



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109790154 B

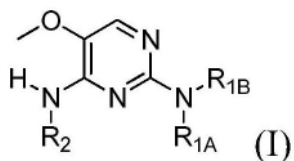
(45) 授权公告日 2023. 06. 23

(21) 申请号 201780060077.X	B.H.T.斯图普斯
(22) 申请日 2017.09.28	W.C.J.安姆布瑞施
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109790154 A	J.A.H.波勒肯斯 J.E.G.吉勒蒙特 P.J-M.B.拉波伊森 T.H.M.约克斯 L.J.E.卡尔姆斯
(43) 申请公布日 2019.05.21	(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
(30) 优先权数据 16191568.1 2016.09.29 EP	专利代理师 徐晶 黄登高
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.03.28	(51) Int.Cl.
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2017/074600 2017.09.28	<i>G07D 405/12</i> (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/060317 EN 2018.04.05	<i>G07D 239/48</i> (2006.01)
(73) 专利权人 爱尔兰詹森科学公司 地址 爱尔兰科克郡	<i>G07F 9/24</i> (2006.01)
(72) 发明人 D.C.麦克戈万 F.M.赫施克	<i>A61K 31/505</i> (2006.01)
	<i>A61K 31/506</i> (2006.01)
	<i>A61P 31/12</i> (2006.01)
	审查员 贾祥玲
	权利要求书2页 说明书9页

(54) 发明名称
用于治疗病毒感染和另外的疾病的嘧啶前药

(57) 摘要
本发明涉及嘧啶前药衍生物,用于制备它们的方法,药物组合物,以及它们在疗法中的用途。

1. 一种具有式 (I) 的化合物



或其药学上可接受的盐, 其中

R_{1A} 选自氢、 C_{1-3} 烷基、四氢呋喃基和四氢吡喃基, 或其中 R_{1A} 与 R_{1A} 所连接的氮一起形成经取代的或未经取代的氨基磷酸酯,

R_{1B} 选自氢、 C_{1-3} 烷基、四氢呋喃基和四氢吡喃基, 或其中 R_{1B} 与 R_{1B} 所连接的氮一起形成经取代的或未经取代的氨基磷酸酯,

例外的是 R_{1A} 和 R_{1B} 不都是氢, 并且其中

R_2 是被羟基基团取代的 C_{1-8} 烷基。

2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中 R_{1A} 和/或 R_{1B} 与 R_{1A} 和 R_{1B} 所连接的氮一起形成经取代的或未经取代的氨基磷酸酯, 并且其中 R_2 是被羟基基团取代的 C_{1-6} 烷基。

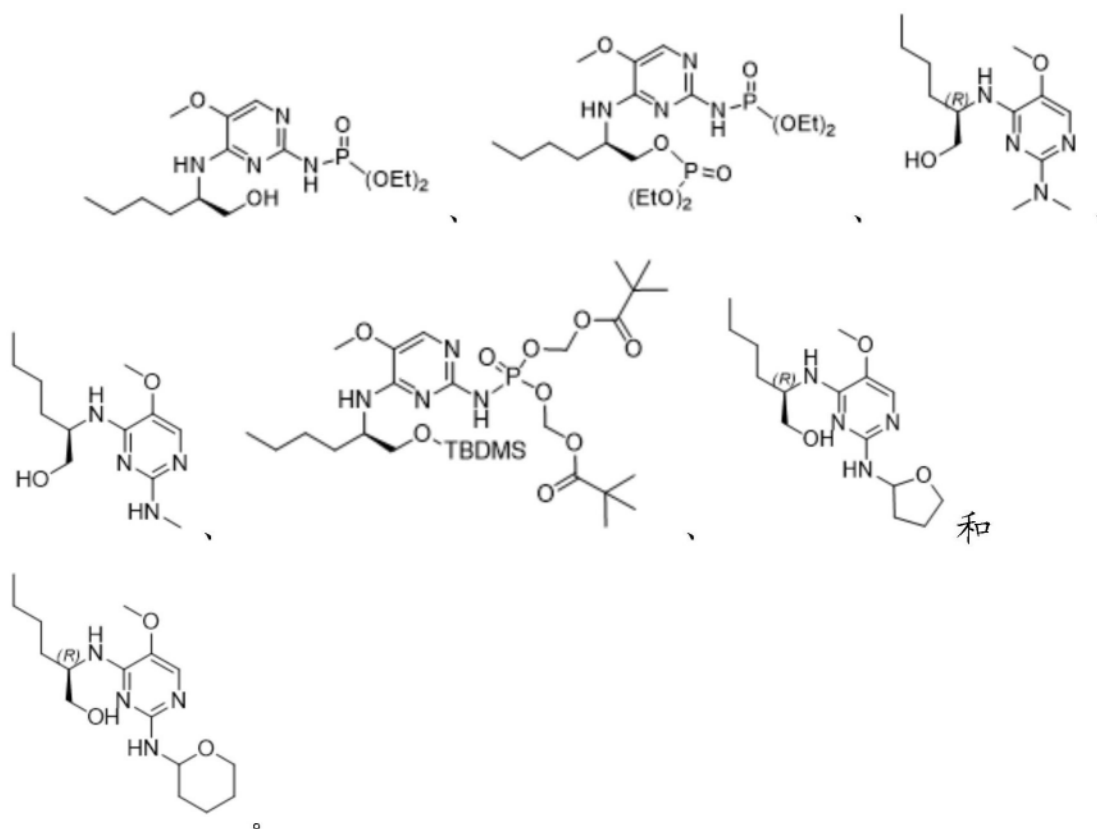
3. 根据权利要求1所述的化合物, 其中 R_{1A} 和/或 R_{1B} 是甲基, 并且其中 R_2 是被羟基基团取代的 C_6 烷基。

4. 一种药物组合物, 包括根据权利要求1-3中任一项所述的具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐, 连同一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或者根据权利要求4所述的包括所述具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物在制备药剂中的用途。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐或者根据权利要求4所述的包括所述具有式 (I) 的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物在制备用于治疗涉及干扰素诱导的障碍的药剂中的用途。

7. 一种化合物, 所述化合物选自:



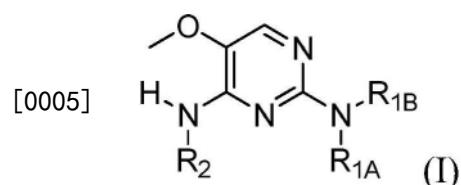
用于治疗病毒感染和另外的疾病的嘧啶前药

[0001] 本发明涉及嘧啶前药衍生物,以及所述嘧啶前药衍生物在治疗病毒感染、免疫障碍和癌症中的用途,或作为疫苗佐剂的用途,由此T辅助细胞1(Th1)免疫应答的诱导是所希望的。

[0002] 例如,在慢性乙型肝炎(HBV)的治疗中,使受感染的器官中耗尽的病毒特异性CD8⁺T细胞重新恢复的Th1应答将是非常有益的(Science[科学]1999,284,825-829;J.Virol[病毒学杂志].2003,77,68-76)。这种应答是通过先天免疫系统诱导的,尤其是通过刺激Toll样受体(TLR)如TLR3、TLR4、TLR7、TLR8和TLR9诱导的(Clin.Transl.Immunol.[临床与转化免疫学]2016,5(5):e85)。TLR8激动剂通过IL-12p70的分泌和CD40或OX40L活化标记物的上调以及间接地通过IFN γ 诱导人类细胞中最强的Th1应答之一(JImmunol.[免疫学杂志]2006,176(12):7438-46;Hum Immunol.[人类免疫学]2011Jan;72(1):24-31;JLeukocBiol.[白细胞生物学杂志]2012,91(1):105-17),这已显示其在体外治疗慢性HBV的潜力(PLoSPathog.[PLoS病原体]2013,9,e1003208;J.Exp.Med.[实验医学杂志]2014,211,2047-2059;PLoSPath.[PLoS病原体]2013,9,e1003490;PLoSPathog.[PLoS病原体]2014,10,e1004210)。

[0003] 目前仅有一种TLR8激动剂(通过皮下注射给予)正处在开发阶段以用于癌症适应症(Clin.Cancer Res.[临床癌症研究]2014,20,3683;CancerImmunol.Immunother.[癌症免疫学免疫疗法]2013,62,1347;WO 2012/045089;还参见US 20080234251、US 20100029585)。因此,强烈需要可供口服的TLR8激动剂来治疗感染(如慢性HBV)。

[0004] 根据本发明,提供了一种具有式(I)的化合物



[0006] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物,其中

[0007] R_{1A}选自氢、经取代的或未经取代的C₁₋₃烷基、杂环、或经取代的或未经取代的氨基磷酸酯,

[0008] R_{1B}选自氢、经取代的或未经取代的C₁₋₃烷基、杂环、或经取代的或未经取代的氨基磷酸酯,

[0009] 例外的是R_{1A}和R_{1B}不都是氢,

[0010] R₂是任选地被羟基基团取代的C₁₋₈烷基。

[0011] 本发明涉及药物化合物的前药组合物。该药物化合物的特征在于生物利用度为50%或更低,并且分子量在100-1000道尔顿的范围内。还描述了将药物化合物递送至个体的方法,该方法包括将所述前药口服给予个体的步骤。前药部分与药物化合物连接,其中修饰允许TLR8激动剂电位减弱。前药在肝脏之前或在肝脏位置被酶促切割以产生药物化合物,使得药物化合物在肝脏之前被递送至个体,从而限制TLR8激动作用。

[0012] 在第一个实施例中,本发明提供了具有式(I)的化合物,其中R_{1A}和/或R_{1B}是经取代

的或未经取代的氨基磷酸酯,并且其中 R_2 是优选地被羟基基团取代的 C_{1-6} 烷基。

[0013] 在第二个实施例中,本发明提供了具有式(I)的化合物,其中 R_{1A} 和/或 R_{1B} 是甲基,并且其中 R_2 是被羟基基团取代的 C_6 -烷基。

[0014] 处于任何立体化学形式的具有式(I)的化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物具有作为药物的活性,特别是作为干扰素的诱导剂的活性。

[0015] 因此,在一个另外的方面,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包括具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物连同一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0016] 此外,根据本发明的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物,或者包括所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物的药物组合物可以用作药剂。

[0017] 本发明的另一个方面是:具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物,或者包括所述具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物的所述药物组合物因而可以相应地用于治疗涉及干扰素诱导的障碍。

[0018] 术语“烷基”是指含有指定碳原子数的直链或具支链饱和脂肪族烃。

[0019] 杂环是指以下这样的分子,它们是饱和的或部分饱和的,并且包括四氢呋喃、四氢吡喃、二噁烷或其他环醚。含氮杂环包括例如氮杂环丁烷、吗啉、哌啶、哌嗪、吡咯烷等。其他杂环包括例如硫吗啉、二氧杂环戊烯基和环砜。

[0020] 具有式(I)的化合物的药学上可接受的盐包括其酸加成盐以及碱盐。合适的酸加成盐是从形成非毒性盐的酸形成的。合适的碱盐是从形成无毒盐的碱形成的。

[0021] 本发明的化合物还可以按非溶剂化的形式和溶剂化的形式存在。术语“溶剂化物”在此用以描述包含本发明的化合物以及一种或多种药学上可接受的溶剂分子(例如,乙醇)的分子复合物。

[0022] 术语“多晶型物”是指本发明的化合物能够以多于一种的形式或晶体结构存在。

[0023] 可以将本发明的化合物以晶态的或非晶态的产品给予。它们可以通过如沉淀、结晶、冷冻干燥、喷雾干燥或蒸发干燥等方法以例如固体填料、粉末或膜形式获得。它们可以单独给予或与一种或多种本发明的其他化合物组合给予或与一种或多种其他药物组合给予。通常,它们将作为与一种或多种药学上可接受的赋形剂相结合的配制品给予。术语“赋形剂”在此用以描述除本发明的一种或多种化合物之外的任何成分。赋形剂的选择在很大程度上取决于如具体给予模式、赋形剂对溶解性和稳定性的影响以及剂型的性质等因素。

[0024] 出于给予目的,本发明化合物或其任一亚组可配制成多种药物形式。作为适当的组合物,可以引用所有通常用于全身给予药物的组合物。为了制备本发明的药物组合物,将作为活性成分的有效量的具体化合物(任选地呈加成盐形式)与药学上可接受的载体组合在紧密混合物中,该载体取决于用于给予所希望的制剂的形式可以采用多种形式。令人希望地,这些药物组合物处于适合于例如口服、经直肠或经皮给予的单位剂型。例如,在制备处于口服剂型的这些组合物中,可以采用任何常见药物介质,在口服液体制剂(例如悬浮液、糖浆剂、酏剂、乳液以及溶液)的情况下,诸如像,水、乙二醇、油、醇以及类似物;或在粉剂、丸剂、胶囊和片剂的情况下,固体载体,例如淀粉、糖、高岭土、稀释剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂以及类似物。片剂和胶囊剂由于其给予简易性而代表了最有利的口服单位剂型,在

该情况下显然采用固体药物载体。还包括可在即将使用前转化成液体形式的固体形式制剂。在适合用于经皮给予的组合物中,该载体可任选地包括渗透增强剂和/或适合的润湿剂,可任选地与小比例的具有任何性质的适合添加剂组合,这些添加剂并不在皮肤上引入显著的有害作用。所述添加剂可促进向皮肤给药和/或可有助于制备期望的组合物。这些组合物能够以不同方式,例如作为透皮贴剂、作为滴剂、作为软膏剂给予。还可以经由吸入或吹入法借助于在本领域中采用的用于经由此方式给予的方法和配制品来给予本发明的化合物。因此,大体上,本发明的化合物能以溶液、悬浮液或干燥粉剂的形式而被给予至肺部。

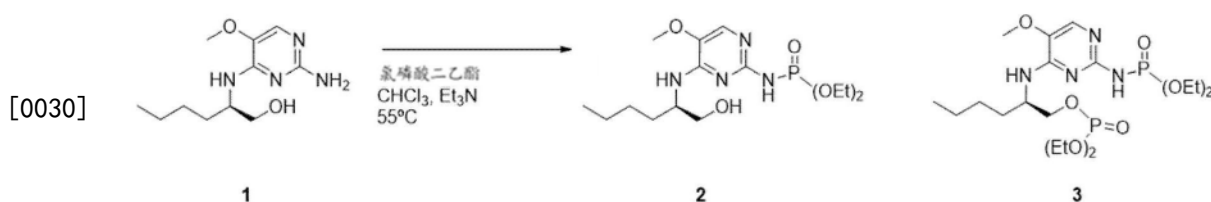
[0025] 为了便于给予和剂量的均一性,将上述药物组合物配制成单位剂型是尤其有利的。如在此使用的单位剂型是指适合作为单一剂量的物理离散单位,各单位含有预定量的活性成分,该预定量的活性成分经计算与所需药物载体相结合而产生所希望的治疗效果。这类单位剂型的实例是片剂(包括刻痕或包衣的片剂)、胶囊剂、丸剂、粉末包、糯米纸囊剂、栓剂、可注射溶液或悬浮液等,及其分离多倍剂。

[0026] 传染病治疗领域技术人员将能够从下文所呈现的测试结果确定有效量。通常,预期每日有效量将为从0.01mg/kg至50mg/kg体重,更优选地从0.1mg/kg至10mg/kg体重。可以适当地将所需剂量在全天中以适宜间隔以两个、三个、四个或更多个子剂量给予。所述子剂量可配制成单位剂型,例如每单位剂型含有1mg至1000mg,以及具体地5mg至200mg活性成分。

[0027] 如本领域的普通技术人员所熟知的,给予的精确剂量和频率取决于所使用的具有式(I)的具体化合物、正在被治疗的具体病状、正在被治疗的病状的严重性、具体患者的年龄、体重和总体身体状况以及个体可能服用的其他药物。此外,显然有效量可以降低或提高,这取决于所治疗的受试者的反应和/或取决于给出本发明化合物处方的医生的评估。因此,上文所述的有效量范围仅为指导且并不打算在任何程度上限制本发明的范围或使用。

[0028] 实验部分

[0029] 2和3的制备



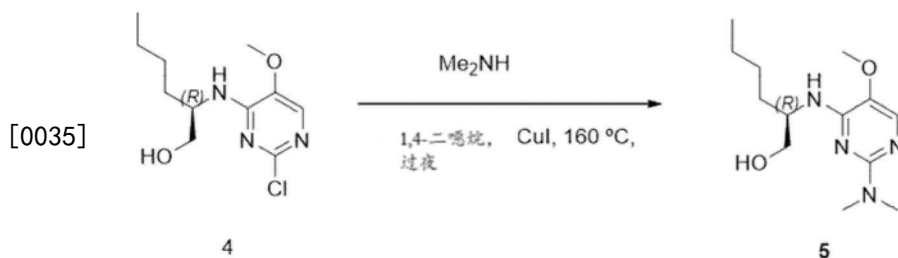
[0031] 在闭式容器中,将氯磷酸二乙酯(0.3mL,2.08mmol)在室温下逐滴添加至CHCl₃(20mL)中的1(0.5g,2.08mmol)的悬浮液中(关于1的合成参见WO 2012/136834)持续5min,并且随后逐滴添加Et₃N(0.38mL,2.71mmol)。将该反应混合物加热至55℃。将溶剂在减压下去除。将粗品经由反相层析进行纯化。第一纯化(以95% [0.1% HCOOH] - 5% [CH₃CN:CH₃OH 1:1]开始并以0% [0.1% HCOOH] - 100% [CH₃CN:CH₃OH 1:1]结束)。第二纯化(以81% [25mM NH₄HCO₃] - 19% [100% CH₃CN]开始并以45% [25mM NH₄HCO₃] - 55% [100% CH₃CN]结束)。将最好的级分进行聚池,并将溶剂去除以提供化合物:

[0032] 2, LC-MS ES⁺m/z=377.1; 室温2.01min, 方法A. [α]_D²³+7.6 (c0.64, MeOH). mp 161.4℃. ¹H NMR (300MHz, CD₃OD) δppm 0.91 (m, 3H), 1.26-1.43 (m, 10H), 1.57 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 3.60 (d, J=5.1Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 4.13 (m, 4H), 4.24 (m, 1H), 7.41 (s, 1H)。

[0033] 3, LC-MS ES⁺m/z=513.0; 室温2.49min, 方法A. [α]_D²³+32.1 (c0.29, MeOH). ¹H NMR

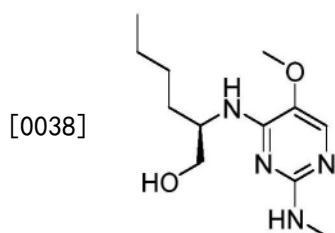
(300MHz, CD_3OD) δ_{ppm} 0.91 (m, 3H), 1.22-1.44 (m, 16H), 1.68 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.98-4.24 (m, 10H), 4.41 (m, 1H), 7.46 (s, 1H)。

[0034] 5的制备



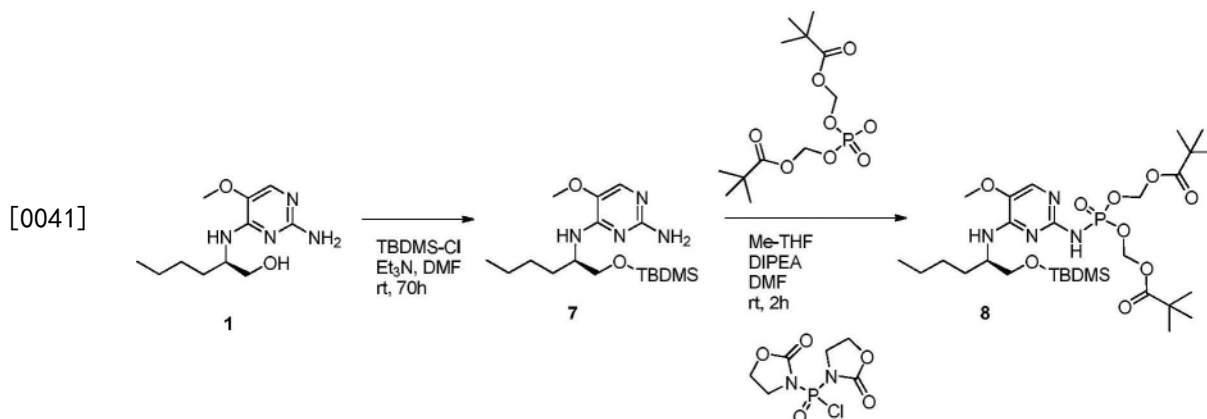
[0036] 在钢制反应器中,将二甲胺(6.67mL,132.8mmol)和碘化亚铜(I)(19.28mg,0.13mmol)的水溶液添加至(R)-2-((2-氯-5-甲氧基嘧啶-4-基)氨基)己烷-1-醇(关于合成参见W0 2012/136834)(500mg,1.92mmol)在1,4-二噁烷(5mL)的溶液中。将该反应混合物加热至160℃过夜。将该反应冷却并且通过填充硅藻土(Celite)过滤,并且将溶剂蒸发至干燥以给出粗品,将其通过柱色谱法在硅胶上进行纯化,以产生(R)-2-((2-(二甲氨基)-5-甲氧基嘧啶-4-基)氨基)己烷-1-醇(250mg,0.93mmol)。LC-MS $\text{ES}^+ m/z = 269.1$;室温:2.00min,方法A。 ^1H NMR(300MHz, CD_3OD) δ_{ppm} 0.90 (m, 3H), 1.25-1.47 (m, 4H), 1.58 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 3.05 (s, 6H), 3.61 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 4.21 (m, 1H), 7.35 (br s, 1H)。 $[\alpha]_D^{23} -8.25$ (c 0.64, CH_3OH)。mp 86.1℃

[0037] 6的制备



[0039] 除了使用甲胺外,用制备化合物5的类似程序制备化合物6。LC-MS $\text{ES}^+ m/z = 255.1$;室温:1.85min,方法A。 ^1H NMR(300MHz, CD_3OD) δ_{ppm} 0.91 (m, 3H), 1.26-1.44 (m, 4H), 1.56 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 2.81 (s, 3H), 3.60 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.18 (m, 1H), 7.32 (br s, 1H)。 $[\alpha]_D^{23} +1.8$ (c 0.59, CH_3OH)。mp 86.1℃

[0040] 8的制备



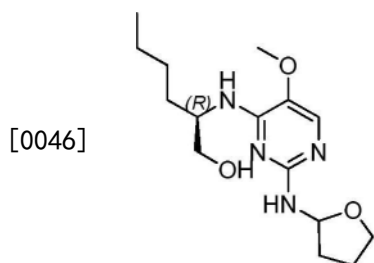
[0042] 步骤1. 7的制备。将TBDMSCl(7.53g,49.9mmol)添加至1(10.0g,41.6mmol)和 Et_3N

(11.6mL, 83.2mmol) 在DMF (120mL) 中的溶液中。将混合物在室温搅拌70h。将EtOAc和10%水性NaHCO₃倾倒入溶液中。将各层分离并将有机层用盐水洗涤(两次)。将有机层用MgSO₄干燥, 通过过滤去除固体, 并将滤液中的溶剂在减压下去除以给出橙色油, 将其通过硅胶柱色谱法使用以下梯度纯化: 从CH₂Cl₂ 100%至90%、CH₃OH 0至10% (用5%水性NH₃), 以提供呈无色油的7。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.01 (s, 6H), 0.80-0.88 (m, 12H), 1.17-1.34 (m, 4H), 1.45 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 2.48-2.52 (m, 12H), 3.49 (dd, J=10.00, 6.50Hz, 1H), 3.58 (dd, J=10.00, 4.70Hz), 3.66 (s, 3H), 4.09 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.84 (d, J=9.09Hz, 1H), 7.37 (s, 1H)。LC-MS ES⁺m/z=355.1, 室温: 3.76, 方法: B)。 $[\alpha]_D^{20} +53.33$ (c 0.3, DMF)。

[0043] 步骤2. 在N₂下, 将双(2-氧基-3-噁唑烷基)次磷酰氯(1.05g, 4.11mmol)分批添加至((羟基磷酰基)双(氧基))双(亚甲基)双(2,2-二甲基丙酸甲酯)(1.61g, 4.93mmol)和DIPEA(2.83mL, 16.4mmol)在无水2-甲基四氢呋喃/DMF(20mL/14.5mL)中的溶液中。将该混合物在室温搅拌2h。

[0044] 步骤3. 然后在无水2-甲基四氢呋喃(17mL)中添加7(729mg, 2.06mmol), 并且将该混合物在室温下搅拌2h。将该反应混合物用EtOAc和水稀释, 将有机层用盐水洗涤(两次), 经MgSO₄干燥, 通过过滤除去固体, 并且在减压下去除滤液中的溶剂, 然后通过硅胶柱色谱法使用以下流动相梯度纯化: 从庚烷/EtOAc(80/20至0/100), 以给出290mg的呈无色油的8。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.84 (t, J=6.82Hz, 3H), 1.12 (s, 18H), 1.18-1.34 (m, 4H), 1.41-1.65 (m, 2H), 3.42 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.03 (m, 1H), 4.61 (t, J=5.56Hz, 1H), 5.60 (m, 4H), 6.44 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.77 (m, 1H)。LC-MS ES⁺m/z=547.6, 室温: 3.02, 方法: B

[0045] (2R)-2-((5-甲氧基-2-((四氢呋喃-2-基)氨基)嘧啶-4-基)氨基)己烷-1-醇(9)的制备

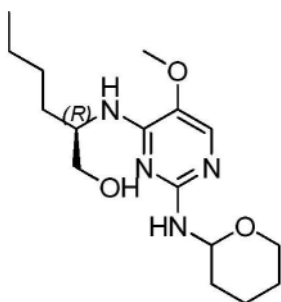


[0047] 在舒伦克(Schlenk)烧瓶中, 将DOWEX(R) 50WX2(100-200目)树脂(一个刮勺)在室温添加至1(4g, 11.3mmol)、2,3-二氢呋喃(1031μL, 13.5mmol, 1.2当量)在无水二氯乙烷(99mL)中的混合物中。将该混合物在80℃下搅拌20h。添加另外的2,3-二氢呋喃(688μL, 9.03mmol, 0.8当量), 并且将该混合物在80℃下搅拌20h。用CH₂Cl₂和水进行萃取, 并且分离各层。将有机层经MgSO₄干燥, 过滤并在减压下除去溶剂以提供标题化合物。

[0048] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δppm 0.84 (t, J=6.57Hz, 3H), 1.18-1.33 (m, 4H), 1.46 (m, 1H), 1.58 (m, 1H), 1.74 (m, 2H), 1.96 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 3.61 (m, 1H), 3.64-3.73 (m, 4H), 4.04 (m, 1H), 4.65 (t, J=5.31Hz, 1H), 5.73 (m, 1H), 6.00 (d, J=9.09Hz, 1H), 6.54 (m, 1H), 7.42 (s, 1H)。LC-MS ES⁺m/z=311.3, 室温: 2.30, 方法: B)

[0049] (2R)-2-((5-甲氧基-2-((四氢-2H-吡喃-2-基)氨基)嘧啶-4-基)氨基)己烷-1-醇(10)的制备

[0050]



[0051] 除了使用外3,4-二氢-2H-吡喃外,根据制备化合物9的程序制备化合物10。

[0052] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.85 (m, 3H), 1.17-1.66 (m, 12H), 1.82 (br d, $J=4.55\text{Hz}$, 1H), 3.35-3.50 (m, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.77 (m, 1H), 4.02 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 5.01 (m, 1H), 6.02 (d, $J=8.59\text{Hz}$, 1H), 6.46 (t, $J=10.11\text{Hz}$, 1H), 7.43 (m, 1H)。LC-MS $\text{ES}^+ m/z=325.1$, 室温; 2.45, 方法: B)

[0053] 分析方法。

[0054]

方法 代码	仪器	柱	流动相	梯度	流速 (mL/min) 柱温 ($^{\circ}\text{C}$)	运行 时间 (min)
A	Agilent (安捷伦) 1100 - DAD-MS D G1956A	YMC-pack ODS-AQ C18 (50 x 4.6 mm, 3	A: 在 H_2O 中的 0.1% HCOOH B: CH_3CN	从 95% A 开 始, 在 4.8 min 内至 5% A, 保持 1.0 min, 在 0.2	2.6 35	6.0

		μm)		min 内至 95% A。		
[0055]	B	Waters (沃 特斯) Acquity	BEH C18 (1.7 μm , 2.1 x 100 mm)	A: 95% 7 mM NH_4OAc / 5% CH_3CN B: CH_3CN	从 84.2% A 和 15.8% B (保持 0.49 min) 在 2.18 min 内到 10.5% A 和 89.5% B, 保 持 1.94 min, 并且在 0.73 min 内回至 起始条件, 保持 0.73 min	0.343 40 6.07

[0056] 支持ADME数据。

[0057] 固有清除率(CL_{int})。在大鼠和人肝微粒体中测定 CL_{int} 。在37℃下、以1 μM 的化合物浓度、以及1mg/mL的微粒体蛋白浓度的条件下进行孵育。以最多60min的间隔取出系列样品并分析化合物的浓度以确定其固有清除率。将化合物在大鼠和人肝细胞(10^6 个细胞/mL)中,以1 μM 孵育0、10、20、40、60和120min。以最多120min的间隔取出系列样品并分析化合物的浓度以确定其固有清除率。

[0058] 体外通透性和外排。使用经人MDR1(P-糖蛋白)转染的MDCK细胞系测定体外通透性和由P-糖蛋白(P-gp)转运的潜力。将化合物添加至MDCK-MDR1细胞的融汇单层的顶端(A)或基底外侧(B)。通过使用特定的LC-MS/MS方法监测膜的相对侧上的测试化合物的形态,测量GF120918缺失和存在时在A→B方向上的通透性,以及测量GF120918缺失时的情况下在B→A方向上的通透性。计算外排比($\text{B} \rightarrow \text{A}-\text{GF120918}/\text{A} \rightarrow \text{B}-\text{GF120918}$)以确定测试化合物是否是P-gp底物。

[0059] 血浆稳定性。在37℃下在大鼠和人血浆中测量血浆稳定性7或24h。以1 μM 孵育化合物。在24孔板中手动进行孵育,并在用乙腈淬灭之前的不同时间点除去系列样品(100 μL)。

[0060] 通过LC-MS/MS(无内部标准)分析样品。相对于 $t=0$ 样品的平均峰面积计算每个时间点剩余的百分比。根据这些数据计算半衰期($t_{1/2}$ 小时)。

[0061] SGF稳定性和FASSIF稳定性。测量了在胃蛋白酶和补充有胰酶和酯酶的禁食态模拟肠液(FASSIF)存在下模拟胃液(SGF)中前药的稳定性。将测试化合物在体外孵育最多2小时,并在不同时间点取样。通过LC-MS/MS分析样品的母体化合物消失。相对于 $t=0$ 样品的平均峰面积计算每个时间点剩余的百分比。根据这些数据计算半衰期($t_{1/2}$ 小时)。

[0062] 大鼠中的药代动力学。使用5mg/kg当量剂量的水性溶液作为前药口服给予SD大鼠。在不同时间点收集血浆样品,并使用LC-MS/MS分析母体和前药的浓度。使用Phoenix WinNonlin 6.3计算PK参数。确定前药和母体的 C_{max} (ng/mL)和 $\text{AUC}_{(0-\text{last})}$ (ng·h/mL)。

[0063] 表1:MDCK-MDR1细胞系中的通透性。

侵入	Papp A->B + GF120918	Papp A->B - GF120918	外排率 B->A/A->B
2	1.6	0.4	54
3	1.6	< 0.2	> 61
5	47	20	3.2
6	27.5	6.8	10
8	10	< 1	> 43
10	17	1.8	33

[0065] 表2:肝微粒体和肝细胞中的固有清除率(CLint)。

侵入	CL _{int} 大鼠肝微 粒体	CL _{int} 人肝微粒体	CL _{int} 大鼠 肝细胞	CL _{int} 人肝细 胞
2	18	< 7.7	20	< 1.9
3	178*	297*	110	17
5	141	14	280	80
6	25	18	120	33
8	>347	n.d.	>280	>280
9	27	115	n.d.	n.d.
10	>347*	88-90	n.d.	n.d.

[0068] n.d. = 未完成,*两个数据点的平均值

[0069] 表3:模拟胃液 (SGF) 和禁食态模拟肠液 (FASSIF) 的稳定性及大鼠和人血浆的稳定性。

侵入	t _{1/2} SGF (h)	t _{1/2} FASSIF (h)	t _{1/2} 大鼠血 浆 (h)	t _{1/2} 人血浆 (h)
2	> 6	> 6	> 30	> 30
3	> 6	> 6	> 30	> 30
5	> 6	> 6	> 30	> 30
6	> 6	> 6	> 30	> 30
8	3.9	0.1	< 0.4	1
9	1	1.1	< 0.4	< 0.4
10	0.3	0.8	1.4	1.4

[0071] 表4:口服给予大鼠1和前药。

[0072]	侵入	$C_{\max}$ 前药	$AUC_{(0-\text{last})}$ 前药	$C_{\max}$ 化合物 1	$AUC_{(0-\text{last})}$ 化合物 1
	1	n.a.	n.a.	177	486
	2	1360	2567	BQL	BQL
	5	88	144	37	60
	6	129	206	47	114

[0073] n.a. = 不适用。