



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111925318 B

(45) 授权公告日 2023. 02. 28

(21) 申请号 202010941188.5

(22) 申请日 2020.09.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111925318 A

(43) 申请公布日 2020.11.13

(66) 本国优先权数据
201910864721.X 2019.09.09 CN(73) 专利权人 天津红日药业股份有限公司
地址 301700 天津市武清区天津新技术产
业园区武清开发区泉发路20号

专利权人 中国医学科学院药物研究所

(72) 发明人 冯志强 陈晓光 马辰 杨阳
来芳芳 王雨辰 季鸣 郭凯静(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 崔锡强

(51) Int.Cl.

C07D 213/30 (2006.01)

C07C 51/41 (2006.01)

C07C 51/43 (2006.01)

C07C 57/145 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01) (续)

(56) 对比文件

CN 109153670 A, 2019.01.04 (续)

审查员 严华

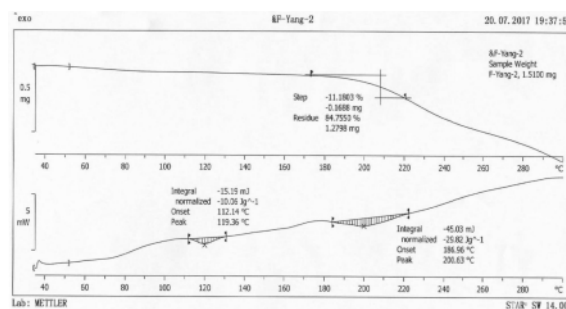
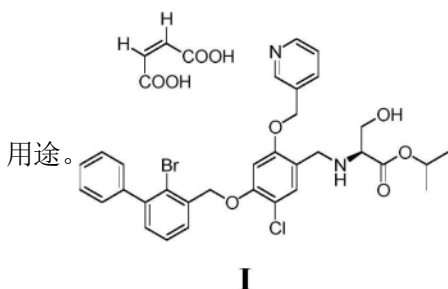
权利要求书3页 说明书19页 附图2页

(54) 发明名称

一个烟醇醚衍生物的马来酸盐及其晶型和应用

(57) 摘要

本发明公开了一个烟醇醚衍生物的马来酸盐及其晶型和应用,即(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐及其立体异构体、晶型及其制法和药物组合物与用途。具体而言,涉及式I所示的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐及其晶型,其立体异构体及其制备方法,含有一个或多个这化合物的组合物,和该化合物及其晶型在制备治疗与PD-1/PD-L1信号通路有关的疾病如癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病的药物中的



[接上页]

(51) Int.Cl.

A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 5/14 (2006.01)
A61P 5/16 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

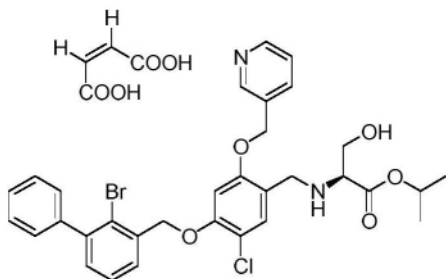
(56) 对比文件

CN 109153670 A, 2019.01.04

CN 107417564 A, 2017.12.01

CN 109311792 A, 2019.02.05

1. 如式I所示的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐及其立体异构体,



I.

2. 一种(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的晶A型固体物质,其特征在于,当使用粉末X射线衍射分析采用Cu靶辐射实验条件时,衍射峰位置:2-Theta值($^{\circ}$)或d值($\text{\AA}$)和衍射峰相对强度(%)具有如下特征:

Peak	2-Theta $\pm 0.2^{\circ}$	d($\text{\AA}$) ± 0.2 $\text{\AA}$	intensity% $\pm 5\%$	Peak	2-Theta $\pm 0.2^{\circ}$	d($\text{\AA}$) ± 0.2 $\text{\AA}$	intensity % $\pm 5\%$
1	4.5	19.6	42.3	22	21.6	4.1	35.5
2	5.6	15.9	50.1	23	22.2	4.0	15
3	6.8	13.0	14.0	24	22.7	3.9	33.6
4	8.5	10.4	16.2	25	23.1	3.9	50.5
5	9.1	9.8	100	26	23.9	3.7	42
6	10.2	8.7	28.1	27	25.0	3.6	16.4
7	12.4	7.1	11.1	28	25.4	3.5	19.2
8	13.3	6.7	18.6	29	26.6	3.4	28
9	13.6	6.5	35.6	30	28.0	3.2	13.9
10	14.6	6.1	12.1	31	28.4	3.1	15.9

11	15.5	5.7	15	32	29.3	3.1	19.1
12	16.0	5.5	11	33	29.9	3.0	14.2
13	16.6	5.3	13.6	34	30.4	2.9	14.4
14	17.1	5.2	14.2	35	31.0	2.9	15.7
15	17.4	5.1	13.8	36	31.6	2.8	15.6
16	17.9	4.9	17.4	37	32.7	2.7	12.2
17	18.7	4.7	17.6	38	34.0	2.6	12.7
18	19.0	4.7	20.1	39	34.9	2.6	11.9
19	19.7	4.5	35.5	40	35.7	2.5	13.4
20	20.0	4.4	46.6	41	39.0	2.3	11.2
21	20.7	4.3	58.3				

3. 根据权利要求2的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的晶A型固体物质,其特征在于,使用红外光谱进行分析时在3059、2984、2841、2761、2519、2170、1988、1968、1807、1741、1716、1623、1602、1580、1505、1481、1460、1446、1425、1401、1389、1368、1309、1262、1242、1205、1171、1111、1095、1069、1040、1004、972、953、924、884、870、864、854、824、788、761、721、703、662 $\text{cm}^{-1} \pm 2\text{cm}^{-1}$ 的吸收峰为所述晶A型固体物质所呈现的红外光谱特征峰位置。

4. 根据权利要求2的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的晶A型固体物质,其特征在于,使用差示扫描量热技术分析时,表现为当升温速率为每分钟10℃的DSC图谱中在175℃ $\pm 3^\circ\text{C}$ 处含有1个吸热峰。

5. 一种(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的混晶固体物质,其特征在于,含有任意非零比例的权利要求2中所述的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的晶A型固体物质。

6. 权利要求1所述的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐或权利要求2所述的晶A型固体物质的制备方法,其特征在于,所述的制备方法为:将(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯和马来酸在溶剂中反应成盐;将获得的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐在丙酮和水的混合溶剂中结晶,丙酮和水的比例范围为200:1至1:1间。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,将(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯和马来酸在溶剂中反应成盐时,所述溶剂为异丙醇、或四氢呋喃、或丙酮。

8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述丙酮和水的比例范围在50:1至5:1间。

9. 根据权利要求6所述的方法, 其特征在于, 所述丙酮和水的比例范围在25:1至10:1间。

10. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述的药物组合物包含作为有效成分的权利要求1所述的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐及其立体异构体或权利要求2中所述的晶A型固体物质以及其药学上可接受的载体或赋形剂。

11. 权利要求2中所述的晶A型固体物质在制备预防和/或治疗黑色素瘤或结肠癌的药物中的应用。

一个烟醇醚衍生物的马来酸盐及其晶型和应用

技术领域

[0001] 本发明公开了一个烟醇醚衍生物的马来酸盐及其晶型和应用,即(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐、及其制法、晶型和药物组合物与用途。具体而言,涉及式I所示的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐,其立体异构体及其制备方法和晶型,含有一个或多个这化合物的组合物,和该化合物在制备预防或治疗与PD-1/PD-L1信号通路有关的疾病如癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病等药物中的用途。

背景技术

[0002] 随着对肿瘤免疫研究的深入,人们发现肿瘤微环境可以保护肿瘤细胞不被机体免疫系统识别和杀伤,肿瘤细胞的免疫逃逸在肿瘤发生、发展中扮演了非常重要的角色。2013年Science杂志将肿瘤免疫治疗列为十大突破之首,再次让免疫治疗成为肿瘤治疗领域的“焦点”。机体免疫细胞的激活或抑制是通过正性信号和负性信号来调节,其中程序性死亡分子1(programmed death 1,PD-1)/PD-1配体(PD-1ligand,PD-L1)便是负性免疫调节信号,抑制了肿瘤特异性CD8⁺T细胞的免疫活性,介导了免疫逃逸。

[0003] 肿瘤细胞所具有的逃避免疫系统的能力,是通过在其表面产生的程序性死亡配体(PD-L1)结合到T细胞的PD-1蛋白上实现的。机体内的肿瘤微环境会诱导浸润的T细胞高表达PD-1分子,肿瘤细胞会高表达PD-1的配体PD-L1和PD-L2,导致肿瘤微环境中PD-1通路持续激活,T细胞功能被抑制而不能发现肿瘤以至于不能向免疫系统发出需要攻击肿瘤和杀伤肿瘤细胞的治疗。PD-1抗体是针对PD-1或者PD-L1的一种抗体蛋白,使得前两种蛋白不能发生结合,阻断这一通路,部分恢复T细胞的功能,使这些细胞能够继续杀伤肿瘤细胞。

[0004] 最近,一系列令人惊喜的研究结果证实PD1/PD-L1抑制性抗体对多种肿瘤具有强大的抗癌活性,格外引人注目。2014年9月4日美国默克的**Keytruda®**(pembrolizumab)成为FDA批准的首例PD-1单抗用于治疗对其它药物治疗无效的晚期或无法切除的黑色素瘤患者。目前,默沙东正在30多种不同类型的癌症中试验Keytruda的潜力,包括各类血液癌症、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、头颈部癌症。2014年12月22日,制药巨头百时美施贵宝公司不负重望,率先发力,获得美国食品药品监督管理局(FDA)加速批准,其研发的抗癌免疫疗法药物nivolumab以Opdivo的商品名上市,用于治疗对其它药物没有应答的不可切除的或转移性黑色素瘤患者,是继默沙东Keytruda之后第二个在美国上市的PD-1抑制剂。FDA于2015年3月4日批准了nivolumab用于治疗在经铂为基础化疗期间或化疗后发生疾病进展的转移性鳞性非小细胞肺癌。根据默沙东公布的Keytruda(pembrolizumab)治疗实体瘤的一项Ib期KEYNOTE-028研究数据,Keytruda治疗在25例胸膜间皮瘤(pleural mesothelioma, PM)患者中取得了28%的总缓解率(ORR),并有48%的患者病情稳定,疾病控制率达到了76%。对当前任何已获批药物均无治疗反应的晚期霍奇金淋巴瘤(HL)患者,接受默沙东Keytruda和百时美Opdivo治疗后,能够达到完全缓解。在2015AACR年会上,约翰霍普金斯基梅尔癌症中心(Kimmel Cancer Center)的肿瘤内科学副教授Leisha A.Emens,MD,PhD做出

的报道指出,罗氏的MPDL3280A这一具有抗PD-L1作用的单克隆抗体,在晚期三阴性乳腺癌中表现出了持久的疗效。

[0005] 虽然肿瘤免疫治疗被认为是靶向治疗后癌症治疗的革命。但是,单抗治疗药物有其本身的缺陷:易被蛋白酶分解,因而在体内不稳定,不能口服;易产生免疫交叉反应;产品质量不易控制,制作技术要求高;大量制备和纯化比较困难,生产成本高;使用不方便,只能注射或点滴。所以,PD1/PD-L1相互作用小分子抑制剂是肿瘤免疫治疗的更佳选择。

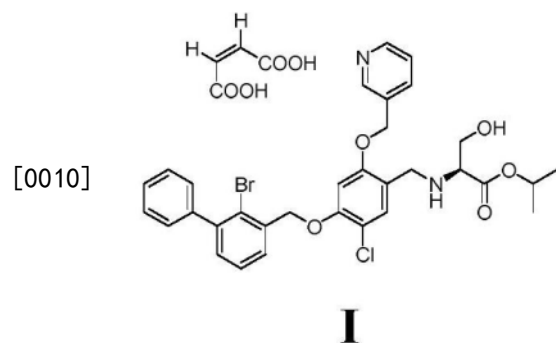
[0006] 本发明人在国际申请PCT/CN2017/085418中公开了(S)-N-[2-(吡啶-3-亚甲氧基)-4-(2-溴-3-(苯基)苄氧基)-5-氯代苄基]丝氨酸异丙酯盐酸盐以及其在制备预防或治疗与PD-1/PD-L1信号通路有关的疾病如癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病等药物中的用途。发明人在后期研究中发现该化合物的马来酸盐相比其盐酸盐在稳定性和药效上均强于后者。本发明的实施例1为完全按照国际专利申请PCT/CN2017/085418中的制备方法制备的其盐酸盐,作为对比例。

发明内容

[0007] 本发明解决的技术问题是提供一种具有抑制PD1/PD-L1相互作用的结构式I的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐,以及其立体异构体,其制备方法、药物组合物和其在制备预防或治疗与PD1/PD-L1信号通路有关疾病药物中的用途。

[0008] 为解决本发明的技术问题,本发明提供如下技术方案:

[0009] 本发明技术方案的第一方面是提供如式I所示的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐及其立体异构体,



[0011] 本发明技术方案的第二方面提供了一种(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的晶A型固体物质,其特征在于,当使用粉末X射线衍射分析采用Cu靶辐射实验条件时,衍射峰位置:2-Theta值(°)或d值(Å)和衍射峰相对强度(%)具有如下特征:

[0012]

Pe ak	2-Th eta $\pm 0.2^\circ$	d(Å) ± 0.2 Å	intensity % $\pm 5\%$	Pe ak	2-The ta $\pm 0.2^\circ$	d(Å) ± 0.2 Å	intensit y% $\pm 5\%$
1	4.5	19.6	42.3	22	21.6	4.1	35.5
2	5.6	15.9	50.1	23	22.2	4.0	15

[0013]

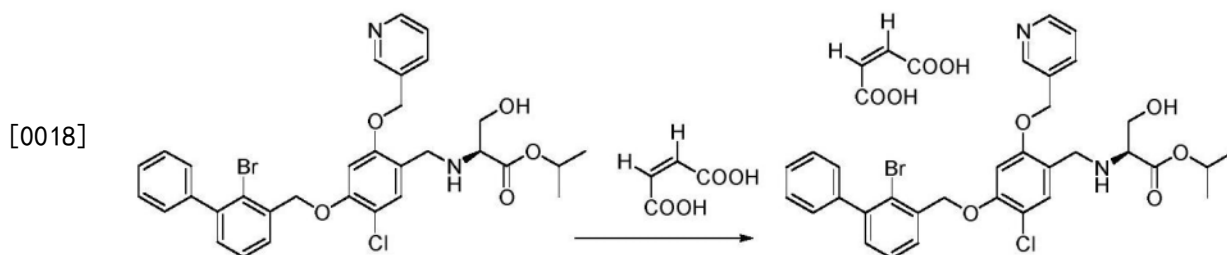
3	6.8	13.0	14.0	24	22.7	3.9	33.6
4	8.5	10.4	16.2	25	23.1	3.9	50.5
5	9.1	9.8	100	26	23.9	3.7	42
6	10.2	8.7	28.1	27	25.0	3.6	16.4
7	12.4	7.1	11.1	28	25.4	3.5	19.2
8	13.3	6.7	18.6	29	26.6	3.4	28
9	13.6	6.5	35.6	30	28.0	3.2	13.9
10	14.6	6.1	12.1	31	28.4	3.1	15.9
11	15.5	5.7	15	32	29.3	3.1	19.1
12	16.0	5.5	11	33	29.9	3.0	14.2
13	16.6	5.3	13.6	34	30.4	2.9	14.4
14	17.1	5.2	14.2	35	31.0	2.9	15.7
15	17.4	5.1	13.8	36	31.6	2.8	15.6
16	17.9	4.9	17.4	37	32.7	2.7	12.2
17	18.7	4.7	17.6	38	34.0	2.6	12.7
18	19.0	4.7	20.1	39	34.9	2.6	11.9
19	19.7	4.5	35.5	40	35.7	2.5	13.4
20	20.0	4.4	46.6	41	39.0	2.3	11.2
21	20.7	4.3	58.3				

[0014] 所述的晶A型固体物质,其特征在于,使用红外光谱进行分析时在3059、2984、2841、2761、2519、2170、1988、1968、1807、1741、1716、1623、1602、1580、1505、1481、1460、1446、1425、1401、1389、1368、1309、1262、1242、1205、1171、1111、1095、1069、1040、1004、972、953、924、884、870、864、854、824、788、761、721、703、662 $\text{cm}^{-1} \pm 2\text{cm}^{-1}$ 的吸收峰为所述晶A型固体物质所呈现的红外光谱特征峰位置。

[0015] 所述的晶A型固体物质,其特征在于,使用差示扫描量热技术分析时,表现为当升温速率为每分钟10℃的DSC图谱中在175℃±3℃处含有1个吸热峰。

[0016] 本发明技术方案的第二方面还提供了一种(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的混晶固体物质,其特征在于,含有任意非零比例的所述的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐的晶A型固体物质。

[0017] 本发明技术方案第三方面是提供了第一方面所述化合物和第二方面所述晶A型固体物质的制备方法:



[0019] 式I所述化合物的制备方法为:将(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯和马来酸在溶剂中反应成盐,最佳溶剂为异丙醇、或四氢呋喃、或丙酮;将获得的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐在丙酮和水的混合溶剂中结晶,丙酮和水的比例范围为200:1至1:1间,较佳比例范围在50:1至5:1间,最佳比例范围在25:1至10:1间。在所述的式I化合物及其溶剂化物和其盐的制备过程中,不同结晶条件可能出现多晶。

[0020] 本发明技术方案第四方面是提供了一种药物组合物,所述的药物组合物包含作为有效成分的本发明第一方面所述的(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐及其立体异构体或第二方面所述晶A型固体物质以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0021] 本发明还涉及以本发明化合物作为活性成份的药物组合物。该药物组合物可根据本领域公知的方法制备。可通过将本发明化合物与一种或多种药学上可接受的固体或液体赋形剂和/或辅剂结合,制成适于人或动物使用的任何剂型。本发明化合物在其药物组合物中的含量通常为0.1-95重量%。

[0022] 本发明化合物或含有它的药物组合物可以单位剂量形式给药,给药途径可为肠道或非肠道,如口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、鼻腔、口腔粘膜、眼、肺和呼吸道、皮肤、阴道、直肠等。

[0023] 给药剂型可以是液体剂型、固体剂型或半固体剂型。液体剂型可以是溶液剂(包括真溶液和胶体溶液)、乳剂(包括o/w型和w/o型和复乳)、混悬剂、注射剂(包括水针剂、粉针剂和输液)、滴眼剂、滴鼻剂、洗剂和搽剂等;固体剂型可以是片剂(包括普通片、肠溶片、含片、分散片、咀嚼片、泡腾片、口腔崩解片)、胶囊剂(包括硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊)、颗粒剂、散剂、微丸、滴丸、栓剂、膜剂、贴片、气(粉)雾剂、喷雾剂等;半固体剂型可以是软膏剂、凝胶剂、糊剂等。

[0024] 本发明化合物可以制成普通制剂、也制成是缓释制剂、控释制剂、靶向制剂及各种微粒给药系统。

[0025] 为了将本发明化合物制成片剂,可以广泛使用本领域公知的各种赋形剂,包括稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、润滑剂、助流剂。稀释剂可以是淀粉、糊精、蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、山梨醇、木糖醇、微晶纤维素、硫酸钙、磷酸氢钙、碳酸钙等;湿润剂可以是水、乙醇、异丙醇等;粘合剂可以是淀粉浆、糊精、糖浆、蜂蜜、葡萄糖溶液、微晶纤维素、阿拉伯胶浆、明胶浆、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、丙烯酸树脂、卡波姆、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇等;崩解剂可以是干淀粉、微晶纤维素、低取代羟丙基纤维素、交联聚乙烯吡咯烷酮、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、碳酸氢钠与枸橼酸、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、十二烷基磺酸钠等;润滑剂和助流剂可以是滑石粉、二氧化硅、硬脂酸盐、酒石酸、液体石蜡、聚乙二醇等。

[0026] 还可以将片剂进一步制成包衣片,例如糖包衣片、薄膜包衣片、肠溶包衣片,或双层片和多层片。

[0027] 为了将给药单元制成胶囊剂,可以将有效成分本发明化合物与稀释剂、助流剂混合,将混合物直接置于硬胶囊或软胶囊中。也可将有效成分本发明化合物先与稀释剂、黏合剂、崩解剂制成颗粒或微丸,再置于硬胶囊或软胶囊中。用于制备本发明化合物片剂的各种稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、助流剂品种也可用于制备本发明化合物的胶囊剂。

[0028] 为将本发明化合物制成注射剂,可以用水、乙醇、异丙醇、丙二醇或它们的混合物作溶剂并加入适量本领域常用的增溶剂、助溶剂、pH调剂剂、渗透压调节剂。增溶剂或助溶剂可以是泊洛沙姆、卵磷脂、羟丙基-β-环糊精等;pH调剂剂可以是磷酸盐、醋酸盐、盐酸、氢氧化钠等;渗透压调节剂可以是氯化钠、甘露醇、葡萄糖、磷酸盐、醋酸盐等。如制备冻干粉针剂,还可加入甘露醇、葡萄糖等作为支撑剂。

[0029] 此外,如需要,也可以向药物制剂中添加着色剂、防腐剂、香料、矫味剂或其它添加剂。

[0030] 为达到用药目的,增强治疗效果,本发明的药物或药物组合物可用任何公知的给药方法给药。

[0031] 本发明化合物药物组合物的给药剂量依照所要预防或治疗疾病的性质和严重程度,患者或动物的个体情况,给药途径和剂型等可以有大范围的变化。一般来讲,本发明化合物的每天的合适剂量范围为0.001-150mg/Kg体重,优选为0.01-100mg/Kg体重。上述剂量可以一个剂量单位或分成几个剂量单位给药,这取决于医生的临床经验以及包括运用其它治疗手段的给药方案。

[0032] 本发明的化合物或组合物可单独服用,或与其他治疗药物或对症药物合并使用。当本发明的化合物与其它治疗药物存在协同作用时,应根据实际情况调整它的剂量。

[0033] 本发明技术方案的第五方面是提供了(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐及其立体异构体或第二方面所述的晶A型固体物质在制备预防和/或治疗与PD-1/PD-L1信号通路有关疾病的药物中的应用。

[0034] 所述的与PD-1/PD-L1信号通路有关的疾病选自癌症、感染性疾病、自身免疫性疾病。所述的癌症选自皮肤癌、肺癌、泌尿系肿瘤、血液肿瘤、乳腺癌、胶质瘤、消化系统肿瘤、生殖系统肿瘤、淋巴瘤、神经系统肿瘤、脑瘤、头颈癌。所述的感染性疾病选自细菌感染、病毒感染。所述的自身免疫性疾病选自器官特异性自身免疫病、系统性自身免疫病,其中,所述的器官特异性自身免疫病包括慢性淋巴细胞性甲状腺炎、甲状腺功能亢进、胰岛素依赖

型糖尿病、重症肌无力、溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、肺出血肾炎综合征、原发性胆汁性肝硬化、多发性脑脊髓硬化症、急性特发性多神经炎,所述的系统性自身免疫病包括类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、系统性血管炎、硬皮病、天疱疮、皮炎、混合性结缔组织病、自身免疫性溶血性贫血。

[0035] 有益技术效果:

[0036] 本发明化合物(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐与盐酸盐相比,其晶型稳定,对光照射、高湿、高温环境的稳定性好,在小鼠皮下移植瘤模型上或在人免疫系统重建的NSG荷瘤小鼠模型上对多种类型肿瘤具有较高的抑瘤率。

附图说明

[0037] 图1、实施例1化合物的差示扫描量热分析/热重分析图谱

[0038] 图2、实施例2化合物的差示扫描量热分析/热重分析图谱

[0039] 图3、实施例2化合物的粉末X-射线衍射图谱

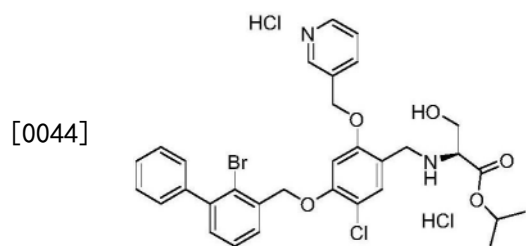
具体实施方式:

[0040] 以下将结合实施例对发明作进一步说明,但并不限制本发明的范围。

[0041] 测定仪器:核磁共振光谱用Bruker AVANCE III 500型高分辨超导核磁共振谱仪。质谱用QSTAR Elite LC/MS/MS System。元素分析用FLASH1112微量元素分析仪及MX-5百万分之一天平。紫外分析用岛津UV-2700紫外可见分光光度仪。比旋光度用美国PE Model 343旋光仪。粉末X-射线衍射分析用D8-Advance型X-射线衍射仪。差示扫描量热分析/热重分析(DSC/TG)用瑞士Mettler Mettler TGA/DSC³热分析仪。

[0042] 1、盐的制备:

[0043] 实施例1:(S)-N-[2-(吡啶-3-亚甲氧基)-4-(2-溴-3-(苯基)苄氧基)-5-氯代苄基]丝氨酸异丙酯盐酸盐(该实施例作为对比例,为已知化合物,其制备方法和国际申请PCT/CN2017/085418的实施例6完全相同)



[0045] 将598毫克(S)-N-[2-(吡啶-3-亚甲氧基)-4-(2-溴-3-(苯基)苄氧基)-5-氯代苄基]丝氨酸和60毫升无水异丙醇置于100毫升圆底烧瓶中,冰水浴搅拌下加入6毫升二氯亚砷,2滴DMF,室温搅拌2小时后加热回流至反应完全,减压除去溶剂得到(S)-N-[2-(吡啶-3-亚甲氧基)-4-(2-溴-3-(苯基)苄氧基)-5-氯代苄基]丝氨酸异丙酯盐酸盐白色固体。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.62 (s, 1H, -HCl), 9.40 (s, 1H, -HCl), 9.10 (s, 1H, -ArH), 8.86 (d, 1H, -ArH), 8.59 (d, J=7.6Hz, 1H, -ArH), 8.01-7.91 (m, 1H, -ArH), 7.73-7.64 (m, 2H, -ArH), 7.57-7.46 (m, 3H, -ArH), 7.46-7.37 (m, 4H, -ArH), 7.16 (s, 1H, -ArH), 5.47 (s, 2H, -CH₂-), 5.36 (s, 2H, -CH₂-), 4.92 (m, 1H, -CH-), 4.30-4.15 (m, 2H, -CH₂-), 4.05 (s, 1H, -CH-), 3.97 (dd,

$J=12.0, 3.0\text{Hz}$, 1H , $-\text{CH}_2-$), 3.84 (dd, $J=12.0, 3.8\text{Hz}$, 1H , $-\text{CH}_2-$), 1.20 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H , $-\text{CH}_3$), 1.18 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H , $-\text{CH}_3$). MS (FAB): 640 (M).

[0046] 实施例2: (S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐 (IMMH-010)

[0047] 室温下,将(S)-N-[2-(吡啶-3-亚甲氧基)-4-(2-溴-3-(苯基)苄氧基)-5-氯代苄基]丝氨酸异丙酯(2.6g),异丙醇9mL加入到50mL反应瓶中,升温至 40°C ,搅拌0.5h,滴加马来酸(0.594g)-异丙醇(4mL)溶液,控温 $35\sim 45^{\circ}\text{C}$,有固体析出,保温搅拌0.5h,自然降至室温,搅拌过夜。次日,抽滤,滤饼依次用异丙醇0.5mL,丙酮0.5mL淋洗,得淡黄色固体,即为(S)-N-(2-(吡啶-3-甲氧基)-4-(2-溴-3-苯基苄氧基)-5-氯苄基)丝氨酸异丙酯马来酸盐粗品。室温下,将粗品,丙酮26mL加入到50mL反应瓶中,升温至回流,滴加纯化水1.4mL,体系全溶,热过滤,滤毕,转移到50mL反应瓶中,自然降至室温,搅拌析晶过夜。次日,降温至 $5\sim 15^{\circ}\text{C}$,搅拌2h,抽滤,滤饼用丙酮0.5mL淋洗, 45°C 鼓风干燥至恒重,得白色固体0.73g晶体。

[0048] 2、实施例2化合物的结构确证:

[0049] 1) 元素分析:

[0050] (1) 测试仪器:微量元素分析仪FLASH1112及百万分之一天平MX-5。

[0051] (2) 测试方法:碳、氢、氮测定,平行测定两次。

[0052] (3) 测得结果:

[0053] 实施例2化合物的元素分析数据表

含量 (%)	C	H	N
理论值 (%)	57.19	4.80	3.71
实测值 (%)	57.10	4.80	3.63
	57.21	4.78	3.59
平均值 (%)	57.16	4.79	3.61
绝对误差 (%)	0.03	0.01	0.1

[0055] 2) 高分辨质谱:

[0056] (1) 测试仪器:QSTAR Elite LC/MS/MS System

[0057] (2) 测试条件:ESI源

[0058] (3) 测得数据:

[0059] 实施例2化合物的高分辨质谱数据

[M+H] ⁺ 测定值 (m/z)	639.1259
[M+H] ⁺ 理论值 (m/z)	639.1256
误差 ($\times 10^{-6}$)	0.49
分子离子峰分子组成	$\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5\text{ClBr}$
分子式	$\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{ClBr}$

[0061] 3) 紫外吸收光谱:

[0062] (1) 测试仪器: 岛津UV-2700紫外可见分光光度仪

[0063] (2) 测试方法: 将样品配制成一定浓度溶液, 并用同批溶剂作为空白对照, 采用1cm吸收池在190~400nm范围内测定。

[0064] 溶剂: 水-甲醇(1:1)、0.1mol/L盐酸-甲醇(1:1)、0.1mol/L氢氧化钠-甲醇(1:1)

[0065] 试液浓度: 20 μ l/ml。

[0066] (3) 测得数据:

[0067] 实施例2化合物的UV数据表

IMMH-010	$\lambda_{\max}$ (nm)	吸收值	谱带归属
甲醇-水 (1:1)	206.50	2.567	K 带吸收
	237.50	0.622	
	285.30	0.116	
0.1mol/L 盐酸-甲醇 (1:1)	206.60	2.464	
	237.50	0.621	
	285.40	0.147	
0.1mol/L 氢氧化钠- 甲醇(1:1)	227.60	0.550	
	285.70	0.042	

[0069] 4) 红外吸收光谱:

[0070] (1) 测试仪器: 英国PE (Spectrum400) 红外光谱仪

[0071] (2) 测试条件: 衰减全反射(ATR)红外光谱法, 粉末直接进样方式实施例2化合物的IR数据表

吸收峰 (cm^{-1})	振动类型	基团	强度
3059	=C-H 伸缩 振动	芳环, 烯	w
2984, 2840	C-H 伸缩振 动	甲基, 亚甲基	w

[0073]

1716	C=O 伸缩振动	羧基 (马来酸盐)	w
1741	C=O 伸缩振动	酯键	m
1623	C=C 伸缩振动	烯键 (马来酸盐)	m
1600,1580,1505,1446	C=C 伸缩振动	芳环	s
1368,1389,1460	C-H 变形振动	异丙基	s
703,761,788	=C-H 非平面变角振动	芳环	s

[0074]

5) 核磁共振氢谱及碳谱:

[0075]

(1) 测试仪器: Bruker AVANCE III 500型高分辨超导核磁共振谱仪

[0076]

(2) 测试条件: 溶剂为DMSO-d₆, 内标为TMS

[0077]

实施例2化合物的¹H-NMR数据

[0078]

编号	化学位移 (ppm)	谱线多重性	J (Hz)	质子数
1	8.72	d	1.7	1
2	8.56	dd	4.8, 1.7	1
3	7.92	m	\	1
4	7.64	dd	7.7, 1.7	1
5	7.55	s	\	1
6	7.51	t	7.6	1
7	7.49 - 7.46	m	\	1
8	7.46 - 7.44	m,	\	1

[0079]

9	7.44-7.42	m	\	1
10	7.42-7.40	m	\	1
11	7.40-7.38	m	\	2
12	7.38-7.36	m	\	1
13	7.14	s	\	1
14	6.05	s	\	2
15	5.48	brs	\	1
17	5.34	s	\	2
18	5.29	s	\	2
19	4.86	p	6.3	1
20	4.10	s	\	2
21	3.87-3.73	m	\	3
22	1.16	dd	\	6

[0080]

实施例2化合物的¹³C-NMR数据

[0081]

编号	化学位移 (ppm)	碳原子数	碳类型	官能团
1	167.69	1	4°	酯基
2	167.12	2	4°	羧基
3	156.60	1	4°	芳环碳
4	154.76	1	4°	芳环碳
5	149.33	1	3°	芳环碳
6	148.97	1	3°	芳环碳
7	143.10	1	4°	芳环碳
8	140.76	1	4°	芳环碳
9	136.16	1	4°	芳环碳
10	135.68	1	3°	芳环碳
11	135.24	2	3°	烯键

[0082]

12	132.51	1	3°	芳环碳
13	132.00	1	4°	芳环碳
14	131.27	1	3°	芳环碳
15	129.25	2	3°	芳环碳
16	129.10	1	3°	芳环碳
17	128.20	2	3°	芳环碳
18	127.84	1	3°	芳环碳
19	127.78	1	3°	芳环碳
20	123.63	1	3°	芳环碳
21	123.06	1	4°	芳环碳
22	112.90	1	4°	芳环碳
23	100.19	1	3°	芳环碳
24	71.08	1	2°	亚甲基
25	69.66	1	3°	次甲基
26	68.16	1	2°	亚甲基
27	60.47	1	3°	次甲基
28	59.50	1	2°	亚甲基
29	43.34	1	2°	亚甲基
30	21.40	1	1°	甲基
31	21.34	1	1°	甲基

[0083] 6) 比旋光度:

[0084] (1) 测试仪器:美国PE Model 343旋光仪。

[0085] (2) 测定方法:取本品,精密称定,加DMSO溶解并定量稀释制成每1ml中约含50mg的溶液,测定比旋度。

[0086] (3) 测定温度:20℃

[0087] (4) 结果

[0088] 以DMSO为溶剂,测定浓度50mg/ml,实施例2化合物的比旋度为+5.5°。 $[\alpha]_{589}^{20} = +5.5^\circ$ (C=5, DMSO)

[0089] 3、实施例2化合物的晶型分析:

[0090] 1) 粉末X-射线衍射分析:

[0091] (1) 测试仪器:D8-Advance型X-射线衍射仪

[0092] (2) 测试条件:工作电压40kV,工作电流40mA,Cu靶。扫描速度0.02度/步,停留时间0.1秒/步。

[0093] (3) 测试结果(见图3):

[0094] 实施例2化合物的粉末X-射线衍射数据表

[0095]

Intensity %	Angle 2-theta	Intensity Cont	d value Angstrom
42.3	4.509	1707	19.58167
50.1	5.565	2020	15.86828
14.0	6.785	567	13.01670
16.2	8.481	653	10.41733
100.0	9.054	4033	9.75969
28.1	10.206	1133	8.66043
11.1	12.392	449	7.13700
18.6	13.285	749	6.65934
35.6	13.620	1435	6.49629
12.1	14.550	486	6.08317
15.0	15.497	603	5.71323
11.0	15.984	442	5.54049
13.6	16.574	550	5.34433
14.2	17.119	573	5.17560
13.8	17.401	558	5.09221
17.4	17.929	703	4.94346
17.6	18.697	711	4.74221
20.1	18.963	809	4.67625
35.5	19.650	1432	4.51412
46.6	20.037	1880	4.42785

[0096]

58.3	20.655	2351	4.29674
35.5	21.556	1433	4.11923
15.0	22.174	604	4.00580
33.6	22.706	1356	3.91306
50.5	23.110	2036	3.84561
42.0	23.863	1692	3.72585
16.4	24.974	660	3.56261
19.2	25.356	774	3.50974
28.0	26.594	1127	3.34912
13.9	27.986	560	3.18567
15.9	28.414	641	3.13867
19.1	29.261	772	3.04971
14.2	29.872	574	2.98871
14.4	30.398	581	2.93813
15.7	30.948	634	2.88721
15.6	31.580	631	2.83082
12.2	32.673	493	2.73853
12.7	33.988	512	2.63555
11.9	34.858	480	2.57176
13.4	35.712	539	2.51218
11.2	39.004	453	2.30741

[0097] (4) 解析:粉末X-射线衍射分析显示,实施例2化合物为晶态物质。

[0098] 2) 差示扫描量热分析/热重分析(DSC/TG):

[0099] (1) 测试仪器:瑞士Mettler Mettler TGA/DSC3⁺热分析仪

[0100] (2) 参数设置:起始温度35℃;终止温度250℃;升温速率10℃/min。

[0101] (3) 测得数据:DSC:峰顶温度:174.68℃(吸热)。

[0102] TGA:约170℃开始失重,175℃失重明显。

[0103] (4) 解析:DSC显示174.68℃处有一吸热峰,应为实施例2化合物熔融吸收热量导致。

[0104] TGA显示在160℃之前热重曲线基本不变,没有失重,表明实施例2化合物不含结晶溶剂。温度升高至DSC吸热峰顶(约175℃)失重明显,为样品熔融分解导致的失重,DSC吸热峰为实施例2化合物的分解点。

[0105] 4、实施例1化合物和实施例2化合物的稳定性比较

[0106] 1) 实施例1化合物的稳定性

- [0107] (1) 理化性质
 [0108] 外观:类白色粉末
 [0109] 熔点:119.36℃ (DSC法) (见附图1)
 [0110] 纯度:99.5% (HPLC归一化法)
 [0111] $\log P=2.4$
 [0112] (2) 影响因素试验

[0113]

	外观	熔点 (DSC 法, °C)	纯度 (%)	有关物质 (%)
初始	类白色粉末	119.36	99.5	0.5
60℃ 5 天	类白色粉末	118.69	99.5	0.5
RH 92.5% 5 天	无色粘稠液体	-	99.5	0.5
光照 5 天	透明块状固体	-	96.0	4.0

[0114] 实施例1化合物在高温60℃放置5天,外观、熔点、杂质含量均无明显变化,高温条件下稳定;高湿RH92.5%放置5天。严重吸湿,外观呈无色粘稠液体,有关物质未发生变化;光照条件下外观呈透明块状,杂质增加至4.0%,光照条件下不稳定。

- [0115] 2) 实施例2化合物的稳定性
 [0116] (1) 理化性质
 [0117] 外观:白色固体
 [0118] 熔点:174.68℃ (DSC法) (见附图2)
 [0119] 纯度:98.7% (HPLC归一化法)
 [0120] $\log P=3.2$
 [0121] (2) 影响因素试验

	外观	熔点 (DSC 法, °C)	手性杂 质 (%)	纯度 (%)	有关物 质 (%)
[0122]	初始	174.68	0.2	98.7	1.3
	60°C 10 天	174.64	0.2	98.7	1.3
	RH 92.5% 10 天	174.57	0.2	98.7	1.3
	光照 10 天	174.60	0.2	98.6	1.4

[0123] 实施例2化合物光照、高温、高湿条件下稳定。

[0124] 5、实施例1化合物和实施例2化合物对小鼠黑色素瘤B16F10的体内抗肿瘤药效比较

[0125] 实验目的：

[0126] 在小鼠皮下移植瘤模型上评价PD-L1抑制剂实施例1化合物和实施例2化合物对小鼠黑色素瘤B16F10的体内抗肿瘤药效。

[0127] 实验方案：

[0128] 动物分组：实验分为溶剂对照组、环磷酰胺80mg/kg组 (CTX)、实施例1化合物和实施例2化合物分别为5mg/kg组、10mg/kg组。

[0129] 实验步骤：将传代的B16F10瘤株用匀浆器研匀后，用无菌生理盐水清洗两遍后计数，用生理盐水调整细胞浓度为 9×10^6 个/ml肿瘤细胞悬液，将0.2ml细胞混悬液接种到C57BL/6J小鼠右侧腋下，记为第0天。接种后次日动物随机分组，称重后给药。溶剂对照组每天口服给予0.5% CMC；环磷酰胺腹腔给药；待测化合物每天口服给药1次。处理时称量体重，处死动物。剥取肿瘤组织，称重并进行拍照。最后计算肿瘤抑制率，以肿瘤抑制率评价抗肿瘤作用强度。

[0130] 计算统计方法：肿瘤增殖抑制率TGI (%)： $TGI = (1 - T/C) \times 100$ 。(T：治疗组肿瘤重量；C：阴性对照组肿瘤重量)。

[0131] 统计方法：利用Graphpad进行数据统计分析，采用One-way ANOVA检验，* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

[0132] 实验结果：

[0133] 给药后处理动物称取肿瘤重量，实施例1化合物和实施例2化合物对小鼠黑色素瘤B16F10抗肿瘤作用详见下表。

[0134] 实施例2化合物对小鼠B16F10的体内抗肿瘤作用

分组	给药剂量 (mg/kg)	数量 (开始 / 结束)	体重(g) X ±SD		瘤重(g)	
			开始	结束	X ±SD	TGI%
溶剂对照组		10/10	17.32±0.46	21.0±0.7	2.32±0.85	NA
CTX 组	80×1	10/10	16.94±0.43	19.2±0.8	0.23±0.18***	90
实施例 2	5×14	10/10	17.09±0.81	20.0±1.2	1.39±0.84*	40
化合物组	10×14	10/10	17.15±0.50	20.1±1.0	1.04±0.66**	55

[0135] 注：与溶剂对照组比较，*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001，One-way ANOVA NA：不适用

[0136] 实施例1化合物对小鼠B16F10的体内抗肿瘤作用

分组	给药剂量 (mg/kg)	数量 (开始 / 结束)	体重(g) X ±SD		瘤重(g)	
			开始	结束	X ±SD	TGI%
溶剂对照组		7/7	17.1±0.9	18.8±1.1	3.49±0.91	NA
CTX 组	80×1	7/7	16.9±0.8	17.5±0.9	1.00±0.34***	70
实施例 1	5×14	7/7	17.7±1.1	20.1±1.5	3.11±0.98*	11
化合物组	10×14	7/7	18.8±1.4	21.0±1.8	3.04±0.94**	13

[0139] 注：与溶剂对照组比较，*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001，One-way ANOVA NA：不适用

[0140] 6、实施例1化合物和实施例2化合物对小鼠结肠癌MC38的体内抗肿瘤药效比较

[0141] 实验目的：

[0142] 在小鼠皮下移植瘤模型上评价PD-L1抑制剂实施例1化合物和实施例2化合物对小鼠结肠癌MC38的体内抗肿瘤药效。

[0143] 实验方案：

[0144] 动物分组：实验分为溶剂对照组、环磷酰胺80mg/kg组(CTX)、实施例1化合物和实施例2化合物分别5mg/kg组、10mg/kg组。

[0145] 实验步骤：将传代的MC38瘤株用匀浆器研匀后，用无菌生理盐水清洗两遍后计数，用生理盐水调整细胞浓度为 9×10^6 个/ml肿瘤细胞悬液，将0.2ml细胞混悬液接种到C57BL/6J小鼠右侧腋下，记为第0天。接种后次日动物随机分组，称重后给药。溶剂对照组每天口服给予0.5% CMC；环磷酰胺腹腔给药；待测化合物每天口服给药1次。处理时称量体重，处死动物。剥取肿瘤组织，称重并进行拍照。最后计算肿瘤抑制率，以肿瘤抑制率评价抗肿瘤作用

强度。

[0146] 计算统计方法:肿瘤增殖抑制率TGI(%): $TGI = (1 - T/C) \times 100$ 。(T:治疗组肿瘤重量;C:阴性对照组肿瘤重量)。

[0147] 统计方法:利用Graphpad进行数据统计分析,采用One-way ANOVA检验,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

[0148] 实验结果:

[0149] 给药后处理动物称取肿瘤重量,实施例1化合物和实施例2化合物对小鼠结肠癌MC38抗肿瘤作用详见下表。

[0150] 实施例2化合物对小鼠结肠癌MC38抗肿瘤作用

分组	给药剂量 (mg/kg)	数量 (开始/结束)	体重 (g) X ±SD		瘤重 (g)	
			开始	结束	X ±SD	TGI%
溶剂对照组		10/10	22.0±0.4	26.1±1.3	1.70±0.75	NA
CTX 组	40×2	10/10	22.0±0.8	24.5±0.9	0.17±0.10 ^{**}	90
实施例2化合物组	2.5×14	10/10	22.0±0.6	25.3±2.3	1.13±0.78	34
	5×14	10/10	21.9±0.8	23.7±1.8	0.42±0.39 ^{***}	75
	10×14	10/10	21.9±0.7	25.0±1.7	0.73±0.54 ^{**}	57

[0152] 注:与溶剂对照组比较,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$,One-way ANOVA NA:不适用

[0153] 实施例1化合物对小鼠结肠癌MC38抗肿瘤作用

分组	给药剂量 (mg/kg)	数量 (开始/结束)	体重(g) X ±SD		瘤重(g)	
			开始	结束	X ±SD	TGI%
溶剂对照组		7/7	18.6±0.3	24.1±0.8	3.94±0.78	NA
CTX 组	40×1	6/6	18.8±0.9	21.7±1.4	1.30±1.44 ^{**}	67
实施例1化合物组	5×14	5/6	18.7±0.4	23.4±1.2	3.21±0.28 ^{***}	18
	10×14	5/6	18.5±0.6	23.8±1.4	2.86±1.36 ^{**}	27

[0155] 注:与溶剂对照组比较,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$,One-way ANOVA NA:不适用

[0156] 7、实施例1化合物和实施例2化合物在人肺癌NCI-H460模型上抗肿瘤药效比较

[0157] 实验目的:

[0158] 在人免疫系统重建的NSG荷瘤小鼠人肺癌NCI-H460模型上评价PD-L1抑制剂实施

例1化合物和实施例2化合物的体内抗肿瘤药效。实验方案:

[0159] 动物分组:实验分为溶剂对照组、环磷酰胺80mg/kg组 (CTX)、实施例1化合物和实施例2化合物分别5mg/kg组、10mg/kg组。

[0160] 实验步骤:将新鲜的人白细胞分离获得PBMC后,尾静脉接种至NSG小鼠,每只接种 1×10^7 个,第3天在小鼠腋下接种NCI-H460肿瘤细胞,每只接种 1×10^6 个。带肿瘤生长至 $100 \sim 300 \text{mm}^3$ 后分组给药,溶剂对照组每天口服给予0.5%CMC;环磷酰胺腹腔给药;待测化合物每天口服给药1次。处理时称量体重,处死动物。剥取肿瘤组织,称重并进行拍照。最后计算肿瘤抑制率,以肿瘤抑制率评价抗肿瘤作用强度。

[0161] 计算统计方法:肿瘤增殖抑制率TGI(%): $\text{TGI} = (1 - \text{T}/\text{C}) \times 100$ 。(T:治疗组肿瘤重量;C:阴性对照组肿瘤重量)。

[0162] 统计方法:利用Graphpad进行数据统计分析,采用One-way ANOVA检验,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

[0163] 实验结果:

[0164] 给药后处理动物称取肿瘤重量,实施例1化合物和实施例2化合物对NCI-H460抗肿瘤作用详见下表。

[0165] 实施例1化合物和实施例2化合物对NCI-H460抗肿瘤作用

[0166]	分组	给药剂 量 (mg/kg)	数 量 (开 始 / 结 束)	瘤体 X ±SD		瘤重 (g)	
				Day 1	Day 20	X ±SD	TGI%
	溶剂对照 组		5/5	180.4±13.0	2129.9±362.7	2.73±0.60	NA
	CTX 组	100×1	5/5	165.4±22.4	556.5±81.1	0.90±0.15***	66.9
[0167]	实施例2化 合物组	15×14	5/5	166.5±24.5	1405.2±442.9	1.90±0.037	30.6
	实施例1化 合物组	15×14	5/5	161.9±21.0	1441.4±337.6	2.06±0.22	24.7

[0168] 与溶剂对照组比较,* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$,One-way ANOVA NA:不适用

[0169] 综上实验结果显示:

[0170] 在小鼠黑色素瘤高转移株B16F10皮下移植瘤模型中,实施例2化合物每天口服给药在5mg/kg和10mg/kg剂量下的抑瘤率分别为40%和55%,而实施例1化合物在同等剂量下的抑瘤率分别为11%和13%。

[0171] 在小鼠结肠癌MC38皮下移植瘤模型中,实施例2化合物每天口服给药在5mg/kg和10mg/kg剂量下的抑瘤率分别为75%和57%,而实施例1化合物在同等剂量下的抑瘤率分别

为18%和27%。

[0172] 在人免疫系统重建的NSG荷瘤小鼠 (NCI-H460) 上, 实施例2化合物每天口服给药在15mg/kg剂量下的抑瘤率优于实施例1化合物 (抑瘤率30.6%vs 24.7%)。

[0173]

肿瘤模型	同剂量抑瘤率比较
B16F10	实施例 2 化合物 (马来酸盐) > 实施例 1 化合物 (盐酸盐)
MC38	实施例 2 化合物 (马来酸盐) > 实施例 1 化合物 (盐酸盐)
NSG NCI-H460	实施例 2 化合物 (马来酸盐) > 实施例 1 化合物 (盐酸盐)

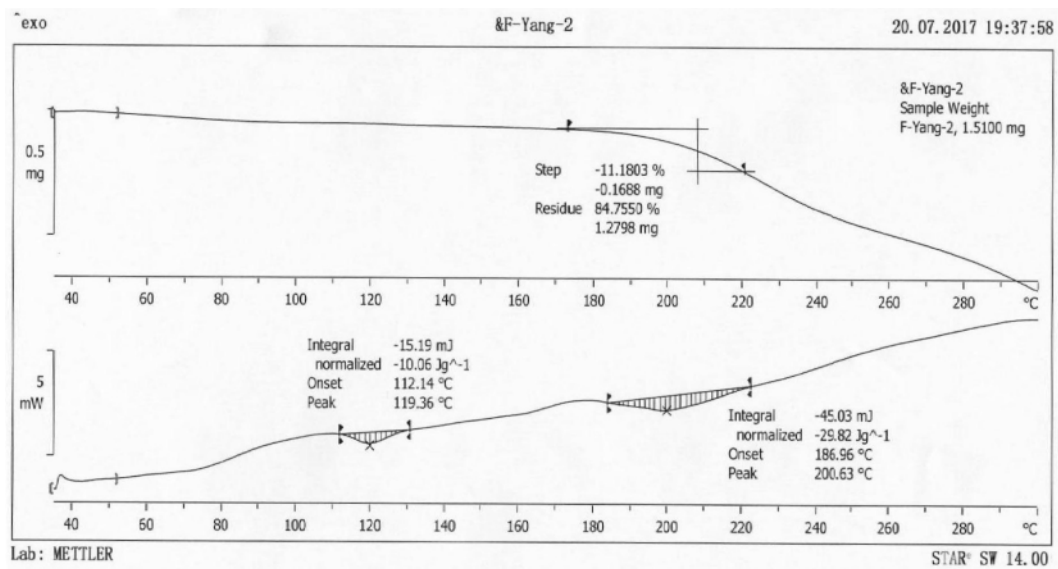


图1

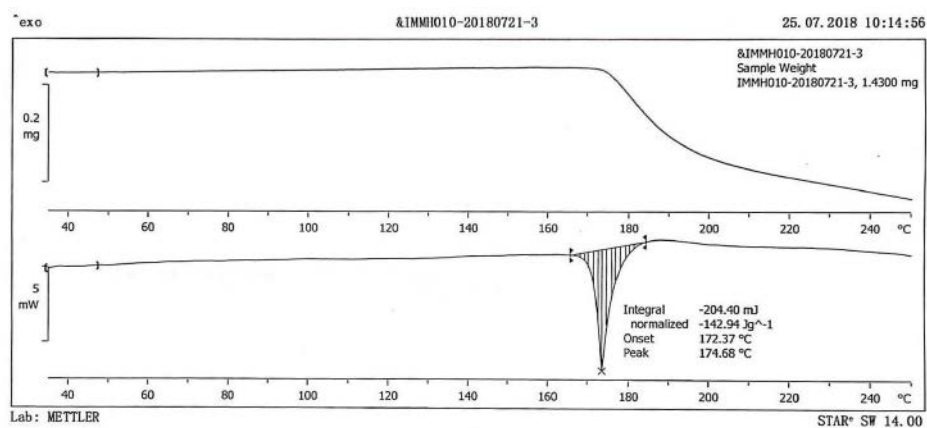


图2

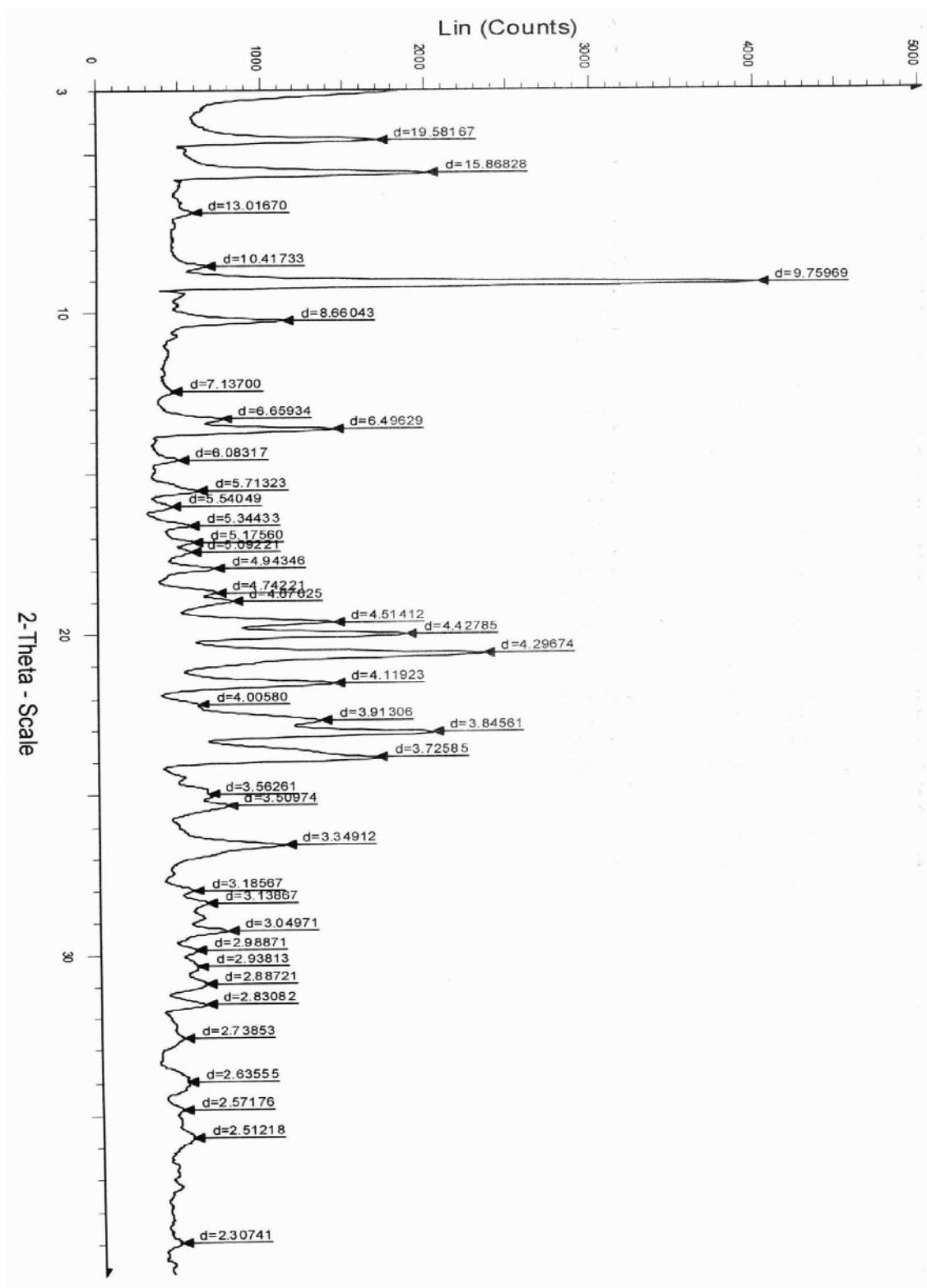


图3