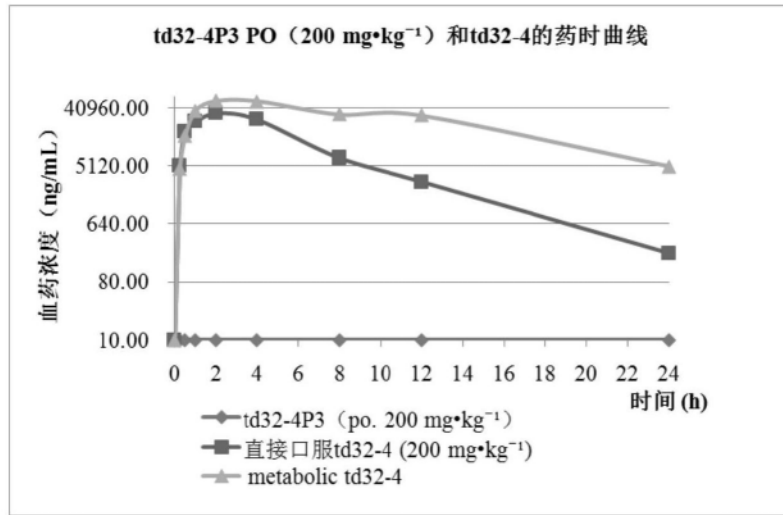


图3

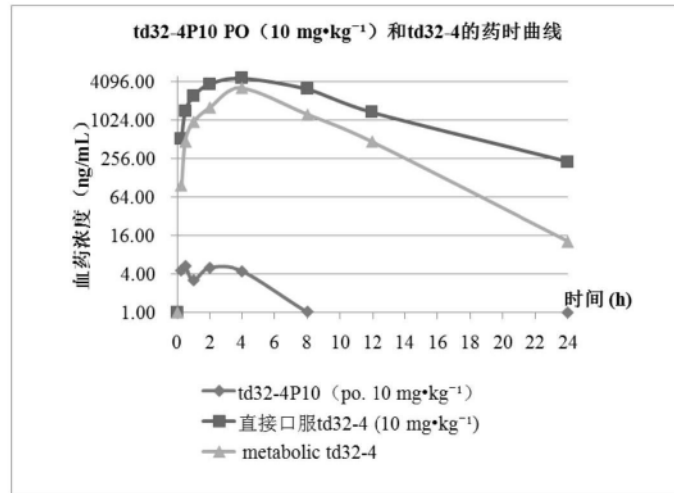


图4

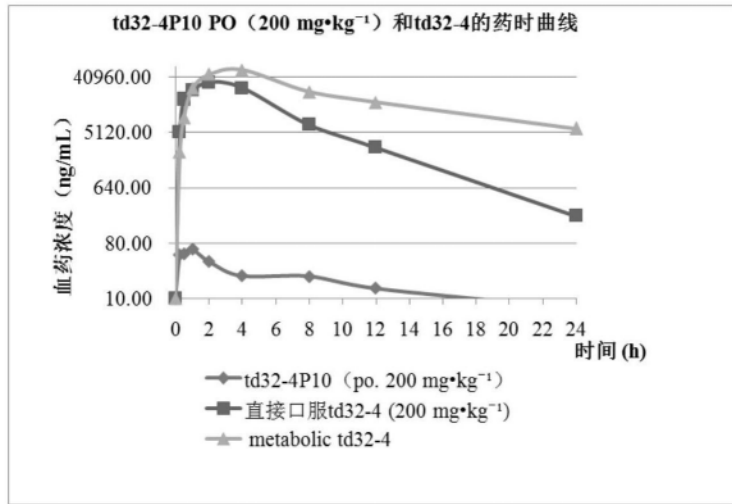


图5

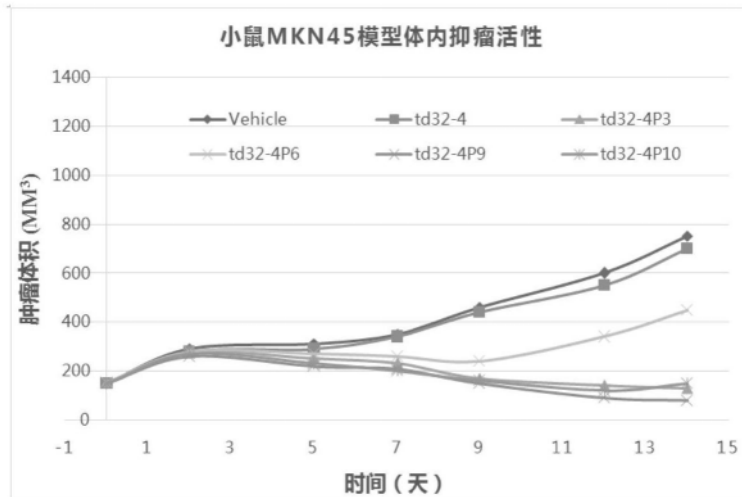


图6