



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107663207 B

(45) 授权公告日 2021.07.30

(21) 申请号 201710616304.4	<i>C07C 303/32</i> (2006.01)
(22) 申请日 2017.07.26	<i>A61K 31/506</i> (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 107663207 A	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.02.06	(56) 对比文件
(66) 本国优先权数据 201610598804.5 2016.07.27 CN	CN 103748096 A, 2014.04.23
(73) 专利权人 南京圣和药业股份有限公司 地址 210038 江苏省南京市经济技术开发区惠中路9号	CN 104302178 A, 2015.01.21
(72) 发明人 赵立文 符伟 张晓平 吴伟杰 刘子宁 金建淋	CN 105175396 A, 2015.12.23
(51) Int. Cl.	CN 105377835 A, 2016.03.02
<i>C07D 471/04</i> (2006.01)	审查员 仲艳雯
<i>C07C 309/04</i> (2006.01)	

权利要求书1页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

一种EGFR激酶抑制剂的甲磺酸盐结晶及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种EGFR激酶抑制剂的甲磺酸盐结晶。具体地说,本发明涉及N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺的甲磺酸盐晶型与制备方法,所述晶型可用于制备治疗和/或预防具有抗药性肿瘤的药物。

1. 一种N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型,其特征是X-射线粉末衍射光谱用 2θ 角度表示在为6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61处有特征峰。

2. 根据权利要求1所述的晶型,其特征是X-射线粉末衍射光谱用 2θ 角度表示在为6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61、14.16、14.98、15.18、15.95、16.39、16.85、17.17、17.90处有特征峰。

3. 根据权利要求2所述的晶型,其特征是X-射线粉末衍射光谱用 2θ 角度表示在为6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61、14.16、14.98、15.18、15.95、16.39、16.85、17.17、17.90、19.07、19.82、21.10、21.80、22.02、22.62、22.96处有特征峰。

4. 根据权利要求3所述的晶型,其特征是X-射线粉末衍射光谱用 2θ 角度表示在为6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61、14.16、14.98、15.18、15.95、16.39、16.85、17.17、17.90、19.07、19.82、21.10、21.80、22.02、22.62、22.96、23.69、24.34、24.70、26.44、26.93、28.13、28.76、30.03、30.83处有特征峰。

5. 根据权利要求1-4任意一项所述的晶型,其中N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸的化学配比为1:1。

6. 一种制备如权利要求1-5任意一项所述晶型的方法,所述方法包括以下步骤:

(1) 将N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸溶于析晶溶剂中反应成盐,冷却析出晶体;和

(2) 过滤、洗涤、干燥。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于步骤(1)中所述的析晶溶剂为低级有机溶剂,所述低级有机溶剂为碳原子数小于6的醇类、酮类、酯类、醚类或腈类溶剂。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于所述的析晶溶剂为异丙醇或丙酮。

9. 一种药物组合物,其含有如权利要求1-5任意一项所述晶型及药学上可接受的载体。

10. 如权利要求1-5任意一项所述晶型或如权利要求9所述的药物组合物在制备治疗和/或预防肿瘤药物中的应用。

11. 根据权利要求10的应用,其中所述肿瘤为具有抗药性的肿瘤。

12. 根据权利要求11的应用,其中所述肿瘤为对EGFR抑制剂具有抗药性的肿瘤。

一种EGFR激酶抑制剂的甲磺酸盐结晶及制备方法

技术领域

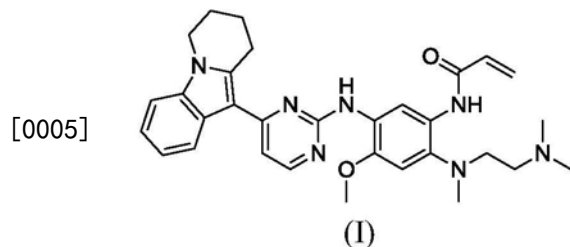
[0001] 本发明涉及一种EGFR激酶抑制剂的甲磺酸盐结晶。具体地说,本发明涉及 N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a] 吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型及其制备方法与用途。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体(EGFR)是erbB受体家族的跨膜蛋白酪氨酸激酶成员。erbB受体的同源二聚和/或异源二聚导致胞内域中关键酪氨酸残基的磷酸化,刺激参与细胞增殖和生存的许多细胞内信号传导通路。erbB家族信号传导的失调促进增殖、侵入、转移、血管生成和肿瘤细胞生存,并且已在许多癌症,例如肺癌、头颈部癌和乳腺癌等中得到描述。小分子EGFR酪氨酸激酶抑制剂与ATP 竞争结合到EGFR胞内区磷酸化位点,抑制EGFR自磷酸过程并阻断下游信号通路,从而达到抑制肿瘤细胞的目的。

[0003] 吉非替尼、厄洛替尼是EGFR的第一代可逆小分子抑制剂,主要用于治疗非小细胞肺癌。但是临床研究表明许多患者很快(12-14个月)就对这些EGFR小分子抑制剂产生抗药性。研究表明看门残基T790M突变是EGFR基因20号外显子一个突变点,是导致耐药产生的主要机制之一。第二代不可逆抑制剂,如阿法替尼对 L858R以及T790M突变的EGFR具有很强的抑制作用,对吉非替尼或厄洛替尼已经产生抗药性的患者有显著的疗效。然而第二代EGFR突变体抑制剂对野生型 EGFR也同样具有很强的抑制作用,从而导致临床治疗过程中大部分患者产生毒副作用,譬如皮疹、腹泻。

[0004] 因此第三代EGFR抑制剂首先应保持对EGFR^{L858R}激活突变体、Exon19缺失激活突变体以及T790M抗性突变体有较强的抑制作用,同时应克服第二代抑制剂的毒副作用,即减少对野生型EGFR的抑制作用。阿斯利康公司(AstraZeneca)研发的化合物AZD9291(又名N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-[[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基]苯基)丙-2-烯酰胺)是一种口服的、不可逆的 EGFR抑制剂,该药对EGFR-T790M突变阳性非小细胞肺癌患者有较佳的治疗效果。但是它的代谢物AZ5104对野生型EGFR也有很强的抑制作用。因此仍需开发具有更好药效的EGFR抑制剂,本发明的发明人研究发现式(I)所示化合物[以下简称“化合物(I)”]是一种不可逆的EGFR激酶抑制剂。



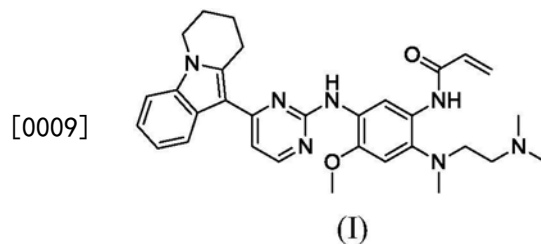
[0006] 化合物(I)的化学名称为N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺。体外激酶活性检测发现化合物(I)对突变型EGFR激酶,例如EGFR^{L858R/T790M}激酶具有良好的抑制活性,IC₅₀值小于1nM,对野生型EGFR激酶影响小,具有较好的选择性。体外细胞实验结果表明

化合物(I)对双突变型细胞的抑制作用较好,且对EGFR野生型细胞的抑制小,选择性好。这将有助于降低临床上的不良反应。

[0007] 本领域技术人员知道,药用活性化合物的晶型结构往往影响该药物的化合物稳定性、溶解度等性质,因此需要深入研究寻找适合药用的晶型。

发明内容:

[0008] 本发明的目的是提供一种水溶性较好、生物利用度高、热稳定性高的EGFR 激酶抑制剂的甲磺酸盐晶型。具体地说,本发明提供一种如以下式(I)所示的N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺)的甲磺酸盐晶型,



[0010] 本发明人对甲磺酸盐晶型进行了核磁共振(NMR)氢谱、X-射线粉末衍射、差示扫描热分析(DSC)、红外(IR)光谱以及热重分析(TGA)检测。

[0011] ¹H-NMR谱显示本发明的晶型结构中N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸的化学配比为1:1。

[0012] 该晶型的X-射线粉末衍射图谱,参见图1,使用Cu-Kα辐射,以2θ角度表示X-射线粉末衍射图,其中在约6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61处有特征峰。

[0013] 进一步地,该晶型的X-射线粉末衍射图谱在约6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61、14.16、14.98、15.18、15.95、16.39、16.85、17.17、17.90处有特征峰。

[0014] 再进一步地,X-射线粉末衍射图谱在约6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61、14.16、14.98、15.18、15.95、16.39、16.85、17.17、17.90、19.07、19.82、21.10、21.80、22.02、22.62、22.96处有特征峰。

[0015] 更进一步地,X-射线粉末衍射图谱在约6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61、14.16、14.98、15.18、15.95、16.39、16.85、17.17、17.90、19.07、19.82、21.10、21.80、22.02、22.62、22.96、23.69、24.34、24.70、26.44、26.93、28.13、28.76、30.03、30.83处有特征峰。

[0016] 非限制性的,该晶型的DSC图谱(参见图2)显示在269℃左右(269±5℃)有熔融吸收峰。

[0017] 非限制性的,该晶型具有如图3所示的红外(IR)图谱。

[0018] 非限制性的,该晶型具有如图4所示的热重分析(TGA)图谱。

[0019] 本发明的另一个方面提供了N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型的制备方法,具体包括如下步骤:

[0020] (1) 将N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四

氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸溶于析晶溶剂中反应,析出结晶;和

[0021] (2) 过滤、洗涤、干燥。

[0022] 上述反应步骤(1)中对原料N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺的存在形态没有特别限定,可以使用任意晶体或无定型固体。

[0023] 在一些实施方案中,上述反应步骤(1)中原料N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸的摩尔比为约1:0.5-3,优选地,N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸的摩尔比为约1:1-2。

[0024] 在一个具体的实施方案中,上述反应步骤(1)中原料N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸的摩尔比优选为约1:1.1。

[0025] 上述反应步骤(1)中的析晶溶剂为低级有机溶剂或它们的混合溶液,所述低级有机溶剂为碳原子数小于6的醇类、酮类、酯类、醚类或腈类溶剂等,所述低级有机溶剂优选为甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、正戊醇、正己醇、丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、乙酸乙酯、乙醚或乙腈等,更优选为异丙醇或丙酮。

[0026] 在一些实施方案中,上述反应步骤(1)中的反应温度为约 $55 \pm 20^\circ\text{C}$,反应时间优选为约0.5-约6h。在一些优选的实施方案中,上述反应步骤(1)中的反应温度为约 $55 \pm 15^\circ\text{C}$,反应时间为约2-约4h。

[0027] 在本发明中,重结晶的方法没有特别限定,可以采用常规的重结晶操作方式进行。例如,可以将N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺与甲磺酸溶于析晶溶剂中反应,析晶、过滤、干燥即可得到本发明的甲磺酸盐晶型。也可以将任意晶型或者无定型的化合物(I)的甲磺酸盐在析晶溶剂中加热溶解,冷却、析晶,也可采取搅拌析晶,过滤干燥也可得到本发明所述晶型。过滤得到的结晶通常采用在减压下,在 $20^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ 左右,优选 $25^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ 条件下真空干燥,就能达到去除重结晶溶剂的目的。所述的析晶溶剂为低级有机溶剂或它们的混合溶液,所述低级有机溶剂为碳原子数小于6的醇类、酮类、酯类、醚类或腈类溶剂等,所述低级有机溶剂优选为甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、正戊醇、正己醇、丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、乙酸乙酯、乙醚或乙腈,更优选为异丙醇或丙酮。

[0028] 按照本发明的方法制备得到的甲磺酸盐晶型不含有或者含有较低含量的残留溶剂,符合国家药典规定的有关医药产品残留溶剂的限量要求,可以较好的作为医药活性成分使用。

[0029] 本发明的另一个方面提供了一种药物组合物,其含有N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型及药学上可接受的载体。

[0030] 本发明的另一个方面提供了N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲

磺酸盐晶型或包含上述甲磺酸盐晶型的药物组合物在制备用于治疗 and/或预防肿瘤的药物中的应用。尤其是在制备治疗和/或预防具有抗药性的肿瘤的药物中的应用。所述具有抗药性的肿瘤可以是对多种药物具有抗药性的肿瘤,优选对EGFR 抑制剂抗药的肿瘤,例如对第一、第二、第三代EGFR抑制剂,例如对吉非替尼、厄洛替尼和拉帕替尼具有抗药性的肿瘤。所述肿瘤包括但不限于实体瘤,优选为肺癌、头颈部肿瘤、结直肠癌、膀胱癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌、口腔癌、肝癌、卵巢癌。更优选地,所述肿瘤为非小细胞肺癌。在一些实施方案中,本发明提供本发明的化合物(I)可药用盐治疗具有抗药性的肿瘤的方法,其中所述肿瘤携带EGFR突变基因。在一个实施方案中,所述肿瘤携带的EGFR突变基因是第20号外显子存在T790M突变。在另一个实施方案中,所述肿瘤携带的EGFR 突变基因是第21号外显子存在L858R突变和/或缺失/插入突变。在另一个实施方案中,所述肿瘤携带的EGFR突变基因是T790M和L858R双重突变。在另一些实施方案中,本发明提供用于治疗肿瘤的本发明的化合物(I)可药用盐或本发明的药物组合物,其中治疗肿瘤作用表现在突出的疗效,高度的选择性和/或较少的副作用。在再一些实施方案中,本发明提供本发明的化合物(I)可药用盐或本发明的药物组合物治疗肿瘤的方法,所述方法包括给予需要其的患者治疗有效量的本发明的化合物(I)可药用盐或本发明的药物组合物,所产生的治疗肿瘤方面的作用表现在突出的疗效,高度的选择性和/或较少的副作用。

[0031] 在这里需要特别说明的是,X-射线粉末衍射图谱对于特定的晶型具有特征性。判断是否与已知晶型相同时,应该注意的是峰的相对位置(即 2θ)而不是它们的相对强度。这是由于谱图(尤其在低角度)的相对强度会因为晶体条件、粒径或其它测定条件的差异产生的优势取向效果而变化,衍射峰的相对强度对于晶型的确定并非是特征性的。另外,同一个晶型的 2θ 值可能存在轻微误差,约为 $\pm 0.2^\circ$ 。因此,在确定每种结晶结构时,应该将此误差考虑在内。在XRD图谱中通常用 2θ 角或晶面距 d 值表示峰位置,两者之间具有简单的换算关系: $d = \lambda / 2 \sin \theta$,其中 d 值代表晶面间距, λ 代表X射线的波长, θ 为衍射角。还应特别指出的是,在混合物的鉴定中,由于含量下降等因素会造成部分衍射线缺失,此时,无需依赖高纯试样中观察到的全部谱带,一条谱带也可能对给定的晶体是特征性的。

[0032] DSC测定当晶体由于其晶体结构发生变化或晶体熔融而吸收或释放热时的转变温度。对于同种化合物的同种晶型,在连续的分析中,热转变温度和熔点误差典型的在约 5°C 之内。当我们说一个化合物具有给定的DSC峰或熔点时,这是指该DSC峰或熔点 $\pm 5^\circ\text{C}$ 。需要指出的是对于混合物而言,其DSC峰或熔点可能会在更大的范围内变动。此外,由于在物质熔化的过程中伴有分解,因此熔化温度与升温速率相关。

附图说明:

[0033] 图1:N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型的X-射线粉末衍射图谱。

[0034] 图2:N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型的DSC谱图。

[0035] 图3:N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型的IR谱图。

[0036] 图4:N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型的TGA谱图。

具体实施方式

[0037] 实验所用的测试仪器

[0038] 1.X-射线粉末衍射谱

[0039] 仪器型号:瑞士D8 Advance X-射线衍射仪

[0040] 射线:单色铜射线,波长为1.54nm

[0041] 扫描方式: θ - 2θ

[0042] 扫描范围: $3-40^{\circ}2\theta$

[0043] 步长: 0.02°

[0044] 电压:40Kv

[0045] 电流:40Ma

[0046] 狭缝:1.0/1.0/Ni/0.2

[0047] 2.DSC谱

[0048] 仪器型号:NETZSCH DSC 204型差热分析仪

[0049] 升温速率: $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

[0050] 温度范围: $40^{\circ}\text{C}-300^{\circ}\text{C}$

[0051] 3.TGA谱

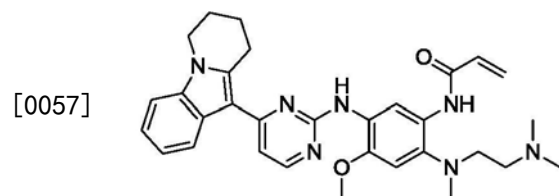
[0052] 仪器型号:NETZSCH TG 209型热重分析仪

[0053] 温度范围: $30-320^{\circ}\text{C}$

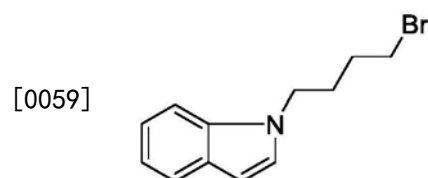
[0054] 升温速率: $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

[0055] 一、化合物(I)的制备

[0056] 实施例1:N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺



[0058] 步骤a 1-(4-溴丁基)-1H-吡啶的合成



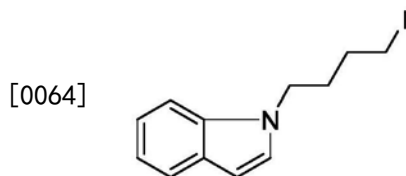
[0060] 在100mL反应瓶中,依次加入NaH(60%含量,1.23g,30.73mmol),DMF(10 mL),室温搅拌5min后冷却至 $0-4^{\circ}\text{C}$,缓慢加入10mL溶解有吡啶(3g,25.61mmol)的DMF溶液,加毕,升至室温反应20min制得吡啶活化溶液。

[0061] 另取250mL反应瓶,加入1,4-二溴丁烷(16.59g,76.82mmol),DMF(50mL)。 $0-4^{\circ}\text{C}$ 下

缓慢滴加上述制得的吡啶活化溶液,滴毕,室温下反应0.5h。反应结束后,加入水(100mL)淬灭,乙酸乙酯萃取,合并乙酸乙酯层,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析纯化得标题化合物。

[0062] ESI-MS m/z :252.1[M+H]⁺。

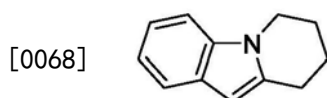
[0063] 步骤b 1-(4-碘丁基)-1H-吡啶的合成



[0065] 在250mL反应瓶中,依次加入步骤a所得物1-(4-溴丁基)-1H-吡啶(5g,19.83mmol),碘化钠(13.39g,89.93mmol),乙腈(100mL),回流过夜。反应结束后,加水,乙酸乙酯萃取,合并乙酸乙酯层,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩干燥得标题物,直接用于下一步。

[0066] ESI-MS m/z :300.0[M+H]⁺。

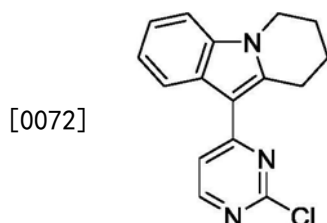
[0067] 步骤c 6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶的合成



[0069] 在250mL三颈瓶中,依次加入步骤b所得物1-(4-碘丁基)-1H-吡啶(5.93g,按19.83mmol),磷酸钾(8.4g,39.67mmol),四三苯基磷钡(2.3g,1.98mmol),1,4-二氧六环(80mL),氩气保护,回流过夜反应。反应结束后,加水淬灭反应,乙酸乙酯萃取,合并乙酸乙酯层,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析纯化得标题化合物。

[0070] ESI-MS m/z :172.1[M+H]⁺。

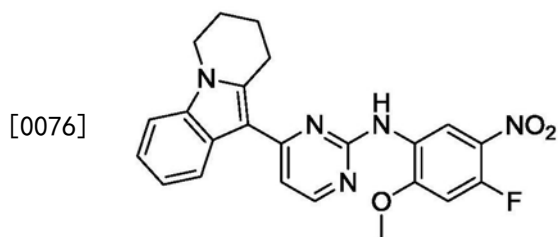
[0071] 步骤d 10-(2-氯嘧啶-4-基)-6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶的合成



[0073] 在100mL反应瓶中,依次加入三氯化铝(2.18g,16.35mmol),乙二醇二甲醚(50mL),2,4-二氯嘧啶(2.44g,16.35mmol),步骤c所得物6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶(2.8g,16.35mmol),回流反应2h。反应结束后,反应液冷却至室温,过滤,滤饼水洗,干燥后得标题物。

[0074] ESI-MS m/z :284.1[M+H]⁺。

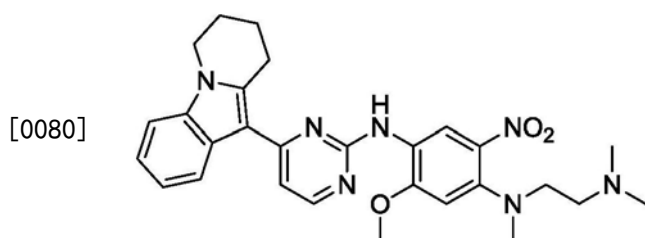
[0075] 步骤e N-(4-氟-2-甲氧基-5-硝基苯基)-4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-胺的合成



[0077] 在100mL反应瓶中,加入步骤d所得物10-(2-氯嘧啶-4-基)-6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚(1.05g,3.52mmol)、4-氟-2-甲氧基-5-硝基苯胺(655mg,3.52mmol)和对甲苯磺酸(605mg,3.52mmol),用15mL仲丁醇溶解,110℃下反应5h,反应结束后,冷却至室温,过滤,干燥,得标题化合物。

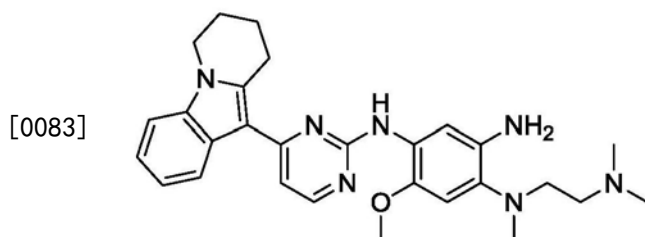
[0078] ESI-*Ms* m/z :434.2[M+H]⁺。

[0079] 步骤f N-(4-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-2-甲氧基-5-硝基苯基)-4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚-10-基)-嘧啶-2-胺的合成



[0081] 在50mL单口瓶中,依次加入步骤e所得物N-(4-氟-2-甲氧基-5-硝基苯基)-4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚-9-基)-嘧啶-2-胺(1.65g,3.70mmol)、N,N,N'-三甲基乙二胺(373mg,3.70mmol)、二异丙基乙胺(1.41g,11.1mmol)和30mL 1,4-二氧六环,溶解,110℃反应3h,停止反应,浓缩,柱层析纯化得标题化合物。ESI-*Ms* m/z :516.3[M+H]⁺。

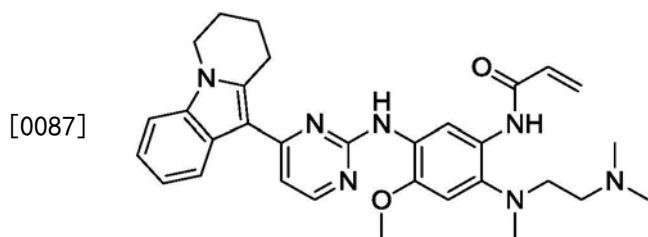
[0082] 步骤g N-(4-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-2-甲氧基-5-氨基苯基)-4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚-10-基)-嘧啶-2-胺的合成



[0084] 在50mL单口瓶中,依次加入步骤f所得物N-(4-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-2-甲氧基-5-硝基苯基)-4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚-10-基)-嘧啶-2-胺(1.7g,3.20mmol)、10%钯碳(50mg)和30mL甲醇,在1个标准大气压下,氢气还原1h,停止反应,过滤,浓缩得标题化合物,直接用于下一步。

[0085] ESI-*Ms* m/z :486.3[M+H]⁺。

[0086] 步骤h N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚-10-基)嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺的合成



[0088] 在100mL单口瓶中,加入步骤g所得物N-(4-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-2-甲氧基-5-氨基苯基)-4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚-10-基)-嘧啶-2-胺(1.14g,2.27mmol)、二异丙基乙胺(878mg,6.8mmol)、30mL无水二氯甲烷,溶解,滴入烯丙基酰氯(204mg,2.27mmol)的二氯甲烷(5mL)溶液,反应30min,浓缩,柱层析纯化得标题化合物。

[0089] $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 10.20 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.34 (d, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.06 (d, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.19-7.03 (m, 3H), 6.98 (s, 1H), 6.57-6.41 (m, 1H), 6.28-6.15 (m, 1H), 5.82-5.71 (m, 1H), 4.09 (t, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.18 (t, 2H), 3.06-2.92 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.47-2.40 (m, 2H), 2.27 (s, 6H), 2.08-1.96 (m, 2H), 1.87-1.74 (m, 2H)。

[0090] ESI-MS m/z : 540.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0091] 二、化合物(I)甲磺酸盐的制备

[0092] 实施例2:N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吲哚-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐

[0093] 方法一:称取化合物(I)(148.5mg,0.28mmol)溶于1.49mL 95%的丙酮中,55°C时固体溶清,用1mL丙酮稀释甲磺酸(29.11mg,0.30mmol),55°C下将甲磺酸的丙酮溶液加入到上述化合物(I)的丙酮溶液中,反应2h后过滤,丙酮洗涤,在室温下真空干燥过夜,得结晶形态的甲磺酸盐155mg,收率为89%(不考虑溶剂化合物和残留溶剂,根据 $^1\text{HNMR}$ 确认晶型的成盐比后进行收率计算)。

[0094] 方法二:称取化合物(I)(148.5mg,0.28mmol)溶于8.25mL异丙醇中,55°C时固体溶清,用2mL异丙醇稀释甲磺酸(29.11mg,0.30mmol),55°C下将甲磺酸的异丙醇溶液加入到上述化合物(I)的异丙醇溶液中,反应2h后过滤,异丙醇洗涤,在室温下真空干燥过夜,得结晶形态的甲磺酸盐150mg,收率为84%。

[0095] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6): δ 9.56 (s, 1H, 重水交换后消失), 9.20 (s, 1H, 重水交换后消失), 8.50 (s, 1H), 8.36 (d, 1H), 8.09 (d, 1H), 7.91 (s, 1H, 重水交换后消失), 7.43 (d, 1H), 7.16 (t, 1H), 7.12 (t, 1H), 7.05 (d, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.63 (dd, 1H), 6.29 (dd, 1H), 5.78 (d, 1H), 4.11 (t, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.33-3.31 (m, 2H), 3.26-3.21 (m, 4H), 2.81 (s, 6H), 2.62 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.03-2.02 (m, 2H), 1.84-1.83 (m, 2H)。ESI-MS m/z : 540.3 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}+\text{H}]^+$ 。

[0096] 该晶型的X-射线衍射谱图参见图1,使用Cu-K α 辐射,以 2θ 角度表示X-射线粉末衍射图,在约6.94、8.50、9.12、9.64、11.05、11.61、14.16、14.98、15.18、15.95、16.39、16.85、17.17、17.90、19.07、19.82、21.10、21.80、22.02、22.62、22.96、23.69、24.34、24.70、26.44、26.93、28.13、28.76、30.03、30.83 处有特征峰。将图1中的 2θ 、晶面间距 d 值以及峰的相对强度列于表1。

[0097] 甲磺酸盐晶型的DSC图谱(参见图2)显示在269°C左右(269 \pm 5°C)有熔融吸热峰。

[0098] 表1:甲磺酸盐晶型的XRD图谱详情

峰序号	2θ	d 值	计数	相对强度
1	6.94	12.73	192.0	16.1
2	8.50	10.39	356.0	29.8
3	9.12	9.69	318.0	26.7
4	9.64	9.16	411.0	34.5
5	11.05	8.00	224.0	18.8
6	11.61	7.61	860.0	72.1
7	14.16	6.25	717.0	60.2
8	14.98	5.91	302.0	25.3
9	15.18	5.83	310.0	26.0
10	15.95	5.55	214.0	18.0
11	16.39	5.40	261.0	21.9
12	16.85	5.26	382.0	32.0
13	17.17	5.16	247.0	20.7
14	17.90	4.95	167.0	14.0
15	19.07	4.65	715.0	60.0
16	19.82	4.48	782.0	65.6
17	21.10	4.21	225.0	18.9
18	21.80	4.07	352.0	29.5
19	22.02	4.03	782.0	65.6
20	22.62	3.93	176.0	14.8
21	22.96	3.87	184.0	15.4
22	23.69	3.75	1192.0	100.0
23	24.34	3.65	276.0	23.2
24	24.70	3.60	393.0	32.9
25	26.44	3.37	96.3	8.1
26	26.93	3.31	134.0	11.2
27	28.13	3.17	160.0	13.4

[0099]

28	28.76	3.10	235.0	19.7
29	30.03	2.97	107.0	9.0
30	30.83	2.90	139.0	11.7
31	31.74	2.82	60.5	5.1
32	33.36	2.68	92.0	7.7
33	34.45	2.60	86.7	7.3
34	36.96	2.43	66.3	5.6
35	39.75	2.27	70.9	5.9

[0100]

[0101] 三.N-(2-((2-(二甲基氨基)乙基)(甲基)氨基)-4-甲氧基-5-((4-(6,7,8,9-四氢吡啶并[1,2-a]吡啶-10-基)-嘧啶-2-基)氨基)苯基)烯丙酰胺甲磺酸盐晶型的相关性质研究

[0102] 实施例3:溶解度实验

[0103] 测定实施例1制备的化合物(I)与实施例2制备的化合物(I)甲磺酸盐晶型的水溶性,实验结果列于表2。

[0104] 表2:化合物(I)及其甲磺酸盐晶型的水溶性

	溶解度 (mg/mL)
化合物(I)	<0.1
甲磺酸盐晶型	1

[0106] 实验结果表明,相对于化合物(I)而言,化合物(I)的甲磺酸盐晶型的溶解性明显增强。

[0107] 四、药理活性研究

[0108] 实验例1:化合物(I)的体外激酶活性评价

[0109] 1实验材料

[0110] 1.1酶

[0111] EGFR^{WT}激酶,购于Carna公司;

[0112] EGFR^{T790M/L858R}激酶,购于Invitrogen公司。

[0113] 1.2试剂

[0114] 三磷酸腺苷(ATP),购于Sigma公司;

[0115] 缩氨酸(Peptide FAM-P22),购于GL Biochem公司;

[0116] 乙二胺四乙酸(EDTA),购于Sigma公司。

[0117] 1.3仪器

[0118] Caliper EZ reader微流控芯片仪器,购于Caliper Life Sciences, Inc.

[0119] 2实验方法

[0120] 2.1准备1×激酶基础缓冲液和终止缓冲液

[0121] 1×激酶基础缓冲液(对于EGFR^{WT}):50mM HEPES,pH7.5,0.0015%Brij-35,10mM MgCl₂,10mM MnCl₂,2mM DTT;

[0122] 1×激酶基础缓冲液(对于EGFR^{T790M/L858R}):50mM HEPES,pH7.5,0.0015% Brij-35,10mM MgCl₂,2mM DTT;

[0123] 终止缓冲液:100mM HEPES,pH7.5,0.0015%Brij-35,0.2%Coating Reagent#3,50mM EDTA。

[0124] 2.2准备化合物

[0125] 用100%DMSO将化合物(I)分别溶解至10mM,再用完全培养基稀释至50μM,然后用含0.1%DMSO的完全培养基稀释至5μM后,依次3倍稀释,共10个浓度(对于EGFR^{WT});

[0126] 用100%DMSO将化合物(I)分别溶解至10mM,再用完全培养基稀释至50μM,然后用含0.1%DMSO的完全培养基稀释至1μM后,依次3倍稀释,共10个浓度(对于EGFR^{T790M/L858R});

[0127] 在空的孔中加入100μl 100%DMSO用于配制有激酶无化合物对照组和无激酶无化合物对照组;

[0128] 标记以上所用96孔板为来源板。

[0129] 2.3准备中间板

[0130] 从来源板中转移10μl溶液到新的96孔板中,作为中间板,在中间板每孔中加入90μl 1×激酶缓冲液,振荡混匀10min。

[0131] 2.4准备实验板

[0132] 从96孔中间板中,每孔转移5 μ l溶液到384孔板中。

[0133] 2.5激酶反应

[0134] 2.5.1.准备2.5 \times 激酶溶液:将EGFR^{WT}激酶和EGFR^{T790M/L858R}激酶原液分别加入1 \times 基础缓冲液中,配制成2.5 \times 激酶溶液;

[0135] 2.5.2.准备2.5 \times 缩氨酸溶液:将FAM标记的缩氨酸和ATP加到1 \times 基础缓冲液中,配制成2.5 \times 缩氨酸溶液;

[0136] 2.5.3.转移10 μ l 2.5 \times 激酶溶液到384孔实验板中,室温孵育10min;

[0137] 2.5.4.转移10 μ l 2.5 \times 缩氨酸溶液到384孔实验板中,在28 $^{\circ}$ C条件下孵育一段时间,加入25 μ l终止缓冲液终止反应。

[0138] 同时设置无激酶无化合物对照组(包含DMSO、1 \times 基础缓冲液和2.5 \times 缩氨酸溶液)和有激酶无化合物对照组(包括DMSO、2.5 \times 激酶溶液和2.5 \times 缩氨酸溶液)。

[0139] 2.5.5.Caliper仪器读数、拟合曲线,计算抑制率

[0140] 在Caliper仪器上读取数据,并从Caliper程序中获得conversion数据,根据以下公式计算抑制率:

[0141] 抑制率% = (max-com) / (max-min) \times 100计算抑制率,其中“max”代表有激酶无化合物对照组,“com”代表受试化合物组,“min”代表无激酶无化合物对照组。

[0142] 2.5.6.采用Graphpad 5.0数据处理软件计算IC₅₀值。结果见表3。

[0143] 表3

受试化合物	酶	IC ₅₀ (nM)	
	化合物(I)	EGFR ^{L858R/T790M}	EGFR ^{WT}
		0.38	4.0

[0145] 从以上结果可以看出,化合物(I)对突变型EGFR激酶,例如EGFR^{L858R/T790M}激酶具有良好的抑制活性,IC₅₀值小于1nM。由此可见,化合物(I)对突变型EGFR 激酶抑制作用好,相对于EGFR野生型激酶具有较好的选择性。

[0146] 实验例2:化合物(I)的体外细胞活性评价

[0147] 1实验材料

[0148] 1.1细胞

[0149] 实验用细胞株NCI-H1975(EGFR双突变细胞,具有L858R和T790M突变)和A431(EGFR野生型细胞),购自于ATCC。

[0150] 1.2试剂

[0151] Cell Titer-Glo luminescent cell viability assay,购自于Promega公司;

[0152] RPMI1640 medium,购自于Invitrogen公司;

[0153] DMEM medium,购自于Invitrogen公司;

[0154] 胎牛血清,购自于Invitrogen公司;

[0155] DMSO,购自于Sigma公司;

[0156] NCI-H1975细胞培养于含10%灭活的胎牛血清(GIBCO)的RPMI1640培养基中,含青霉素100IU/mL和链霉素100 μ g/mL;

[0157] A431细胞培养于含10%灭活的胎牛血清(GIBCO)的DMEM培养基中,含青霉素100IU/mL和链霉素100 μ g/mL。

[0158] 2实验方法

[0159] 2.1实验过程(CTG assay)

[0160] 将对数生长期的NCI-H1975细胞和A431细胞消化后,吹打成单细胞悬液,接种于96孔培养板,每孔培养基100 μ L,每个细胞株各种3块96孔板,其中 NCI-H1975细胞每孔接种 3×10^3 个细胞,A431细胞每孔接种 4×10^3 个细胞。将接种后的NCI-H1975细胞和A431细胞在5% CO₂培养箱中培养16-24小时,待细胞贴壁后,按以下浓度要求加入化合物(化合物在NCI-H1975细胞上的最高测试浓度为4 μ M,3倍稀释,共9个浓度;在A431细胞上的最高测试浓度为10 μ M,3倍稀释,共9个浓度),在培养箱中再培养72小时。同时设置空白对照组(只有培养基,不加细胞和DMSO溶液)和DMSO对照组(培养基中加入细胞和0.5%的 DMSO溶液)。加入100 μ L的CTG溶液,避光振荡2min,孵育10min。

[0161] 2.2读数,计算IC₅₀值

[0162] 将培养板放入 Enspire[®]多模式微孔板检测仪读板,记录luminescence读值结果,并按照以下公式计算抑制率:

[0163] 抑制剂(%) = $(1 - (RLU_{com} - RLU_{blank}) / (RLU_{DMSO} - RLU_{blank})) \times 100\%$,

[0164] 其中RLU_{com}表示受试化合物组的吸光值,RLU_{blank}表示空白对照组的吸光值,RLU_{DMSO}表示DMSO对照组的吸光值,

[0165] 利用XLFit曲线拟合软件绘制药效抑制率曲线并计算IC₅₀值,结果见表4。

[0166] 表4

[0167] 受试化合物	细胞	
	IC ₅₀ (nM)	
	NCI-H1975	A431
化合物(I)	2	414

[0168] 已有研究表明,已上市的EGFR抑制剂的主要副作用之一为皮疹、腹泻等,这些都与野生型的EGFR被抑制有关。以上实验结果表明,化合物(I)对双突变型细胞(NCI-H1975)的抑制作用较好,且对EGFR野生型细胞(A431)的抑制小,选择性好。有望成为对抗EGFR突变导致耐药的肿瘤具有特异疗效且副作用较小的药物。

[0169] 实验例3:化合物(I)与甲磺酸盐的口服生物利用度的研究

[0170] 1实验材料

[0171] 1.1化合物

[0172] 使用根据实施例1、2的化合物进行该实验。其中,口服药物配方为25mM 的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH2.75)溶解,制成2.7mg/ml澄清溶液。

[0173] 1.2动物

[0174] 雄性SD大鼠,体重180-220g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

[0175] 受试大鼠实验前给予2~4天的环境适应期,给药前禁食8-12h,给药2h后给水,4h后给食。

[0176] 1.3试剂

[0177] 甲醇(色谱纯):Spectrum公司生产;

[0178] 乙腈(色谱纯):Spectrum公司生产;

[0179] 其余试剂均为市售分析纯。

[0180] 1.4仪器

[0181] 美国AB公司API 4500型三重四级杆液质联用仪,配有电喷雾离子源(ESI), LC-30AD双泵;SIL-30AC自动进样器;CTO-30AC柱温箱;DGU-20A3R脱气机;Analyst QS A01.01色谱工作站;Milli-Q超纯水器(Millipore Inc);Qilinbeier Vortex-5振荡器;HITACHI CF16RX II台式高速冷冻离心机。

[0182] 2实验方法

[0183] 1) 雄性SD大鼠6只,分成2组,每组大鼠3只,禁食但可自由饮水12 小时后,采取0时刻空白血浆;

[0184] 2) 取步骤1)中的2组大鼠,分别灌胃(intragastric administration,I.G.)给予本发明中的甲磺酸盐、化合物(I) 13.5mg/kg(按游离碱量折算);

[0185] 3) 于灌胃后5min,15min,30min,1h,2h,4h,8h,10h,24h,从眼底静脉丛连续取血置于分布有肝素抗凝的EP管中,8000rpm/min离心5min后取上层血浆,-20℃冻存,待LC-MS/MS分析;

[0186] 4) 根据步骤3)所得的血药浓度-时间数据,采用WinNonlin软件求算药代动力学参数,实验结果见表5:

[0187] 表5:化合物(I)及其甲磺酸盐晶型的药代参数结果

	剂量	$T_{1/2}$	T_{max}	C_{max}/C_{0min}	$AUC_{(0-t)}$	$AUC_{(0-\infty)}$
	mg/kg	(h)	(h)	ng/ml	h*ng/ml	h*ng/ml
[0188] 甲磺酸盐晶型	13.5	5.3±4.6	5.3±2.3	144.4±51.4	1006.2±101.1	1140.5±76.9
化合物(I)	13.5	2.8±0.3	4±0	109.4±36.3	664.6±276.4	749.3±279.2

[0189] 以上大鼠的药代试验结果表明,口服给予大鼠同等剂量后,甲磺酸盐晶型在动物体内的体内暴露量及达峰浓度与化合物(I)相比有显著的提高,半衰期明显延长,适合药用。

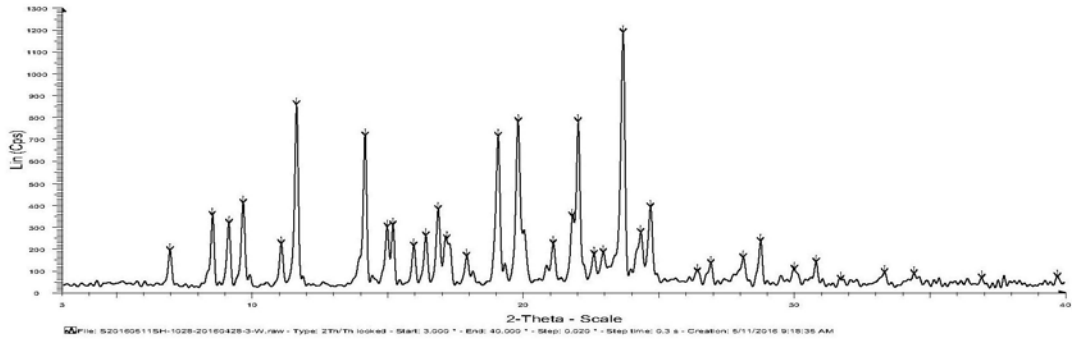
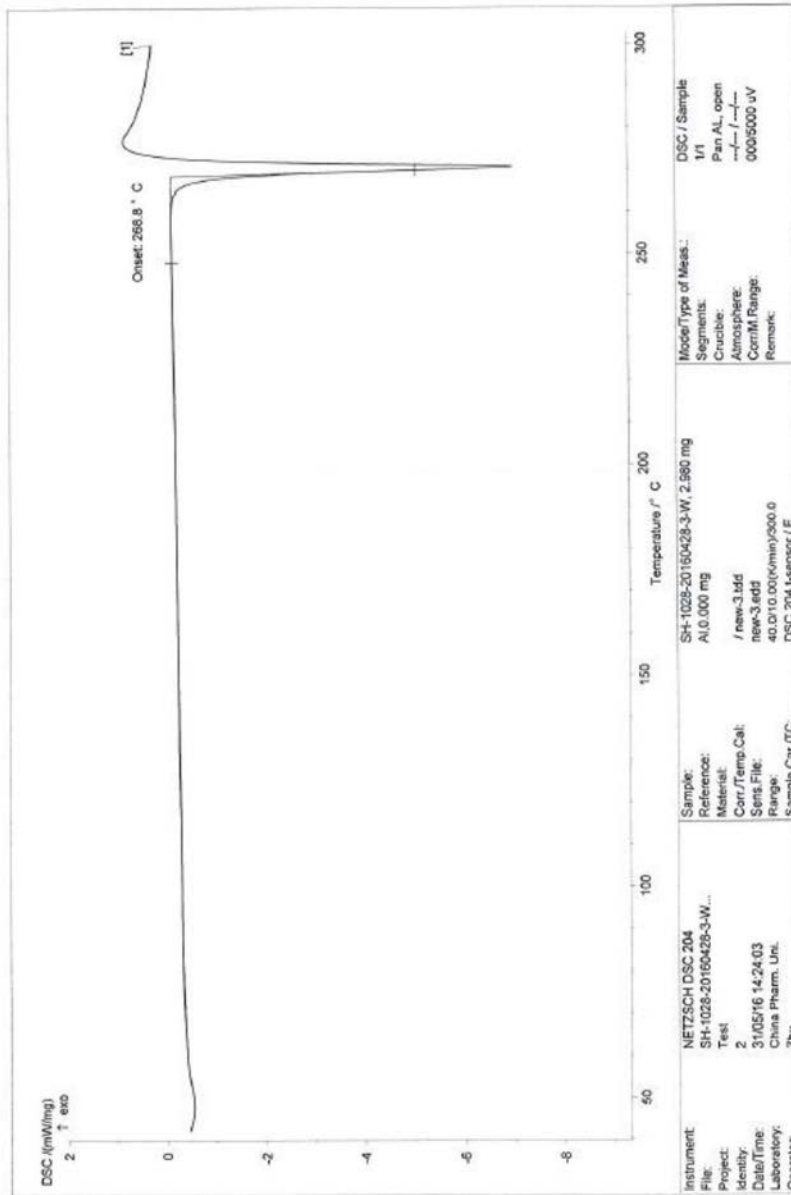


图1



China Pharmaceutical University

图2

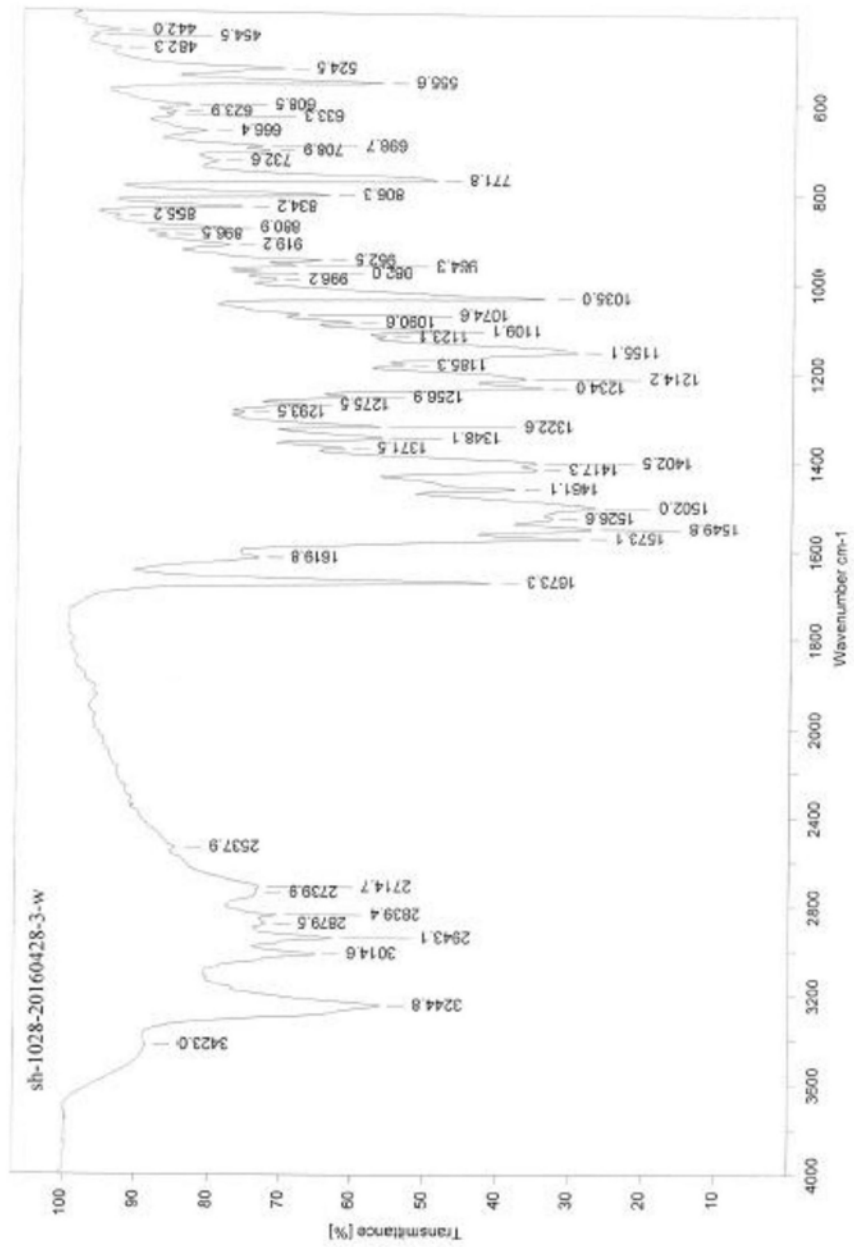


图3

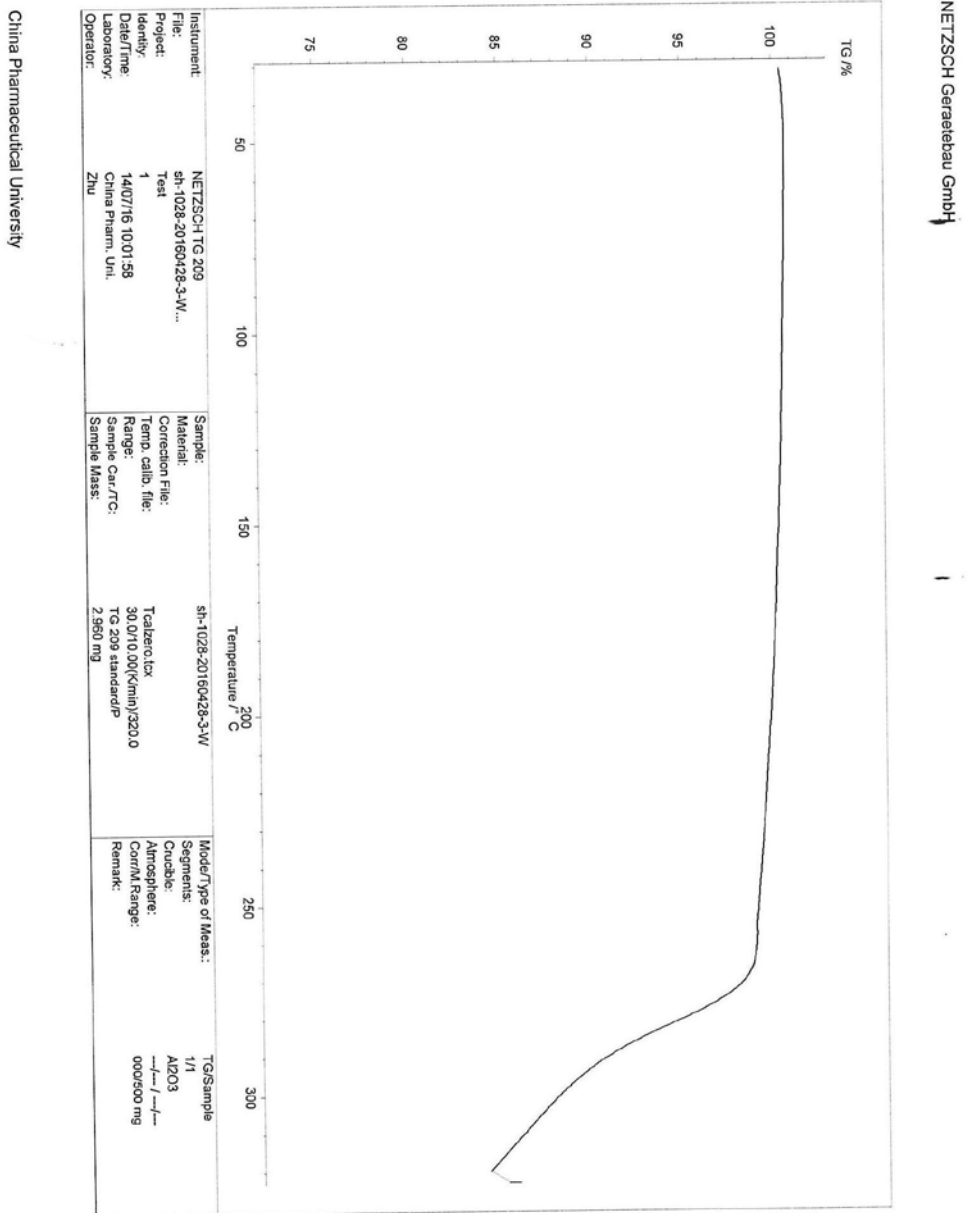


图4