



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118108786 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 31

(21) 申请号 202410021967.1

(22) 申请日 2024.01.08

(71) 申请人 华东师范大学

地址 200241 上海市闵行区东川路500号

(72) 发明人 朱书雷 吕伟 丁梦园

(74) 专利代理机构 上海蓝迪专利商标事务所

(普通合伙) 31215

专利代理师 徐筱梅 张翔

(51) Int. Cl.

C07K 5/062 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

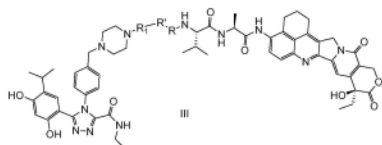
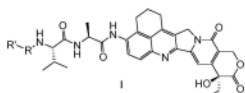
权利要求书3页 说明书18页 附图14页

(54) 发明名称

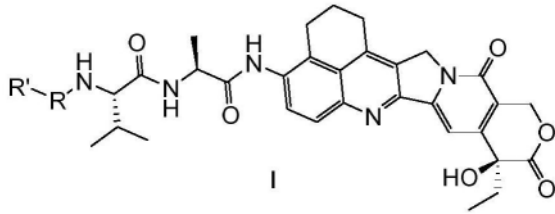
连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物及其合成方法和应用

(57) 摘要

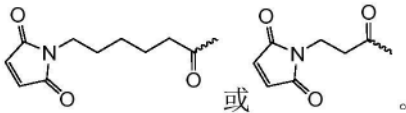
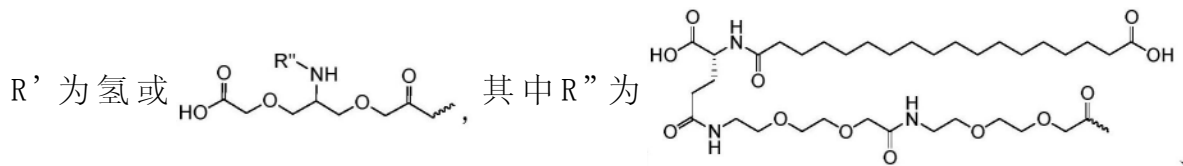
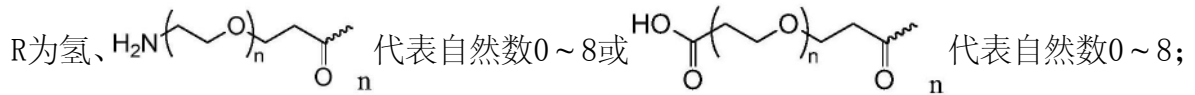
本发明公开了式I所示的连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体及其合成方法和应用。本发明还公开了式III所示的组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药及其合成方法和应用。本发明还公开了一种药物组合物及其应用。



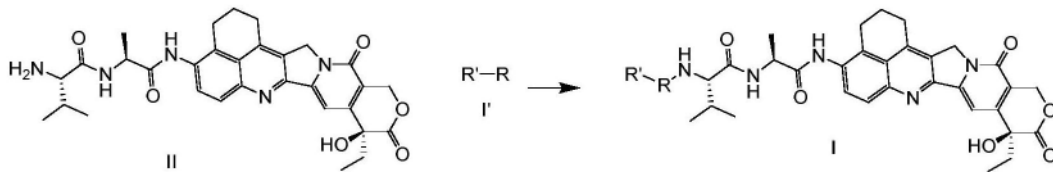
1. 一种连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体,其特征在於,其结构如式I所示:



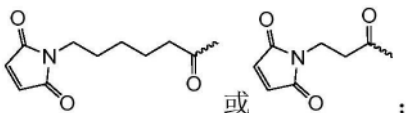
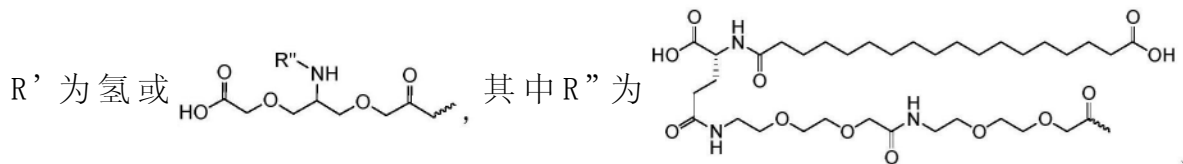
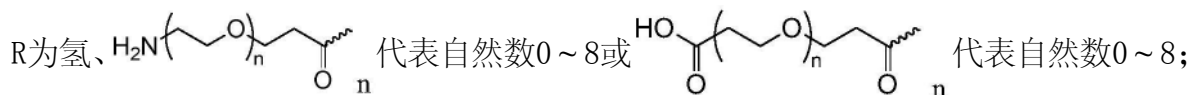
其中,



2. 一种连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体的合成方法,其特征在於,所述方法包括以下步骤:式II化合物与式I'化合物溶于第一溶剂中,通过加入缩合剂及碱得到式I化合物;反应路线如下所示:



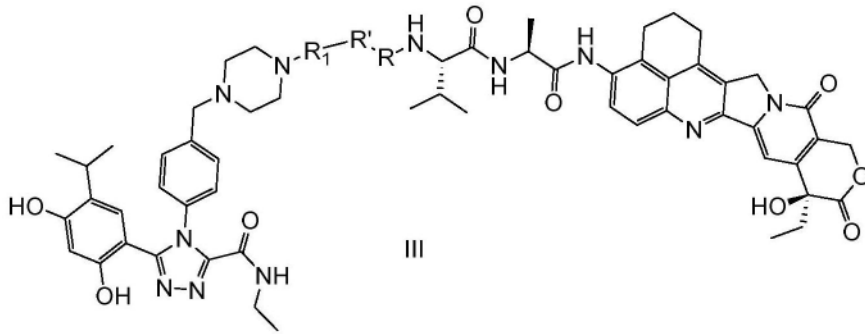
其中,



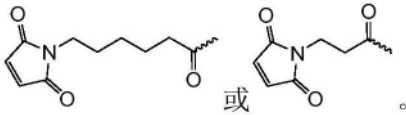
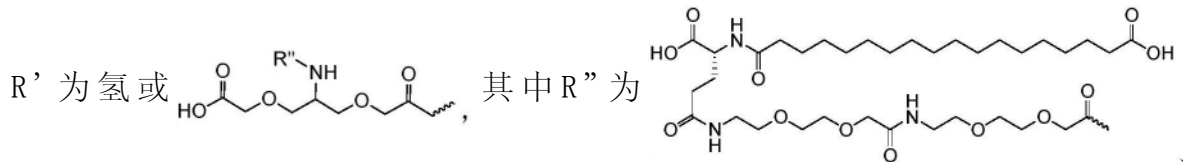
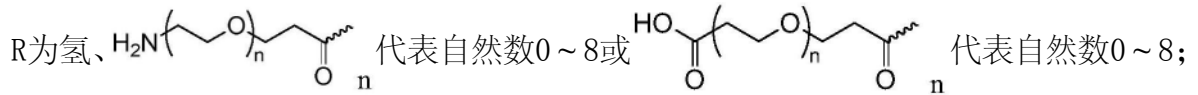
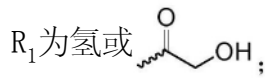
所述式II化合物、式I'化合物、缩合剂、碱的摩尔比为1:(1.01-1.2):(1.1-2):(1.5-3);所述碱选自三乙胺、DMAP、DIPEA、NMP、咪唑中的一种或多种;所述第一溶剂选自无水二氯甲烷、无水三氯甲烷、无水四氢呋喃、无水N,N-二甲基甲酰胺、无水N,N-二甲基乙酰胺中的一种或多种;所述缩合剂选自HATU、HBTU、EDCI、HOBT、HOAT、DCC、EEDQ、DMTMM、 T_3P 、 T_4P 中的

一种或多种;反应的温度为0~35℃;反应的时间为2~8小时。

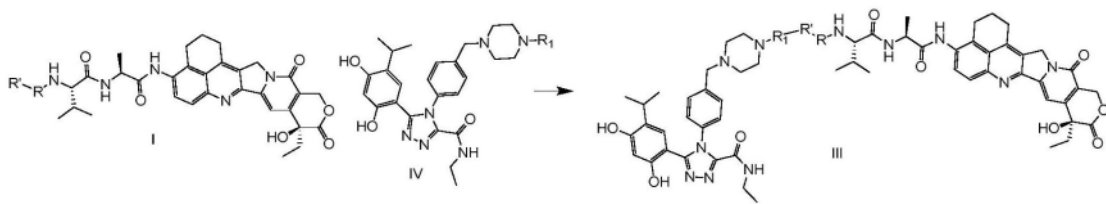
3.一种组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药,其特征在于,其结构如式III所示:



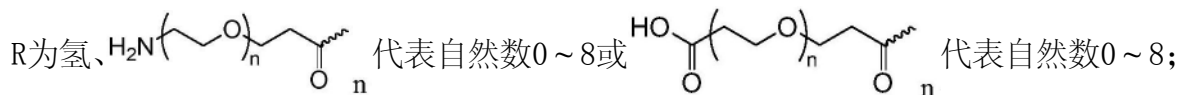
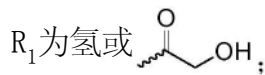
其中,

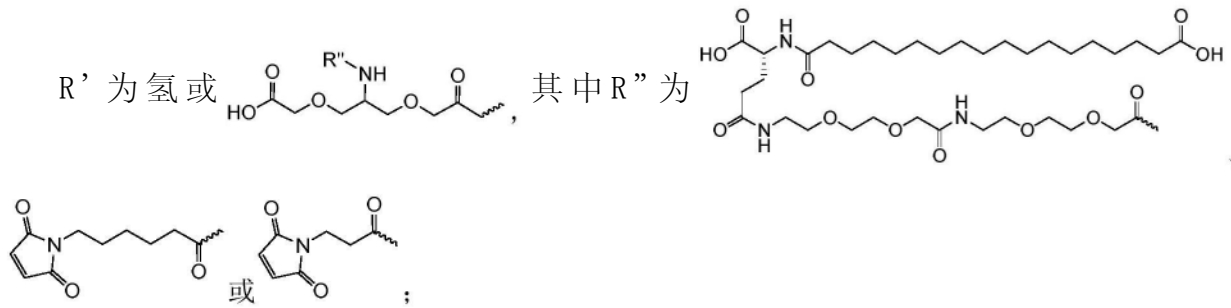


4.一种组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药的合成方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:式IV化合物与式I化合物溶于第二溶剂中,通过加入缩合剂及碱进行缩合反应得到式III化合物;反应路线如下所示:



其中,





所述碱选自三乙胺、DMAP、DIPEA、NMP、咪唑中的一种或多种；所述第二溶剂选自无水二氯甲烷、无水三氯甲烷、无水四氢呋喃、无水N,N-二甲基甲酰胺、无水N,N-二甲基乙酰胺中的一种或多种；所述缩合剂选自HATU、HBTU、EDCI、HOBT、HOAT、DCC、EEDQ、DMTMM、T₃P、T₄P中的一种或多种；所述式I化合物、式IV化合物、缩合剂和碱的摩尔比为1:(1.01-1.2):(1.1-2):(1.5-3)；反应的温度为0-30℃；反应的时间为4-12小时。

5. 一种药物组合物,其特征在于,其包括如权利要求1所述的连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体(I)或如权利要求4所述的组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药(III)以及药学上可接受的载体。

6. 一种如权利要求1所述的连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体(I)、如权利要求4所述的组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药(III)或如权利要求7所述的药物组合物在抗肿瘤药物和抗肿瘤药物靶向给药体系制备中的应用。

连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物及其合成方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化合物的合成,尤其涉及用作医药中间体的一种连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物及其合成方和应用。

背景技术

[0002] 喜树碱(CPT)是传统抗肿瘤药物中研究较为广泛的一类植物类药物,也是当下研究最火热的拓扑异构酶1(TOP1)抑制剂。喜树碱及其衍生物作为拓扑异构酶I抑制剂选择性地捕获TOP1裂解复合体,成为了极具潜力的抗肿瘤药物。喜树碱衍生物被广泛运用于药物递送系统,其中抗体药物偶联物(Anti-body drug conjugate,ADC)是靶向给药体系中最具代表性的药物。为了通过靶向肿瘤来增加TOP1抑制剂在癌细胞中的积聚,TOP1抑制剂类的ADC被广泛开发。第一三共“神药”Enhertu(DS-8201)的大获成功,更是将喜树碱类ADC的研发热潮推向顶峰。然而,ADC的分子量较大,对于肿瘤组织的渗透性较差,导致能够有效进入肿瘤的效应分子比例很低,不足2%。此外,ADC的制备工艺较为复杂、合成较为困难,会导致高昂的治疗费用,从而限制了其临床应用。另外许多10-羟基喜树碱衍生物,例如拓扑异构酶1抑制剂伊立替康的活性代谢产物SN38,虽然对许多恶性肿瘤有效,但具有水溶性差、生物利用度低和严重的剂量限制毒性等特点,为了解决这些问题,开发了一系列SN-38的前药。除了SN-38以外的基于喜树碱衍生物的前药也陆续被开发出来,例如European Journal of Medicinal Chemistry 226(2021)1 13851报道了一种基于新型喜树碱衍生物CPTS0001的季铵盐类白蛋白结合型前药Mal-glu-CPTS0001。该前药显著降低了母体药物的毒性,最大耐受剂量增加的同时增强了药物的体内可选择性,改善了前药在肿瘤中的积累。

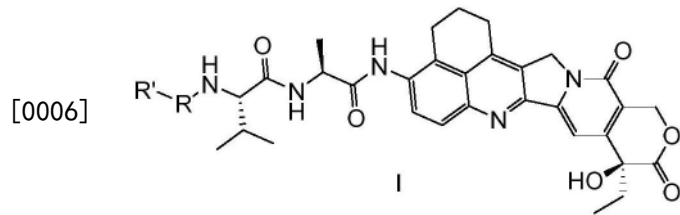
[0003] 组织蛋白酶(Cathepsin B)是在各种动物组织的细胞内(特别是溶酶体部分)发现的一类蛋白酶,在多种肿瘤细胞中过表达,如胃、肺、子宫内膜癌等多种重大疾病密切相关,是近年来备受关注的一类靶标蛋白酶。组织蛋白酶B具有羧基肽酶活性,可选择性识别某些氨基酸序列并切割序列C端的二肽接头,例如Val-Cit、Val-Ala、GGFG等,这些连接子在在研或者已获批的ADC中广泛应用。酶切割的连接子通常具有更高的血浆稳定性,可有效防止药物的过早释放,这一类连接子已经在临床上取得成功。然而,由于ADC分子量较大,肿瘤组织渗透性差,可到达肿瘤部位的有效载荷不足2%。此外合成路线困难,工艺复杂,会导致高昂的治疗费用。因此,开发一种制备工艺相对简单、成本较低的组织蛋白酶B裂解的喜树碱衍生物类前药可有效应对临床需求。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服现有药物的缺陷而提出的组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类前药及其合成方法和应用。通过组织蛋白酶B裂解型连接子将10-氨基喜树碱衍生物与HSP90抑制剂连接。该类化合物在静脉注射后,在肿瘤胞外基质中或肿瘤细胞溶酶体中经组织蛋白酶B触发裂解,释放出10-氨基喜树碱衍生物。该类化合物也可以在静脉注射后

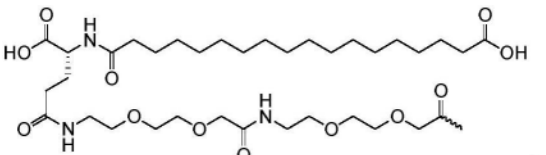
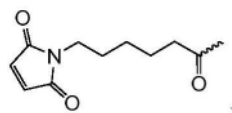
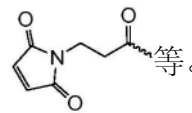
与血浆中白蛋白结合形成大分子载药体系,延长药物在体内循环的半衰期,降低清除率,从而达到更好的治疗效果。

[0005] 本发明提供了一种组织蛋白酶B裂解型10-氨基类喜树碱类化合物的前药中间体,该类化合物具有式I结构:

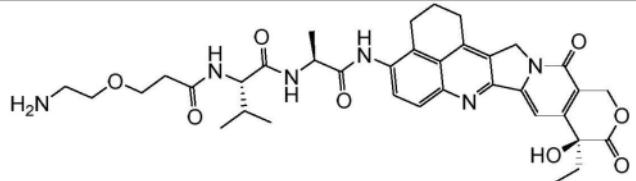
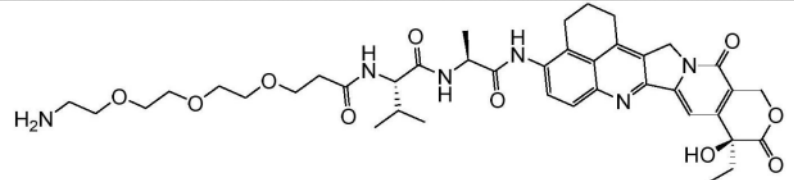


[0007] 其中,

[0008] R为氢、 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{O})_n$ n代表自然数0~8、 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n$ n代表自然数0~8;

[0009] R' 为氢、 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{O})_n$, 其中R" 为 、、等。

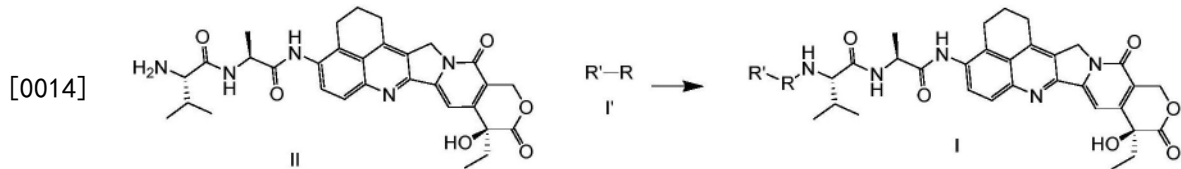
[0010] 具体地,所述连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体包括如下所列的化合物:

| 化合物编号 | 结构式 | 实施例 |
|-------|--|-----|
| 4a |  | 1-2 |
| 4b |  | 1-2 |

[0011]

| | | |
|--------|--|-----|
| | | 1-2 |
| [0012] | | 2-7 |

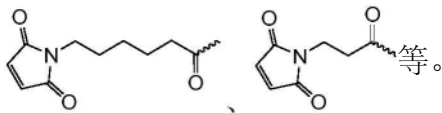
[0013] 本发明还提供了一种连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体的合成方法,其合成方法包括以下具体步骤:式I'化合物与式II化合物溶于第一溶剂中,通过加入缩合剂及碱进行缩合反应得到式I化合物,反应路线如下所示:



[0015] 其中:

[0016] R为氢、 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ n代表自然数0~8、 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ n代表自然数0~8;

[0017] R'为氢、 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 其中R''为



[0018] 步骤中,所述反应的温度控制在0~35℃;优选地,为25℃。

[0019] 步骤中,所述反应的时间为2~8小时;优选地,为4小时。

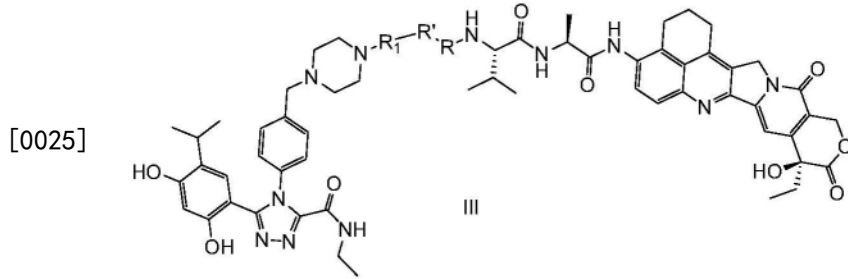
[0020] 步骤中,所述式I'化合物、式II化合物、碱的用量摩尔比为1:(1.01-1.2):(1.1-2):(1.5-3);优选地,为1:1:1.5:3。

[0021] 步骤中,所述碱选自三乙胺、DMAP、DIPEA、NMP、咪唑中的一种或多种;优选地,为DIPEA。

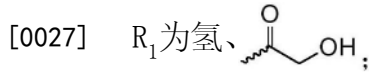
[0022] 步骤中,所述第一溶剂选自无水二氯甲烷、无水三氯甲烷、无水四氢呋喃、无水N,N-二甲基甲酰胺、无水N,N-甲基乙酰胺中的一种或多种;优选地,为无水二氯甲烷。

[0023] 步骤中,所述缩合剂选自HATU、HBTU、EDCI、HOBT、HOAT、DCC、EEDQ、DMTMM、T₃P、T₄P中的一种或多种;优选地,为HATU。

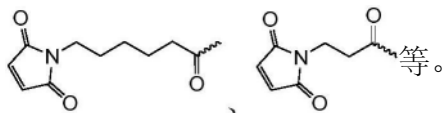
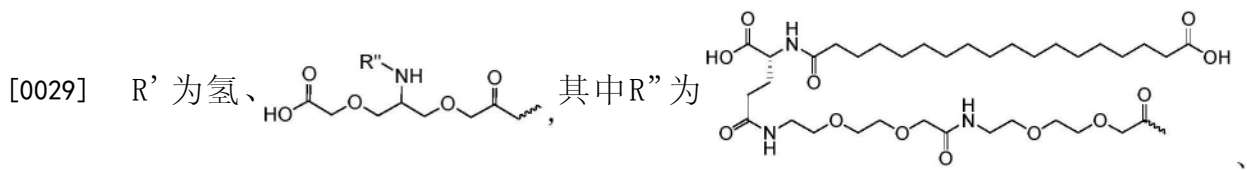
[0024] 本发明还提供了一种组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药,其特征在于,其结构如式III所示:



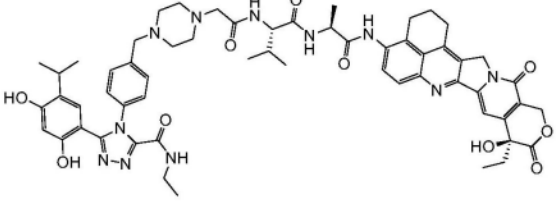
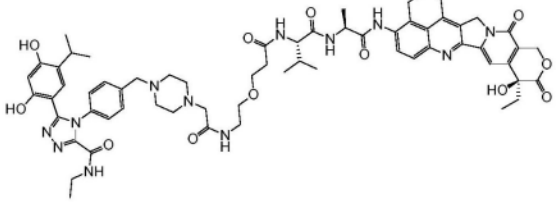
[0026] 其中,



8;



[0030] 具体地,所述的组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药(III),其包括如下所列的化合物:

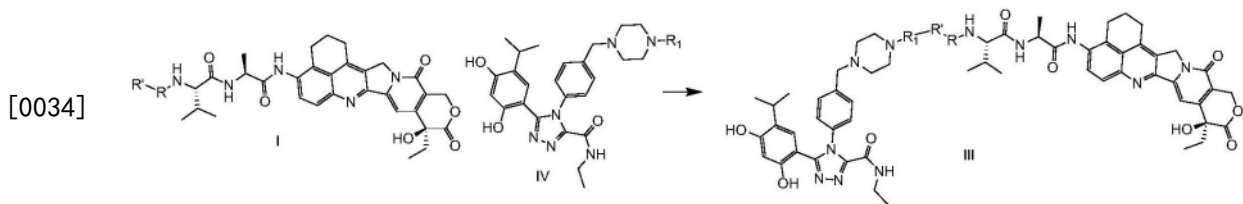
| 化合物编号 | 结构式 | 实施例 |
|------------|--|----------|
| 24 |  | 5 |
| 25a |  | 5 |

[0031]

| | | |
|-------------------|--|-------------------|
| <p>25b</p> | | <p>5</p> |
| <p>25c</p> | | <p>5</p> |
| <p>20</p> | | <p>3-3</p> |
| <p>22</p> | | <p>4</p> |

[0032]

[0033] 本发明还提供了一种组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱类衍生物前药的合成方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:式IV化合物与式I化合物溶于第二溶剂中,通过加入缩合剂及碱进行缩合反应得到式III化合物;反应路线如下所示:

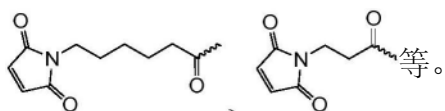


[0035] 其中,

[0036] R_1 为氢、

[0037] R 为氢、 n 代表自然数0~8、 n 代表自然数0~8;

[0038] R' 为氢、 ,其中 R'' 为



[0039] 步骤中,所述反应的温度控制在0~30℃;优选地,为25℃。

[0040] 步骤中,所述反应的时间为4~12小时;优选地,为6小时。

[0041] 步骤中,所述碱选自三乙胺、DMAP、DIPEA、NMP、咪唑中的一种或多种;优选地,为DIPEA。

[0042] 步骤中,所述第二溶剂选自无水二氯甲烷、无水三氯甲烷、无水四氢呋喃、无水N,N-二甲基甲酰胺、无水N,N-二甲基乙酰胺中的一种或多种;优选地,为无水二氯甲烷。

[0043] 步骤中,所述缩合剂选自HATU、HBTU、EDCI、HOBT、HOAT、DCC、EEDQ、DMTMM、T₃P、T₄P中的一种或多种;优选地,为HATU。

[0044] 步骤中,所述式I化合物、式IV化合物、缩合剂和碱的摩尔比为1:(1.01-1.2):(1.1-2):(1.5-3);优选地,为1:1:1.5:3。

[0045] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含所述连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类前药中间体,即式I化合物;或组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱衍生物前药,即式III所示的化合物或药物组合物,在以及药学上可接受的载体。

[0046] 本发明还提供了所述连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体,即式I化合物;或组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱衍生物前药,即式III所示的化合物或药物组合物在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0047] 本发明还提供了所述连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体,即式I化合物;或组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱衍生物前药,即式III所示的化合物或药物组合物,在制备和抗肿瘤药物靶向给药中的应用。

[0048] 其中,所述肿瘤包括结直肠癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌等。

[0049] 其中,所述靶向给药包括组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱衍生物体内白蛋白非共价/共价结合型前药、基于组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱衍生物为效应分子的抗体偶联药物等。

[0050] 本发明的有益效果在于:本发明中式III化合物的合成路线简单且易于纯化;原料易得,生产成本较低,可以大量制备,以满足目前以及未来临床医药研究的需要。

附图说明

[0051] 图1化合物20的¹H NMR谱图;

[0052] 图2化合物20的¹³C NMR谱图;

[0053] 图3化合物22的¹H NMR谱图;

[0054] 图4化合物22的¹³C NMR谱图;

[0055] 图5化合物24的¹H NMR谱图;

[0056] 图6化合物24的¹³C NMR谱图;

[0057] 图7化合物25a的¹H NMR谱图;

[0058] 图8化合物25a的¹³C NMR谱图;

[0059] 图9化合物25b的¹H NMR谱图;

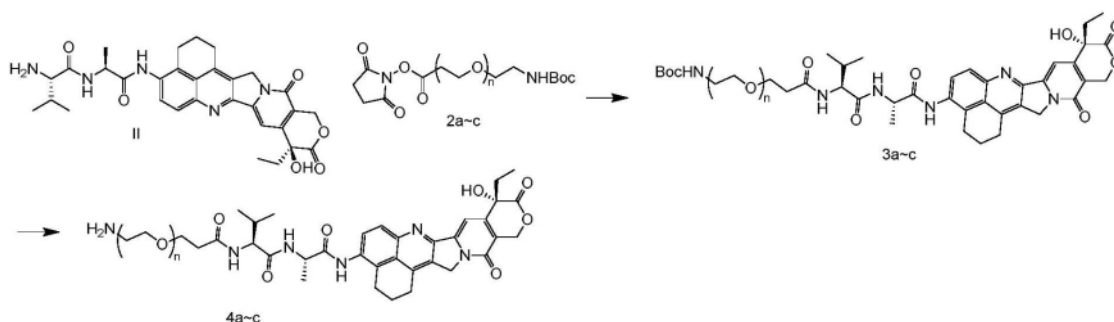
- [0060] 图10化合物25b的¹³C NMR谱图；
 [0061] 图11化合物25c的¹H NMR谱图；
 [0062] 图12化合物25c的¹³C NMR谱图；
 [0063] 图13化合物20、22、25c的酶释曲线；
 [0064] 图14化合物25c对人结直肠癌HCT-116裸鼠移植瘤的生长抑制作用；
 [0065] 图15化合物25c对人结直肠癌HCT-116荷瘤鼠体重的影响；
 [0066] 图16化合物25c对人结直肠癌HCT-116荷瘤鼠瘤重的影响；
 [0067] 图17化合物1 (组织蛋白酶B作用下释放出的药物) 结构示意图。

具体实施方式

[0068] 本发明所述的一种连接组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物的合成方法，在以下实施例中有更详细的叙述，但以下实施例不构成对本发明的限制。该合成方法包括：

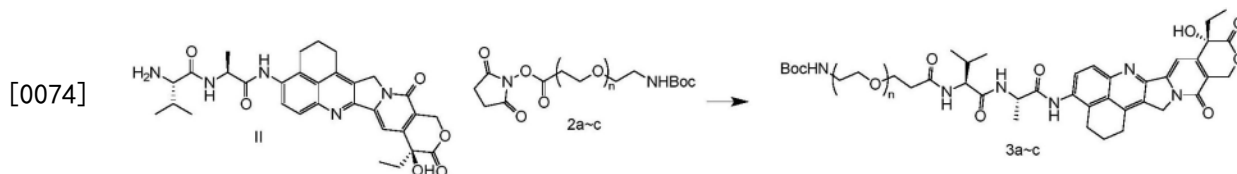
[0069] 式II化合物通过与不同长度PEG链的活性酯反应得到带有叔丁酯保护的组蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体；化合物在酸性条件下脱除叔丁酯保护得到组织蛋白酶B裂解的10-氨基喜树碱类化合物前药中间体，即式I化合物；或通过苄基保护的丝氨酸构建可用于连接三个药效团的连接子，得到前药中间体，即式I化合物。随后将得到的式I化合物与HSP90抑制剂片段在溶剂中进行酰胺缩合反应，过反相柱纯化得到用于组织蛋白酶B裂解型10-氨基喜树碱衍生物前药，即式III化合物。所需反应原料易得，均可通过市场才能够得到采购；反应条件简单，易于纯化，可以大量制备，满足临床医药研究开发需要。

[0070] 实施例1



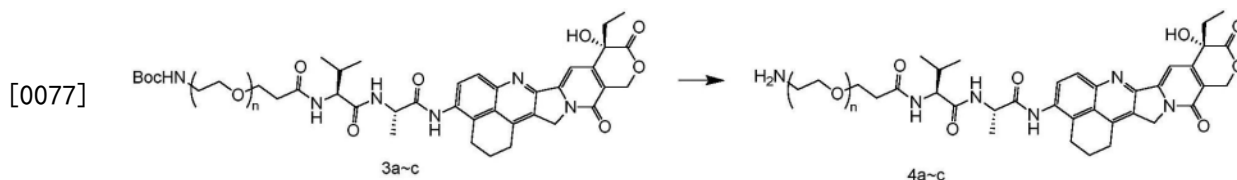
[0072] 实施例1中，n为1、3、4。

[0073] 1-1



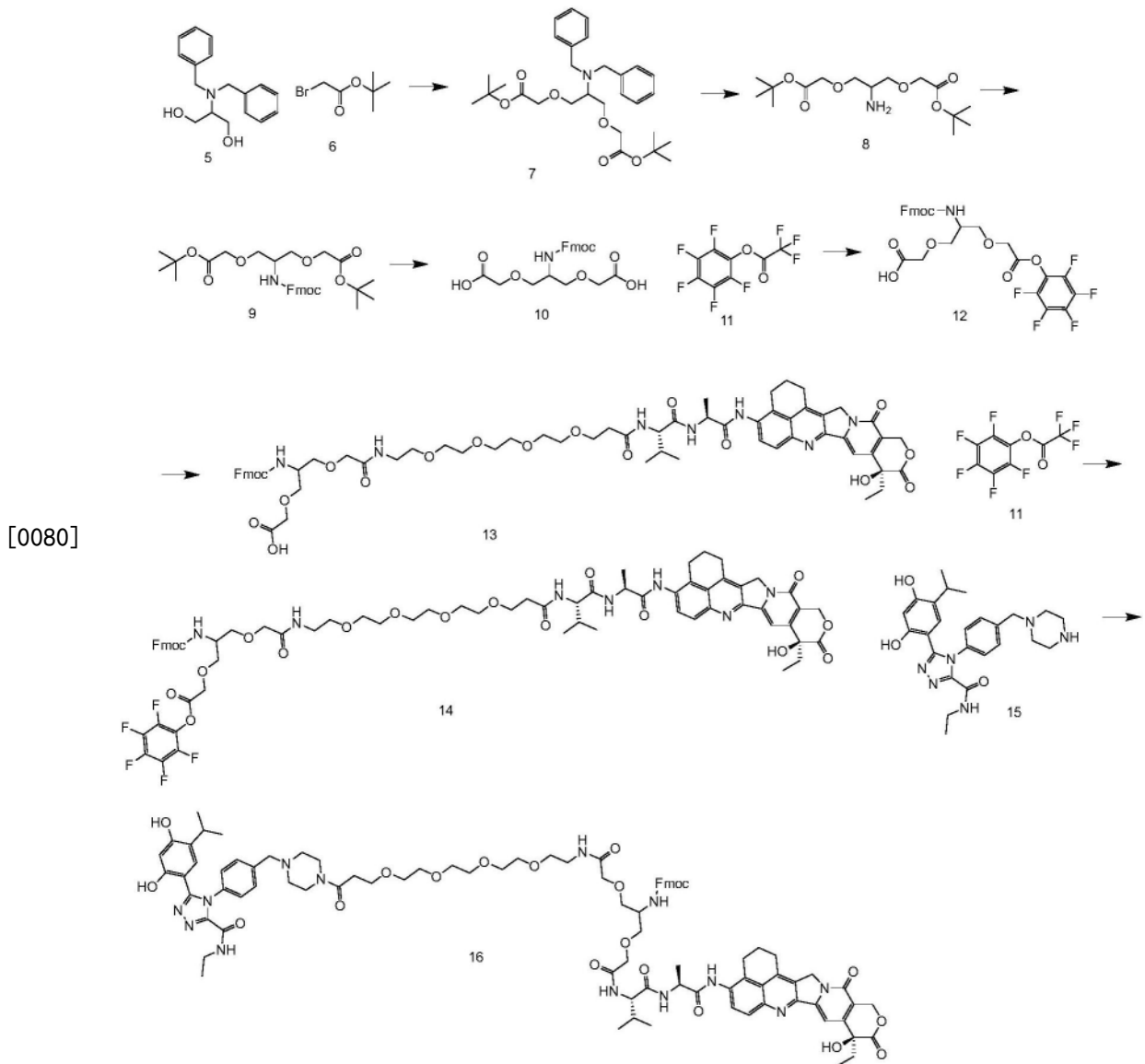
[0075] 氮气保护下，将化合物II (80mg, 0.113mmol) 溶于无水DMF中，加入DIEA (14.6mg, 0.113mmol)，及化合物2a~c (37.3mg, 0.113mmol)，室温下反应12h。待反应结束后，减压浓缩，得黄色固体80mg，收率89.9%，直接投入下一步。

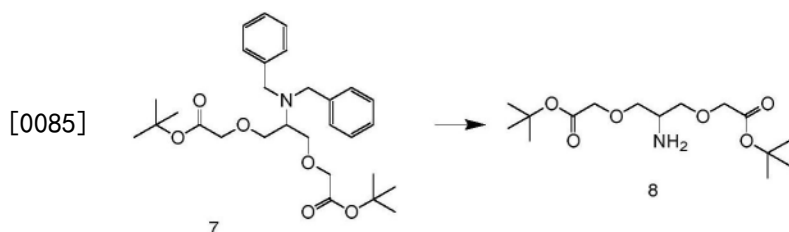
[0076] 1-2



[0078] 氮气氛围下,将化合物3a~c(80mg,0.101mmol)溶于20%TFA的无水DCM溶液中,室温下反应2h。待反应结束后,减压浓缩,得黄棕色固体83mg,收率97.9%。化合物4a:¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ8.31(s,2H),7.81(s,2H),7.02(s,2H),6.17(s,2H),5.76(d,J=10.5Hz,4H),5.60(s,2H),5.37(s,2H),5.00(t,J=32.9Hz,6H),3.75(s,2H),3.67(s,4H),3.62(s,2H),3.47(s,2H),3.07(s,4H),2.97(s,2H),2.73(s,1H),2.58(s,2H),2.23(d,J=13.4Hz,4H),1.98(s,2H),1.44(s,6H),1.31(s,4H),0.96(s,12H),0.89(s,3H)。化合物4b:¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ8.31(s,1H),8.03(s,1H),7.81(s,1H),7.01(s,1H),6.97(s,1H),5.99(s,1H),5.78(s,1H),5.74(s,1H),5.32(s,1H),5.06(s,1H),4.97(d,J=6.0Hz,2H),3.75(s,1H),3.67(s,2H),3.62(s,2H),3.52(s,8H),3.41(s,1H),3.07(s,2H),2.97(s,1H),2.73(s,1H),2.60(s,2H),2.24(s,1H),2.19(s,1H),2.10(s,1H),1.44(d,J=1.1Hz,5H),0.96(s,6H),0.89(s,2H)。化合物4c:¹H NMR(400MHz,DMSO) δ9.76(s,1H),8.26(d,J=6.7Hz,1H),7.91(d,J=8.9Hz,2H),7.77(d,J=9.1Hz,1H),5.39(s,2H),5.21(s,2H),4.52-4.47(m,1H),4.20(d,J=8.2Hz,1H),3.51(s,4H),3.47-3.45(m,14H),3.11(s,2H),2.38(d,J=6.5Hz,3H),1.90(ddd,J=21.5,13.8,6.8Hz,6H),1.35(d,J=6.8Hz,2H),1.30(d,J=6.5Hz,2H),1.19(s,3H),0.83(dd,J=7.4,4.3Hz,9H)。

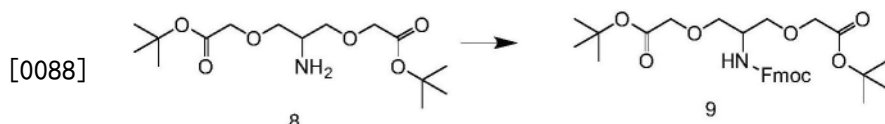
[0079] 实施例2





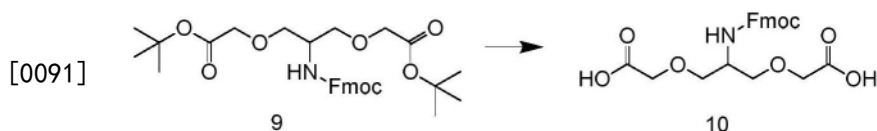
[0086] 将化合物7 (400mg, 0.8mmol) 溶于10mL甲醇中, 加入10%的钯炭 (5mol%), 置换氢气, 加热至45℃反应12h。待反应结束后, 过滤钯炭, 收集滤液, 滤液旋干后得无色油状物238mg, 收率93.1%, 可直接进行下一步反应。

[0087] 2-3



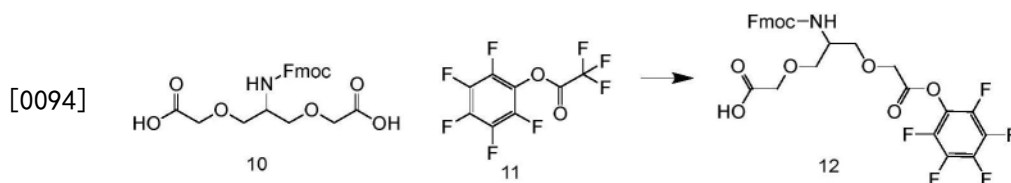
[0089] 氮气氛围下, 将化合物8 (3.7g, 11.6mmol) 溶于50mL无水DCM中, 加入DIEA (1.79g, 13.9mmol), 搅拌下加入Fmoc-Cl (3.6g, 13.9mmol), 室温下反应8h。待反应结束后除去溶剂, 粗产物经Flash柱纯化 (PE:EA=0%→20%), 得淡黄色油状物6g, 收率95.5%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.75 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.65 (d, J=7.3Hz, 2H), 7.37 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.31 (d, J=7.3Hz, 2H), 6.14 (d, J=6.7Hz, 1H), 4.35 (d, J=7.1Hz, 2H), 4.25-4.11 (m, 2H), 4.02-3.95 (m, 4H), 3.79-3.63 (m, 4H), 1.48 (s, 18H)。

[0090] 2-4



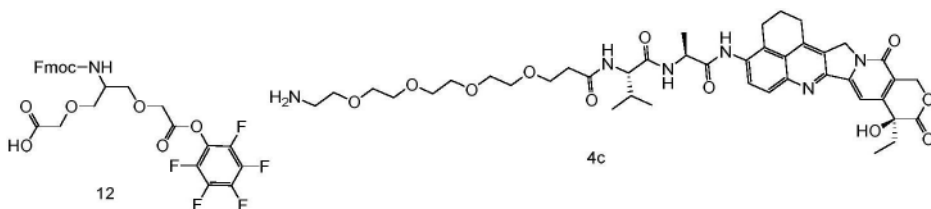
[0092] 氮气氛围下, 将化合物9 (3g, 5.54mmol) 溶于40% TFA的DCM溶于中, 室温下反应4h。待反应结束后除去溶剂, 剩余物PE重沉淀可析出固体, 过滤后得白色固体1.8g, 收率75.7%。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ7.89 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.70 (d, J=7.4Hz, 2H), 7.41 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.31 (dd, J=15.9, 8.2Hz, 3H), 4.34-4.16 (m, 3H), 4.06-3.91 (m, 4H), 3.81-3.72 (m, 1H), 3.49 (dd, J=11.9, 6.0Hz, 4H)。

[0093] 2-5

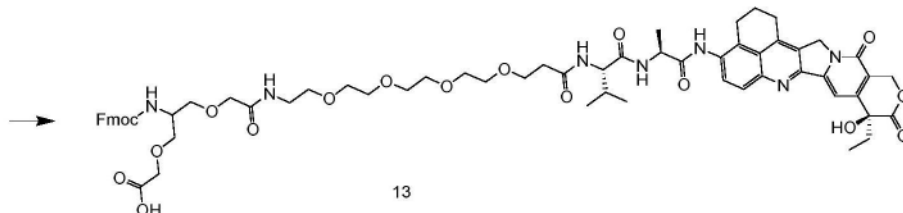


[0095] 氮气保护下, 将化合物10 (200mg, 0.466mmol) 溶于8mL无水DCM中, 加入DIEA (60.2mg, 0.466mmol), 随后加入三氟乙酸五氟苯酯 (化合物11) (130.4mg, 0.466mmol), 室温下反应10h。原料反应不完全, 除去溶剂后柱层析纯化 (DCM:MeOH=50:1→20:1), 得淡黄色油状物100mg, 收率36.0%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.75 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.61 (d, J=7.4Hz, 2H), 7.38 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.29 (t, J=7.3Hz, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.36 (d, J=7.2Hz, 2H), 4.22 (t, J=7.0Hz, 1H), 4.10 (t, J=21.0Hz, 3H), 3.893.59 (m, 4H)。

[0096] 2-6

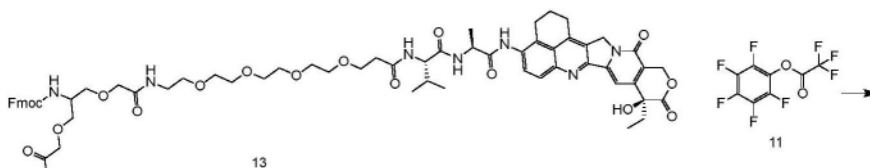


[0097]

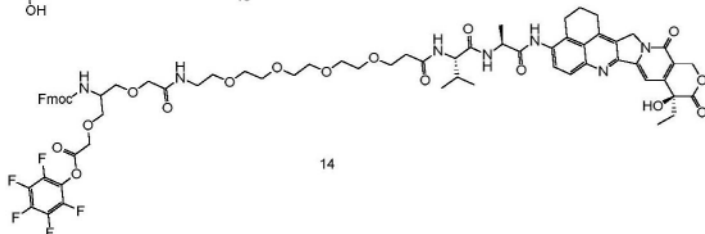


[0098] 氮气保护下,将化合物4c (50mg,0.061mmol)溶于5mL无水DCM中,加入化合物12 (36.3mg,0.061mmol)及DIEA(11.8mg,0.091mmol),室温下反应液5h。待反应结束后除去溶剂,EA打浆可得淡黄色固体40mg,收率53.2%。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 9.85 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.95 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.86 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.83-7.75 (m, 2H), 7.68 (d, J=7.0Hz, 2H), 7.39 (t, J=7.2Hz, 2H), 7.31 (d, J=8.5Hz, 3H), 6.52 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.55-4.49 (m, 1H), 4.22 (dd, J=19.2, 11.6Hz, 4H), 4.02 (dd, J=14.2, 7.1Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.77 (s, 1H), 3.58 (t, J=6.0Hz, 2H), 3.47 (d, J=3.8Hz, 18H), 3.14 (s, 2H), 2.96 (s, 2H), 1.99 (s, 4H), 1.87 (dt, J=14.5, 7.2Hz, 2H), 1.39 (d, J=6.7Hz, 3H), 1.17 (t, J=7.1Hz, 2H), 0.87 (dd, J=15.2, 8.6Hz, 9H)。

[0099] 2-7

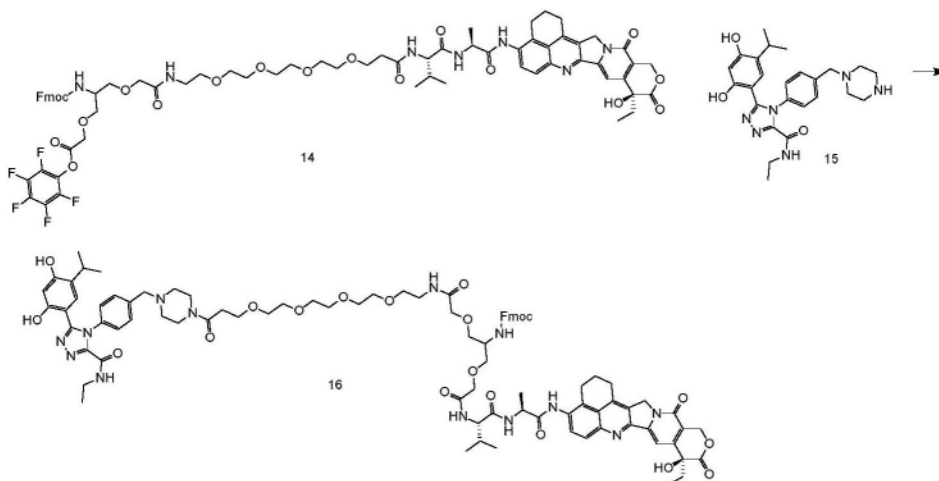


[0100]



[0101] 氮气保护下,将化合物13 (40mg,0.032mmol)溶于5mL无水DMF中,加入三氟乙酸五氟苯酯(化合物11) (10.9mg,0.039mmol)及DIEA(5.0mg,0.039mmol),室温下反应4h。待反应结束后除去溶剂,粗产物经Flash柱纯化 (DCM:MeOH=5%→10%),得淡黄色固体。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.11 (s, 1H), 7.877.67 (m, 5H), 7.587.48 (m, 3H), 7.377.33 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 5.945.65 (m, 1H), 5.284.75 (m, 3H), 4.49 (s, 1H), 4.34 (d, J=6.4Hz, 2H), 4.164.11 (m, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.693.65 (m, 12H), 3.58 (s, 8H), 3.113.08 (m, 8H), 2.87 (d, J=41.0Hz, 4H), 2.58 (d, J=30.2Hz, 2H), 1.91 (dd, J=36.9, 30.5Hz, 4H), 1.52 (d, J=6.4Hz, 3H), 0.99 (dd, J=14.0, 6.3Hz, 9H)。

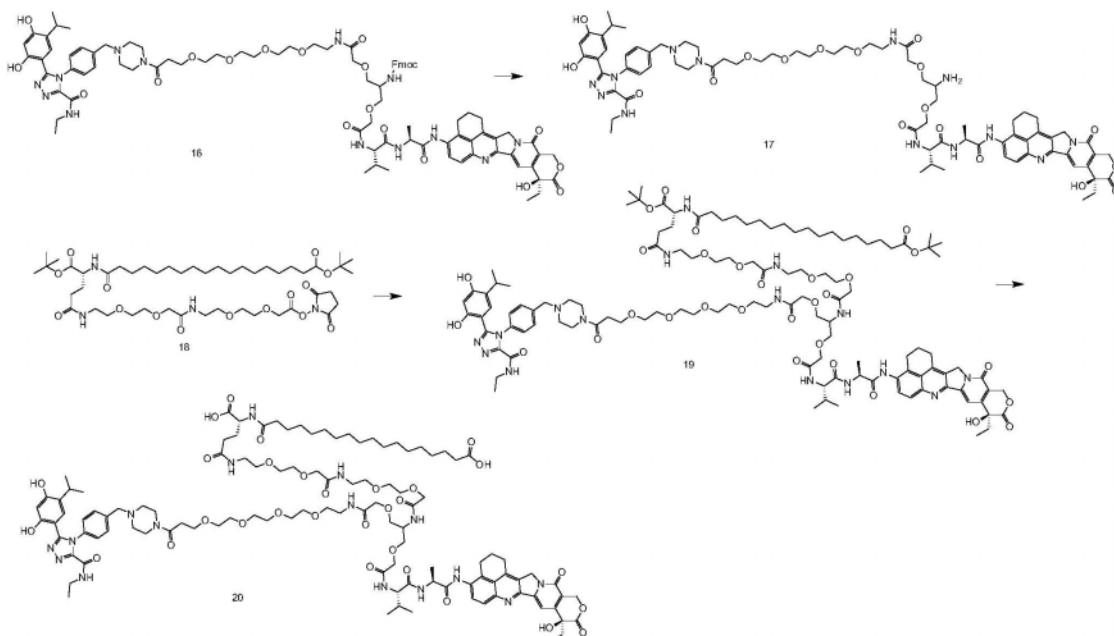
[0102] 2-8



[0103]

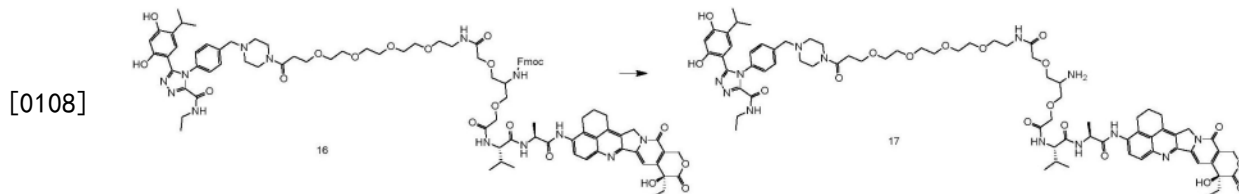
[0104] 氮气保护下,将化合物14 (180mg, 0.129mmol) 溶于10mL无水DMF中,加入化合物15 (60mg, 0.129mmol) 及DIEA (25.0mg, 0.194mmol), 室温下反应4h。待反应结束后除去溶剂,EA打浆得淡黄色固体150mg,收率69.3%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.30 (s, 2H), 8.22 (s, 2H), 7.90 (s, 4H), 7.81 (d, J=7.4Hz, 6H), 7.60 (s, 2H), 7.34 (d, J=1.4Hz, 7H), 7.26-7.10 (m, 9H), 6.92 (s, 2H), 6.37 (s, 2H), 6.19 (s, 2H), 5.84 (d, J=15.5Hz, 4H), 5.66 (d, J=9.0Hz, 4H), 5.08 (d, J=4.5Hz, 6H), 4.74 (d, J=6.0Hz, 4H), 4.66 (s, 2H), 4.56-4.45 (m, 8H), 3.82 (d, J=73.9Hz, 6H), 3.65 (t, J=12.5Hz, 11H), 3.60-3.33 (m, 45H), 3.30-3.22 (m, 7H), 3.09-2.85 (m, 12H), 2.94 (s, 1H), 2.73 (s, 1H), 2.56 (s, 2H), 2.48 (s, 5H), 2.24 (s, 2H), 1.88 (s, 2H), 1.43 (d, J=12.8Hz, 8H), 1.09 (d, J=50.0Hz, 19H), 1.00 (d, J=16.3Hz, 2H), 0.96 (s, 12H), 0.89 (s, 3H)。

[0105] 实施例3



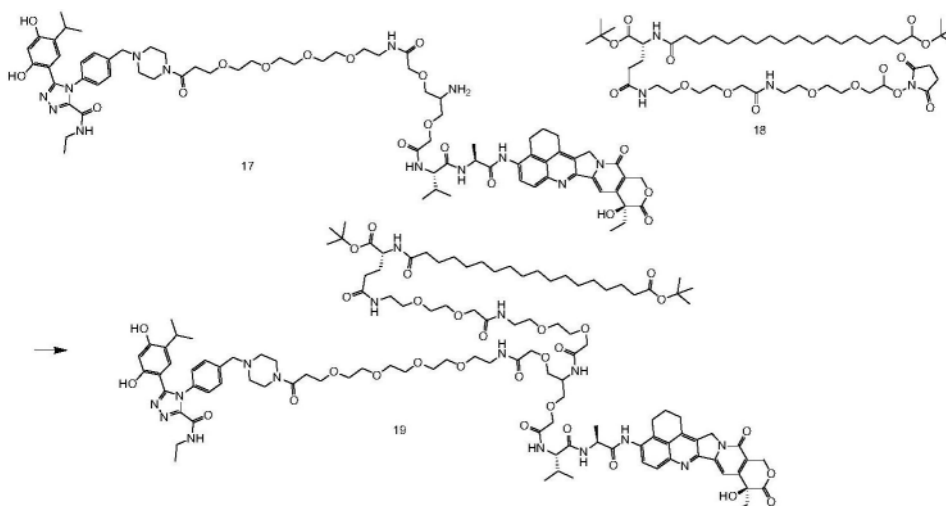
[0106]

[0107] 3-1



[0109] 将化合物16(150mg,0.089mmol)溶于20%二乙胺/THF溶液中,室温下反应3h。待反应结束后除去溶剂,PE打浆除去小极性杂质后经反相柱纯化(0.1%TFA-水:乙腈=5%→35%),冻干后得淡黄色固体100mg,收率76.9%。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ9.75(d,J=11.3Hz,1H),8.27(d,J=6.6Hz,1H),8.09(s,2H),8.05-7.77(m,4H),7.48(d,J=27.7Hz,2H),7.30(s,1H),6.65(s,1H),6.31(s,1H),5.43(s,2H),5.27(s,2H),4.52(d,J=6.3Hz,2H),4.41-4.23(m,4H),3.94(s,3H),3.49(d,J=6.2Hz,35H),3.22(d,J=45.8Hz,9H),2.97(s,4H),2.04-1.85(m,4H),1.39(d,J=6.5Hz,2H),1.05(t,J=7.2Hz,2H),0.92-0.83(m,12H)。

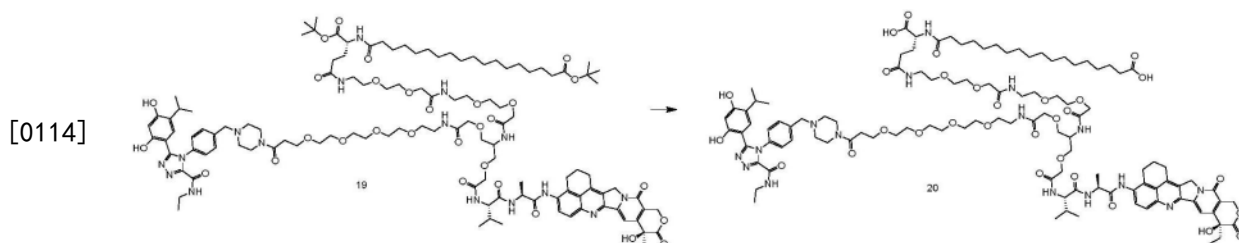
[0110] 3-2



[0111]

[0112] 氮气保护下,将化合物17(40mg,0.027mmol)溶于无水DMF中,加入化合物18(25.5mg,0.027mmol)及DIEA(4.2mg,0.032mmol),室温下反应4h。待反应结束后除去溶剂,EA打浆可得淡黄色固体47mg,收率76.2%,可直接投入下一步。

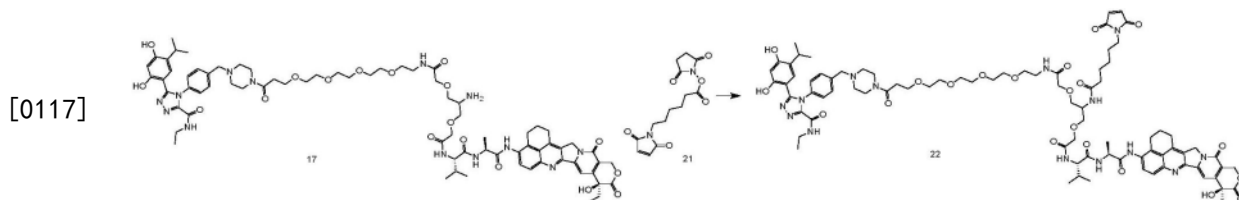
[0113] 3-3



[0115] 将化合物19(45mg,0.019mmol)溶于30%TFA/DCM溶液中,室温下反应5h。待反应结束后除去溶剂,经反相柱纯化(0.1%TFA-水:乙腈=5%→42%),冻干后得淡黄色固体28mg,收率65.4%。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ12.22(s,1H),10.36-9.65(m,2H),9.08-8.27(m,1H),8.077.63(m,5H),7.48(d,J=37.1Hz,3H),7.31(s,1H),6.59(d,J=69.9Hz,1H),5.35(d,J=68.1Hz,2H),4.30(dd,J=105.3,63.8Hz,4H),3.94(dd,J=40.8,16.7Hz,5H),3.49

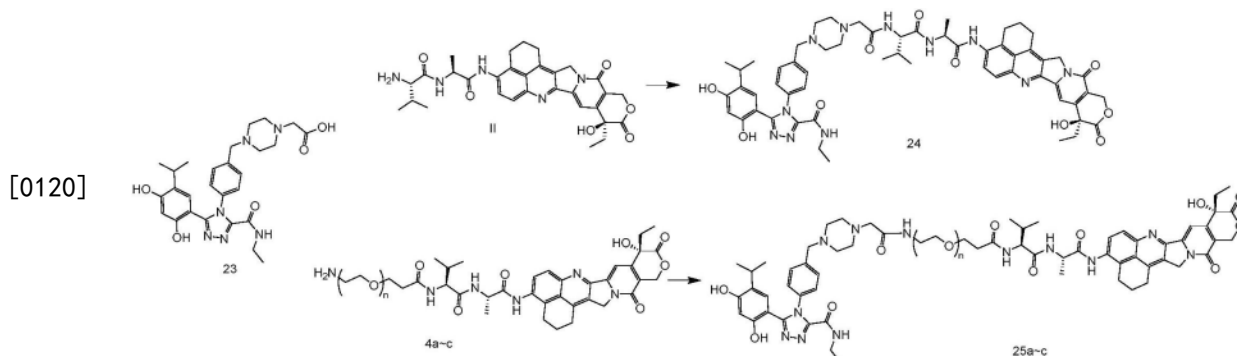
(t, J=26.8Hz, 32H), 3.22(d, J=36.2Hz, 10H), 2.97(s, 3H), 2.62(s, 1H), 2.33(s, 2H), 2.04(ddd, J=136.7, 62.0, 29.1Hz, 10H), 1.43(d, J=26.9Hz, 4H), 1.28(d, J=45.5Hz, 22H), 1.05(s, 3H), 0.88(s, 13H). (^1H NMR谱图如图1所示) ^{13}C NMR (101MHz, DMSO) δ 174.98, 174.02, 172.97, 172.84, 171.89, 171.78, 171.53, 170.74, 169.79, 169.71, 169.51, 169.31, 168.15, 157.77, 157.35, 156.57, 155.95, 155.10, 151.28, 150.51, 148.02, 146.70, 146.57, 141.81, 133.03, 131.92, 129.12, 128.76, 128.46, 127.36, 127.21, 126.93, 125.94, 125.68, 119.15, 103.31, 102.89, 96.95, 72.87, 70.61, 70.40, 70.23, 70.17, 70.00, 69.93, 69.79, 69.55, 69.34, 67.38, 67.02, 65.73, 57.79, 57.06, 51.93, 51.04, 49.99, 49.27, 40.60, 40.39, 40.18, 39.98, 39.77, 39.56, 39.35, 38.95, 38.50, 38.38, 36.34, 35.53, 34.12, 34.02, 33.02, 32.15, 31.15, 30.72, 29.54, 29.47, 29.38, 29.30, 29.21, 29.11, 29.01, 27.49, 26.82, 25.85, 25.70, 25.48, 24.96, 22.90, 21.34, 19.63, 18.54, 18.32, 15.00, 8.25. (^{13}C NMR谱图如图2所示) HR-MS (ESI): m/z Calc for, $[\text{M}+\text{H}]^+$: 2172.1408, found: 2172.1422.

[0116] 实施例4



[0118] 氮气保护下, 将化合物17 (60mg, 0.0412mmol) 溶于5mL无水DMF中, 加入化合物21 (12.7mg, 0.0412mmol) 及DIEA (7.9mg, 0.062mmol), 室温下反应6h。待反应结束后除去溶剂, 经反相柱纯化 (0.1% TFA-水: 乙腈=5% → 32%), 冻干后得淡黄色固体40mg, 收率58.9%。 ^1H NMR (400MHz, DMSO) δ 9.77(s, 2H), 9.00(s, 1H), 8.29(d, J=6.3Hz, 1H), 7.97-7.88(m, 3H), 7.84-7.74(m, 2H), 7.45(d, J=49.0Hz, 4H), 7.30(s, 1H), 7.00(d, J=7.6Hz, 2H), 6.65(s, 1H), 6.51(s, 1H), 6.32(s, 1H), 5.43(s, 2H), 5.26(s, 2H), 4.56-4.50(m, 1H), 4.24(dd, J=17.3, 9.2Hz, 3H), 4.04(s, 1H), 3.86(s, 2H), 3.58(d, J=7.3Hz, 3H), 3.49-3.41(m, 20H), 3.26(d, J=5.8Hz, 3H), 3.16(d, J=5.6Hz, 4H), 3.00-2.88(m, 4H), 2.40(dd, J=23.6, 16.9Hz, 3H), 2.06(d, J=7.2Hz, 2H), 2.00(d, J=6.2Hz, 3H), 1.88(dd, J=14.5, 7.2Hz, 2H), 1.50-1.44(m, 4H), 1.39(d, J=7.0Hz, 4H), 1.21(d, J=16.4Hz, 8H), 1.04(t, J=7.1Hz, 3H), 0.86(d, J=5.4Hz, 15H). (^1H NMR谱图如图3所示) ^{13}C NMR (101MHz, DMSO) δ 172.98, 172.42, 171.84, 171.54, 170.73, 169.56, 157.76, 157.35, 156.59, 155.05, 151.28, 150.52, 148.33, 148.08, 146.70, 146.58, 141.81, 134.91, 133.04, 129.09, 128.78, 127.21, 126.94, 125.93, 125.69, 119.15, 111.36, 110.42, 102.93, 96.94, 72.87, 70.58, 70.23, 70.17, 70.00, 69.93, 69.36, 67.38, 65.74, 57.79, 49.99, 49.27, 48.56, 40.61, 40.40, 40.19, 39.98, 39.77, 39.57, 39.36, 38.50, 37.43, 36.34, 35.60, 34.79, 34.01, 31.76, 31.62, 31.15, 30.72, 30.30, 29.46, 28.24, 26.83, 26.21, 25.80, 25.21, 22.88, 22.56, 21.35, 19.63, 18.55, 18.32, 14.99, 14.43, 8.26. (^{13}C NMR谱图如图4所示) HR-MS (ESI): m/z Calc for, $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1649.7892, found: 1649.7791.

[0119] 实施例5



[0121] 氮气保护下,将化合物23(36.9mg,0.071mmol)溶于无水DMF中,依次加入EDCI(16.3mg,0.085mmol),化合物1或化合物4a~c(50mg,0.071mmol)及DIEA(18.4mg,0.142mmol),室温下反应12h。待反应结束后,加水稀释(50mL),EA萃取(15mL×2)。有机相合并后用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥。粗产物柱层析(DCM/MeOH=30:1→15:1),得黄色固体30mg,收率39.2%。化合物24:¹H NMR(400MHz,DMSO)δ10.62(s,1H),9.80(d,J=23.9Hz,2H),8.97(s,1H),8.45(s,1H),8.027.67(m,3H),7.34(d,J=27.4Hz,4H),6.54(d,J=16.3Hz,2H),6.34(s,1H),5.76(s,1H),5.35(d,J=68.6Hz,4H),4.44(d,J=86.8Hz,2H),3.50(s,3H),3.16(s,4H),2.94(d,J=35.8Hz,5H),1.95(d,J=64.9Hz,6H),1.40(s,3H),1.23(s,6H),1.02(s,6H),0.84(d,J=33.4Hz,12H)。(¹H NMR谱图如图5所示)¹³C NMR(101MHz,DMSO)δ172.97,171.79,171.16,169.45,157.73,157.35,156.60,156.55,154.86,151.30,150.51,148.19,146.71,146.58,141.81,140.06,133.03,129.62,129.11,128.79,127.81,127.80,127.23,126.95,126.30,125.90,125.69,119.15,117.85,103.04,102.97,96.93,87.44,72.87,65.74,53.26,50.01,49.23,34.01,31.67,31.63,30.73,30.30,29.48,26.82,25.72,25.52,22.78,21.36,19.78,18.33,18.08,17.73,14.95,8.26。(¹³C NMR谱图如图6所示)化合物25a:¹H NMR(400MHz,DMSO)δ10.59(s,1H),9.77(d,J=7.8Hz,2H),8.97(t,J=5.6Hz,1H),8.31(d,J=6.4Hz,1H),7.95(d,J=8.8Hz,2H),7.82(d,J=9.1Hz,1H),7.66(s,1H),7.37(d,J=7.9Hz,2H),7.29(d,J=8.1Hz,2H),6.56(s,1H),6.52(s,1H),6.33(s,1H),5.43(s,2H),5.26(s,2H),4.56-4.51(m,1H),4.29-4.25(m,1H),3.59(t,J=6.3Hz,2H),3.49(s,2H),3.39(s,3H),3.26(s,1H),3.23(d,J=5.8Hz,2H),3.18-3.13(m,4H),2.97(s,2H),2.89(d,J=12.2Hz,3H),2.47-2.40(m,6H),2.02-1.98(m,2H),1.91-1.83(m,2H),1.39(d,J=6.8Hz,3H),1.23(s,4H),1.03(t,J=7.1Hz,3H),0.87(dd,J=13.3,6.3Hz,9H),0.79(d,J=6.8Hz,6H)。(¹H NMR谱图如图7所示)¹³C NMR(101MHz,DMSO)δ173.02,171.90,171.60,170.93,169.86,157.71,157.41,156.63,156.48,154.84,151.22,150.59,148.19,146.68,146.55,141.95,134.43,132.95,130.27,129.72,129.25,128.85,127.72,127.15,126.88,126.32,126.00,125.69,119.10,103.01,102.91,97.14,72.88,69.07,67.08,65.71,61.80,61.46,57.89,53.15,52.93,49.97,49.32,49.06,38.55,36.30,34.04,31.07,30.74,29.42,26.81,25.67,25.46,22.74,22.53,21.29,19.60,18.50,18.25,14.90,8.21。(¹³C NMR谱图如图8所示)化合物25b:¹H NMR(400MHz,DMSO)δ10.60(s,1H),9.76(s,2H),8.97(t,J=5.8Hz,1H),8.29(d,J=6.5Hz,1H),7.94(t,J=8.3Hz,2H),7.82(d,J=9.1Hz,1H),7.67(s,1H),7.37(d,J=8.1Hz,2H),7.29(d,J=7.4Hz,2H),6.56(s,1H),6.52(s,1H),6.33(s,1H),5.43(s,2H),5.25(s,2H),4.55-4.50(m,

1H), 4.26 (t, J=7.7Hz, 1H), 3.59 (t, J=6.3Hz, 2H), 3.49 (s, 10H), 3.41 (t, J=5.7Hz, 2H), 3.27-3.23 (m, 2H), 3.16 (t, J=6.6Hz, 6H), 2.97 (s, 2H), 2.89 (d, J=12.7Hz, 3H), 2.42 (dd, J=24.2, 6.9Hz, 8H), 2.00 (d, J=6.2Hz, 2H), 1.86 (dd, J=14.7, 7.2Hz, 2H), 1.39 (d, J=6.7Hz, 3H), 1.23 (s, 2H), 1.03 (t, J=7.1Hz, 3H), 0.87 (d, J=4.3Hz, 6H), 0.84 (d, J=7.0Hz, 3H), 0.79 (d, J=6.8Hz, 6H). (¹H NMR谱图如图9所示) ¹³C NMR (101MHz, DMSO) δ172.97, 171.83, 171.54, 170.75, 169.64, 157.73, 157.35, 156.61, 156.52, 154.87, 151.27, 150.51, 148.19, 146.70, 146.57, 141.80, 134.46, 133.03, 129.59, 129.08, 128.76, 127.77, 127.20, 126.91, 126.32, 125.92, 125.68, 119.14, 103.03, 102.97, 96.96, 72.87, 70.25, 70.19, 69.98, 69.46, 67.39, 65.73, 61.86, 61.64, 57.80, 53.29, 53.05, 49.98, 49.27, 49.07, 38.54, 36.36, 34.01, 31.14, 30.73, 29.44, 26.81, 25.69, 25.47, 22.78, 21.33, 19.63, 18.54, 18.31, 14.95, 8.25. (¹³C NMR谱图如图10所示) 化合物25c: ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ10.54 (s, 1H), 9.81 (d, J=5.8Hz, 2H), 8.95 (s, 1H), 8.30 (d, J=6.7Hz, 1H), 7.95 (dd, J=8.8, 5.2Hz, 2H), 7.82 (d, J=9.1Hz, 1H), 7.41 (d, J=7.3Hz, 2H), 7.31 (d, J=5.4Hz, 3H), 6.58 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.564.50 (m, 1H), 4.25 (t, J=7.7Hz, 1H), 3.59 (t, J=6.1Hz, 4H), 3.48 (d, J=6.4Hz, 12H), 3.443.39 (m, 3H), 3.25 (d, J=5.9Hz, 3H), 3.15 (d, J=7.2Hz, 6H), 2.97 (s, 3H), 2.91 (dd, J=15.8, 8.6Hz, 2H), 2.39 (dd, J=13.6, 6.9Hz, 3H), 1.94 (ddd, J=22.1, 13.8, 7.0Hz, 7H), 1.39 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.28 (dd, J=12.0, 6.2Hz, 1H), 1.11 (t, J=7.1Hz, 1H), 1.03 (t, J=7.1Hz, 3H), 0.890.84 (m, 9H), 0.80 (d, J=6.8Hz, 6H). (¹H NMR谱图如图11所示) ¹³C NMR (101MHz, DMSO) δ172.97, 171.86, 171.52, 170.73, 158.44, 158.14, 157.79, 157.35, 156.62, 156.43, 154.94, 152.81, 151.27, 150.52, 148.17, 146.70, 146.58, 141.80, 133.06, 129.11, 128.79, 127.84, 127.61, 127.20, 126.92, 126.46, 125.89, 125.68, 124.87, 119.14, 103.04, 96.93, 72.87, 70.26, 70.17, 69.99, 69.94, 69.43, 67.39, 65.74, 57.83, 49.29, 49.06, 48.25, 40.62, 40.41, 40.20, 39.99, 39.78, 39.57, 39.37, 38.61, 37.61, 36.35, 34.01, 31.13, 30.73, 26.82, 25.72, 25.51, 22.81, 21.35, 21.01, 19.64, 18.55, 18.35, 14.96, 14.85, 8.26. (¹³C NMR谱图如图12所示)。

[0122] 实施例6

[0123] 本发明实施例制备的化合物20、22和25c的体外酶释实验,酶释结果如图13所示。

[0124] 取5μL母液(化合物22结构中含有马来酰亚胺,需提前加入10μL 10mM的N-乙酰半胱氨酸的水溶液,置于37℃恒温振荡器中孵育30min),用ABS (pH=5.0) 稀释至500μL。取40μL组织蛋白酶B母液,加入80μL酶活化液,置于37℃恒温振荡器中活化15min。随后将活化好的组织蛋白酶B母液加入到含有待测物的ABS溶液中,置于37℃恒温振荡器中孵育。分别在15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 18h取样40μL,并用160μL冷甲醇进行蛋白沉淀,在4℃下离心20min,转速为13000rpm,取上清液并用HPLC通过外标定量法测试体系中释放出的有效载荷的含量(n=3),判断该前药能否在组织蛋白酶B条件下有效释放出化合物1,化合物1结构如图17所示。

[0125] 实施例7

[0126] 本发明实施例制备的化合物25c对人结肠癌HCT-116裸小鼠皮下移植瘤的生长抑制作用。

[0127] 在无菌条件下,取生长旺盛期的瘤组织剪切成1.5mm³左右,接种于裸小鼠右侧腋窝皮下。裸小鼠皮下移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径,待肿瘤生长至平均体积约为90mm³左右后将动物随机分组。00332-4825mg/kg组,每三天尾静脉注射给药一次,连续给药2周(共给药5次,实验结束当天给药为第6次);JJY-07001mg/kg,每三天尾静脉注射给药一次,连续给药2周(共给药5次,实验结束当天给药为第6次)。Vehicle组给予等量溶剂。整个实验过程中,每周2次测量移植瘤直径,同时称量小鼠体重。肿瘤体积(tumor volume,TV)的计算公式为:TV=1/2×a×b²,其中a、b分别表示长、宽。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/V₀。其中V₀为分笼给药时(即d₀)测量所得肿瘤体积,V_t为每一次测量时的肿瘤体积。抗肿瘤活性的评价指标为:1)相对肿瘤增殖率T/C(%),计算公式如下:T/C(%)=(TRTV/CRTV)×100%,TRTV:治疗组RTV;CRTV:阴性对照组RTV;2)肿瘤体积增长抑制率GI%,计算公式如下:GI%=[1-(TV_t-TV₀)/(CV_t-CV₀)]×100%,TV_t为治疗组每次测量的瘤体积;TV₀为治疗组分笼给药时所得瘤体积;CV_t为对照组每次测量的瘤体积;CV₀为对照组分笼给药时所得瘤体积;3)瘤重抑制率,计算公式如下:瘤重抑制率%=(W_c-W_t)/W_c×100%,W_c:对照组瘤重,W_t:治疗组瘤重。本项目全部实验结束后,剩余化合物继续保留3个月,逾期将由我室自行处理,不再负责保存。

[0128] 实验结束当天各组继续给予化合物,在给药30分钟后取血浆,取瘤一份冻存,取主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、胃、眼球)冻存。实验结果如下表1:

[0129] 表1.对人结直肠癌HCT-116裸小鼠移植瘤的实验治疗作用(d14)

| 组别 | 剂量、给药方式 | 动物数 | | 体重(g) | | TV (mm ³ , mean±SD) | | RTV (mean±SD) | T/C (%) | |
|----------------|-------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|---------------|-------------|-------|
| | | d ₀ | d ₁₄ | d ₀ | d ₁₄ | d ₀ | d ₁₄ | | | |
| [0130] Vehicle | 0.2 mL/20g q3d×14 | iv | 8 | 8 | 20.9 | 19.5 | 92±31 | 1546±729 | 16.90±5.10 | |
| 25c | 25 mg/kg q3d×14 | iv | 4 | 4 | 21.0 | 16.0 | 93±33 | 99±45 | 1.29±0.90** | 13.01 |
| 1 | 1 mg/kg q3d×14 | iv | 4 | 4 | 21.0 | 18.7 | 90±39 | 706±320 | 8.24±3.53* | 49.19 |

[0131] *p<0.05, **p<0.001

[0132] 化合物25c 25mg/kg剂量组,每三天尾静脉注射给药一次,连续给药两周,实际给药6次,对人结直肠癌HCT-116裸小鼠皮下移植瘤的生长有极其显著的抑制作用,第14天所得T/C百分数为13.01%。实验第7天,本组有一只小鼠体重减轻超过15%,但是考虑到小鼠状态尚可,且溶剂对照组小鼠也有不同程度的体重减轻,因此并未停药;实验结束当天,本组有一只小鼠体重减轻超过15%,两只小鼠体重减轻百分比达到33%。

[0133] 阳性对照化合物1 1mg/kg组,每三天尾静脉注射给药一次,连续给药两周,实际给药6次,对人结直肠癌HCT-116裸小鼠皮下移植瘤的生长有部分的抑制作用,对人结肠癌HCT-116裸小鼠皮下移植瘤的生长有部分抑制作用,第14天所得T/C百分数为49.19%。

[0134] 动物实验数据表明:相较于阳性对照来说,化合物25c显示出优秀的抗肿瘤活性,化合物25c治疗组小鼠瘤重明显减轻。(实验结果见图14-16)

[0135] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明

精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

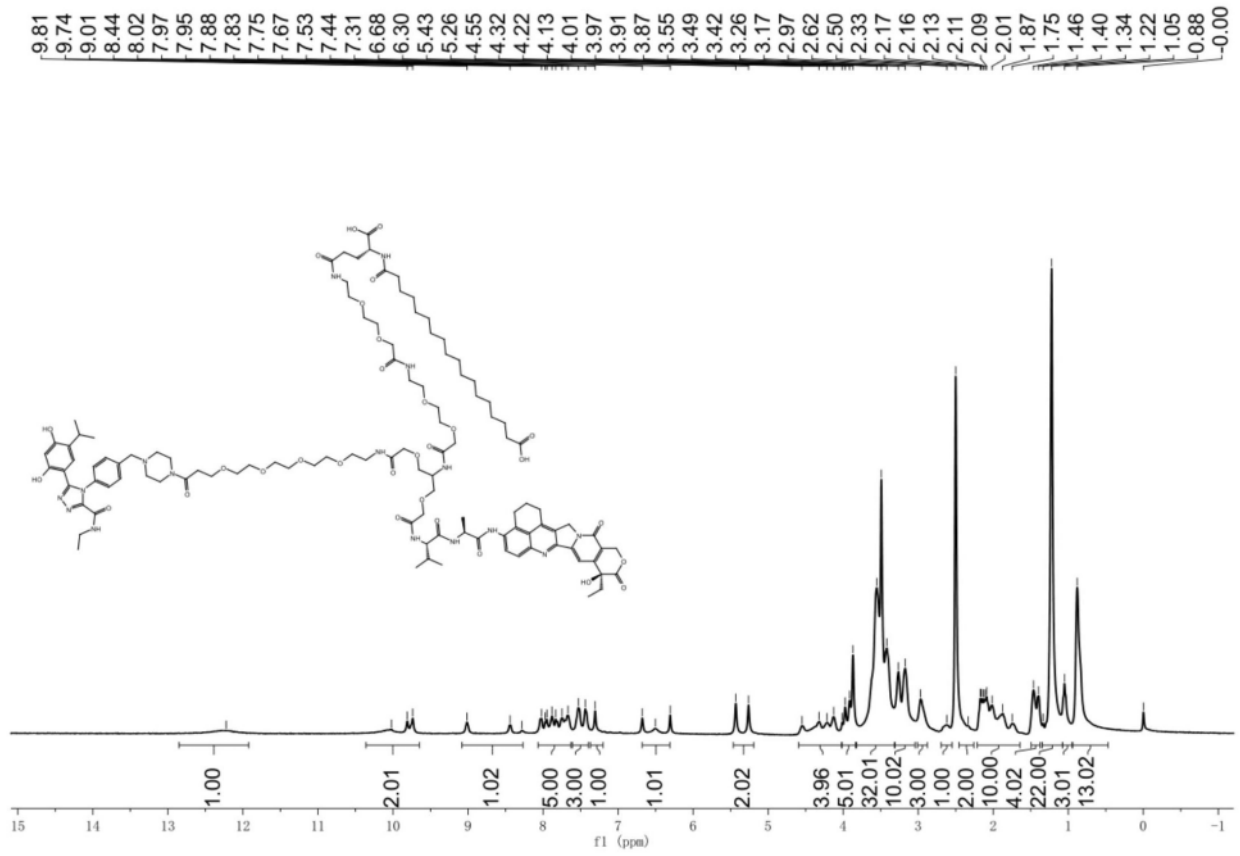


图1

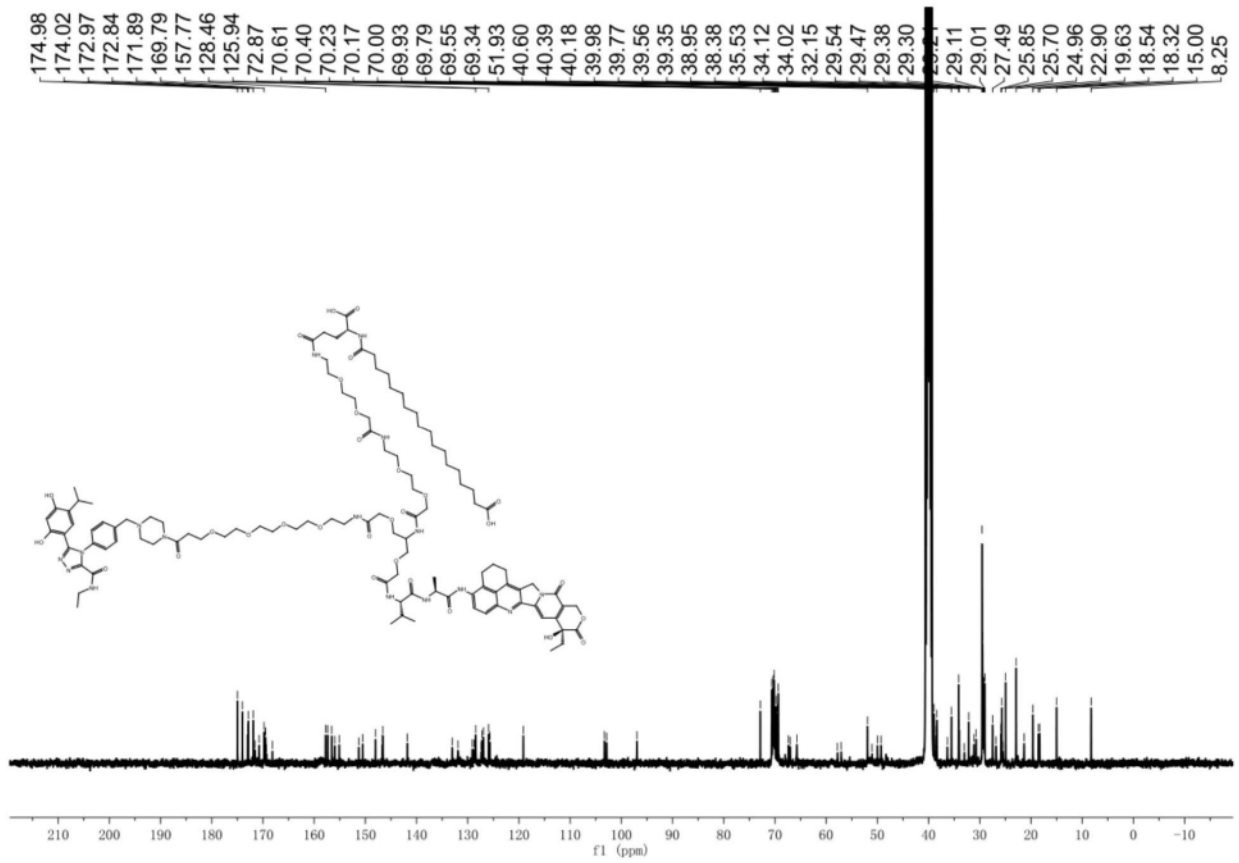


图2

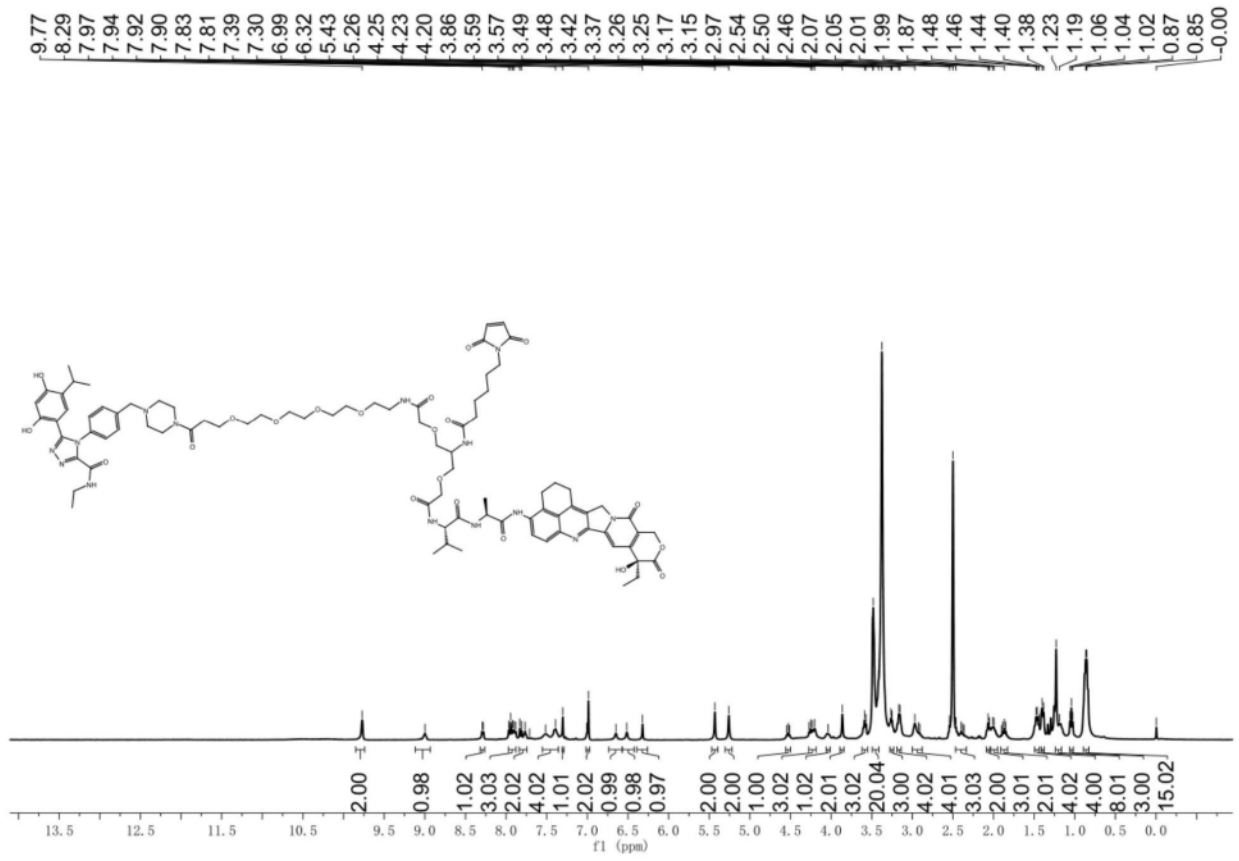


图3

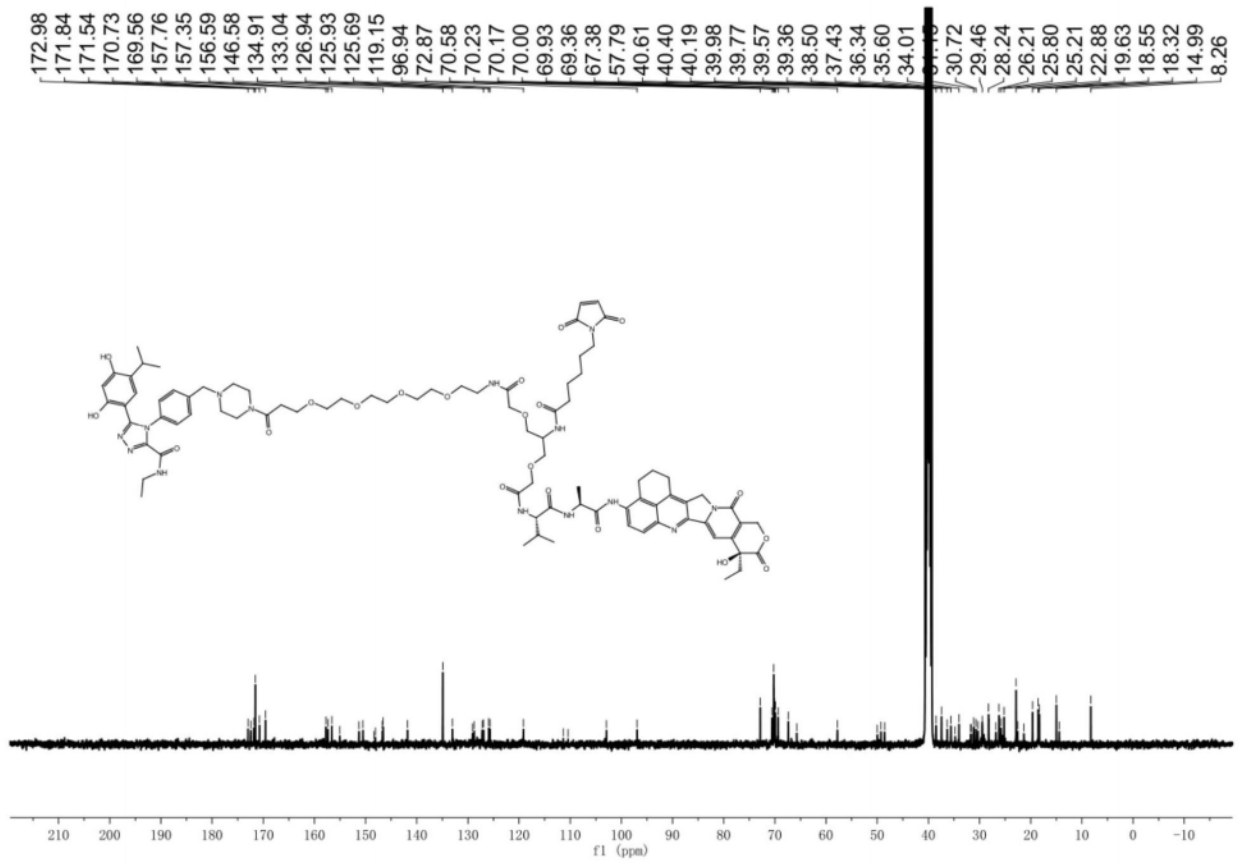


图4

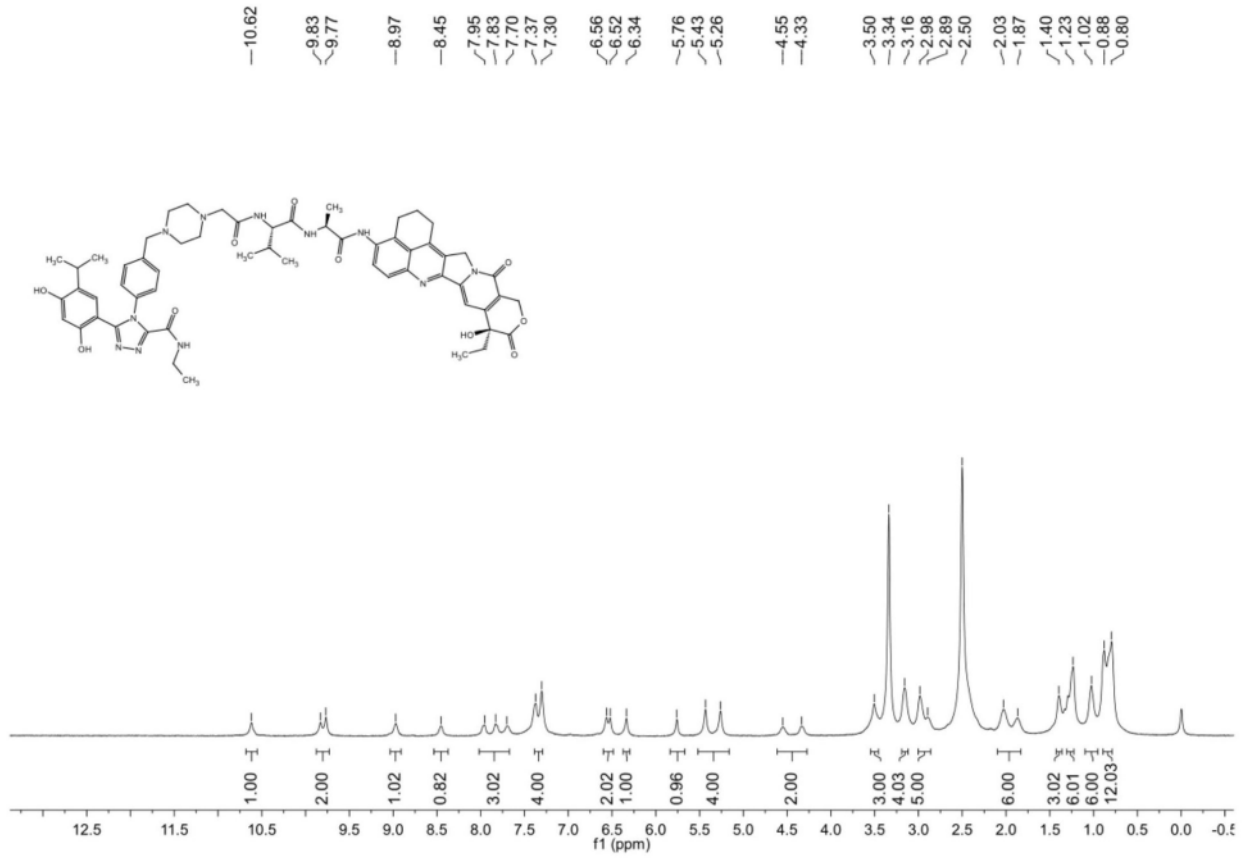


图5

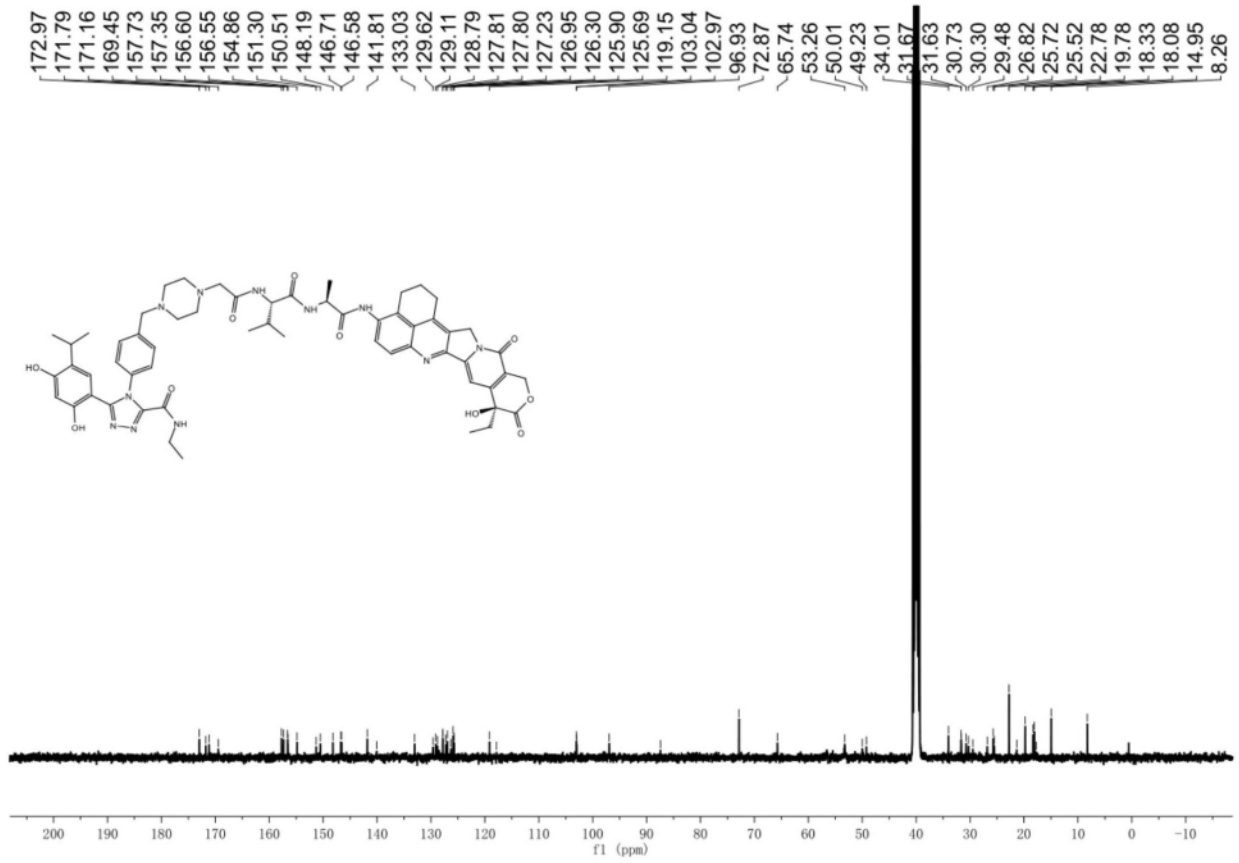


图6

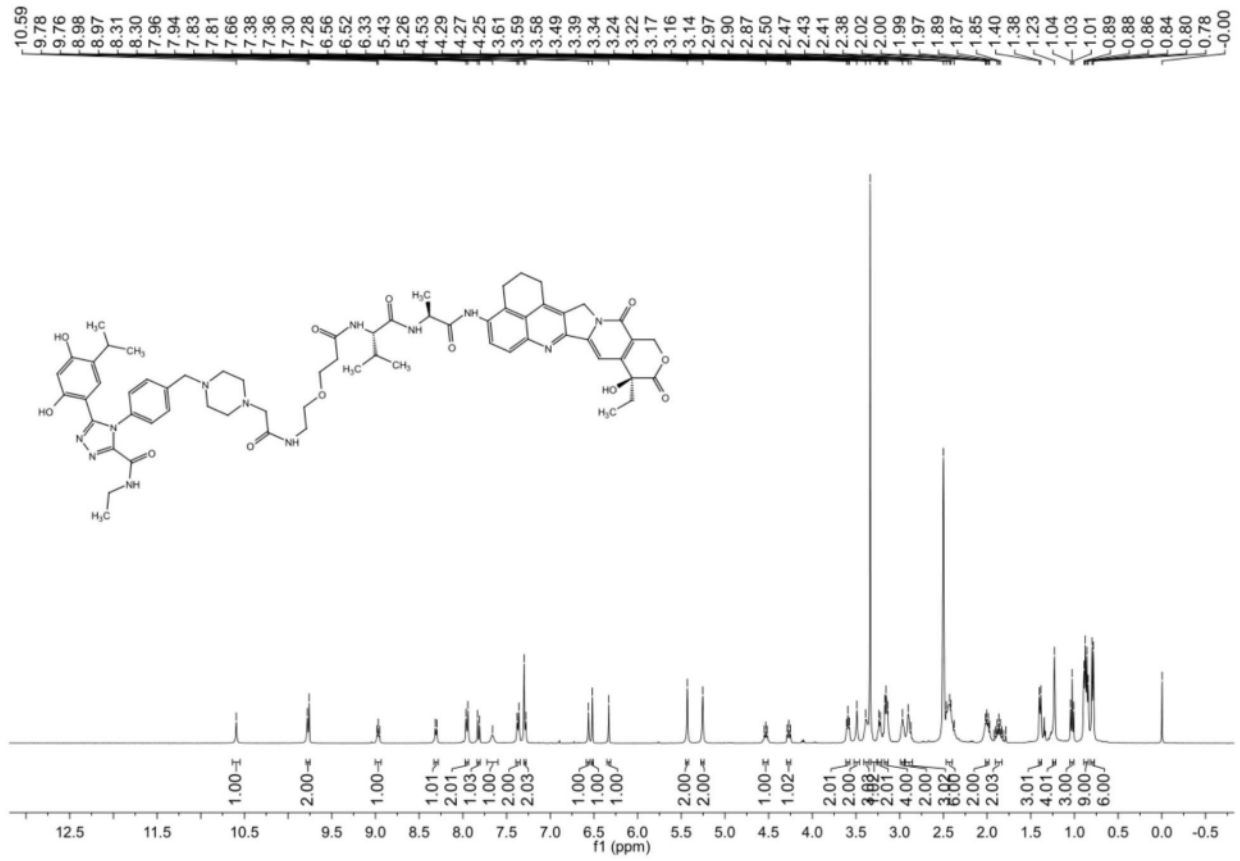


图7

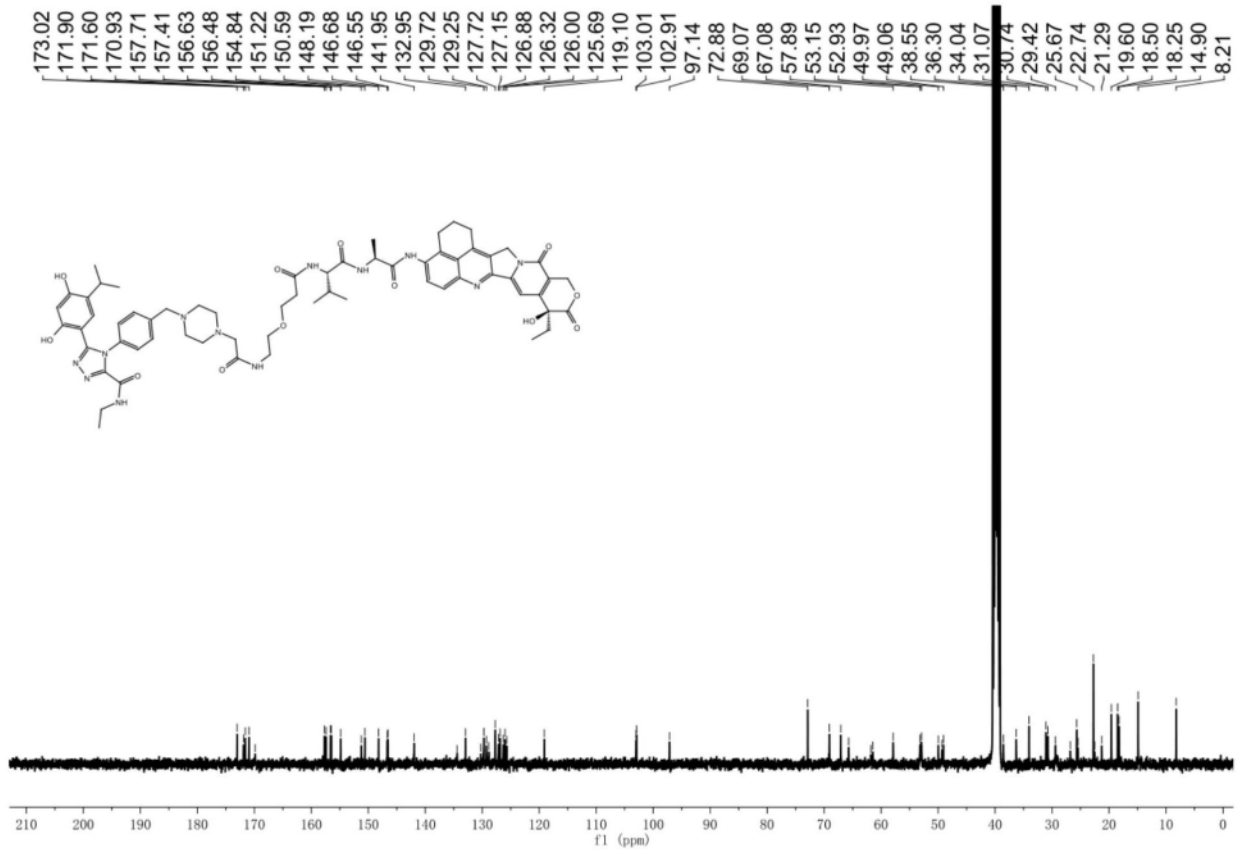


图8

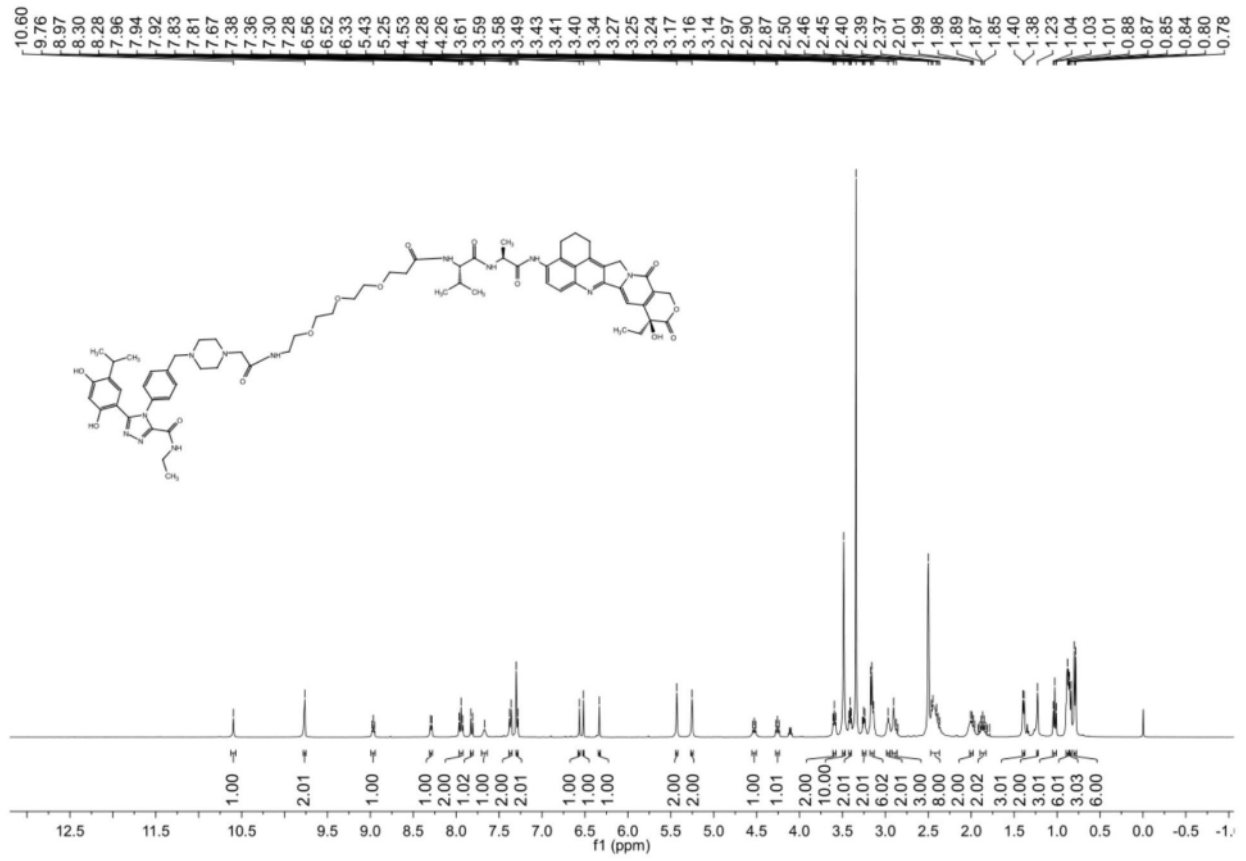


图9

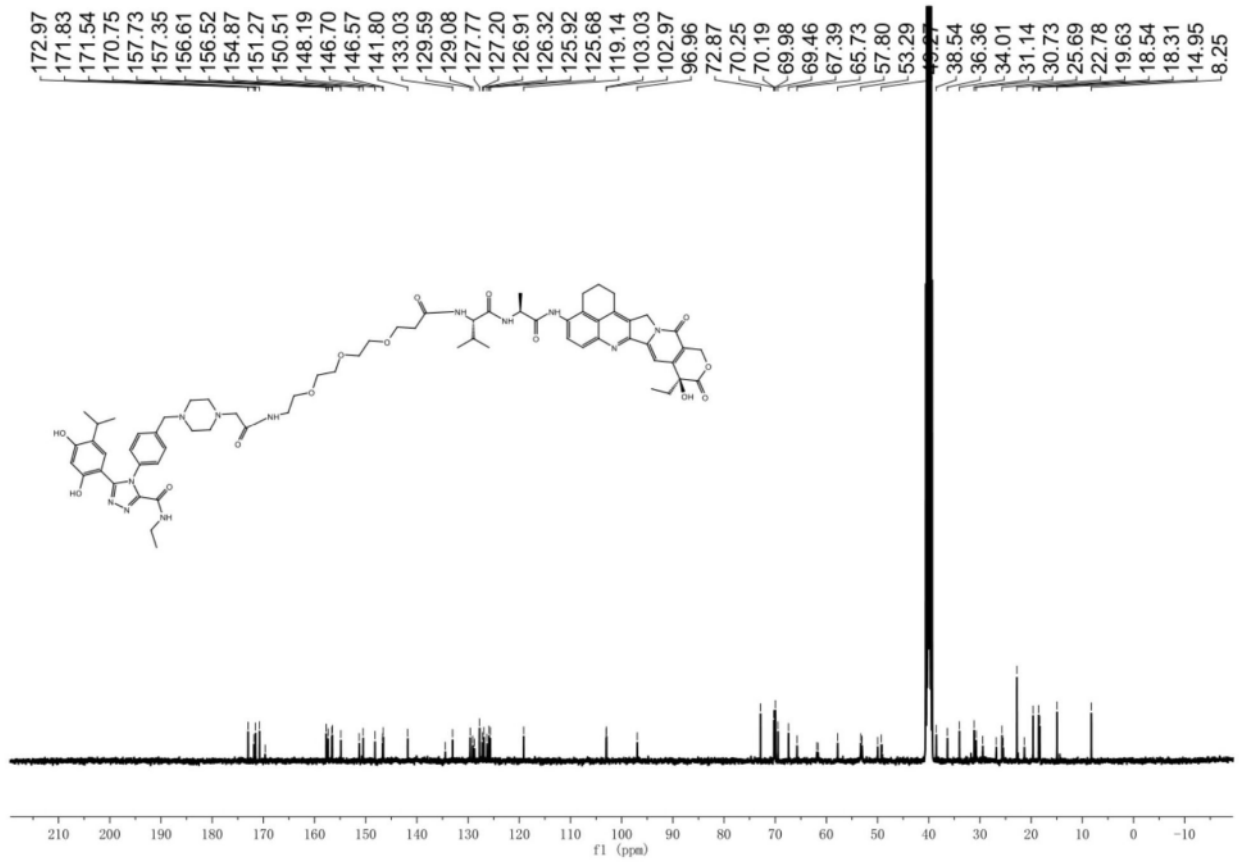


图10

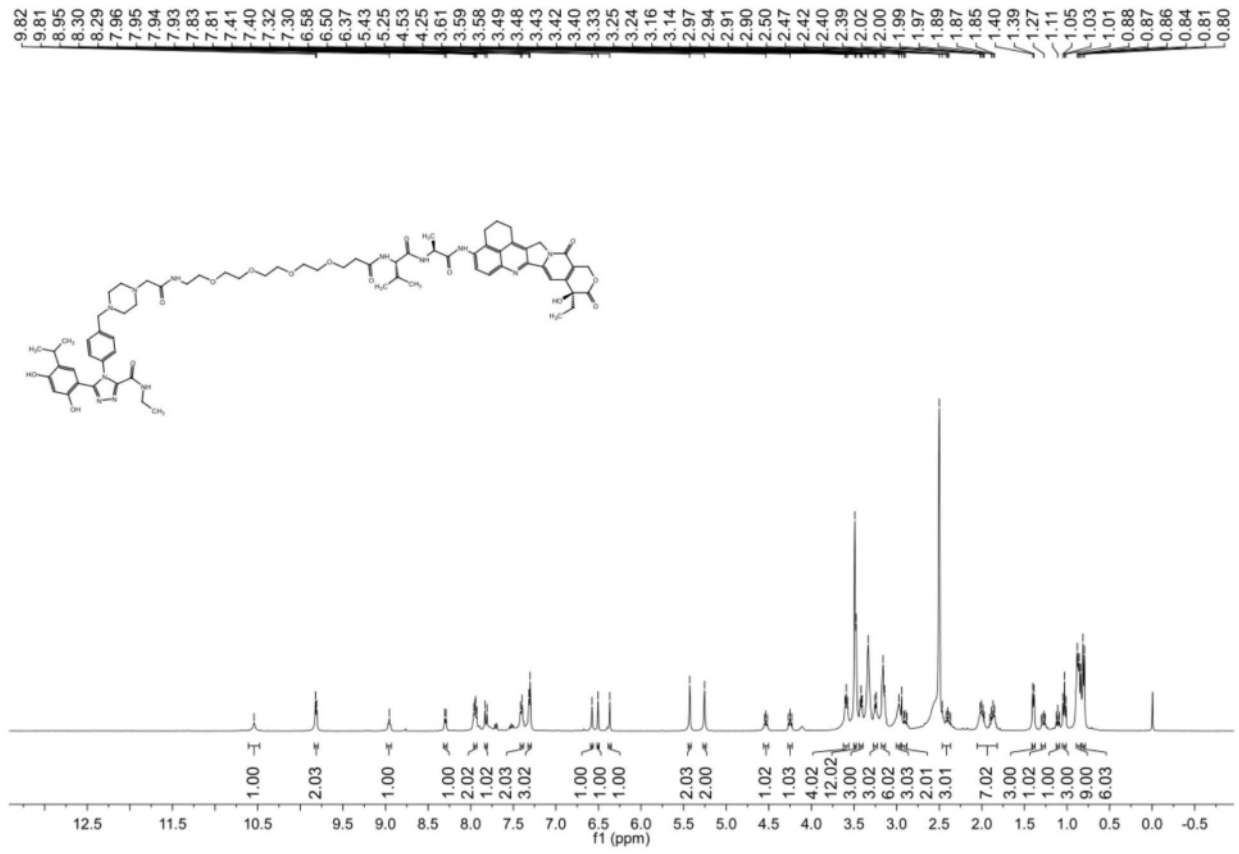


图11

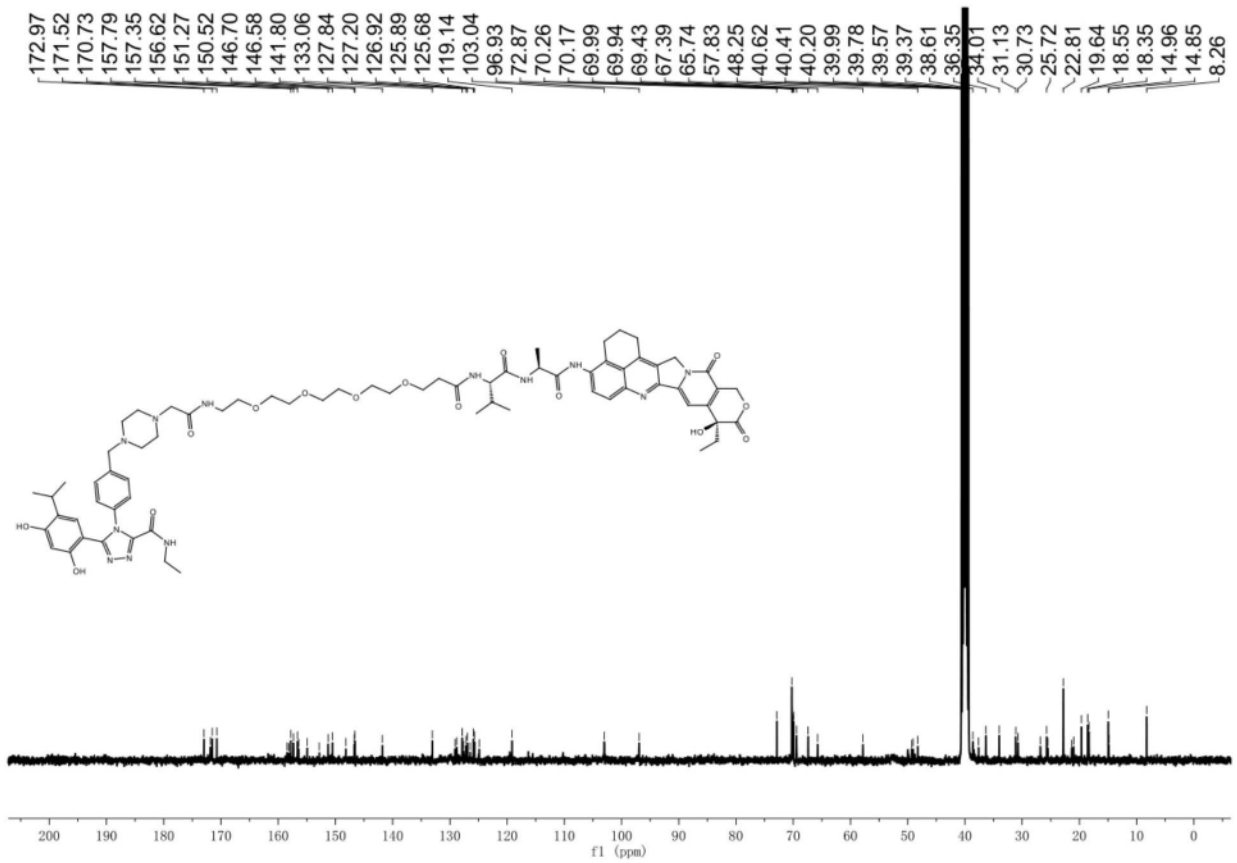


图12

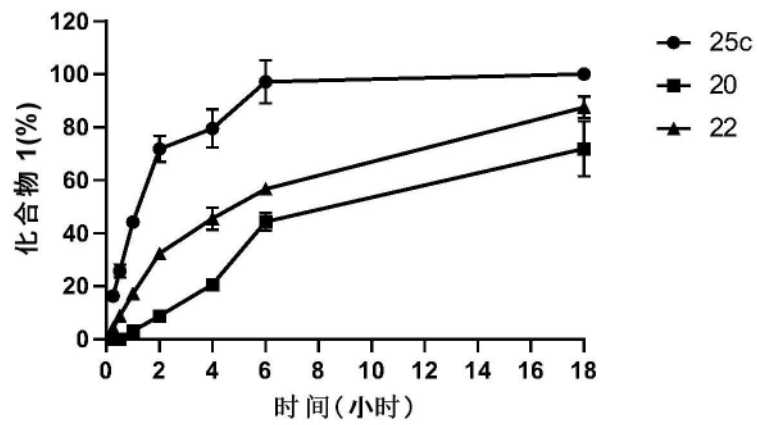


图13

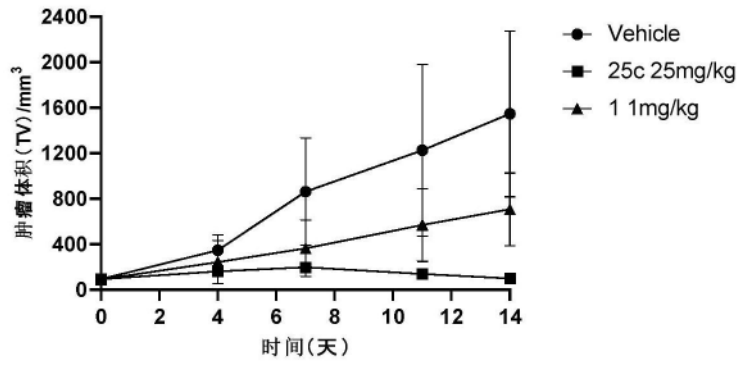


图14

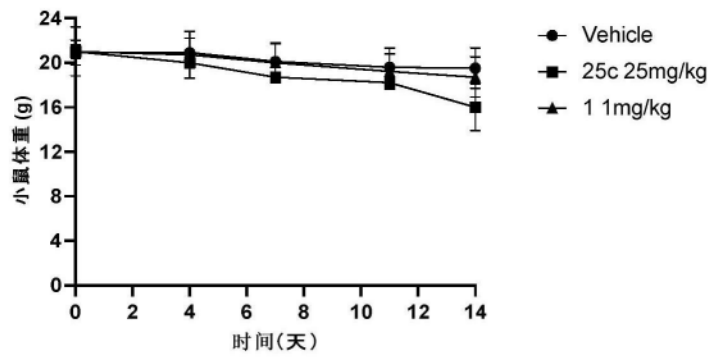


图15

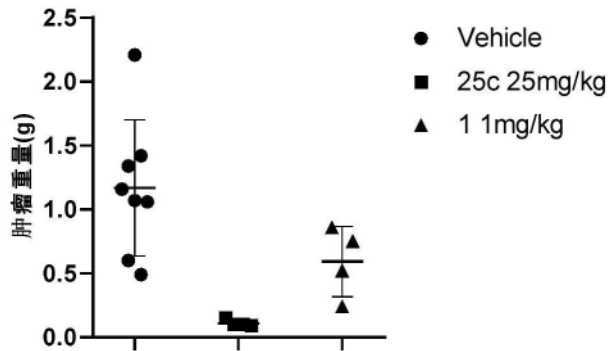


图16

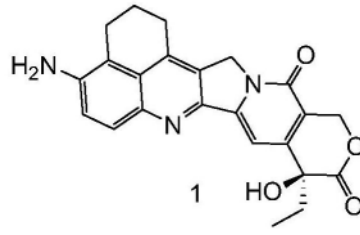


图17