

(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
2008 年 8 月 21 日 (21.08.2008)

(10) 国际公布号
WO 2008/098485 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 239/94 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)

(74) 代理人: 中国专利代理(香港)有限公司(CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.); 中国香港特别行政区湾仔港湾道23号鹰君中心22号楼, Hong Kong (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2008/000318

(22) 国际申请日: 2008 年 2 月 4 日 (04.02.2008)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200710037557.2
2007 年 2 月 14 日 (14.02.2007) CN

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

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 上海艾力斯医药科技有限公司(SHANGHAI ALLIST PHARMACEUTICALS, INC.) [CN/CN]; 中国上海市张江科技园区蔡伦路780号4楼, Shanghai 201203 (CN)。

(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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 郭建辉(GUO, Jianhui) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区蔡伦路780号4楼, Shanghai 201203 (CN)。姜勇(JIANG, Yong) [CN/CN]; 中国上海市张江高科技园区蔡伦路780号4楼, Shanghai 201203 (CN)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

(54) Title: THE SALTS OF 4-ANILINE QUINAZOLINE DERIVATIVE

(54) 发明名称: 4-苯胺喹唑啉衍生物的盐

(57) Abstract: The salts of N-{4-[3-chloro-4-(3-fluoro-benzyloxy)phenylamino]-quinazoline-6-yl}-acrylamide, preparation methods, compositions containing the same and their uses thereof. The present salts have excellent anti-tumour activity, good bioavailability in vitro and in vivo in animals and low toxicity, so they are suitable for anti-tumour medicaments.

(57) 摘要:

本发明提供 *N*-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酸酰胺的成盐形式、其制备方法、包含该成盐形式的药物组合物及该成盐形式的应用。本发明的盐具有优异肿瘤抑制活性, 且在动物体内的生物利用度良好、毒性低, 适于制备抗肿瘤用的制剂。

WO 2008/098485 A1

4-苯胺喹唑啉衍生物的盐

技术领域

- 本发明涉及 4-苯胺喹唑啉衍生物的盐。具体的说，本发明涉及
- 5 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺的成盐形式、其制备方法、包含该成盐形式的药物组合物及该成盐形式在预防和/或治疗肿瘤中的应用。

背景技术

- 10 癌症被认为是由细胞内信号传导系统或信号传导机制介导的疾病。细胞接受许多来自细胞外的指令，指导细胞是否增殖，信号传导系统的目的是接受细胞表面的这些或其它信号，将其导入细胞内，然后将这些信号传递到细胞核、细胞骨架，影响基因的转录和蛋白质的合成。

- 15 癌症的最常见病因是一系列的缺损，所述缺损可以是某些蛋白质的缺损(当其突变时)，或者是对细胞内蛋白质的量的调节的缺损，从而使蛋白过度产生或产生不足。通常，在细胞内存在重要损伤，该损伤导致组成型状态，由此使细胞核收到增殖信号，而事实上这些信号并不存在。这可以通过多种机制发生。有时细胞会在不应该的情况下
- 20 开始生产其自身受体的真正的生长因子，所谓的自分泌环机制。

细胞表面存在大量的受体，生长因子与这些受体的相互作用是细胞生长正常调节的必需事件。然而，在某些条件下，由于这些受体或者突变或者过量表达，这些受体可变为异常，其结果是细胞繁殖不受控制，最终导致肿瘤的生长。

- 25 表皮生长因子受体(EGFR)被确定为在细胞生长和繁殖过程中至关重要的驱动因素。在常见的肿瘤，如非小细胞肺癌中，表皮生长因子受体大量表达，远远超出正常范围。表皮生长因子受体家族由 EGFR(Erb-B1)、Erb-B2(HER-2/neu)、Erb-B3 和 Erb-B4 组成。表皮生长因子受体与大部分癌症的疾病进程有关，特别是结肠癌和乳腺癌。
- 30 该受体的过度表达和突变已被明确证实是预后不好的乳腺癌的主要危险因素。此外，已证实该受体家族的所有四个成员均可与该家族的其它成员聚合为异源二聚体，形成信号传导复合物，如果该家族中有一个以上的成员在恶性肿瘤中过度表达，便可导致协同的信号传导作

用。

EGFR 属于蛋白酪氨酸激酶(PTK)家族, 蛋白酪氨酸激酶是一类将磷酸基团从 ATP 催化转移到位于蛋白质底物的酪氨酸残基上的酶。蛋白酪氨酸激酶在正常细胞生长中起作用。EGFR 的过度表达, 5 导致该受体在缺乏配体的条件下被激活, 使某些蛋白发生磷酸化, 产生了细胞分裂的信号。因此, EGFR 通过自身酪氨酸激酶的作用, 导致了弱信号的过度放大, 引起了细胞的过量增殖。

由于异常的受体酪氨酸激酶在癌发病机理中所起作用的重要性, 因此最近的许多研究都涉及作为潜在抗癌治疗药物的特异的 PTK 抑制剂的研制。欧洲专利申请 EP520722 A1 公开了某些 4-苯胺基间二氮杂萘具有 PTK 抑制剂活性。欧洲专利申请 EP566226 A1 公开了在位置 5-8 含有许多取代基的 4-苯胺基间二氮杂萘具有 PTK 抑制剂活性。从欧洲专利申请 EP635498 A1 得知, 在位置 6 含有许多取代基、在位置 7 必须有一个卤素取代的某些 4-苯胺基间二氮杂萘也具有 15 PTK 抑制剂活性。

WO 96/30347(中国专利 CN96102992)涉及一些 4-(取代苯胺基)喹唑啉衍生物、其前药和其药学上可接受的盐, 用于治疗过度增生疾病。

WO97/38983(中国专利 CN97194458)提供了作为酪氨酸激酶不可逆抑制剂的化合物。 20

WO99/35146(中国专利 CN99803887)公开了作为蛋白酪氨酸激酶抑制剂的二环杂芳族化合物。

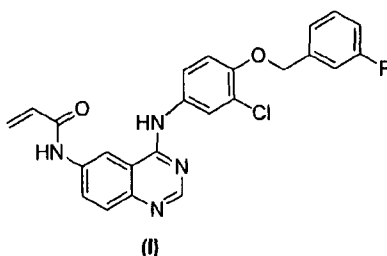
WO00/06555(中国专利 CN99808949)也涉及某些取代的喹唑啉的衍生物具有 PTK 抑制剂活性。

WO2006/071017 提及了某些能抑制癌细胞生长的喹唑啉衍生物。 25

本申请的申请人于 2006 年 10 月 20 日提交的申请 PCT/CN2006/002786 描述了一类新型的 4-苯胺喹唑啉衍生物, 以及其作为 PTK 抑制剂的应用。其中, 实施例 8 制备的化合物为 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺, 实验证明其对 30 人表皮样鳞癌细胞 A431、人乳腺癌细胞 BT-474 有较好的抑制生长的作用, 对移植于裸鼠的人表皮样鳞癌 A431 的抑瘤作用明显。体外实验证明该化合物对 Erb-B2 激酶有优越的抑制活性。所述文献通过引用以全文并入本文。

发明内容

- 本发明所要解决的技术问题是提供新颖的 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺 (如下式结构 I) 成盐形式、
- 5 其制备方法, 包含该成盐形式的药物组合物及该成盐形式在预防和/或治疗肿瘤中的应用。该成盐形式具有优异肿瘤抑制活性, 且在动物体内的生物利用度良好、毒性低, 适于制备抗肿瘤用的制剂。



- 10 本发明的第一方面, 提供了一种式(I)化合物在药学上可接受的盐。在本发明中, 所述“药学上可接受的盐”是指在药学上无毒的酸加成盐和碱加成盐。所述酸加成盐为式(I)化合物与合适的无机酸或者有机酸形成的盐, 包括例如氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、碳酸盐、碳酸氢盐、亚硫酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、乙酸盐、草酸盐、
- 15 丙二酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、酒石酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、甲苯甲酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、苹果酸盐、双羧基酸盐、水杨酸盐、香草酸盐、扁桃酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、乳糖酸盐和月桂基磺酸盐等。所述碱加成盐为式(I)化合物与合适的无机碱或者
- 20 有机碱形成的盐, 包括例如与碱金属、碱土金属、季铵阳离子形成的盐, 如钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐、四甲基季铵盐、四乙基季铵盐等; 胺盐, 包括与氨(NH₃)、伯胺、仲胺或叔胺形成的盐, 如: 甲胺盐、二甲胺盐、三甲胺盐、三乙胺盐、乙胺盐等, 特别是三乙胺盐。
- 25 在本发明提供的进一步优选的方案中, 所述盐是酸加成盐, 包括无机酸盐和有机酸盐, 其中所述无机酸盐可以选自氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、亚硫酸盐、磷酸盐或者硼酸盐; 其中所述有机酸盐可以选自乙酸盐、草酸盐、丙二酸盐、戊酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、酒石酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、甲苯甲酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富

马酸盐、苹果酸盐、双羟萘酸盐、水杨酸盐、香草酸盐、扁桃酸盐或者琥珀酸盐；更优选的酸加成盐为盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐、碳酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、水杨酸盐、草酸盐、乙酸盐、戊酸盐、丙二酸盐或者酒石酸盐，特别是盐酸盐、硫酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、草酸盐或者酒石酸盐。

在本发明提供的最优选方案中，所述盐为盐酸盐或者对甲苯磺酸盐。

本发明的第二方面，提供了一种制备本发明所述药学上可接受的盐的制备方法，通过采用合适的酸或者碱处理 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺得到所述的盐，包括步骤：

- (a) 将 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺溶于合适的有机溶剂中，在搅拌条件下滴加含相应酸或相应碱的溶剂；
- (b) 直接过滤或经浓缩后过滤得到固体，水洗，干燥后得到所述的盐。

其中所述的有机溶剂可以例如选自甲醇、乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺、乙醚或者 1,4-二氧六环或者其混合溶剂；所述的酸包括无机酸如氢溴酸、盐酸、硫酸、碳酸、亚硫酸、磷酸、硼酸，有机酸如乙酸、草酸、丙二酸、戊酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸、月桂酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、酒石酸、苯甲酸、乳酸、甲苯甲酸、柠檬酸、马来酸、富马酸、苹果酸、双羟萘酸、水杨酸、香草酸、扁桃酸、琥珀酸、葡萄糖酸、乳糖酸和月桂基磺酸等；所述的碱包括无机碱和有机碱，如碱金属的、碱土金属的或季铵的氢氧化物或碳酸盐，氨水，甲胺，二甲胺，三甲胺，三乙胺，乙二胺等。

通常，上述制备过程可以在冷却、常温或者加热条件下进行，值得注意的是反应温度的选择对不同的成盐反应有一定影响，这也是在本领域技术人员知识范畴内的。本发明成盐反应温度为 -10°C ~ 所用溶剂的沸点，优选 0°C ~ 40°C ，本领域技术人员通过本领域常规的技术手段就能容易地确定具体成盐反应的最优反应温度。

以制备本发明优选的盐酸盐为一具体例子，该方法包括：

- (a) 将 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺溶于乙酸乙酯/三乙胺或者四氢呋喃/三乙胺中，缓慢滴加 HCl/1,4-二氧六环溶液，有固体析出；

(b) 停止搅拌, 过滤, 水洗, 干燥后得到 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺盐酸盐。

以制备本发明优选的对甲苯磺酸盐为另一具体例子, 该方法包括:

5 (a) 将 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺溶于甲醇/四氢呋喃混合溶剂中, 缓慢滴加对甲苯磺酸的甲醇/四氢呋喃混合溶液, 有固体析出;

(b) 停止搅拌, 过滤, 水洗, 干燥后得到 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺对甲苯磺酸盐。

10 此外, 还可以通过本领域已知的其他用于制备胺的酸加成盐的方法制备 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺酸加成盐。

本发明的第三方面, 提供了一种药物组合物, 它含有本发明所述的盐和药学上可接受的载体。

15 所述药物组合物可给药于哺乳动物(如人), 可以口服、直肠、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)、局部等方式给药。使用药物组合物时, 将治疗或预防有效量的本发明所述盐施用于需要治疗或预防的哺乳动物(如人)。术语“治疗或预防有效量”指的是足以在哺乳动物(如人)体内引起兽医或临床医师所探求的生物或医学反应的活性化合物的量。普通的医师、兽医和临床医师可容易地确定治疗或预防指定疾病所需的本发明盐的有效量。一般, 为每天 0.01~20mg/kg 患者体重, 20 优选每天 0.1~10mg/kg 患者体重。更具体而言, 对于 60kg 体重的人, 日给药剂量通常为 1~1000mg, 优选 20~500mg。当然, 具体剂量还应考虑给药途径, 患者的年龄、性别、体重和健康状况, 以及被治疗的特定状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围内的。在本文中使用的术语“哺乳动物”包括但不限于猫、狗、兔、山羊、绵羊、大鼠、25 小鼠和人等, 特别优选人。

所述药物组合物可以配制为用于口服给药的固体剂型, 包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂、颗粒剂和糖丸等。在这些固体剂型中, 本发30 明提供的盐可以与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合, 所述惰性赋形剂(或载体)包括但不限于: (a) 填料或增溶剂, 例如, 淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸; (b) 粘合剂, 例如, 羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶; (c) 保湿

剂, 例如, 甘油; (d) 崩解剂, 例如, 琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、聚乙烯基聚吡咯烷酮和碳酸钠; (e) 缓溶剂, 例如石蜡; (f) 吸收加速剂, 例如, 季胺化合物; (g) 润湿剂, 例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯; (h) 吸附剂, 例如, 高岭土; 5 和(i) 润滑剂, 例如, 滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠, 或其混合物。胶囊剂、片剂和丸剂中, 剂型也可包含缓冲剂。

固体剂型如片剂、糖丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可采用包衣和壳材制备, 如肠衣和其它本领域公知的材料。它们可包含不透明剂, 并且, 这种组合物中活性化合物的释放可以延迟的方式在消化道内的某一部分中释放。必要时, 活性化合物也可与上述赋形剂中的一种或多10 种形成微胶囊形式。

所述药物组合物也可以配制为用于口服给药的液体剂型, 包括药15 学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆或酏剂等。除了本发明提供的盐作为活性化合物外, 液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂, 如水或其它溶剂, 增溶剂和乳化剂, 例如, 乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油, 特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油, 或这些物质的混合物等。除了这些惰性稀释剂外, 组合物也可包含助剂, 如20 润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。

当本发明盐以悬浮液存在时, 除了本发明提供的盐外, 悬浮液可包含悬浮剂, 例如, 乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物等。

所述药物组合物可以配制为用于肠胃外注射的剂型, 包括生理上25 可接受的无菌含水或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液, 和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂可用于制备所述无菌含水或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

30 所述药物组合物可以配制为用于局部给药的剂型, 包括软膏剂、散剂、贴剂、喷射剂和吸入剂。本发明提供的盐可在无菌条件下与生理上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂, 或必要时可能需要的推进剂一起混合。

另一方面,本发明所述的盐可用于制备由蛋白酪氨酸激酶介导的疾病的治疗或者预防药物,所述疾病包括肿瘤,特别是恶性肿瘤,例如乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、表皮样鳞癌等。

- 5 再一方面,本发明还涉及治疗和/或预防哺乳动物肿瘤的方法,包括将治疗或预防有效量的本发明所述的盐给予需要此治疗或预防的哺乳动物。

本发明所述的盐可以单独给药,或者与其他药学上可接受的治疗剂联合给药,特别是与其他抗肿瘤药物组合。所述治疗剂包括但不限于: 10 作用于 DNA 化学结构的药物抗肿瘤药如顺铂,影响核酸合成的抗肿瘤药物如甲氨蝶呤(MTX)、5-氟尿嘧啶(5FU)等,影响核酸转录的抗肿瘤药物如阿霉素、表阿霉素、阿克拉霉素、光辉霉素等,作用于微管蛋白合成的抗肿瘤药物如紫杉醇、长春瑞滨等,芳香化酶抑制剂如氨鲁米特、兰特隆、来曲唑、瑞宁德等,细胞信号通路抑制剂如 15 伊马替尼(Imatinib)、吉非替尼(Gefitinib)、埃罗替尼(Erlotinib)等。待组合的各成分可同时或顺序地给予,以单一制剂形式或以不同制剂的形式给予。所述组合不仅包括本发明的化合物和一种其它活性剂的组合,而且包括本发明的化合物和两种或更多种其它活性剂的组合。

20

本发明的主要优点包括:

- (a)本发明提供的盐经实验证明在动物体内具有优异的生物利用度;
(b)本发明提供的盐经实验证明具有优异的抗肿瘤活性;
25 (c)本发明提供的盐经实验证明在动物体内毒性低,给药安全性高。

下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的保护范围。下列实施例中 30 未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。所采用的原料为可商业上购得的或者可以很容易地由本领域技术人员根据已知文献方法制得的。对于所涉及的缩写,THF 指四氢呋喃,EA 指乙酸乙酯,DMSO 是指二甲基亚砷,PVPP 指聚乙烯

基聚吡咯烷酮，PVP 指聚乙烯基吡咯烷酮，ig 指灌胃，iv 指静脉注射。除非另有说明，否则份数和百分比为重量份数和重量百分比。

具体实施方式

- 5 实施例 1: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺

步骤 A: 4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-6-硝基喹唑啉的制备

- 1) 在一装有回流冷凝装置的 100ml 烧瓶中加入 6-硝基喹唑啉 2.85g(15mmol)，三氯氧磷 25ml，105℃回流反应 3h，取出小心倾入 10 150ml 冰水体系中，慢慢析出鳞片状固体，过滤干燥，经鉴别该化合物为 4-氯-6-硝基-喹唑啉。收率 78%。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 9.22(2H, s), 8.74(1H, dd, $J=2.57\text{Hz}$, 9.16Hz), 8.27(1H, d, $J=9.16\text{Hz}$).

- 15 2) 在一装有回流冷凝装置的 250ml 的烧瓶内加入 2-氯-4-硝基苯酚 4.65g(26.6mmol)，间氟苄溴 3.31ml(27.0mmol, 1eq)，碳酸钾 9.4g(54mmol, 2eq)，二甲基甲酰胺 50ml，加热回流。反应 4h 后，取出趁热滤去固体，滤液冷至室温。向体系中加入 300ml 乙酸乙酯稀释，用水洗涤 3 次，有机相干燥，浓缩，柱层析纯化得固体产物。将 20 上述固体产物置于一个装有回流冷凝装置的 250ml 烧瓶内，加入还原铁粉 4.7g(87mmol)，冰醋酸 10ml，无水乙醇 50ml。加热回流，5h 后取出，冷却至室温，用大量水-乙酸乙酯混和溶剂萃取，合并有机相，用碳酸氢钠溶液洗涤两次，干燥，浓缩，柱层析纯化样品，得到浅棕色固体，经鉴别该产物为 4-(3-氟苄氧基)-3-氯苯胺。总收率 75%。

- 25 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.38-7.29(1H, m), 7.23-7.16(2H, m), 7.04-6.96(1H, m), 6.79-6.74(2H, m), 6.50(1H, dd, $J=2.75\text{Hz}$, 8.61Hz), 5.03(2H, s), 3.50(2H, br)。

- 3) 将 4-氯-6-硝基-喹唑啉 1.20g (5.7mmol) 和 4-(3-氟苄氧基)-3- 30 氯苯胺 1.37g (5.6mmol) 溶于 80mL 异丙醇中，回流反应 3h，当体系中析出大量黄色固体，过滤，固体用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤至 pH=8。真空干燥，得到黄色固体 1.62g (3.75mmol)。经鉴别该化合物为 4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-6-硝基喹唑啉，收率 67%。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 11.30(1H, br), 9.54-9.48(1H, m), 8.45-8.41(1H, m), 8.31-8.25(1H, m), 7.98-7.89(1H, m), 7.50-7.47(1H, m), 7.35-7.26 (1H, m), 7.05-6.96(1H, m), 6.90-6.80(2H, m), 7.74-7.60(2H, m), 4.84(2H, s)。

5

步骤 B: 4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-6-氨基喹唑啉的制备
在一个装有回流冷凝装置的烧瓶中加入按照步骤 A 的方法制备的 4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-6-硝基喹唑啉 1.60g

(3.77mmol), 还原铁粉 1.05g (18.85mmol, 5eq), 冰醋酸 2mL,
10 甲醇 40mL, 85℃油浴下回流反应 2.5h 后, 过滤除去铁粉, 滤液用乙酸乙酯稀释, 碳酸氢钠溶液洗涤, 水洗, 有机相干燥、浓缩, 得到黄色固体 900mg (2.28mmol)。经鉴别该化合物为 4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-6-氨基喹唑啉, 收率 61%。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO): δ 9.32(1H, s), 8.31(1H, s), 8.04(1H, d, $J=2.64\text{Hz}$), 7.73(1H, dd, $J=2.64\text{Hz}$, 8.80Hz), 7.54-7.43(2H, m),
15 7.36-7.28(3H, m), 7.26-7.14(3H, m), 5.57(2H, br), 5.27(2H, s)。

步骤 C: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺的制备

20 在冰浴下加按照步骤 B 的方法制备的 4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-6-氨基喹唑啉 1.2g (3.04mmol), 三乙胺 0.6mL (4.58mmol, 1.5eq), 丙烯酰氯 0.28mL (3.33mmol, 1.1eq), THF 40mL, 逐渐升至室温反应, 3h 后, 停止反应, 过滤, 固体水洗至中性, 干燥, 得到黄色固体 1.0g (2.23mmol)。经鉴别该化合物为: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺, 收率 67%。MS: 449。
25 mp: 222-225℃。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 8.75(1H, s), 8.60-8.52(2H, m), 7.81(1H, d, $J=2.44\text{Hz}$), 7.69(2H, s), 7.54(1H, dd, $J=2.56\text{Hz}$, 8.92Hz), 7.30-7.22(2H, m), 7.18-7.08(2H, m), 6.96-6.86(2H, m),
30 6.37(2H, d, $J=5.86\text{Hz}$), 5.67(1H, t, $J=5.86\text{Hz}$), 5.06(2H, s)。

实施例 2: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺盐酸盐

将按照实施例 1 所述方法制备的 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺 1.0g (2.23mmol) 溶于 20mL 乙酸乙酯/三乙胺混合溶剂 (EA/Et₃N=40/1) 中, 于冰水浴下搅拌, 缓慢滴加 4mol/L 的 HCl/1,4-二氧六环溶液 (2mL)。有黄色固体析出, 45min 后停止搅拌, 过滤, 水洗, 干燥得黄绿色固体 530mg (1.09mmol)。经鉴别该化合物为 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺盐酸盐, 收率 49%。MS: 449。mp: 249-252℃。

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃+DMSO): δ 8.91(1H, s), 8.76-8.69(2H, m), 8.01(1H, d), 7.83(2H, s), 7.68(1H, dd), 7.46-7.33(2H, m), 7.34-7.29(2H, m), 7.23-7.18(2H, m), 6.51(2H, d), 6.28(1H, t), 5.61(2H, s)。

题述的 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺盐酸盐也可通过以下方法制备: 将 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺 1.0g (2.23mmol) 溶于 20mL 四氢呋喃/三乙胺混合溶剂 (THF/Et₃N=40/1) 中, 于冰水浴下搅拌, 缓慢滴加 4N 浓 HCl/1,4-二氧六环溶液 2mL, 有黄色固体析出, 45min 后停止搅拌, 过滤, 水洗, 干燥得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺盐酸盐 370mg (0.76mmol), 收率 34%。

20 实施例 3: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺硫酸盐

按照实施例 2 所示的方法, 采用 2mol/L 的硫酸/1,4-二氧六环溶液代替所用的 4mol/L 的 HCl/1,4-二氧六环溶液, 获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺硫酸盐。

25 ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃+DMSO): δ 8.99(1H, s), 8.82-8.76(2H, m), 8.10(1H, d), 7.90(2H, s), 7.74(1H, dd), 7.53-7.40(2H, m), 7.42-7.37(2H, m), 7.31-7.26(2H, m), 6.60(2H, d), 6.35(1H, t), 5.70(2H, s)。

30 实施例 4: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺磷酸盐

按照实施例 2 所示的方法, 采用 2mol/L 的磷酸/1,4-二氧六环溶液代替所用的 4mol/L 的 HCl/1,4-二氧六环溶液, 获得 N-{4-[3-氯-4-(3-

氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺磷酸盐。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 8.95(1H, s), 8.78-8.72(2H, m), 8.07(1H, d), 7.86(2H, s), 7.70(1H, dd), 7.50-7.36(2H, m), 7.38-7.33(2H, m), 7.27-7.22(2H, m), 6.56(2H, d), 6.30(1H, t),
5 5.64(2H, s)。

实施例 5: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺碳酸盐

按照实施例 2 所示的方法, 采用 2mol/L 的碳酸/1,4-二氧六环溶液代替所用的 4mol/L 的 HCl/1,4-二氧六环溶液, 获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺碳酸盐。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 8.97(1H, s), 8.90-8.74(2H, m), 8.09(1H, d), 7.87(2H, s), 7.72(1H, dd), 7.52-7.38(2H, m), 7.40-7.35(2H, m), 7.29-7.24(2H, m), 6.58(2H, d), 6.32(1H, t),
15 5.66(2H, s)。

实施例 6: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺对甲苯磺酸盐

将按照实施例 1 所述方法制备的 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺 3g (6.68mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃/甲醇的混合溶剂 ($\text{THF}/\text{CH}_3\text{OH}=1/1$) 中, 向体系中缓慢滴加对甲苯磺酸 (6eq, 7.62g) 的四氢呋喃/甲醇混合溶液 ($\text{THF}/\text{CH}_3\text{OH}=1/1$) 24mL, 在滴加过程中, 体系缓慢析出大量黄色固体, 过滤, 固体水洗。真空干燥得黄绿色固体 2.93g (4.72mmol)。经鉴别该化合物为
25 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺对甲苯磺酸盐, 收率 70%。

元素分析 ($\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{ClFN}_4\text{O}_5\text{S}$):

理论值: C: 59.95%, H: 4.22%, N: 9.02%, S: 5.16%

实测值: C: 60.01%, H: 4.22%, N: 8.99%, S: 5.13%

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 10.78(1H, s), 9.07(1H, s), 8.89(1H, s), 8.06-8.04(1H, d), 7.88-7.84(2H, t), 7.59-7.57(1H, d), 7.50-7.44(3H, dd), 7.35-7.30(3H, m), 7.21-7.16(1H, t), 7.10-7.08(2H, d), 6.54-6.48(1H, dd), 6.38-6.34(1H, d), 5.90-5.87(2H, d), 2.26(3H,

s)。

题述的 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺对甲苯磺酸盐也可以通过以下方法制备：将 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺 3g (6.68mmol) 溶于 30mL 四氢呋喃/甲醇的混合溶剂 (THF/CH₃OH=2/1) 中，向体系中缓慢滴加对甲苯磺酸(1eq, 1.27g)的四氢呋喃/甲醇的混合溶液

(THF/CH₃OH=1/1) 24mL，滴加完毕后，体系缓慢析出大量黄色固体，过滤，固体水洗。真空干燥得题述的盐 2.6g (4.19mmol)，收率 63%。

10

实施例 7: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺甲磺酸盐

按照实施例 6 所示的方法，采用甲磺酸 (6eq, 4.25g) 代替对甲苯磺酸，获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺甲磺酸盐。

15

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃+DMSO): δ 9.05(1H, s), 8.95-8.79(2H, m), 8.15(1H, d), 7.93(2H, s), 7.77(1H, dd), 7.57-7.43(2H, m), 7.45-7.40(2H, m), 7.34-7.29(2H, m), 6.63(2H, d), 6.37(1H, t), 5.71(2H, s), 2.87(3H, s)。

20

实施例 8: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺苯甲酸盐

按照实施例 6 所示的方法，采用苯甲酸 (6eq, 4.76g) 代替对甲苯磺酸，获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺苯甲酸盐。

25

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃+DMSO): δ 10.70(1H, s), 8.98(1H, s), 8.80(1H, s), 7.08-7.00(1H, d), 7.81-7.76(2H, t), 7.51-7.49(1H, d), 7.42-7.36(3H, dd), 7.27-7.22(3H, m), 7.14-7.08(1H, t), 7.02-7.00(2H, d), 6.48-6.40(1H, dd), 6.30-6.26(1H, d), 5.82-5.80(2H, d), 2.40(3H, s)。

30

实施例 9: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺水杨酸盐

按照实施例 6 所示的方法, 采用水杨酸 (6eq, 5.39g) 代替对甲
苯磺酸, 获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙
烯酰胺水杨酸盐。

元素分析 ($C_{31}H_{24}ClFN_4O_5$):

5 理论值: C: 64.43%, H: 4.12%, N: 9.54%

实测值: C: 64.48%, H: 4.12%, N: 9.52%

1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$ +DMSO): δ 10.70(1H, s), 8.98(1H,
s), 8.80(1H, s), 7.08-7.00(1H, d), 7.81-7.76(2H, t), 7.51-7.49(1H,
d), 7.42-7.36(3H, dd), 7.27-7.22(3H, m), 7.14-7.08(1H, t),
10 7.02-7.00(2H, d), 6.48-6.40(1H, dd), 6.30-6.26(1H, d), 5.82-5.80(2H,
d), 2.40(3H, s)。

实施例 10: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙
烯酰胺草酸盐

15 将按照实施例 1 所述方法制备的 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基
胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺 1.0g (2.23mmol) 溶于 20mL 甲醇中,
于冰水浴下搅拌, 缓慢滴加草酸 (990mg) 的甲醇溶液 (2mL), 有
黄色固体析出, 45min 后停止搅拌, 过滤, 水洗, 干燥得黄绿色固体
530mg (0.98mmol) N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-
20 基}-丙烯酰胺草酸盐, 收率 44%。MS: 449。mp: 253-256°C。

1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$ +DMSO): δ 9.11(1H, s), 8.76-8.64(2H,
m), 8.01(1H, d, $J=2.44$ Hz), 7.90(2H, s), 7.71(1H, dd, $J=2.56$ Hz,
8.92Hz), 7.52-7.41(2H, m), 7.33-7.26(2H, m), 7.12-7.05(2H, m),
6.54(2H, d), 6.12(1H, t), 5.56(2H, s), 2.98(6H, s)。

25

实施例 11: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙
烯酰胺乙酸盐

按照实施例 10 所示的方法, 采用乙酸 (660mg) 代替草酸, 获
得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺的乙
30 酸盐。

1H -NMR(400MHz, $CDCl_3$ +DMSO): δ 8.97(1H, s), 8.90-8.74(2H,
m), 8.09(1H, d, $J=2.44$ Hz), 7.87(2H, s), 7.72(1H, dd), 7.52-7.38(2H,
m), 7.40-7.35(2H, m), 7.29-7.24(2H, m), 6.58(2H, d), 6.32(1H,

t), 5.66(2H, s), 2.10(3H, s)。

实施例 12: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺戊酸盐

5 按照实施例 10 所示的方法, 采用戊酸 (1.12g) 代替草酸, 获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺的戊酸盐。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 8.97(1H, s), 8.90-8.74(2H, m), 8.09(1H, d, $J=2.44\text{Hz}$), 7.87(2H, s), 7.72(1H, dd), 7.52-7.38(2H, 10 m), 7.40-7.35(2H, m), 7.29-7.24(2H, m), 6.58(2H, d), 6.32(1H, t), 5.66(2H, s), 2.28(3H, t), 1.60(2H, m), 1.38(2H, m), 1.00(3H, t)。

实施例 13: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺丙二酸盐

15 按照实施例 10 所示的方法, 采用丙二酸 (1.14g) 代替草酸, 获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺的丙二酸盐。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 8.97(1H, s), 8.90-8.74(2H, 20 m), 8.09(1H, d, $J=2.44\text{Hz}$), 7.87(2H, s), 7.72(1H, dd), 7.52-7.38(2H, m), 7.40-7.35(2H, m), 7.29-7.24(2H, m), 6.58(2H, d), 6.32(1H, t), 5.66(2H, s), 3.27(2H, s)。

实施例 14: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺酒石酸盐

25 按照实施例 10 所示的方法, 采用酒石酸 (1.65g) 代替草酸, 获得 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺的酒石酸盐。

元素分析 ($\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{ClFN}_4\text{O}_3$):

30 理论值: C: 56.15%, H: 4.04%, N: 9.35%

实测值: C: 56.19%, H: 4.04%, N: 9.33%

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 8.97(1H, s), 8.90-8.74(2H, m), 8.09(1H, d, $J=2.44\text{Hz}$), 7.87(2H, s), 7.72(1H, dd), 7.52-7.38(2H,

m), 7.40-7.35(2H, m), 7.29-7.24(2H, m), 6.58(2H, d), 6.32(1H, t), 5.66(2H, s), 4.55(2H, s)。

5 实施例 15: N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺三乙胺盐

将按照实施例 1 所述方法制备的 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺 1.0g (2.23mmol) 悬浮于 20mL 甲醇中, 于 35℃ 下搅拌, 缓慢滴加三乙胺 2.3mL, 悬浮液慢慢澄清。45min 后停止搅拌, 浓缩, 水洗, 干燥得黄绿色固体 530mg (0.96mmol),
10 经鉴别为 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基胺基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺三乙胺盐。收率 43%。MS: 449。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$): δ 10.59(1H, s), 10.07(1H, s), 8.80(1H, s), 8.58(1H, s), 7.95-7.89(2H, m), 7.79-7.75(1H, d), 7.67-7.63(1H, dd), 7.49-7.42(2H, s), 7.33-7.23(3H, m), 7.19-7.13(1H,
15 m), 7.12-7.07(2H, dm), 6.58-6.42(1H, m), 6.38-6.35(1H, d), 5.84(1H, t,), 5.21(2H, s), 1.20-1.10(9H, m)。

实施例 16 溶解度实验

按照常规溶解度测定方法, 即在室温条件下, 称取适量待测化合物并将其至于 15mL 水溶液中, 然后充分搅拌使溶, 室温下放置 3h, 用移液管吸取 10mL 上部澄清饱和溶液至于已称重的称量瓶中, 加热挥干溶剂, 干燥, 称重得到残留物质量即为溶液中溶质的质量, 再经计算得到式(I)化合物及其盐在水中的溶解度, 同法测得待测化合物在甲醇中的溶解度, 结果如下所示:

化合物	水中溶解度(/mL)	甲醇中溶解度(/mL)
式(I)化合物	<10ng	<1mg
盐酸盐	>5 μ g	>5mg
硫酸盐	>5 μ g	>5mg
对甲苯磺酸盐	>7 μ g	>7mg
甲磺酸盐	>5 μ g	>5mg
草酸盐	>5 μ g	>5mg
酒石酸盐	>7 μ g	>7mg
三乙胺盐	>5 μ g	>5mg

实施例 17 SD 大鼠 (Sprague Dawley 大鼠) 药物吸收实验

灌胃给药(ig): 健康 SD 大鼠 24 只, 雄性, 体重 200 ~ 250g, 随机分成三组。分别灌胃给予上述实施例 1 所得的化合物 (21.68 mg/kg)、其盐酸盐 (23.42 mg/kg) 或其对甲苯磺酸盐 (30mg/kg), 于给药后 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0、7.0、9.0、12 和 24 小时采集血样, 分离制备血浆, 采用液相色谱/串联质谱法测定血浆中药物的浓度, 得到药物浓度-时间曲线。

其主要的药物动力学参数如下表所示:

化合物	剂量(mg/kg)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-t} (ng.h/mL)	T _{1/2} (h)
式(I)化合物	21.68	0.75	32	106	1.81
盐酸盐	23.42	2.25	289	1038	1.27
对甲苯磺酸盐	30	3.38	333	1235	1.22

静脉注射(iv): 健康 SD 大鼠 8 只, 雄性, 体重 200 ~ 250g, 静脉给予式(I)化合物的对甲苯磺酸盐, 于给药后 5min、15min、0.5、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0 和 7.0 小时采集血样, 分离制备血浆, 采用液相色谱/串联质谱法测定血浆中药物的浓度, 得到药物浓度-时间曲线。其主要的药物动力学参数如下表所示:

化合物	剂量(mg/kg)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-t} (ng.h/mL)	T _{1/2} (h)
对甲苯磺酸盐	5	0.083	1745	1860	1.55

经剂量校正后,按 AUC_{0-1} 计算,实施例 1 所得的式(I)化合物灌胃给药的绝对生物利用度为 0.95%,化合物的盐酸盐灌胃给药的绝对生物利用度为 9.30%,化合物的对甲苯磺酸盐灌胃给药的绝对生物利用度为 11.07%。

实施例 18 EGFR 酪氨酸激酶抑制活性检测

将 EGFR 酪氨酸激酶反应底物 Poly(Glu,Tyr) 4:1 包被酶标板; T-PBS 洗板三次,于 37°C 烘箱中干燥;每孔依次加入用反应缓冲液稀释的 ATP 溶液、梯度浓度的待测化合物、以及受试酪氨酸激酶启动反应,置 37°C 摇床反应 1 小时, T-PBS (含 0.05%吐温的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液)洗板三次;加入抗体 PY99 于 37°C 反应 1h, T-PBS 洗板三次;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠的 IgG 于 37°C 反应 1h, T-PBS 洗板三次;加入 OPD (邻苯二胺)显色液,室温避光反应 1-10 min;加入 2 M H_2SO_4 中止反应,用可调波长式微孔板酶标仪 VERSAmax (美国 MDC 公司)测在 492nm 波长下的 OD 值。样品的抑制率通过下列公式求得:

$$\text{样品的抑制率}\% = [1 - (\text{待测化合物 OD 值} - \text{无酶对照孔 OD 值}) / (\text{阴性对照 OD 值} - \text{无酶对照孔 OD 值})] \times 100\%$$

结果表明:式(I)化合物的盐酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、草酸盐或酒石酸盐对 EGFR 酪氨酸激酶具有优异的抑制活性。

实施例 19 对肿瘤细胞株的增殖抑制试验

将上述实施例所得的式(I)化合物的对甲苯磺酸盐或盐酸盐配制成 5 个浓度梯度,参照活细胞的四氮唑盐

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-di-phenyl tetrazolium bromide, MTT) 法检测:分别将处于对数生长期的人表皮样癌细胞 A431、人乳腺癌细胞 BT-474 (1×10^5) 接种于 96 孔培养板,培养 24h 后,加入不同浓度的待测化合物,每个浓度设三复孔;并设 DMSO 溶剂对照孔及无细胞调零孔。用药物处理细胞 72 小时后,加入 20 μ L MTT (Sigma, St Louis, MO, USA) 溶液;继续培养 4 小时后,加入 50 μ L 三联液 (10%SDS-5%异丁醇-0.01mol/L HCl),于培养箱中过夜。然后用酶标仪在 570nm 波长下测定 OD 值。以下列公式计算药物对

细胞生长的抑制率:

抑制率 (%) = (溶剂对照 OD 值 - 待测化合物 OD 值) / 溶剂对照 OD 值 × 100%, IC₅₀ 值采用 Logit 法计算。

结果: 式(I)化合物的对甲苯磺酸盐对人表皮样鳞癌细胞 A431、
5 人乳腺癌细胞 BT-474 的 IC₅₀ 分别为 0.73 μM、0.42 μM; 式(I)化合物的盐酸盐对人表皮样鳞癌细胞 A431、人乳腺癌细胞 BT-474 的 IC₅₀ 分别为 0.84 μM、0.46 μM。

实施例 20

10 对移植于 BALB/cA 裸鼠的人体表皮样鳞癌 A431 的抑瘤作用

取生长良好的 A431 实体瘤, 无菌条件下切割成 2-3mm 大小的均匀小块, 用套管针于每只 BALB/cA 裸鼠右腋皮下接种一块, 接种后 7 日起随机分组, 开始连续经口灌胃给药 13 天, 并用游标卡尺每 4 天测瘤块的长径 (a)、短径 (b), 根据公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体
15 积 (mm³), 接种后 23 天脱颈处死动物, 解剖取瘤块, 称瘤重, 计算抑瘤率。

结果如下表所示, 表明式(I)化合物的对甲苯磺酸盐具有明显的抑瘤作用。

20

组别	剂量 (mg/kg)	给药 方式	动物数		动物体重(g) (去瘤后)	瘤重(g) $\bar{x} \pm SD$	抑瘤率 %
			始	终			
溶剂对照	25mL/kg	ig	7	7	22.40 ± 2.81	1.13 ± 0.18	0
对甲苯 磺酸盐	25	ig	5	5	21.58 ± 2.18	0.79 ± 0.20	29.99
	50	ig	5	5	22.05 ± 1.59	0.71 ± 0.20	37.15
	100	ig	5	5	22.35 ± 1.92	0.58 ± 0.21	48.65

对移植于 BALB/cA 裸鼠的人卵巢癌 SKOV-3 的抑瘤作用

取生长旺盛期的 SKOV-3 瘤组织剪切成 1.5 mm³ 左右均匀小块, 在无菌条件下, 用套针管接种于 BALB/cA 裸鼠右侧腋窝皮下。裸鼠
25 移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径, 待肿瘤生长至 80-100 mm³ 后将动物随机分组。受试物实验组经口灌胃每日一次, 连续用药 3 周。阳性对照药 MMC(丝裂霉素)的剂量为 5mg/kg 于第 1 天静脉给药 1 次。阴性对照组为 0.5%CMC-Na(羧甲基纤维素钠) 0.2mL/只。每周 2 次测

量肿瘤长径 (a)、短径 (b)，同时称裸鼠体重。根据公式 $V=ab^2/2$ 计算肿瘤体积 (mm^3)。根据测量的结果计算出相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV) (计算公式为: $RTV = V_t/V_0$, 其中 V_0 为分笼给药时(即 d_0)测量所得肿瘤体积, V_t 为每一次测量时的肿瘤体积)。

5 抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增殖率 T/C (%), 计算公式如下:

$$T/C (\%) = (T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100$$

T_{RTV} : 治疗组 RTV ; C_{RTV} : 阴性对照组 RTV。

10 疗效评价标准: T/C(%) > 60% 为无效, T/C(%) ≤ 60 为有效。

结果如下表所示, 表明式(I)化合物的对甲苯磺酸盐具有明显的抑瘤作用。

组别	剂量、给药方式		动物数		肿瘤体积 (mm ³)		RTV	T/C (%)
			开始	最后	V ₀	V ₂₁		
0.5%CMC-Na	0.2mL/只	ig	12	12	85± 35	638± 339	9.6± 5.4	
MMC	5mg/kg	iv	6	6	83± 13	258± 77	3.1± 0.5	32.0
对甲苯磺酸盐	200mg/kg	ig	6	6	86± 13	303± 72	3.5± 0.8	36.9
对甲苯磺酸盐	100mg/kg	ig	6	6	87± 41	345± 88	4.3± 1.3	45.0
对甲苯磺酸盐	50mg/kg	ig	6	6	79± 28	421± 89	5.1± 1.7	53.0

V_0 指给药前肿瘤体积; V_{21} 指连续用药 3 周后肿瘤体积

15

实施例 21 长期给药毒性试验

健康 SD 大鼠 130 只, 雄性, 体重 200~250g, 随机分成 26 组。连续灌胃给予式(I)化合物的盐酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、草酸盐、酒石酸盐 4 周, 设 20、50、100、500、800mg/(kg·天) 5 个剂量组和 1 个溶剂对照组。给药 4 周结果显示: 20、50、100、500、800mg/(kg·天)组大鼠体征、外观、行为、活动、粪便形状未见异常, 进食量正常, 体重和体重增长与对照组基本相似, 无统计学差异。血液学、血液生化学、心电图、体温和尿液检查结果显示, 各项检查指标与对照组相似, 均在正常值范围内波动。表明式(I)化合物的成盐形式毒性低、给药安全性高。

20

25

实施例 22 药物组合物

由以下组分制备 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺盐酸盐的胶囊:

5	式(I)化合物的盐酸盐	15g
	淀粉	15g
	乳糖	30g
	PVPP	2.5g
10	PVP	2.5g
	滑石粉	3g
	十二烷基硫酸钠	4g

按常规方法, 将式(I)化合物的盐酸盐、淀粉混合过筛, 再与上述其
15 他组分混合均匀, 装入普通明胶胶囊。

实施例 23 药物组合物

由以下组分制备 N-{4-[3-氯-4-(3-氟-苄氧基)苯基氨基]-喹唑啉-6-基}-丙烯酰胺对甲苯磺酸盐的片剂:

20	式(I)化合物的对甲苯磺酸盐	20g
	淀粉	20g
	乳糖	40g
	PVPP	3g
25	PVP	3g
	滑石粉	1.6g
	十二烷基硫酸钠	5g

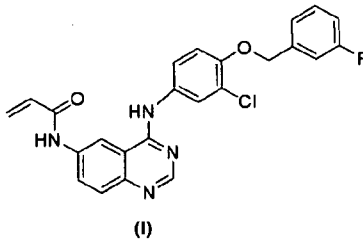
按常规方法, 将式(I)化合物的对甲苯磺酸盐、淀粉混合过筛, 再与
30 上述其他组分混合均匀, 直接压片。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲

授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请的权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种式(I)所示化合物在药学上可接受的盐，



5

2. 如权利要求 1 所述的盐，其中所述盐为式(I)化合物与无机酸或有机酸形成的酸加成盐或者与无机碱或有机碱形成的碱加成盐。

3. 如权利要求 2 所述的盐，其中所述盐为酸加成盐。

4. 如权利要求 3 所述的盐，其中所述酸加成盐为氢溴酸盐、盐
10 酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、碳酸盐、碳酸氢盐、亚硫酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、硼酸盐、乙酸盐、草酸盐、丙二酸盐、戊酸盐、苯甲酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、甲苯甲酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、苹果酸盐、双羟萘酸盐、水杨酸盐、香草酸盐、扁桃酸盐或者琥珀酸盐。

5. 如权利要求 4 所述的盐，其中所述酸加成盐为盐酸盐、硫酸
15 盐、磷酸盐、碳酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、水杨酸盐、草酸盐、乙酸盐、戊酸盐、丙二酸盐或者酒石酸盐。

6. 如权利要求 5 所述的盐，其中所述酸加成盐为盐酸盐或者对
甲苯磺酸盐。

7. 如权利要求 2 所述的盐，其中所述盐为碱加成盐。
20

8. 如权利要求 7 所述的盐，其中所述碱加成盐为碱金属盐、碱
土金属盐、季铵阳离子盐或者胺盐。

9. 如权利要求 8 所述的盐，其中所述碱加成盐为钠盐、钾盐、
钙盐、镁盐、四甲基季铵盐、四乙基季铵盐、甲胺盐、二甲胺盐、三
25 甲胺盐、三乙胺盐、乙胺盐。

10. 如权利要求 9 所述的盐，其中所述盐为三乙胺盐。

11. 用于治疗或预防哺乳动物肿瘤的权利要求 1~10 任一所述
盐。

12. 一种制备权利要求 1~10 任一所述盐的方法，包括步骤：

(a) 将式(I)化合物溶于有机溶剂中，在搅拌条件下滴加含酸或碱的溶剂；

(b) 直接过滤或经浓缩后过滤得到固体，水洗，干燥后得到所述盐。

5 13. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述的有机溶剂为甲醇、乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺、乙醚、1,4-二氧六环或者其混合溶剂。

14. 一种包含权利要求 1 - 10 任一所述的盐和药学上可接受的载体的药物组合物。

10 15. 如权利要求 14 的药物组合物，其还包含另外的抗肿瘤药物。

16. 如权利要求 1 - 10 任一所述的盐在制备抗肿瘤药物中的用途。

17. 如权利要求 16 所述的用途，其中所述肿瘤选自乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌和表皮样鳞癌。

15 18. 一种治疗或预防哺乳动物肿瘤的方法，包括将治疗或预防有效量的权利要求 1-10 任一所述的盐给予需要的哺乳动物。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述肿瘤选自乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌和表皮样鳞癌。

20 20. 如权利要求 19 所述的方法，其中进一步包括将另外的抗肿瘤药物与权利要求 1-10 任一所述的盐同时或顺序地给予需要的哺乳动物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/000318

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

IPC: C07D 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)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CNKI, CA, STN: C24H18CIFN4O2 897383-62-9 quinazolin+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO2006071017A1(HANMI PHARM IND CO LTD), 06 July 2006(06.07.2006), examples 1-225, pages 7-22,32-33 of the description, the preferred compounds 2-5,20-22,26,30, claims 1-12	1-20
PX	WO2007082434A1(SHANGHAI ALLIST PHARMACEUTICA et al.),26 July 2007 (26.07.2007), cited in the application, example 8	1-20

☐ 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
03 March 2008 (03.03.2008)

Date of mailing of the international search report
27 Mar. 2008 (27.03.2008)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
HE Xiaoping
Telephone No. (86-10)62084365

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/000318

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.: 18-20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 18-20 are directed to a method of treatment or prevention tumour of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the salts.

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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/000318

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO2006071017A1	06.07.2006	CN101094840A	26.12.2007
		US2008009509A1	10.01.2008
		NO20073959A	27.09.2007
		EP1844022A1	17.10.2007
		CA2592286A1	06.07.2006
		AU2005320472A1	06.07.2006
		KR20060076210A	04.07.2006
		KR20060076186A	04.07.2006
		WO2006071079A1	06.07.2006
WO2007082434A1	26.07.2007	CN101103005A	09.01.2008
		CN101003514A	25.07.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/000318

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D239/94 (2006.01) i

A61K31/517 (2006.01) i

A61P35/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2008/000318

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(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)

IPC: C07D 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))

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CNKI, CA, STN: C24H18CIFN4O2 897383-62-9 喹唑啉 quinazolin+

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	WO2006071017A1(韩美药品株式会社), 06.7 月 2006(06.07.2006), 实施例 1-225, 说明书第 7-22、32-33 页, 优选的化合物 2-5, 20-22, 26, 30, 权利要求 1-12	1-20
PX	WO2007082434A1(上海艾力斯医药科技有限公司等), 26.7 月 2007 (26.07.2007), 申请中引用, 实施例 8	1-20

☐ 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

“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

03.3 月 2008 (03.03.2008)

国际检索报告邮寄日期

27.3 月 2008 (27.03.2008)

中华人民共和国国家知识产权局(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

何小平

电话号码: (86-10) 62084365

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 18-20

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

权利要求 18-20 涉及治疗或预防动物肿瘤的方法, 还是作了检索, 检索是基于所述的盐的制药用途进行的。

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到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。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明;
包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/000318

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO2006071017A1	06.07.2006	CN101094840A	26.12.2007
		US2008009509A1	10.01.2008
		NO20073959A	27.09.2007
		EP1844022A1	17.10.2007
		CA2592286A1	06.07.2006
		AU2005320472A1	06.07.2006
		KR20060076210A	04.07.2006
		KR20060076186A	04.07.2006
		WO2006071079A1	06.07.2006
WO2007082434A1	26.07.2007	CN101103005A	09.01.2008
		CN101003514A	25.07.2007

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2008/000318

主题的分类

C07D239/94 (2006.01) i

A61K31/517 (2006.01) i

A61P35/00 (2006.01) i