



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115836069 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 06

(21) 申请号 202180049183.4

(22) 申请日 2021.07.22

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 115836069 A

(43) 申请公布日 2023.03.21

(66) 本国优先权数据  
202010711260.5 2020.07.22 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2023.01.09

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/CN2021/107815 2021.07.22

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02022/017449 ZH 2022.01.27

(73) 专利权人 南京正大天晴制药有限公司  
地址 210046 江苏省南京市南京经济技术  
开发区恒广路99号

(72) 发明人 马昌友 田禾 赵建良 陈东晖  
吴舰 徐丹 朱春霞 田舟山

(74) 专利代理机构 北京植众德本知识产权代理  
有限公司 16083  
专利代理师 关巍

(51) Int.Cl.  
C07D 471/04 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 102574852 A, 2012.07.11 (续)

审查员 吴永英

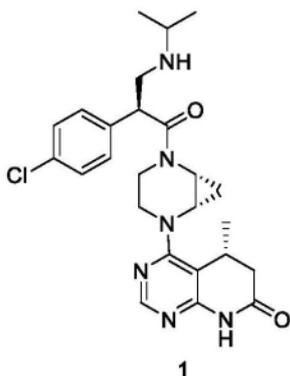
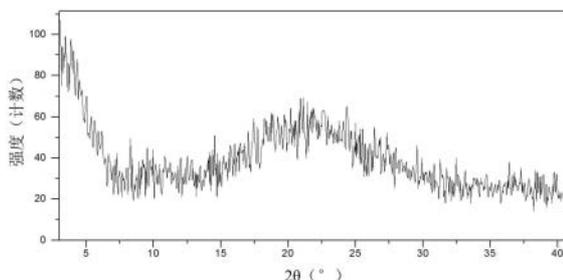
权利要求书2页 说明书14页 附图5页

(54) 发明名称

一种二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶酮衍生物的盐、其制备方法及应用

(57) 摘要

本申请公开了一种二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶酮衍生物的盐、其制备方法及应用,所述盐选自富马酸盐、甲磺酸盐、羟基乙磺酸盐、 $\alpha$ -萘磺酸盐、对甲苯磺酸盐、1,2-乙二磺酸盐、草酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、L-(+)-酒石酸盐、马尿酸盐、L-抗坏血酸盐、L-苹果酸盐、苯甲酸盐、龙胆酸盐、盐酸盐、硫酸盐或磷酸盐。本申请的二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶酮衍生物的盐可用于乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌的治疗。



CN 115836069 B

1

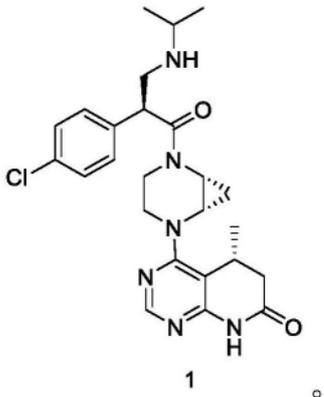
[接上页]

(56) 对比文件

WO 2005051304 A2, 2005.06.09

CN 113272304 A, 2021.08.17

1. 式1化合物的药学上可接受的盐,所述盐选自有机酸盐或无机酸盐,其中有机酸盐选自富马酸盐、甲磺酸盐、羟基乙磺酸盐、 $\alpha$ -萘磺酸盐、对甲苯磺酸盐、1,2-乙二磺酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、L-(+)-酒石酸盐、马尿酸盐、L-抗坏血酸盐、L-苹果酸盐、苯甲酸盐或龙胆酸盐,所述无机酸盐选自盐酸盐、硫酸盐或磷酸盐,



2. 根据权利要求1所述的盐,其选自富马酸盐或盐酸盐。

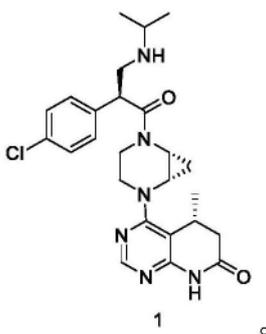
3. 根据权利要求1所述的盐,其选自有机酸盐,其中式1化合物与有机酸的摩尔比为1:1。

4. 根据权利要求1所述的盐,其选自盐酸盐,其中式1化合物与氯化氢的摩尔比为1:1或1:2。

5. 根据权利要求1所述的盐,其选自盐酸盐,其中式1化合物与氯化氢的摩尔比为1:2。

6. 根据权利要求1所述的盐,其选自富马酸盐,其中式1化合物与富马酸的摩尔比为1:1。

7. 式1化合物的药学上可接受的盐,所述盐为草酸盐,其中式1化合物与草酸的摩尔比为1:1,



8. 权利要求1-7中任一项所述的式1化合物的药学上可接受的盐的制备方法,包括式1化合物与相应的酸成盐的步骤。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述成盐的步骤中,成盐反应的溶剂选自醇类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂、酮类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂、酯类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂、苯类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂或卤代烃类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂。

10. 包含权利要求1-7任一项所述盐的药物组合物。

11. 用作药物的权利要求1-7中任一项所述的式1化合物的药学上可接受的盐或权利要

求10所述的药物组合物。

12. 权利要求1-7任一项所述的盐或权利要求10所述的药物组合物在制备用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的药物中的用途。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态为癌症。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述癌症为乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌。

15. 根据权利要求13所述的用途,其中所述癌症为前列腺癌。

## 一种二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶酮衍生物的盐、其制备方法及其用途

[0001] 本申请要求于2020年7月22日提交中国专利局、申请号为202010711260.5发明名称为“一种二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶酮衍生物的盐、其制备方法及其用途”的中国专利申请的优先权,其全部内容通过引用结合在本申请中。

### 技术领域

[0002] 本申请属于药物化学领域,具体涉及一种二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶酮衍生物的盐、其制备方法以及医药用途。

### 背景技术

[0003] 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)及其下游蛋白AKT(又称蛋白激酶B,PKB)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)组成的PI3K/AKT/mTOR通路作为细胞内非常重要的信号转导途径,在细胞的生长、存活、增殖、凋亡、血管生成、自吞噬等过程中发挥着极其重要的生物学功能。该通路的异常激活会引起一系列的疾病,包括癌症、神经病变、自身免疫性疾病和血液淋巴系统疾病。

[0004] AKT,是一类丝氨酸/苏氨酸激酶,通过下游众多效应器影响细胞存活、生长、代谢、增殖、迁移和分化。超过50%的人类肿瘤存在AKT过度活化的现象,尤以前列腺癌、胰腺癌、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌为主。AKT过活化可导致肿瘤发生、转移以及耐药性产生。

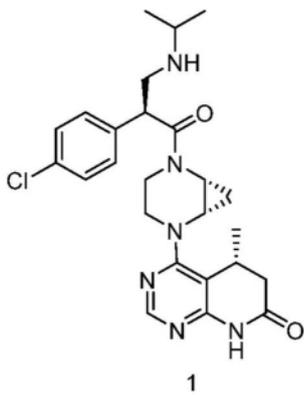
[0005] AKT具有三种亚型:AKT1、AKT2和AKT3。作为典型的蛋白激酶,每种亚型均由氨基末端的PH结构域(Pleckstrin homology domain)、中部结合ATP的激酶结构域以及羧基末端的调节结构域组成。3种亚型约80%的氨基酸序列同源,仅在PH结构域和激酶结构域连接区变化较大。

[0006] 目前,针对PI3K/AKT/mTOR信号通路的靶向药物主要是PI3K抑制剂和mTOR抑制剂,而AKT处于该信号转导通路的核心部位。抑制AKT活性既可避免抑制上游PI3K造成的严重副作用,也可避免抑制下游mTOR引起的负反馈机制影响药效。例如,CN101631778A公开了一类环戊二烯并[D]嘧啶衍生物,CN101578273A公开了一类羟基化和甲氧基化的环戊二烯并[D]嘧啶衍生物,CN101511842A公开了一类二氢咪喃并嘧啶衍生物,CN101970415A公开了一类5H-环戊二烯并[d]嘧啶衍生物,这些化合物具有小于10 $\mu$ M的抑制AKT1的IC<sub>50</sub>。然而,寻找有效和选择性的AKT抑制剂仍然是当前肿瘤靶向药物研发的重要方向。

### 发明内容

[0007] 一方面,本申请提供了式1化合物的药学上可接受的盐,所述盐选自有机酸盐或无机酸盐,其中有机酸盐选自富马酸盐、甲磺酸盐、羟基乙磺酸盐、 $\alpha$ -萘磺酸盐、对甲苯磺酸盐、1,2-乙二磺酸盐、草酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、L-(+)-酒石酸盐、马尿酸盐、L-抗坏血酸盐、L-苹果酸盐、苯甲酸盐或龙胆酸盐,所述无机酸盐选自盐酸盐、硫酸盐或磷酸盐,式1化合物结构如下:

[0008]



[0009] 在一些实施方案中,所述有机酸盐选自富马酸盐。

[0010] 在一些实施方案中,所述无机酸盐选自盐酸盐。

[0011] 在一些实施方案中,所述有机酸盐中式1化合物与有机酸的摩尔比为1:1。

[0012] 在一些实施方案中,所述盐酸盐中式1化合物与氯化氢的摩尔比为1:1或1:2。

[0013] 在一些实施方案中,所述硫酸盐中式1化合物与硫酸的摩尔比为1:2。

[0014] 在一些实施方案中,所述磷酸盐中式1化合物与磷酸的摩尔比为1:1。

[0015] 在一些实施方案中,所述磷酸盐中式1化合物与磷酸的摩尔比为1:1。

[0016] 可以理解为,本申请所说的盐是式1化合物与相应的酸通过成盐反应获得,在反应中,式1化合物转化为阳离子,与相应的酸的酸根结合,形成所述盐;因此本申请中式1化合物与酸的摩尔比可以理解为盐中式1化合物的阳离子与相应酸的酸根的摩尔比。

[0017] 在一些典型实施方案中,本申请提供了式1化合物的富马酸盐,其中式1化合物与富马酸的摩尔比为1:1,或式1化合物的阳离子与富马酸的酸根的摩尔比为1:1。

[0018] 在一些典型实施方案中,本申请提供了式1化合物的盐酸盐,其中式1化合物与氯化氢的摩尔比为1:1,或式1化合物的阳离子与氯离子的摩尔比为1:1,此时为式1化合物的单盐酸盐。

[0019] 在一些典型实施方案中,本申请提供了式1化合物的盐酸盐,其中式1化合物与氯化氢的摩尔比为1:2,或式1化合物的阳离子与氯离子的摩尔比为1:2,此时为式1化合物的二盐酸盐。

[0020] 另一方面,本申请提供了式1化合物的药学上可接受的盐的制备方法,包括将式1化合物与相应的酸成盐的步骤。

[0021] 在一些实施方案中,所述成盐反应的溶剂选自醇类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂、酮类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂、酯类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂、苯类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂或卤代烃类溶剂与烷烃类溶剂的混合溶剂。

[0022] 在一些实施方案中,所述醇类溶剂选自甲醇、乙醇或异丙醇;优选异丙醇;所述酮类溶剂选自丙酮或丁酮;优选丙酮;所述酯类溶剂选自乙酸乙酯或乙酸丁酯;优选乙酸乙酯;所述苯类溶剂选自甲苯;所述卤代烃类溶剂选自二氯甲烷;所述烷烃类溶剂选自正庚烷。

[0023] 在一些典型的实施方案中,本申请提供了式1化合物富马酸盐的制备方法,包括将式1化合物与富马酸成盐的步骤;优选地,成盐溶剂选自异丙醇和正庚烷的混合溶剂。

[0024] 在一些典型的实施方案中,本申请提供了式1化合物盐酸盐的制备方法,包括将式

1化合物与盐酸成盐的步骤;优选地,成盐溶剂选自甲苯和正庚烷的混合溶剂或乙酸乙酯和正庚烷的混合溶剂。

[0025] 另一方面,本申请还提供了包含所述式1化合物的药学上可接受的盐的药物组合物。

[0026] 在一些实施方案中,所述药物组合物进一步包含一种或多种药学上可接受的载体。

[0027] 在一些实施方案中,所述药物组合物为适于口服的固体药物制剂,优选片剂或胶囊。

[0028] 另一方面,本申请还提供了用作药物的式1化合物的药学上可接受的盐或其药物组合物。

[0029] 另一方面,本申请还提供了式1化合物的药学上可接受的盐或其药物组合物在制备用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的药物中的用途。

[0030] 另一方面,本申请还提供了式1化合物的药学上可接受的盐或其药物组合物用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的用途。

[0031] 另一方面,本申请还提供了用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的方法,其包括向有需要的个体给予本申请的式1化合物的药学上可接受的盐或其药物组合物。

[0032] 另一方面,本申请还提供了用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的本申请的式1化合物的药学上可接受的盐或其药物组合物。

[0033] 在一些实施方案中,所述AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态为癌症。

[0034] 在一些典型的实施方案中,所述癌症为乳腺癌、前列腺癌或卵巢癌。

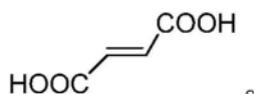
[0035] 在一些典型的实施方案中,所述癌症为前列腺癌。

[0036] 相关定义

[0037] 除非有特定说明,下列用在说明书和权利要求书中的术语具有下述含义:

[0038] 本申请的药学上可接受的盐还包括它们的水合物形式。

[0039] 术语“药学上可接受的载体”是指对机体无明显刺激作用,而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些载体。包括但不限于国家食品药品监督管理局许可的可用于人或动物的任何稀释剂、崩解剂、粘合剂、助流剂、润湿剂。

[0040] 术语“富马酸”指反丁烯二酸,具有结构:。

[0041] 术语“醇类溶剂”是指一个或多个羟基(OH)取代C1-C6烷烃上的一个或多个氢原子所衍生的物质,所述C1-C6烷烃是指含有1-6个碳原子的直链或支链的烷烃,醇类溶剂的具体实例包括但不限于:甲醇、乙醇、异丙醇或正丙醇。

[0042] 术语“烷烃类溶剂”是指含有5-7个碳原子的直链或支链或环状的烷烃,具体实例包括但不限于正己烷、环己烷、正庚烷。

[0043] 术语“酯类溶剂”是指含有酯基-COOR且碳原子数为3-10个的链状化合物,其中R为C1-C6烷基,所述C1-C6烷基是指含有1-6个碳原子的直链或支链烷烃,酯类溶剂的具体实例包括但不限于乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯。

[0044] 术语“卤代烃类溶剂”是指一个或多个卤素原子取代C1-C6烷烃上的一个或多个氢

原子所衍生的物质,所述C1-C6烷烃是指含有1-6个碳原子的直链或支链的烷烃,所述卤素原子是指氟、氯、溴、碘,卤代烃类溶剂的具体实例包括但不限于二氯甲烷或氯仿。

[0045] 术语“酮类溶剂”是指含有羰基-CO-且碳原子数为3-10个的链状或环状化合物,具体实例包括但不限于丙酮、丁酮或环己酮。

[0046] 术语“苯类溶剂”是指含有苯基的溶剂,具体实例包括甲苯、二甲苯、异丙苯或氯苯。

[0047] 术语“当量”是指按照化学反应的当量关系,以每步骤中所用基本原料为1当量,所需要的其他原料的当量用量。

[0048] 如无特殊说明,本申请的简称具有如下含义:

[0049] M: mol/L

[0050] mM: mmol/L

[0051] nM: nmol/L

[0052] Boc: 叔丁氧羰基

[0053] DCM: 二氯甲烷

[0054] DEA: 二乙胺

[0055] DIEA: N,N-二异丙基乙胺

[0056] HATU: 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯

[0057] RT: 保留时间

[0058] SFC: 超临界流体色谱

[0059] h: 小时

[0060] min: 分

[0061] TK: 酪氨酸激酶

[0062] SEB: 荧光信号增强剂

[0063] HTRF: 均相时间分辨荧光

[0064] DTT: 二硫苏糖醇

## 附图说明

[0065] 为了更清楚地说明本申请实施例和现有技术的技术方案,下面对实施例和现有技术中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0066] 图1为实施例1式1化合物的单分子示意图;

[0067] 图2为实施例1式1化合物的草酸盐单晶的不对称结构单元示意图;

[0068] 图3为实施例2中式1化合物的硫酸盐的XRPD图谱;

[0069] 图4为实施例2中式1化合物的磷酸盐的XRPD图谱;

[0070] 图5为实施例2中式1化合物的羟基乙磺酸盐的XRPD图谱;

[0071] 图6为实施例2中式1化合物的 $\alpha$ -萘磺酸盐的XRPD图谱;

[0072] 图7为实施例2中式1化合物的L-苹果酸盐的XRPD图谱;

[0073] 图8为实施例3中式1化合物的单盐酸盐的XRPD图谱;

[0074] 图9为实施例4中式1化合物的二盐酸盐的XRPD图谱；

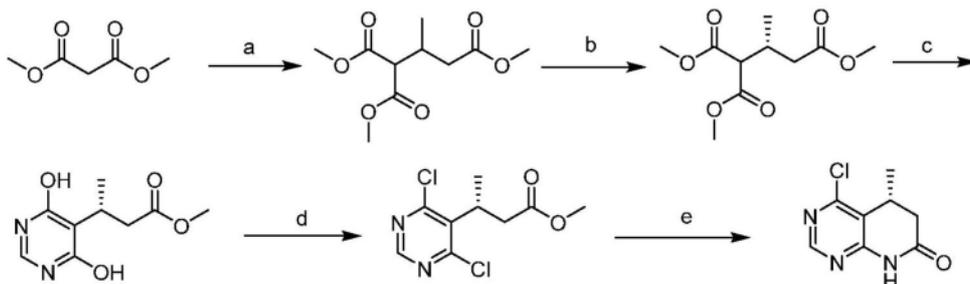
[0075] 图10为实施例5中式1化合物的富马酸盐的XRPD图谱。

### 具体实施方式

[0076] 下面通过实施例更详细地描述本申请。但这些具体描述仅用于说明本申请的技术方案,不对本申请构成任何限制。

[0077] 实施例1 式1化合物的制备

[0078] 制备例1中间体(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮的制备



[0080] a) 2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯

[0081] 氮气保护下,于20℃将甲醇钠甲醇溶液(30wt%,50.32g)加入到甲醇中(900mL),然后升温至70℃,将丙二酸二甲酯(461.12g)和巴豆酸乙酯(349.46g)混合均匀,滴加到上述甲醇钠甲醇溶液中,70℃反应3小时。反应完全后,减压蒸去溶剂,加入乙酸乙酯(1L),用4M盐酸调节pH至7-8,随后加入500mL水,分液,减压蒸去有机相,得到黄色液体777.68g。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ(ppm)3.67(s,3H),3.65(s,3H),3.59(s,3H),3.56(d,J=6.8Hz,1H),2.45-2.58(m,2H),2.23-2.29(m,1H),0.93(d,J=6.8Hz,3H)。

[0082] b) (R)-2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯

[0083] 25℃时,将磷酸氢二钠(4.5g)溶解在1.5L去离子水中,用2N盐酸调节pH=7.05,加入2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯(150.46g)和脂肪水解酶(皱褶假丝酵母菌,40g分6天加入),用2N的氢氧化钠溶液调节pH至7.0-7.6之间,35℃反应6天,手性检测ee%>98%,手性检测条件(Chiralpak IC,4.6×250mm,5μm,正己烷:乙醇=9:1,体积比)。将反应液冷却至10℃,用3M的盐酸调节pH至3-4,加入500mL乙酸乙酯,抽滤,滤饼用乙酸乙酯洗涤(600mL),分液,加入饱和碳酸氢钠水溶液(100mL)洗涤,分液,浓缩有机相,得到淡黄色液体26.89g。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>)δ(ppm)3.74(s,6H),3.68(s,3H),3.46(d,J=7.2Hz,1H),2.71-2.79(m,1H),2.54(dd,J=15.6、4.8Hz,1H),2.32(dd,J=16.0、8.4Hz,1H),1.06(d,J=6.8Hz,3H)。

[0084] c) (R)-3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)丁酸甲酯

[0085] 在氮气保护下,于20℃将乙酸甲脒(11.33g)溶解在甲醇中(200mL),冷却至0℃,滴加甲醇钠甲醇溶液(30wt%,55.62g),0℃反应60min,滴加(R)-2-甲基丙烷-1,1,3-三羧酸三甲酯(24.07g)的甲醇(60mL)溶液,自然升温至20℃,反应10小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,加入3N的盐酸调节pH至5-6,减压蒸去溶剂,随后冷却至0℃,加入3N的盐酸调节pH=3,有固体析出,抽滤收集固体,滤饼用冰水洗涤(100mL),真空干燥滤饼,得到白色固体18.79g,直接用于下一步。

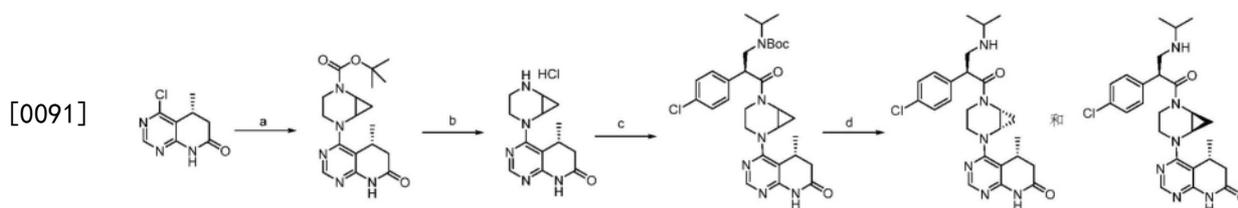
[0086] d) (R)-3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)丁酸甲酯

[0087] 在氮气保护下,22℃时将(R)-3-(4,6-二羟基嘧啶-5-基)丁酸甲酯(14.63g)分散在乙腈中(70mL),先后滴加三氯氧磷(26.42g)及二异丙基乙胺(12.51g),体系放热明显,随后升温至60℃,固体逐渐溶清,继续反应18小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,加入100mL乙酸乙酯,用饱和碳酸氢钠溶液调节pH至7-8,以乙酸乙酯(50mL×3)萃取,减压蒸去有机相,得到黄色固体13.89g,直接用于下一步。

[0088] e) (R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0089] 20℃时将(R)-3-(4,6-二氯嘧啶-5-基)丁酸甲酯(13.89g)和氨水(25-28wt%,70mL)加入到100mL高压釜中,升温至50℃,反应18小时。反应完全后,将反应液冷却至0℃,抽滤,滤饼用(石油醚:乙酸乙酯=10:1,体积比)30mL打浆,得到淡黄色固体7.32g。LC-MS (ESI)m/z:198 (M+H)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.30 (d, J=7.2Hz, 3H), 2.65-2.69 (m, 1H), 2.86-2.92 (m, 1H), 3.47-3.54 (m, 1H), 8.64 (s, 1H), 10.10 (s, 1H)。

[0090] 制备例2(R)-4-((1S,6R)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(式1化合物)的制备



[0092] 反应条件:a)2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯,N-甲基吡咯烷酮,4-二甲氨基吡啶;b)氯化氢/1,4-二氧六环(4.0M),二氯甲烷;c)(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)-丙酸,2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯,4-二甲氨基吡啶,N,N-二甲基甲酰胺;d)三氟乙酸,二氯甲烷。

[0093] a)5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯

[0094] 氮气保护下,于22℃将(R)-4-氯-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮(0.21g),2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯(0.31g)和4-二甲氨基吡啶(0.39g)溶解在N-甲基吡咯烷酮(5mL),然后加热至140℃,反应3小时。反应完全后,将反应液冷却至20℃,倒入20mL冰水中,乙酸乙酯(20mL×2)萃取,饱和食盐水洗涤(10mL×3),减压蒸除溶剂,硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯=3:1~1:1)分离,得到淡黄色液体0.28g。LC-MS (ESI)m/z:360 (M+H)<sup>+</sup>。

[0095] b) (5R)-4-(2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮盐酸盐

[0096] 20℃将5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-羧酸叔丁酯(0.28g)溶解于二氯甲烷(5mL),加入氯化氢/1,4-二氧六环(4.0mL)反应1小时。反应完全后,反应液减压蒸除溶剂,得到黄色固体0.23g,直接用于下一步。

[0097] c) (2S)-2-(4-氯苯基)-3-(5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯

[0098] 在氮气保护下,于20℃将(5R)-4-(2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮盐酸盐(0.20g)和(S)-3-((叔丁氧羰基)(异丙基)氨基)-2-(4-氯苯基)-丙酸(0.22g)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(5mL),加入2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(0.59g)和4-二甲氨基吡啶(0.48g),25℃反应4小时。反应完全后,向反应液中加入20mL水,以乙酸乙酯(10mL×3)萃取,有机相用饱和食盐水洗涤(10mL×2),减压蒸除有机相,柱层析(二氯甲烷:甲醇=50:1)分离,得到黄色固体0.18g。LC-MS(ESI)m/z:583(M+H)。

[0099] d) (R)-4-((1S,6R)-5-((S)-2-(4-氯苯基)-3-(异丙基氨基)丙酰基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-5-甲基-5,8-二氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(6H)-酮

[0100] 20℃将(2S)-2-(4-氯苯基)-3-(5-((R)-5-甲基-7-氧代-5,6,7,8-四氢吡啶并[2,3-d]嘧啶-4-基)-2,5-二氮杂双环[4.1.0]庚烷-2-基)-3-氧代丙基(异丙基)氨基甲酸叔丁酯(0.18g)溶解于二氯甲烷(2mL),加入三氟乙酸(0.86mL),反应3小时。反应完全后,向反应液中加入二氯甲烷(10mL),于0℃滴加2M的氢氧化钠溶液,调节pH=12,分液,饱和食盐水洗涤(5mL)有机相,无水硫酸钠干燥,减压蒸除有机相,得到黄色固体0.10g。经高效制备液相色谱拆分,得到异构体1(3mg),异构体2(12mg)。高效制备液相色谱条件:色谱柱:Aglient 5 $\mu$ m prep-C18 50×21.2mm,流动相A:水(含0.1vol%氨水(25-28wt%));流动相B:甲醇。梯度:时间0-10min,B相60-70%(体积比)。

[0101] 异构体1:RT<sub>1</sub>=5.3min,LC-MS(ESI)m/z:483(M+H)。

[0102] 异构体2:RT=5.9min;LC-MS(ESI)m/z:483(M+H);<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ (ppm) 8.27(d,J=7.6Hz,1H),7.92(s,1H),7.27-7.30(m,4H),4.23-4.29(m,1H),3.90-3.95(m,1H),3.81-3.85(m,1H),3.69-3.72(m,1H),3.44-3.59(m,1H),3.20-3.38(m,3H),3.01-3.05(m,1H),2.70-2.85(m,3H),2.47-2.57(m,1H),2.21-2.25(m,1H),1.25-1.28(m,3H),1.03-1.11(m,6H),0.82-0.90(m,2H)。

[0103] 本申请通过单晶衍射测定实施例1的化合物的构型,从而确认所得异构体2即为本申请的式1化合物:

[0104] 单晶制备:将30.0mg异构体2、2.0mL异丙醇加入5mL螺口玻璃瓶中,搅拌5min,固体溶清。称取3.9mg二水合草酸加入上述玻璃瓶中,玻璃瓶中逐渐有白色固体析出,室温搅拌3h,玻璃瓶中析出大量白色固体。向玻璃瓶中加入1.0mL甲醇,白色固体逐渐消失,溶液变澄清,继续搅拌1h。溶液经0.22 $\mu$ m微孔滤膜滤至3mL螺口玻璃瓶中,玻璃瓶口用保鲜膜覆盖。用针头在瓶口处扎8个小孔,室温放置7天,制得异构体2的草酸盐单晶。

[0105] 单晶衍射实验:

[0106] 单晶X射线衍射仪:BRUKER D8 VENTURE PHOTON II

[0107] 波长:Ga K $\alpha$ ( $\lambda$ =1.34139 Å)

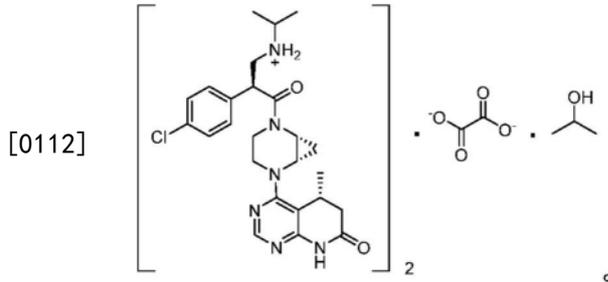
[0108] 测试温度:190K

[0109] 用于结构解析的计算机程序:SHELXL-2018

[0110] 单晶数据:分子式:C<sub>55</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>12</sub>O<sub>9</sub>;分子量:1116.14;晶系:六方晶系;空间群:P61;晶胞参数:a=25.8406(15) Å, b=25.8406(15) Å, c=45.916(3) Å, $\alpha$ =90°, $\beta$ =90°, $\gamma$ =120°;单位晶胞体积:V=26552(4) Å<sup>3</sup>;单位晶胞中包含的分子式个数:Z=12;计算密度:D<sub>calc</sub>=0.838g/cm<sup>3</sup>;R(F<sub>o</sub>):0.0730;R<sub>w</sub>(F<sub>o</sub><sup>2</sup>):0.2069;拟合优度(S):1.034;Flack参数:0.066

(9)。

[0111] 结构描述:单晶X射线衍射及结构解析表明,所制得的单晶为异构体2的草酸盐异丙醇合物。晶体的不对称结构单元中包含四个异构体2分子、两个草酸分子及两个异丙醇分子,其中异构体2和草酸形成草酸盐。异构体2的单分子示意图如图1所示,草酸盐单晶的不对称结构单元如图2所示。结构式表示如下:



[0113] 测试例1 对AKT激酶抑制活性的测定

[0114] 1.材料和试剂

[0115] Envision型号读板仪 (Molecular Devices)

[0116] 白色384孔板 (货号#264706, Thermo)

[0117] HTRF kinEASE TK试剂盒包含的主要试剂 (货号#62TKOPEC, Cisbio)

[0118] TK-生物素底物

[0119] 链霉亲和素-XL665

[0120] 铋标记的酪氨酸激酶底物抗体

[0121] 5×酶反应缓冲液

[0122] SEB

[0123] HTRF检测缓冲液

[0124] AKT1 (货号#01-101, Carna)

[0125] AKT2 (货号#01-102, Carna)

[0126] AKT3 (货号#PV3185, Invitrogen)

[0127] ATP 10mM (货号#PV3227, Invitrogen)

[0128] DTT 1M (货号#D5545, Sigma)

[0129] MgCl<sub>2</sub> 1M (货号#M8266, Sigma)

[0130] 本申请实施例1的异构体1和异构体2

[0131] 阳性对照物:GDC-0068

[0132] 2.实验步骤

[0133] 2.1试剂配制

[0134] 表1激酶的反应体系各组分及浓度表

反应试剂		AKT1	AKT2	AKT3
酶浓度	在酶反应步骤 的终浓度 (10 μL)	0.6 ng/孔	0.1 ng/孔	0.3 ng/孔
ATP 浓度		2μM	20μM	10 nM
TK-生物素底物浓度		2μM	2μM	2μM
酶反应时间		50 min	50 min	50 min
链霉亲和素-XL665 浓度	在总反应中的 终浓度 (20 μL)	125 nM	125 nM	125 nM
铕标记的酪氨酸激酶底物 抗体浓度		1:100 稀释	1:100 稀释	1:100 稀释

[0136] 1×激酶反应缓冲液

[0137] 1mL激酶AKT1,2,3的1×激酶反应缓冲液中含有200μL 5×激酶反应缓冲液、5μL 1M MgCl<sub>2</sub>、1μL 1M DTT、794μL超纯水。

[0138] 5×TK-生物素底物和ATP工作液

[0139] TK-生物素底物和ATP的具体浓度见表1。

[0140] 用1×激酶反应缓冲液稀释底物和ATP至反应浓度的5倍。

[0141] 5×激酶工作液

[0142] 酶筛选时所用的浓度见表1。用1×激酶反应缓冲液配制5×酶工作液。

[0143] 4×链霉亲和素-XL665工作液

[0144] 链霉亲和素-XL665在反应中的浓度参见表1。用检测缓冲液配制4×链霉亲和素-XL665工作液。

[0145] 4×铕标记的酪氨酸激酶底物抗体工作液

[0146] 用检测反应缓冲液将铕标记的酪氨酸激酶底物抗体稀释100倍作为工作液。

[0147] 2.2实验流程

[0148] 所有试剂按照上述方法配好后,除酶外,平衡到室温以后,开始进行加样。

[0149] a) 首先用DMSO将化合物储液(10mM的DMSO溶液)稀释至100μM化合物溶液,然后用1倍激酶反应缓冲液稀释至2.5μM化合物工作液(含2.5%的DMSO)。使用1×激酶反应缓冲液配制2.5%的DMSO溶液,然后用2.5%的DMSO溶液稀释2.5μM化合物工作液,4倍倍比梯度稀释7次,共8个浓度(2500nM,625nM,156nM,39nM,9.8nM,2.4nM,0.6nM,0.15nM)的化合物工作液。除对照孔外,向所有反应孔中加入4μL的稀释好的化合物工作液,向对照孔中加入4μL先前配制的2.5%DMSO/激酶缓冲溶液。

[0150] b) 向所有反应孔中加入2μL先前配制好的TK-生物素底物溶液(酶筛选时底物的浓度见表1)。

[0151] c) 向除阴性孔外的所有反应孔中加入2μL先前配制好的酶溶液(酶的浓度见表1),阴性孔用2μL酶对应1×激酶反应缓冲液补足体积。用封板膜封板,混匀后室温孵育10分钟,让化合物和酶充分作用结合。

[0152] d) 向所有反应孔中加入2μL的ATP溶液来启动激酶反应(酶筛选时的ATP浓度和反应时间见表1)。

[0153] e) 在激酶反应结束前5分钟开始配制检测液。使用试剂盒中的检测缓冲液配制链霉亲和素-XL665和铕标记的酪氨酸激酶底物抗体(1:100)检测液(酶筛选时检测试剂浓度

见表1)。

[0154] f) 待激酶反应结束后,向所有反应孔中加入5 $\mu$ L稀释好的链霉亲和素-XL665,混匀后立即加入稀释好的铕标记的酪氨酸激酶底物抗体检测液。

[0155] g) 封板混匀,室温反应1h后,用ENVISION(Perkinelmer)仪器检测荧光信号(320nm刺激,665nm,615nm发射)。通过全活性孔和背景信号孔计算出每个孔的抑制率,复孔取平均值,同时用专业的画图分析软件PRISM 6.0对每个待测化合物进行半数抑制活性(IC<sub>50</sub>)的拟合。

[0156] 表2:实验加样流程表

	激酶反应体系	对照组	
酶反应步骤(10 $\mu$ L)	样品组	阴性对照	阳性对照
异构体 1 或异构体 2	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L 2.5%DMSO/激酶缓冲液	4 $\mu$ L 2.5%DMSO/激酶缓冲液
TK-生物素标记底物	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
激酶	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L 激酶缓冲液	2 $\mu$ L
封膜室温孵育 10min			
ATP	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
封膜室温孵育 50min			
检测步骤(10 $\mu$ L)			
链霉亲和素-XL665	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
铕标记的酪氨酸激酶底物抗体	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
封膜室温孵育 1h			
检测光: 320nm, 发射光: 665nm, 615nm			

[0157] 2.3数据分析

[0158]  $ER = 665nm \text{ 荧光值} / 615nm \text{ 荧光值}$

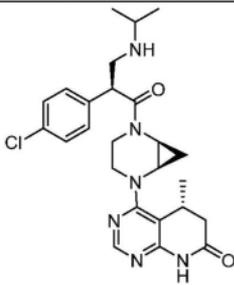
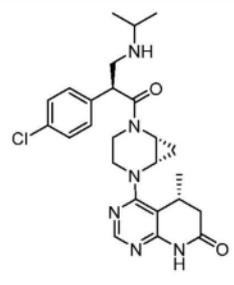
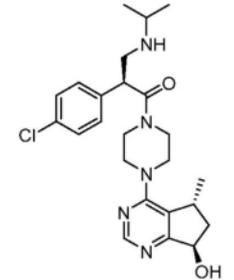
[0159] 抑制率 =  $(ER_{\text{阳性对照}} - ER_{\text{样品}}) / (ER_{\text{阳性对照}} - ER_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$

[0160] 3. 实验结果

[0161] 实验结果如表3所示:

[0162] 表3:AKT抑制活性

化合物	化学结构	AKT1 酶活性 IC <sub>50</sub> (nM)	AKT2 酶活性 IC <sub>50</sub> (nM)	AKT3 酶活性 IC <sub>50</sub> (nM)
[0163]				

实施例 1 异构体 1	 异构体 1	62	542	13
实施例 1 异构体 2	 异构体 2	0.35	6.3	0.09
阳性对照 GDC-0068		3.2	1.7	2.5

[0166] 实施例2 本申请的式1化合物的盐的制备

[0167] 分别取约25毫克式1化合物和1.05当量的酸(对于盐酸,同时设置2.10当量的情况),加入1mL溶剂并在室温下搅拌2天。所得澄清溶液通过5℃搅拌和缓慢挥发的方法尝试结晶,固体通过离心分离,在40℃下,鼓风干燥或减压干燥2-5小时后用XRPD及<sup>1</sup>HNMR表征。成盐结果如下表所示,其中成盐型式经XRPD确定,式1化合物游离碱与酸根的摩尔比(即盐中式1化合物阳离子与酸根的摩尔比)经<sup>1</sup>HNMR确定。

[0168] 表4式1化合物成盐结果

酸	成盐溶剂*	结果	
		成盐型式	成盐结果(式1化合物游离碱与酸根摩尔比)
[0169]			

[0170]

硫酸	二氯甲烷/正庚烷	无定形	硫酸盐 (1: 1)
氢溴酸	异丙醇/正庚烷; 或 丙酮/正庚烷; 或 乙酸乙酯/正庚烷; 或 甲苯/正庚烷; 或 二氯甲烷/正庚烷;		均无盐生成
磷酸	异丙醇/正庚烷	无定形	磷酸盐 (1: 1)
甲磺酸	乙酸乙酯/正庚烷	无定形	甲磺酸盐 (1: 1)
乙酸	异丙醇/正庚烷; 或 丙酮/正庚烷; 或 乙酸乙酯/正庚烷; 或 甲苯/正庚烷; 或 二氯甲烷/正庚烷;		均无盐生成
羟基乙磺酸	乙酸乙酯/正庚烷	无定形	羟基乙磺酸盐 (1: 1)
$\alpha$ -萘磺酸	乙酸乙酯/正庚烷	无定形	$\alpha$ -萘磺酸盐 (1: 1)
对甲苯磺酸	甲苯/正庚烷	无定形	对甲苯磺酸盐 (1: 1)
1,2-乙二磺酸	异丙醇/正庚烷	无定形	1,2-乙二磺酸盐 (1: 1)
草酸	甲苯/正庚烷	无定形	草酸盐 (1: 1)
马来酸	异丙醇/正庚烷	无定形	马来酸盐 (1: 1)
富马酸	异丙醇/正庚烷	无定形	富马酸盐 (1: 1)
柠檬酸	丙酮/正庚烷	无定形	柠檬酸盐 (1: 1)
琥珀酸	异丙醇/正庚烷	无定形	琥珀酸盐 (1: 1)
L-谷氨酸	甲苯/正庚烷	无定形	L-谷氨酸盐 (1: 1)
L-酒石酸	异丙醇/正庚烷	无定形	L-酒石酸盐 (1: 1)
D-葡萄糖醛酸	甲苯/正庚烷	无定形	D-葡萄糖醛酸盐 (1: 1)
马尿酸	乙酸乙酯/正庚烷	无定形与晶型混合物	马尿酸盐 (1: 1)
L-抗坏血酸	丙酮/正庚烷	无定形与晶型混合物	L-抗坏血酸盐 (1: 1)
L-苹果酸	丙酮/正庚烷	无定形	L-苹果酸盐 (1: 1)
苯甲酸	乙酸乙酯/正庚烷	无定形	苯甲酸盐 (1: 1)
龙胆酸	异丙醇/正庚烷	无定形与晶型混合物	龙胆酸盐 (1: 1)

[0171]	盐酸	甲苯/正庚烷	无定形	盐酸盐 (1: 2)
	盐酸	乙酸乙酯/正庚烷	无定形	盐酸盐 (1: 1)

[0172] \*:成盐溶剂中异丙醇、丙酮、乙酸乙酯、甲苯和二氯甲烷与正庚烷的体积比均为1:2。

[0173] 图3~图7分别提供了硫酸盐、磷酸盐、羟基乙磺酸盐、 $\alpha$ -萘磺酸盐、L-苹果酸盐的XRPD图谱。

[0174] 实施例3 式1化合物的单盐酸盐的制备

[0175] 向20mL玻璃小瓶中添加式1化合物(2g)和甲苯(10mL),在室温下振荡溶清。将溶液加入到100mL双层玻璃夹套反应釜中,向反应釜加入4mol/L的氯化氢乙酸乙酯溶液(0.99mL),搅拌反应15分钟。向反应釜加入正庚烷(40mL),在室温下搅拌熟化2小时。熟化完毕,抽滤,湿滤饼在真空下于40℃下干燥19小时,得到白色固体粉末状的式1化合物的单盐酸盐1.97g。

[0176]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.51 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.13-7.52 (m, 4H), 4.51-4.94 (m, 1H), 3.88-4.19 (m, 1H), 3.50-3.81 (m, 3H), 2.97-3.40 (m, 4H), 2.73-2.83 (m, 1H), 2.23-2.31 (m, 1H), 1.07-1.30 (m, 8H), 0.83-0.98 (m, 4H), 0.05 (q, J=5.2Hz, 1H)。

[0177] 式1化合物的单盐酸盐的XRPD图谱见图8。

[0178] 实施例4 式1化合物的二盐酸盐的制备

[0179] 向100mL双层玻璃夹套反应釜中添加式1化合物(2g)和甲苯(10mL),在室温下搅拌溶清。向反应釜加入4mol/L的氯化氢乙酸乙酯溶液(2.18mL),搅拌反应15min。向反应釜加入正庚烷(40mL),在室温下搅拌熟化4小时。熟化完毕,抽滤,湿滤饼在真空下于40℃下干燥6小时,得到白色固体粉末状的式1化合物的二盐酸盐2.25g。

[0180]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.77 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.12-7.51 (m, 4H), 6.68 (s, 1H), 4.64-5.11 (m, 1H), 3.92-4.24 (m, 1H), 3.50-3.82 (m, 3H), 3.22-3.37 (m, 3H), 2.78-3.05 (m, 2H), 2.26-2.34 (m, 1H), 1.09-1.31 (m, 8H), 0.83-0.96 (m, 4H), 0.15 (q, J=5.2Hz, 1H)。

[0181] 式1化合物的二盐酸盐的XRPD图谱见图9。

[0182] 实施例5 式1化合物的富马酸盐的制备

[0183] 向3mL玻璃小瓶中添加式1化合物(25mg)和异丙醇(1mL),在室温下磁力搅拌溶清。向3mL玻璃小瓶中加入富马酸固体(6.31mg),在室温下磁力搅拌反应。搅拌18小时后,向3mL玻璃小瓶中加入正庚烷(2mL),继续搅拌18小时。抽滤,湿滤饼在真空下于40℃下干燥3小时,得到白色固体粉末状的式1化合物的富马酸盐。

[0184]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.49 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.34-7.48 (m, 4H), 6.52 (s, 2H), 4.37-4.76 (m, 1H), 3.88-4.18 (m, 1H), 3.70-3.81 (m, 2H), 3.34-3.54 (m, 2H), 3.03-3.21 (m, 4H), 2.90 (dd, J=11.6, 4.8Hz, 1H), 2.76 (dd, J=16.4, 6.0Hz, 1H), 2.22-2.30 (m, 1H), 1.04-1.32 (m, 8H), 0.85-0.93 (m, 4H), 0.08 (q, J=5.2Hz, 1H)。

[0185] 式1化合物的富马酸盐的XRPD图谱见图10。

[0186] 本申请中,如上测试例1所证明的,本申请的式1化合物具有AKT激酶活性抑制作

用,因此本申请的式1化合物的药学上可接受的盐,如富马酸盐、甲磺酸盐、羟基乙磺酸盐、 $\alpha$ -萘磺酸盐、对甲苯磺酸盐、1,2-乙二磺酸盐、草酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、L-(+)-酒石酸盐、马尿酸盐、L-抗坏血酸盐、L-苹果酸盐、苯甲酸盐、龙胆酸盐以及单盐酸盐、二盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐等也相应地具有AKT激酶活性抑制作用;进而,本申请的式1化合物的药学上可接受的盐,及包含其的药物组合物能够用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态,进一步能够用于制备用于预防和/或治疗AKT蛋白激酶介导的疾病或疾病状态的药物。更进一步地,本申请的式1化合物的药学上可接受的盐相比于式1化合物具有更高的稳定性,提高了式1化合物的物理化学性质,使其有利于生产和应用。

[0187] 以上所述仅为本申请的较佳实施例而已,并不用以限制本申请,凡在本申请的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请保护的范围之内。

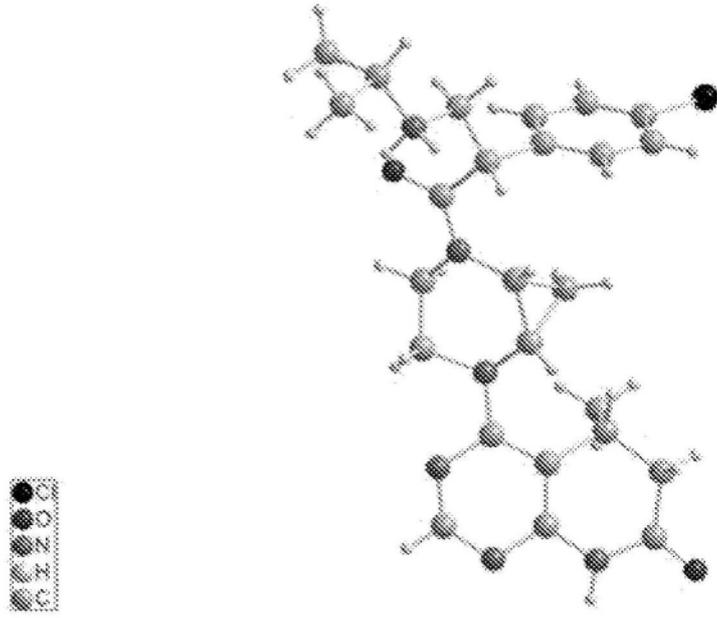


图1

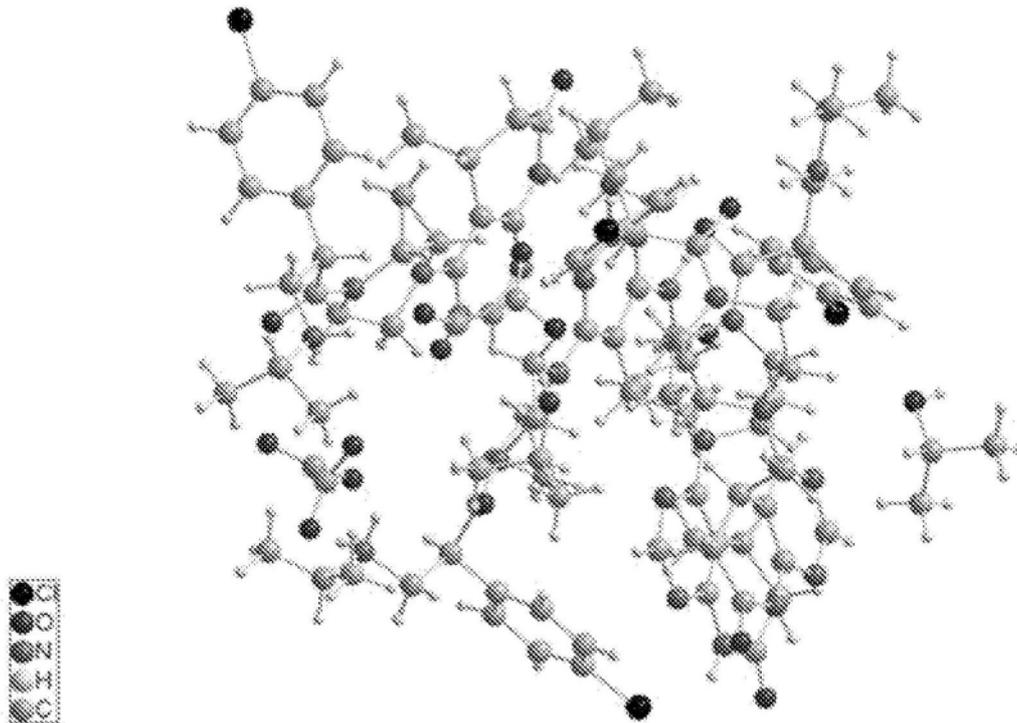


图2

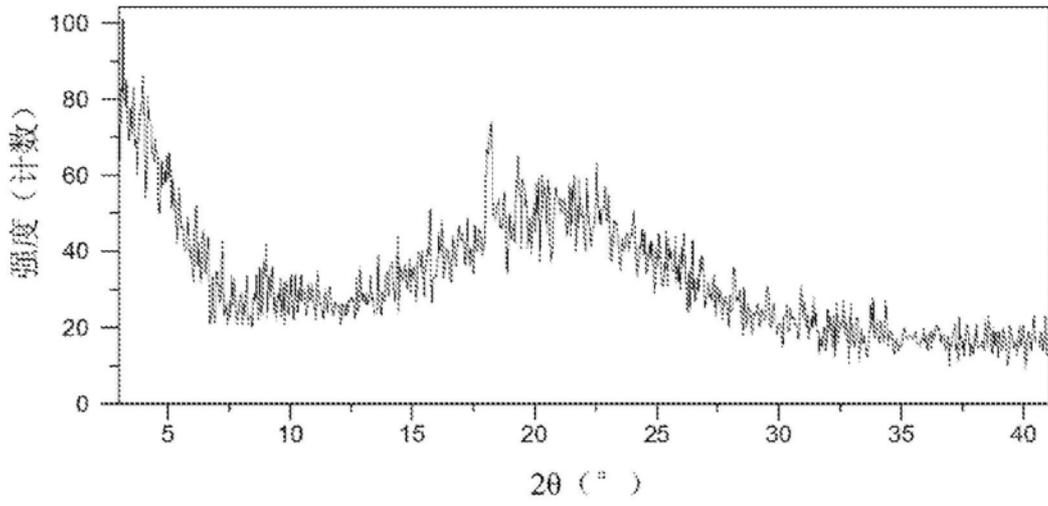


图3

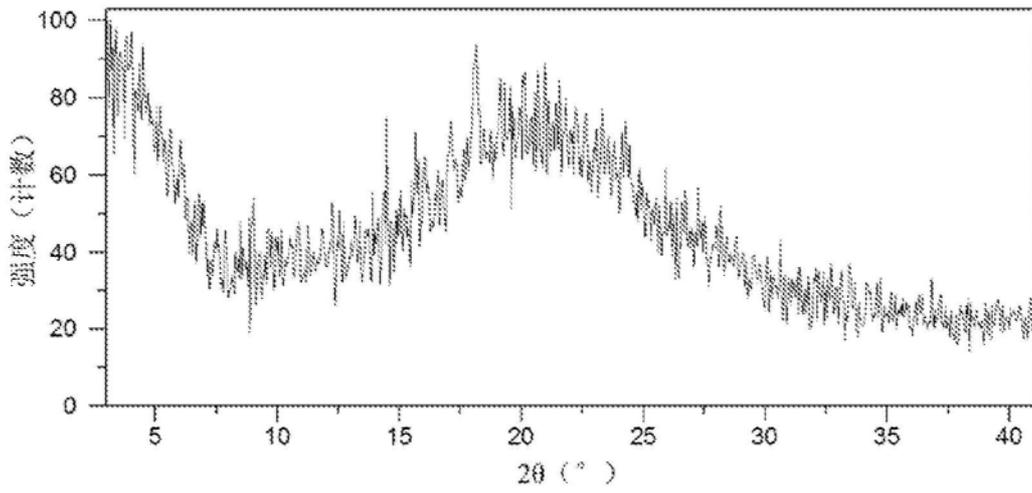


图4

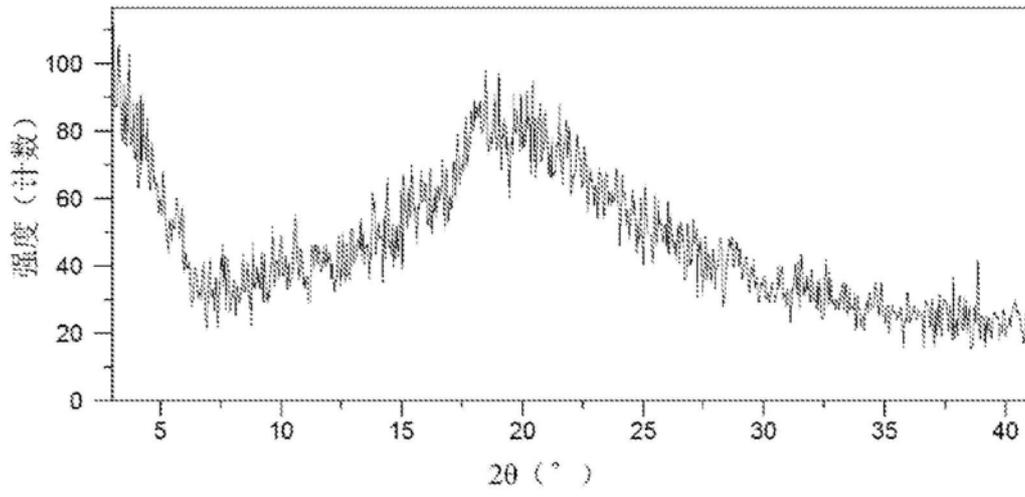


图5

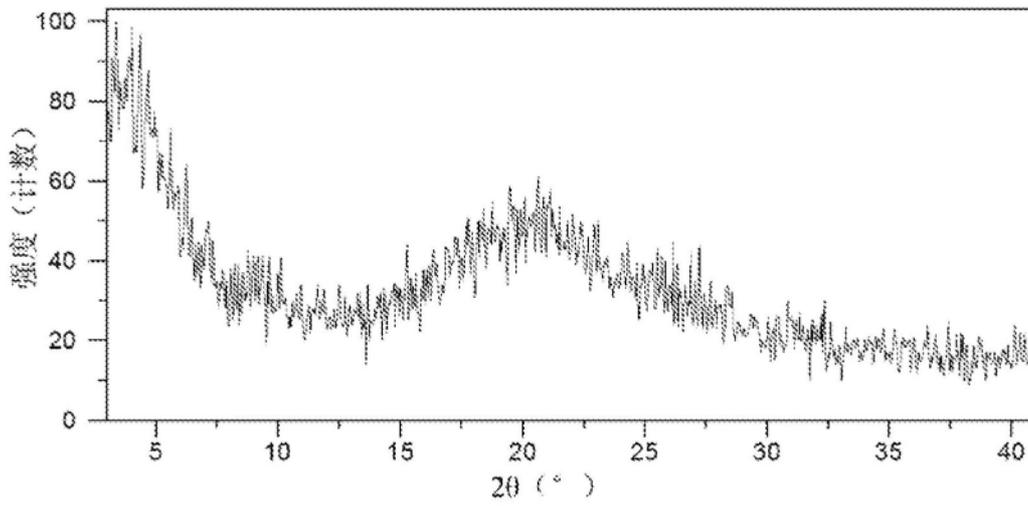


图6

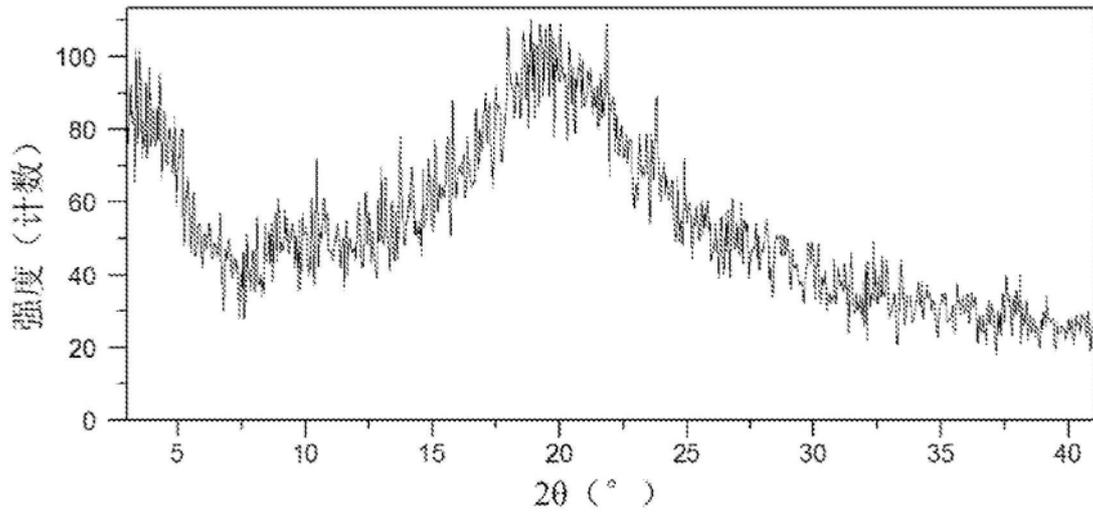


图7

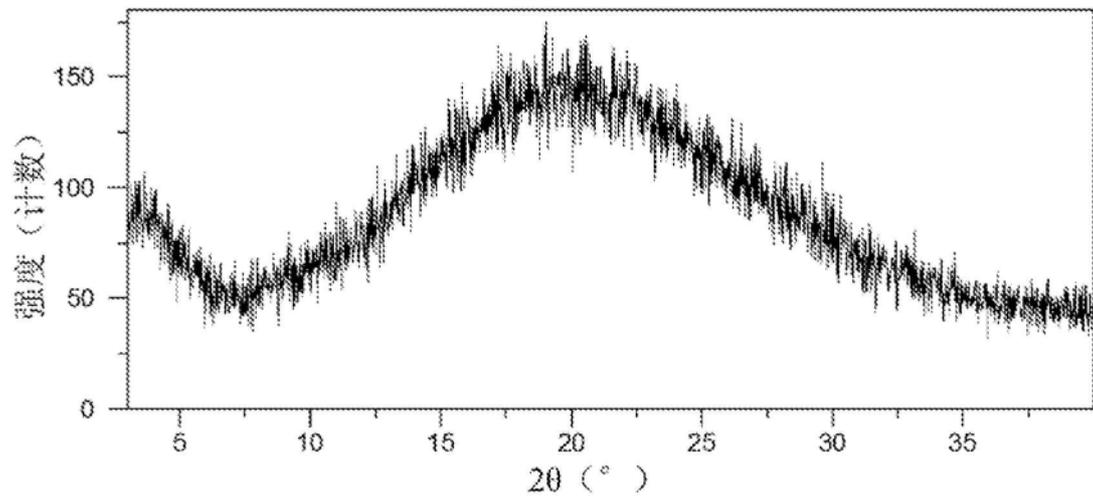


图8

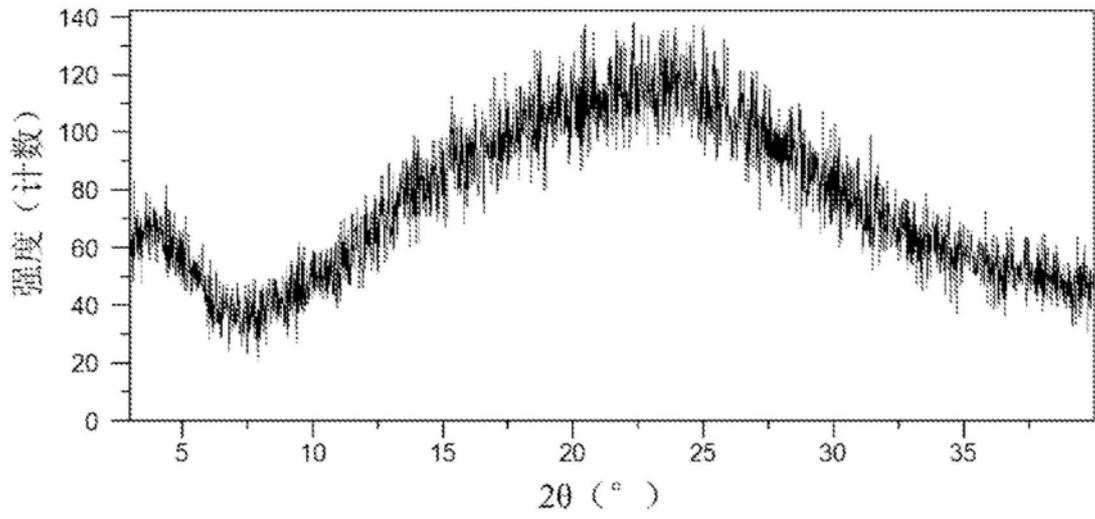


图9

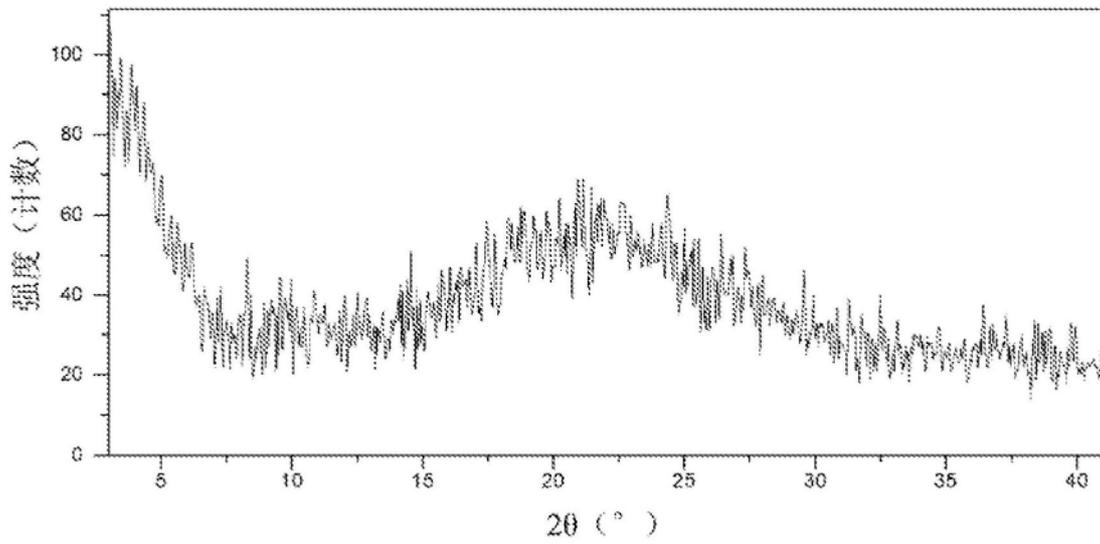


图10