

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年6月22日 (22.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/101847 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 471/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/110284
- (22) 国际申请日: 2016年12月16日 (16.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510951482.3 2015年12月16日 (16.12.2015) CN
- (71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市海州区郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。
- (72) 发明人: 于涛 (YU, Tao); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 李宁 (LI, Ning); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 孔凌微 (KONG, Lingwei); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 姜佩佩 (JIANG, Peipei); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 王勇 (WANG, Yong); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 荣哲民 (RONG, Zhemin); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 王昌俊 (WANG, Changjun); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 郭峰 (GUO, Feng); 中国上海市浦东

新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 李宗斌 (LI, Zongbin); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 王峥 (WANG, Zheng); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 吴家虎 (WU, Jiahu); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。 吴成德 (WU, Chengde); 中国上海市浦东新区富特中路288号, Shanghai 200131 (CN)。

(74) 代理人: 北京信慧永光知识产权代理有限公司 (BEIJING SUNHOPE INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区知春路9号坤讯大厦1106室, Beijing 100191 (CN)。

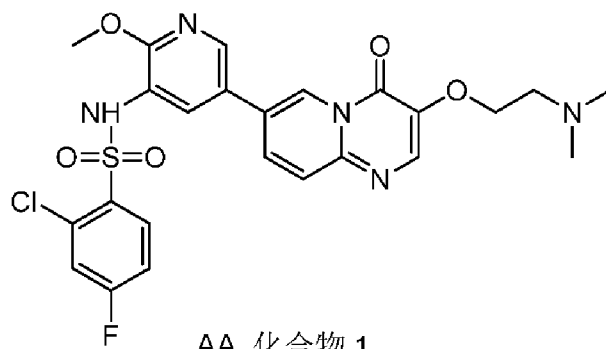
(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,

[见续页]

(54) Title: PYRIDO[1,2-A]PYRIMIDONE ANALOG, CRYSTAL FORM THEREOF, INTERMEDIATE THEREOF AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 吡啶并[1,2-a]嘧啶酮类似物、其晶型、其中间体及其制备方法



AA 化合物 1

AA COMPOUND 1

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are a crystal form of pyrido[1,2-a]pyrimidinone analog, a preparation method therefor and an intermediate thereof.

(57) 摘要: 本发明公开了一种吡啶并[1,2-a]嘧啶酮类似物的晶型及其制备方法和中间体。

WO 2017/101847 A1

IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则
4.17(iii))

吡啶并[1,2-a]嘧啶酮类似物、其晶型、其中间体及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种吡啶并[1,2-a]嘧啶酮类似物的晶型及其制备方法和中间体。

背景技术

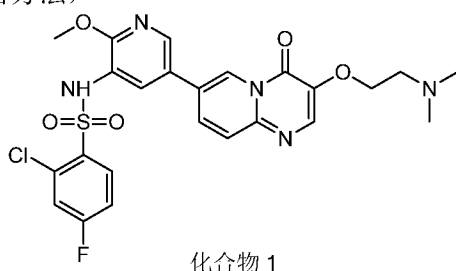
PI3K 通路是人体癌细胞中最常发生变异的地方，可导致细胞的增殖、活化、放大信号。

PI3K 激酶（磷脂酰肌醇 3-激酶，phosphatidylinositol-3-kinase, PI3Ks）属于脂质激酶家族，能够磷酸化磷脂酰肌醇的肌醇环 3'-OH 端，其为一种由调节亚单位 p85 或 p101 和催化亚单位 p110 组成的脂激酶，通过催化磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸（phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2）磷酸化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸（phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP3）而激活下游的 Akt 等从而对细胞的增殖、生存和代谢等起关键作用。因此，抑制磷酸酯酰肌醇 3 激酶，可以影响 PI3K 通路，从而抑制癌细胞的增殖与活化。

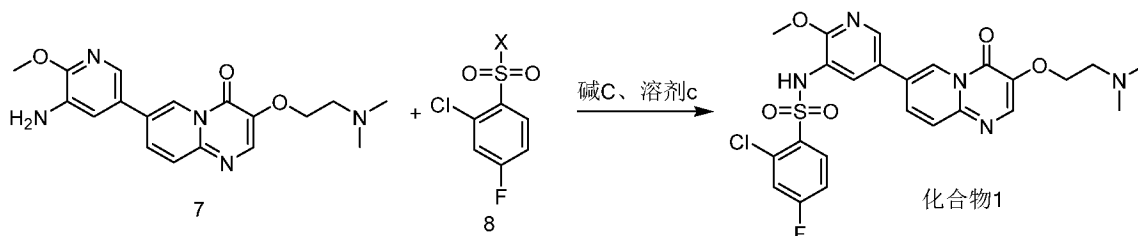
肿瘤抑制基因 PTEN（phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten）使 PIP3 去磷酸化生成 PIP2，从而实现 PI3K/Akt 信号通路的负性调节，抑制细胞增殖和促进细胞凋亡。PI3K 基因突变和扩增在癌症中频繁发生以及 PTEN 在癌症中缺失等都提示 PI3K 与肿瘤发生的密切关系。

发明内容

本发明提供了化合物 1 的制备方法，



其包含如下步骤：



其中，

X 选自 Cl 或 Br；

碱 C 选自吡啶、2,6-二甲基吡啶、Et₃N、4-DMAP、LiOH、Cs₂CO₃ 或 K₂CO₃；

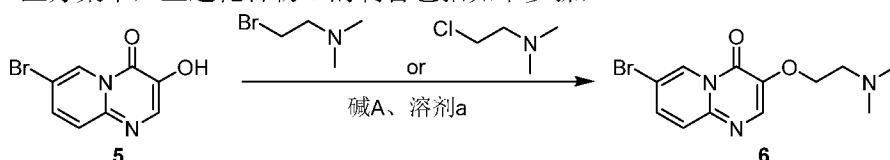
溶剂 c 选自吡啶、二氯甲烷、甲苯、乙腈、丙酮、DMF 或 THF；

化合物 7 与化合物 8 的摩尔比为 1:1~3；

化合物 7 与碱 C 的摩尔比为 1:1~3。

本发明的一些方案中，上述化合物 7 与化合物 8 的摩尔比为 1:1.2~1.6。

本发明的一些方案中，上述化合物 1 的制备包括如下步骤，



其中，

碱 A 选自碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯、氢氧化钾或氢氧化钠；

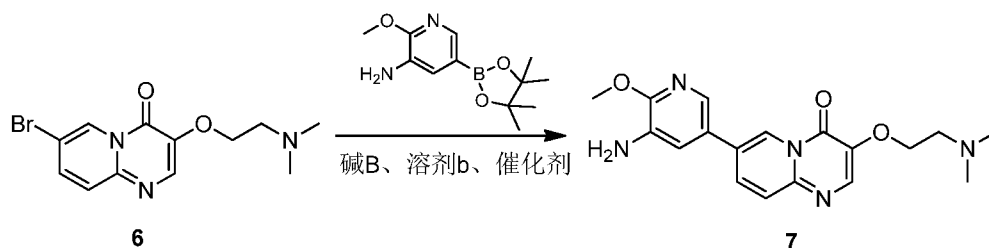
溶剂 a 选自 DMF、DMSO 或 NMP。

其中，2-二甲氨基氯乙烷或 2-二甲氨基溴乙烷可以其盐的形式应用，例如 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐或 2-二甲氨基溴乙烷盐酸盐。

本发明的一些方案中，上述化合物 5 与 2-二甲氨基氯乙烷（或其盐酸盐）或者 2-二甲氨基溴乙烷（或其盐酸盐）的摩尔比为 1:1~2。

本发明的一些方案中，上述化合物 5 与 2-二甲氨基氯乙烷（或其盐酸盐）或者 2-二甲氨基溴乙烷（或其盐酸盐）的摩尔比为 1:1.1~1.3。

本发明的一些方案中，上述化合物 1 的制备包括如下步骤，



其中,

碱 B 选自碳酸钾、碳酸钠、氢氧化钡、磷酸钾、碳酸铯、氟化钾、氟化铯、氢氧化钠、叔丁醇钾、叔丁醇钠、醋酸钾或醋酸钠;

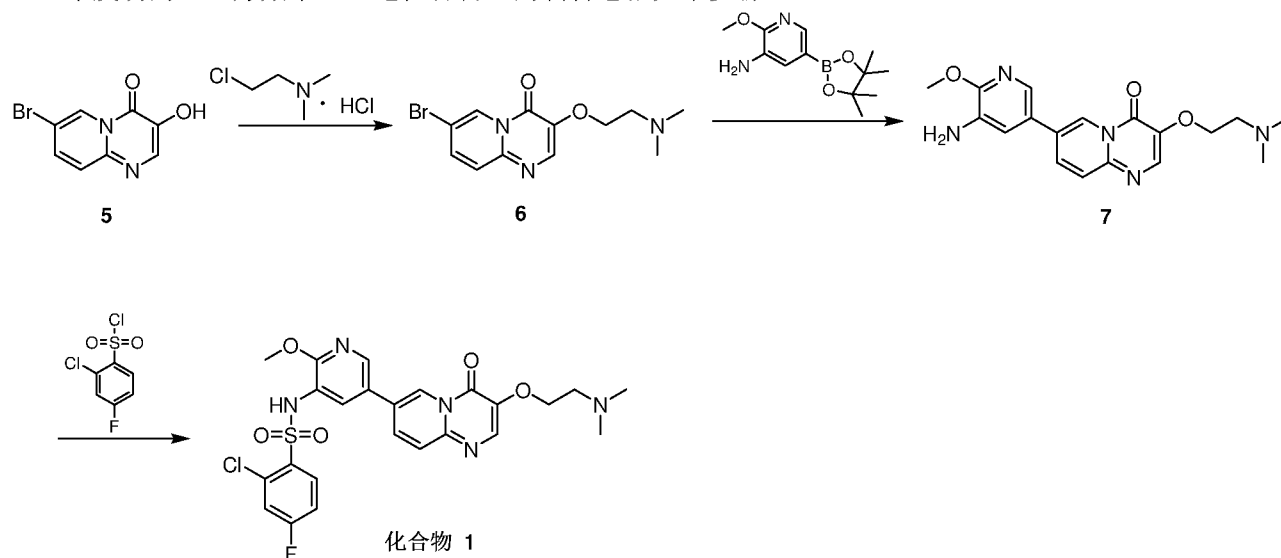
溶剂 b 选自 1,4-二氧六环、DMSO、THF、1,4-二氧六环/水或 THF/水;

所述溶剂 b 中, 1,4-二氧六环或 THF 与水的体积比为 3~6:1, 优选为 5:1;

催化剂选自 Pd(dppf)Cl₂ 或 Pd(PPh₃)₄。

本发明的一些方案中, 上述溶剂 b 中, 1,4-二氧六环或 THF 与水的体积比为 5:1。

本发明的一些方案中, 上述化合物 1 的制备包括如下步骤,

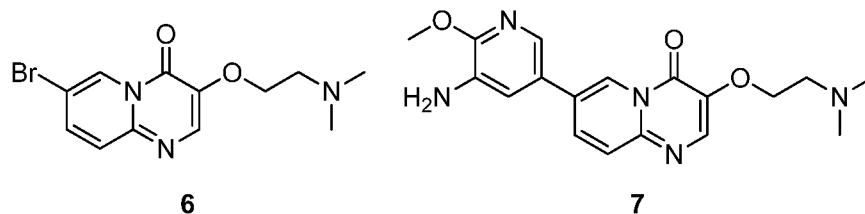


上述反应式中, 由化合物 5 与 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐反应生成化合物 6 的反应中, 优选在碱 A 和溶剂 a 的存在下进行, 其中, 碱 A 选自碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯、氢氧化钾或氢氧化钠; 溶剂 a 选自 DMF、DMSO 或 NMP。本发明的一些方案中, 上述化合物 5 与 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐的摩尔比为 1:1~2。本发明的一些方案中, 上述化合物 5 与 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐的摩尔比为 1:1.1~1.3。

上述反应式中, 由化合物 6 与 2-甲氧基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊烷-2-基)吡啶-3-胺反应生成化合物 7 的反应中, 优选在碱 B、溶剂 b 和催化剂的存在下进行, 其中, 碱 B 选自碳酸钾、碳酸钠、氢氧化钡、磷酸钾、碳酸铯、氟化钾、氟化铯、氢氧化钠、叔丁醇钾、叔丁醇钠、醋酸钾或醋酸钠; 溶剂 b 选自 1,4-二氧六环、DMSO、THF、1,4-二氧六环/水或 THF/水, 所述溶剂 b 中, 1,4-二氧六环或 THF 与水的体积比为 3~6:1, 优选为 5:1; 催化剂选自 Pd(dppf)Cl₂ 或 Pd(PPh₃)₄。

上述反应式中, 由化合物 7 与 2-氯-4-氟苯磺酰氯反应生成化合物 1 的反应中, 优选在碱 C 和溶剂 c 的存在下进行, 其中, 碱 C 选自吡啶、2,6-二甲基吡啶、Et₃N、4-DMAP、LiOH、Cs₂CO₃ 和 K₂CO₃; 溶剂 c 选自吡啶、二氯甲烷、甲苯、乙腈、丙酮、DMF 和 THF; 化合物 7 与 2-氯-4-氟苯磺酰氯的摩尔比为 1:1~3; 化合物 7 与碱 C 的摩尔比为 1:1~3。本发明的一些方案中, 上述化合物 7 与 2-氯-4-氟苯磺酰氯的摩尔比为 1:1.2~1.6。

本发明还提供了作为制备化合物 1 中间体的下式化合物:



本发明提供了化合物 1 的晶型 IX，其特征在于，在 X-射线衍射（XRD）图谱中，具有 $2\theta = 7.947^\circ$ 、 10.073° 、 14.531° 、 19.187° 、 21.237° 、 24.055° 、 25.497° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 7.947^\circ$ 、 10.073° 、 11.970° 、 13.468° 、 14.531° 、 15.911° 、 19.187° 、 21.237° 、 24.055° 、 25.497° 的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 7.947^\circ$ 、 10.073° 、 11.970° 、 13.468° 、 14.531° 、 15.911° 、 19.187° 、 19.561° 、 21.237° 、 23.446° 、 24.055° 、 25.497° 、 27.074° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 1 的晶型 IX，其 XRPD 图谱如图 25 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 1 的晶型 IX，其 XRPD 图谱解析数据如表 1 所示：

表 1 化合物 1 的晶型 IX 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	6.014	2.5	24	24.847	6.6
2	7.947	29.0	25	25.497	60.4
3	10.073	54.2	26	26.265	1.3
4	11.970	23.3	27	27.074	28.0
5	13.053	5.9	28	27.448	10.1
6	13.468	14.4	29	27.862	22.8
7	14.531	62.5	30	28.081	15.6
8	14.828	49.7	31	29.005	4.5
9	15.911	31.1	32	29.445	3.3
10	17.369	21.8	33	30.171	13.0
11	17.569	26.1	34	31.014	1.5
12	17.941	4.5	35	31.437	0.7
13	18.377	1.6	36	31.963	19.5
14	19.187	55.2	37	32.381	23.5
15	19.561	41.3	38	33.937	9.1
16	19.855	61.5	39	34.565	4.7
17	20.233	22.2	40	35.218	6.8
18	21.237	62.8	41	36.403	5.8
19	21.984	22.0	42	36.897	3.7
20	22.373	3.2	43	38.103	7.1
21	23.073	2.2	44	38.605	6.8
22	23.446	32.9	45	39.502	2.6
23	24.055	100.0			

本发明的一些方案中，上述化合物 1 的晶型 IX 的 DSC 图谱如图 26 所示。

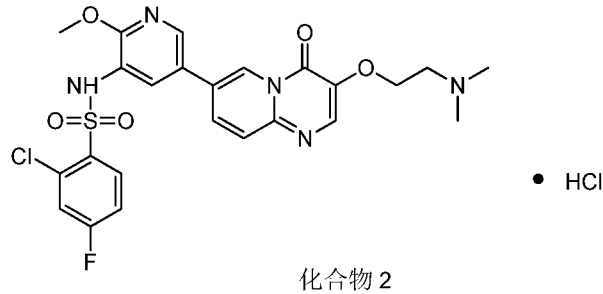
本发明的一些方案中，上述化合物 1 的晶型 IX 的 TGA 图谱如图 27 所示。

上述化合物 1 的晶型 IX 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在，也可以是以溶剂合物结晶的形式存在，此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 IX 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中，所述晶型 IX 占晶型组合物重量 50% 以上，较好的是 80% 以上，更好的是 90% 以上，最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 IX 的药物组合物，该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 IX、或者所述晶型 IX 的晶型组合物，此外，该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了下式所示化合物 2，



本发明提供了化合物 2 的晶型 I，其特征在于，在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中，具有 $2\theta = 10.154^\circ$ 、 12.285° 、 14.511° 、 16.328° 、 24.311° 、 26.188° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 7.270^\circ$ 、 10.154° 、 12.285° 、 13.206° 、 14.511° 、 16.328° 、 24.311° 、 26.188° 、 27.724° 的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 7.270^\circ$ 、 10.154° 、 12.285° 、 13.206° 、 14.511° 、 16.328° 、 19.008° 、 20.702° 、 21.259° 、 24.311° 、 26.188° 、 27.724° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 2 的晶型 I，其 XRPD 图谱如图 1 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 I，其 XRPD 图谱解析数据如表 2 所示。

表 2 化合物 2 的晶型 I 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	7.270	18.4	19	23.567	12.7
2	10.154	80.7	20	24.311	32.1
3	11.745	1.5	21	24.903	14.3
4	12.285	39.9	22	25.318	6.8
5	13.206	31.7	23	26.188	55.8
6	14.511	100.0	24	27.724	31.3
7	15.119	8.1	25	28.809	12.4
8	15.771	4.6	26	29.225	3.7
9	16.328	40.2	27	30.288	14.2
10	16.861	2.7	28	30.584	7.4
11	17.568	10.7	29	31.196	5.5
12	18.653	9.9	30	31.531	20.5
13	19.008	18.0	31	31.767	20.5
14	19.919	7.5	32	32.735	23.6
15	20.702	14.1	33	33.860	1.8
16	21.259	14.0	34	35.356	9.4
17	21.712	5.4	35	36.585	1.4
18	23.169	86.9	36	38.236	6.7

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 I 的 DSC 图谱如图 2 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 I 的 TGA 图谱如图 3 所示。

上述化合物 2 的晶型 I 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在，也可以是以溶剂合物结晶的形式存在，此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 I 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中，所述晶型 I 占晶型组合物重量 50% 以上，较好的是 80% 以上，更好的是 90% 以上，最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 I 的药物组合物，该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 I、或者所述晶型 I 的晶型组合物，此外，该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了化合物 2 的晶型 II，其特征在于，在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中，具有 $2\theta = 6.524^\circ$ 、 7.782° 、 13.895° 、 15.495° 、 17.487° 、 19.322° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 6.524^\circ$ 、 7.782° 、 11.628° 、 13.895° 、 15.495° 、 17.487° 、 19.322° 、 20.962° 、 23.269° 的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 6.524^\circ$ 、 7.782° 、 11.628° 、 13.895° 、 15.495° 、 17.487° 、 19.322° 、 20.962° 、 23.269° 、 24.257° 、 26.009° 、 31.533° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 2 的晶型 II，其 XRPD 图谱如图 4 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 II，其 XRPD 图谱解析数据如表 3 所示。

表 3 化合物 2 的晶型 II 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
----	------	-------	----	------	-------

1	6.524	11.3	22	20.962	11.4
2	7.782	22.3	23	21.474	3.5
3	8.879	1.0	24	23.269	10.9
4	9.977	4.7	25	23.481	9.6
5	10.494	4.4	26	24.257	13.8
6	11.628	6.7	27	24.515	4.9
7	11.804	7.5	28	25.515	8.0
8	12.122	4.5	29	26.009	13.9
9	12.973	4.7	30	26.818	8.4
10	13.406	1.1	31	27.095	5.1
11	13.895	6.7	32	27.350	3.3
12	15.495	100.0	33	27.648	5.5
13	16.423	3.0	34	27.922	9.0
14	16.860	1.9	35	28.477	2.5
15	17.131	2.0	36	28.810	2.9
16	17.487	41.7	37	29.343	3.4
17	17.807	4.7	38	31.533	16.1
18	18.181	1.8	39	32.733	6.0
19	18.749	3.3	40	33.263	2.9
20	19.322	22.3	41	35.260	4.9
21	19.740	1.9	42	37.173	5.8

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 II 的 DSC 图谱如图 5 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 II 的 TGA 图谱如图 6 所示。

上述化合物 2 的晶型 II 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在，也可以是以溶剂合物结晶的形式存在，此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 II 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中，所述晶型 II 占晶型组合物重量 50% 以上，较好的是 80% 以上，更好的是 90% 以上，最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 II 的药物组合物，该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 II、或者所述晶型 II 的晶型组合物，此外，该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了化合物 2 的晶型 III，其特征在于，在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中，具有 $2\theta = 6.979^\circ$ 、 9.939° 、 14.392° 、 16.107° 、 20.982° 、 25.990° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 6.187^\circ$ 、 6.979° 、 9.939° 、 11.910° 、 14.392° 、 16.107° 、 20.982° 、 22.755° 、 25.990° 的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 6.187^\circ$ 、 6.979° 、 9.939° 、 11.910° 、 13.148° 、 14.392° 、 16.107° 、 20.982° 、 22.755° 、 23.975° 、 25.990° 、 29.006° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 2 的晶型 III，其 XRPD 图谱如图 7 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 III，其 XRPD 图谱解析数据如表 4 所示。

表 4 化合物 2 的晶型 III 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	6.187	29.0	15	22.755	25.0
2	6.979	46.3	16	23.436	6.8
3	9.939	80.4	17	23.975	10.9
4	10.425	19.8	18	24.811	8.7
5	11.910	38.0	19	25.990	86.1
6	12.206	29.4	20	27.224	2.9
7	13.148	12.2	21	29.006	25.6
8	14.392	100.0	22	29.522	15.5
9	16.107	66.4	23	30.979	5.3
10	17.531	9.5	24	31.373	8.5
11	18.648	16.3	25	31.966	9.7
12	20.665	3.7	26	32.556	29.3
13	20.982	37.9	27	35.061	11.2
14	21.772	4.4	28	35.527	5.6

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 III 的 DSC 图谱如图 8 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 III 的 TGA 图谱如图 9 所示。

上述化合物 2 的晶型 III 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在,也可以是以溶剂合物结晶的形式存在,此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 III 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中,所述晶型 III 占晶型组合物重量 50% 以上,较好的是 80% 以上,更好的是 90% 以上,最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 III 的药物组合物,该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 III、或者所述晶型 III 的晶型组合物,此外,该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了化合物 2 的晶型 IV,其特征在于,在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中,具有 $2\theta = 6.388^\circ$ 、 7.278° 、 11.076° 、 15.454° 、 21.256° 的衍射峰;典型地具有 $2\theta = 6.388^\circ$ 、 7.278° 、 11.076° 、 12.102° 、 15.454° 、 16.091° 、 18.912° 、 21.256° 的衍射峰;更典型地具有 $2\theta = 6.388^\circ$ 、 7.278° 、 11.076° 、 12.102° 、 15.103° 、 15.454° 、 16.091° 、 18.912° 、 21.256° 、 21.846° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 2 的晶型 IV,其 XRPD 图谱如图 10 所示。

本发明的一些方案中,上述化合物 2 的晶型 IV,其 XRPD 图谱解析数据如表 5 所示。

表 5 化合物 2 的晶型 IV 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	6.388	100.0	20	21.846	14.6
2	7.278	34.3	21	24.093	6.3
3	10.498	0.3	22	24.651	8.7
4	11.076	20.0	23	24.925	0.9
5	12.102	7.4	24	25.502	6.8
6	12.732	1.7	25	25.830	7.6
7	13.447	1.7	26	26.466	5.3
8	14.513	5.5	27	26.819	12.5
9	15.103	19.3	28	27.214	14.1
10	15.454	27.6	29	29.226	6.8
11	16.091	24.8	30	30.069	0.9
12	17.299	1.6	31	30.507	4.8
13	17.906	8.6	32	31.137	3.1
14	18.552	6.2	33	31.724	2.3
15	18.912	21.7	34	32.965	3.0
16	19.107	18.6	35	34.353	1.7
17	20.051	2.1	36	34.906	3.7
18	20.998	20.8	37	36.798	4.4
19	21.256	52.5			

本发明的一些方案中,上述化合物 2 的晶型 IV 的 DSC 图谱如图 11 所示。

本发明的一些方案中,上述化合物 2 的晶型 IV 的 TGA 图谱如图 12 所示。

上述化合物 2 的晶型 IV 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在,也可以是以溶剂合物结晶的形式存在,此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 IV 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中,所述晶型 IV 占晶型组合物重量 50% 以上,较好的是 80% 以上,更好的是 90% 以上,最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 IV 的药物组合物,该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 IV、或者所述晶型 IV 的晶型组合物,此外,该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了化合物 2 的晶型 V,其特征在于,在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中,具有 $2\theta = 7.116^\circ$ 、 14.137° 、 15.911° 、 22.223° 、 24.610° 的衍射峰;典型地具有 $2\theta = 7.116^\circ$ 、 14.137° 、 15.911° 、 21.691° 、 22.223° 、 24.213° 、 24.610° 、 28.987° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 2 的晶型 V,其 XRPD 图谱如图 13 所示。

本发明的一些方案中,上述化合物 2 的晶型 V,其 XRPD 图谱解析数据如表 6 所示。

表 6 化合物 2 的晶型 V 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	7.116	100.0	19	22.223	12.0
2	10.631	2.6	20	23.525	0.7
3	11.553	3.8	21	24.213	7.2
4	12.000	0.8	22	24.610	10.2
5	12.950	0.6	23	26.166	7.3

6	13.703	3.3	24	26.956	6.5
7	14.137	13.7	25	27.369	4.0
8	14.473	3.2	26	27.823	2.6
9	15.911	10.8	27	28.042	1.0
10	16.304	0.4	28	28.987	14.2
11	17.078	4.5	29	30.825	5.2
12	17.664	1.6	30	31.611	1.8
13	18.004	2.3	31	33.368	1.6
14	18.199	3.4	32	35.416	7.3
15	18.380	2.1	33	35.651	13.3
16	19.050	1.9	34	36.326	1.7
17	21.237	2.4	35	37.980	2.1
18	21.691	9.5			

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 V 的 DSC 图谱如图 14 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 V 的 TGA 图谱如图 15 所示。

上述化合物 2 的晶型 V 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在，也可以是以溶剂合物结晶的形式存在，此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 V 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中，所述晶型 V 占晶型组合物重量 50% 以上，较好的是 80% 以上，更好的是 90% 以上，最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 V 的药物组合物，该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 V、或者所述晶型 V 的晶型组合物，此外，该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了化合物 2 的晶型 VI，其特征在于，在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中，具有 $2\theta = 5.775^\circ$ 、 11.770° 、 14.415° 、 15.753° 、 22.518° 、 26.623° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 5.775^\circ$ 、 11.770° 、 14.415° 、 15.753° 、 17.132° 、 20.939° 、 22.518° 、 26.623° 的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 5.775^\circ$ 、 11.770° 、 14.415° 、 15.753° 、 17.132° 、 20.939° 、 22.518° 、 23.745° 、 26.623° 、 31.295° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 2 的晶型 VI，其 XRPD 图谱如图 16 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 VI，其 XRPD 图谱解析数据如表 7 所示。

表 7 化合物 2 的晶型 VI 的 XRPD 图谱解析数据

编号	2 θ 角	相对强度%	编号	2 θ 角	相对强度%
1	5.775	100.0	13	22.518	63.9
2	7.795	5.6	14	23.745	24.4
3	11.770	58.9	15	25.969	14.2
4	12.869	3.8	16	26.623	40.8
5	13.841	2.5	17	27.136	9.2
6	14.415	43.6	18	27.703	9.2
7	15.753	79.9	19	28.116	9.1
8	16.724	9.3	20	29.538	20.2
9	17.132	29.7	21	31.295	61.4
10	17.825	5.1	22	31.882	18.2
11	20.070	10.3	23	34.211	19.1
12	20.939	31.9	24	34.705	18.9

本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 VI 的 DSC 图谱如图 17 所示。

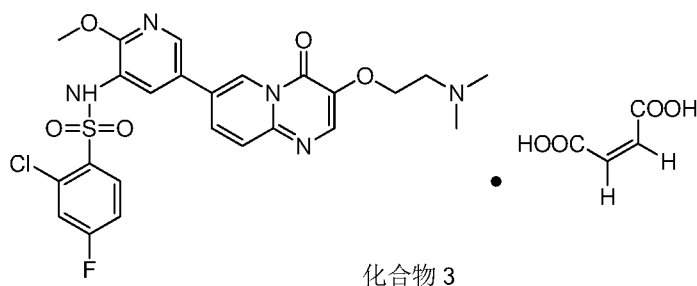
本发明的一些方案中，上述化合物 2 的晶型 VI 的 TGA 图谱如图 18 所示。

上述化合物 2 的晶型 VI 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在，也可以是以溶剂合物结晶的形式存在，此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 VI 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中，所述晶型 VI 占晶型组合物重量 50% 以上，较好的是 80% 以上，更好的是 90% 以上，最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 VI 的药物组合物，该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 VI、或者所述晶型 VI 的晶型组合物，此外，该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了下式所示化合物 3，



本发明提供了化合物 3 的晶型 VII，其特征在于，在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中，具有 $2\theta = 6.325^\circ$ 、 12.677° 、 15.813° 、 21.395° 、 22.519° 、 27.133° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 6.325^\circ$ 、 12.677° 、 13.251° 、 15.813° 、 18.954° 、 21.395° 、 22.519° 、 25.161° 、 27.133° 的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 6.325^\circ$ 、 12.677° 、 13.251° 、 15.813° 、 16.565° 、 18.954° 、 21.395° 、 22.519° 、 24.117° 、 25.161° 、 26.405° 、 27.133° 的衍射峰。

本发明提供了化合物 3 的晶型 VII，其 XRPD 图谱如图 19 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 3 的晶型 VII，其 XRPD 图谱解析数据如表 8 所示。

表 8 化合物 3 的晶型 VII 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	6.325	84.5	15	22.953	39.9
2	12.677	56.5	16	23.820	24.1
3	13.251	39.1	17	24.117	24.2
4	13.642	35.5	18	25.161	47.1
5	14.768	10.0	19	25.855	11.4
6	15.813	51.3	20	26.405	41.6
7	16.565	23.8	21	27.133	100.0
8	17.073	17.0	22	28.551	17.7
9	17.316	4.7	23	29.265	16.7
10	18.038	13.3	24	31.190	7.5
11	18.954	32.1	25	32.873	7.3
12	20.582	4.1	26	33.581	21.2
13	21.395	79.3	27	35.155	12.1
14	22.519	80.4			

本发明的一些方案中，上述化合物 3 的晶型 VII 的 DSC 图谱如图 20 所示。

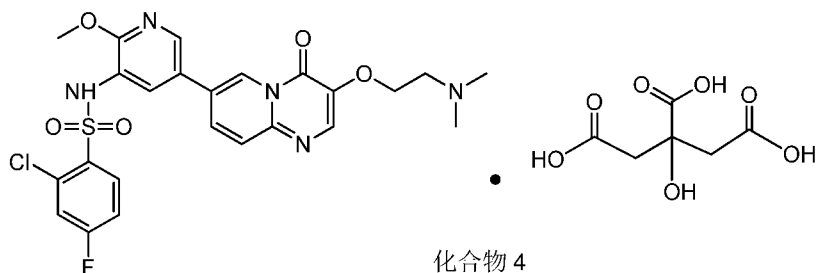
本发明的一些方案中，上述化合物 3 的晶型 VII 的 TGA 图谱如图 21 所示。

化合物 3 的晶型 VII 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在，也可以是以溶剂合物结晶的形式存在，此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 VII 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中，所述晶型 VII 占晶型组合物重量 50% 以上，较好的是 80% 以上，更好的是 90% 以上，最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 VII 的药物组合物，该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 VII、或者所述晶型 VII 的晶型组合物，此外，该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明提供了下式所示化合物 4，



本发明提供了化合物 4 的晶型 VIII，其特征在于，在 X-射线衍射 (XRD) 图谱中，具有 $2\theta = 5.889^\circ$ 、 11.002° 、 12.518° 、 14.906° 、 17.825° 、 22.814° 、 25.555° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 5.889^\circ$ 、 7.173° 、 11.002° 、 11.396° 、 12.518° 、 12.895° 、 14.906° 、 17.825° 、 22.814° 、 25.555° 的衍射峰；更典型地

具有 $2\theta = 5.889^\circ$ 、 7.173° 、 11.002° 、 11.396° 、 12.518° 、 12.895° 、 14.906° 、 16.169° 、 17.825° 、 19.875° 、 21.574° 、 22.814° 、 25.555° 、 27.254° 的衍射峰。

本发明的一些方案中，上述化合物 4 的晶型 VIII，其 XRPD 图谱如图 22 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 4 的晶型 VIII，其 XRPD 图谱解析数据如表 9 所示。

表 9 化合物 4 的晶型 VIII 的 XRPD 图谱解析数据

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	5.889	47.4	13	21.061	11.1
2	7.173	10.4	14	21.574	35.3
3	11.002	42.2	15	21.829	35.6
4	11.396	32.6	16	22.814	47.5
5	12.518	77.6	17	23.598	2.1
6	12.895	62.0	18	25.555	59.3
7	14.906	79.7	19	26.522	10.0
8	15.563	8.8	20	27.254	32.3
9	16.169	44.0	21	28.717	28.4
10	17.825	100.0	22	29.712	3.9
11	18.456	48.5	23	30.702	15.5
12	19.875	26.1	24	31.871	7.7

本发明的一些方案中，上述化合物 4 的晶型 VIII 的 DSC 图谱如图 23 所示。

本发明的一些方案中，上述化合物 4 的晶型 VIII 的 TGA 图谱如图 24 所示。

化合物 4 的晶型 VIII 可以是以非溶剂合物结晶的形式存在，也可以是以溶剂合物结晶的形式存在，此处的溶剂合物是指有机溶剂和/或水与相应化合物形成的溶剂合物。

本发明提供所述晶型 VIII 的晶型组合物。在本申请的部分实施方式中，所述晶型 VIII 占晶型组合物重量 50% 以上，较好的是 80% 以上，更好的是 90% 以上，最好的是 95% 以上。

本发明提供所述晶型 VIII 的药物组合物，该药物组合物中包括治疗有效量的所述晶型 VIII、或者所述晶型 VIII 的晶型组合物，此外，该药物组合物还可以含有或不含有药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

本发明的目的还在于提供化合物 1、化合物 2、化合物 3、化合物 4 或其药物组合物在制备治疗与 PI3K 受体有关疾病的药物中的应用。

本发明的另一个目的在于提供本发明的晶型 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII 和 IX、上述晶型组合物和上述药物组合物在制备治疗与 PI3K 激酶有关疾病的药物中的应用。

在本发明的一些方案中，所述 PI3K 激酶有关疾病选自癌症，如结肠癌、胃癌等。

本发明的目的在于提供一种治疗与 PI3K 激酶有关疾病的方法，所述方法包括将治疗有效量化合物 1、化合物 2、化合物 3、化合物 4 或其药物组合物给予有需要的患者。

本发明的再一目的在于提供一种治疗与 PI3K 激酶有关疾病的方法，所述方法包括将治疗有效量的本发明的晶型 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII 和 IX、上述晶型组合物和上述药物组合物给予有需要的患者。

在本发明的一些方案中，所述 PI3K 激酶有关疾病选自癌症，如结肠癌、胃癌等。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在含有下列含义。一个特定的短语或术语在没有特别定义的情况下，不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照普通的含义去理解。当本文出现商品名时，旨在指代其对应的商品或其活性成分。

本发明的中间体化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备，包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术人员所熟知的等同替换方式，优选的实施方式包括但不限于本发明的实施例。

本发明具体实施方式的化学反应是在合适的溶剂中完成的，所述的溶剂须适合于本发明的化学变化及其所需的试剂和物料。为了获得本发明的化合物，有时需要本领域技术人员在已有实施方式的基础上对合成步骤或者反应流程进行修改或选择。

本领域任何合成路线规划中的一个重要考量因素是为反应性官能团（如本发明中的氨基）选择合适的保护基。对于经过训练的从业者来说，Greene and Wuts 的 (Protective Groups In Organic Synthesis, Wiley and Sons, 1991) 是这方面的权威。本发明引用的所有参考文献整体上并入本发明。

下面会通过实施例具体描述本发明，但这些实施例并不意味着对本发明的任何限制。

本发明所使用的所有溶剂是市售的，无需进一步纯化即可使用。反应一般是在惰性氮气下、无水溶剂中进行的。质子核磁共振数据记录在 Bruker Avance III 400 (400MHz) 分光仪上，化学位移以四甲基硅烷低场处的 (ppm) 表示。质谱是在安捷伦 1200 系列加 6110 (&1956A) 上测定。LC/MS 或 Shimadzu MS 包含一个 DAD: SPD-M20A (LC) 和 Shimadzu Micromass 2020 检测器。质谱仪配备有一个正或负模式下操作的电喷雾离子源 (ESI)。

需要说明的是，在 X-射线衍射光谱中，由结晶化合物得到的衍射谱图对于特定的晶型往往是特征性的，其中谱带（尤其是在低角度）的相对强度可能会因为结晶条件、粒径和其它测定条件的差异而产生的优势取向效果而变化。因此，衍射峰的相对强度对所针对的晶型并非是特征性的，判断是否与已知的晶型相同时，更应该注意的是峰的相对位置而不是它们的相对强度。此外，对任何给定的晶型而言，峰的位置可能存在轻微误差，这在晶体学领域中也是公知的。例如，由于分析样品时温度的变化、样品移动、或仪器的标定等，峰的位置可以移动， 2θ 值的测定误差有时约为 $\pm 0.5^\circ$ ，优选约为 $\pm 0.3^\circ$ ，更优选约为 $\pm 0.2^\circ$ 。因此，在确定每种晶型结构时，应该将此误差考虑在内，在误差内的 2θ 值也属于本发明的范围。在 XRD 图谱中通常用 2θ 角或晶面距 d 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 代表晶面距， λ 代表入射 X 射线的波长， θ 为衍射角。对于同种化合物的同种晶型，其 XRD 谱的峰位置在整体上具有相似性，相对强度误差可能较大。还应指出的是，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的缺失，此时，无需依赖高纯试样中观察到的全部谱带，甚至一条谱带也可能对给定的晶体是特征性的。

需要说明的是，在制备药物晶型时，药物分子与溶剂分子在接触的过程中，外部条件与内部因素造成溶剂分子与化合物分子形成共晶而残留在固体物质中的情况很难避免，从而形成溶剂合物，具体包括化学计量类溶剂合物和非化学计量类溶剂合物。所述的溶剂合物均包括在本发明的范围内。

本发明制备得到的化合物 2 (盐酸盐) 中氯离子的化学计量可以通过离子色谱测定。所用仪器为 883 Basic IC plus 1；色谱柱选用 Metrosep A Supp 5 - 150/4.0；流速 0.700 mL/min；运行时间 10min。

本发明采用下述缩略词：DCM 代表二氯甲烷；PE 代表石油醚；EA 代表乙酸乙酯；DMF 代表 N,N-二甲基甲酰胺；DMSO 代表二甲亚砜；THF 代表四氢呋喃；MeOH 代表甲醇；NMP 代表 N-甲基吡咯烷酮；Et₃N 代表三乙胺；4-DMAP 代表 4-二甲氨基吡啶；LiOH 代表氢氧化锂；Cs₂CO₃ 代表碳酸铯；K₂CO₃ 代表碳酸钾；PPh₃ 代表三苯基膦；Pd(PPh₃)₄ 代表四三苯基膦钯；Pd(dppf)Cl₂ 代表 1,1'-双(二苯基膦)二茂铁氯化钯。

本发明粉末 X-射线衍射 (X-ray powder diffractometer, XRPD) 方法：

仪器型号：布鲁克 D8 advance X-射线衍射仪

测试条件：详细的 XRPD 参数如下：

X-ray 发生器：Cu, α , ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$)

管电压：40kV，管电流：40mA。

散射狭缝：0.60mm

探测器狭缝：10.50mm

反散射狭缝：7.10mm

扫描范围：4-40deg

步长：0.02deg

速率：0.1S

样品盘转速：15rpm

本发明差热分析 (Differential Scanning Calorimeter, DSC) 方法

仪器型号：TA Q2000 差示扫描量热仪

测试条件：取样品 (0.5~1mg) 置于 DSC 铝锅内进行测试，方法为：室温~300℃，升温速率为 10℃/min。

本发明热重分析 (Thermal Gravimetric Analyzer, TGA) 方法

仪器型号：TA Q5000IR 热重分析仪

测试条件：取样品 (2~5mg) 置于 TGA 铂金锅内进行测试，方法为：室温~300℃，升温速率为 10℃/min。

技术效果

本发明提供的化合物 2、化合物 3、化合物 4、化合物 1 的晶型 IX、化合物 2 的晶型 I、化合物 2 的晶型 II、化合物 2 的晶型 III、化合物 2 的晶型 IV、化合物 2 的晶型 V、化合物 2 的晶型 VI、化合物 3 的晶型 VII、化合物 4 的晶型 VIII 性质稳定、溶解度好、引湿性好，具有良好的成药前景。

本发明给出的合成化合物 1 及其中间体的工艺，原料价格便宜易得，同时还克服了所用试剂毒害大、反应条件苛刻、分离纯化困难以及不易工业化等缺点。

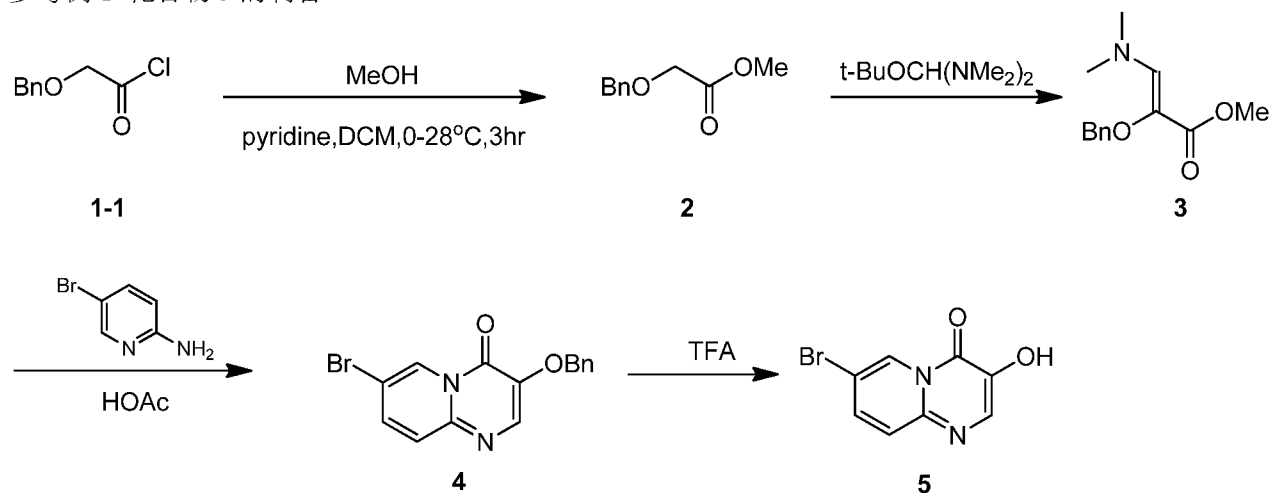
附图说明

图 1 为化合物 2 的晶型 I 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 2 为化合物 2 的晶型 I 的 DSC 谱图。
 图 3 为化合物 2 的晶型 I 的 TGA 谱图。
 图 4 为化合物 2 的晶型 II 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 5 为化合物 2 的晶型 II 的 DSC 谱图。
 图 6 为化合物 2 的晶型 II 的 TGA 谱图。
 图 7 为化合物 2 的晶型 III 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 8 为化合物 2 的晶型 III 的 DSC 谱图。
 图 9 为化合物 2 的晶型 III 的 TGA 谱图。
 图 10 为化合物 2 的晶型 IV 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 11 为化合物 2 的晶型 IV 的 DSC 谱图。
 图 12 为化合物 2 的晶型 IV 的 TGA 谱图。
 图 13 为化合物 2 的晶型 V 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 14 为化合物 2 的晶型 V 的 DSC 谱图。
 图 15 为化合物 2 的晶型 V 的 TGA 谱图。
 图 16 为化合物 2 的晶型 VI 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 17 为化合物 2 的晶型 VI 的 DSC 谱图。
 图 18 为化合物 2 的晶型 VI 的 TGA 谱图。
 图 19 为化合物 3 的晶型 VII 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 20 为化合物 3 的晶型 VII 的 DSC 谱图。
 图 21 为化合物 3 的晶型 VII 的 TGA 谱图。
 图 22 为化合物 4 的晶型 VIII 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 23 为化合物 4 的晶型 VIII 的 DSC 谱图。
 图 24 为化合物 4 的晶型 VIII 的 TGA 谱图。
 图 25 为化合物 1 的晶型 IX 的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。
 图 26 为化合物 1 的晶型 IX 的 DSC 谱图。
 图 27 为化合物 1 的晶型 IX 的 TGA 谱图。

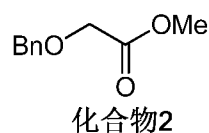
具体实施方式

为了更好的理解本发明的内容，下面结合具体实施例来做进一步的说明，但具体的实施例并不构成对本发明的内容的限制。

参考例 1 化合物 5 的制备

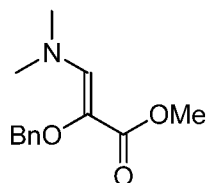


制备甲基 2-(苄氧基)乙酸酯 (2)



将二氯甲烷(960 毫升)加入到 3.0 升三口圆底烧瓶中,加入甲醇(197.6 克,247 毫升),加入吡啶(304.78 毫升, 311 摩尔),将混合物用冰水浴降温至 0℃,氮气保护下,将 2-苄氧基酰氯(300 克, 1.54 摩尔)滴加到圆底烧瓶中,控制温度在 0-10℃,滴加。滴加完后撤掉冰水浴,反应液在 20℃下搅拌 1.5 小时。取样检测,TLC(石油醚/乙酸乙酯=5/1)显示反应完全。将水(1.5 升)加入到圆底烧瓶中,搅拌 10 分钟,分层,收集有机层;有机层用 1.0 摩尔/升的稀盐酸(900 毫升×2)洗涤,分层,收集有机层;有机层用 20% 碳酸钠溶液(600 毫升)洗涤,分层,收集有机层,有机层用无水硫酸钠(150 克)干燥,过滤,滤液减压浓缩,得到无色油状产品(284 克, 1.53 摩尔,收率: 97%,纯度: 99%)。¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) ppm 7.37-7.32(m, 5H), 4.63(s, 2H), 4.11(s, 2H), 3.76(s, 3H); LCMS(ESI) m/z: 202.8(M+23)。

制备甲基 2-(苄氧基)-3-(二甲氨基)丙烯酸酯(3)

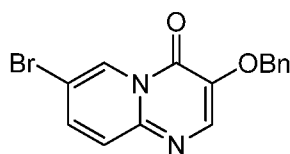


化合物 3

将甲基 2-(苄氧基)乙酸酯(506 克, 2.72 摩尔)加入到 3 升圆底烧瓶中,加入叔丁氧基二(二甲氨基)甲烷(569 克, 3.26 摩尔),控制反应温度在 90-100℃反应 14 小时。取样检测,TLC(PE/EA=5/1)显示反应完全。反应液冷却到 60℃,反应液用油泵浓缩,得到黄色油状产品(699 克,粗品),直接用于下一步反应。

¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) ppm 7.44-7.2(m, 2H), 7.37-7.28(m, 3H), 6.87(s, 1H), 4.72(s, 2H), 3.73(s, 3H), 2.98(s, 6H)。

制备 3-(苄氧基)-7-溴-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(4)

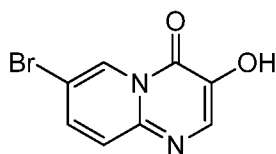


化合物 4

将甲基 2-(苄氧基)-3-(二甲氨基)丙烯酸酯(318 克, 1.35 摩尔)加入到 5 升圆底烧瓶中,加入醋酸(3 升),加入 2-氨基-5-溴吡啶(246 克, 1.35 摩尔)。控制反应液温度在 120-130℃,搅拌反应 14 小时。取样检测,LCMS 显示基本反应完全。反应液冷却到 60℃,反应液浓缩,蒸去溶剂,加入乙酸乙酯(750 毫升),搅拌 10min,过滤,向滤饼中加入乙酸乙酯(500 毫升),搅拌 10min 后过滤,滤饼用乙酸乙酯(150 毫升)淋洗,滤饼旋干得到黄色固体状化合物(319 克,纯度: 95%,收率: 67.79%)。

¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) d=9.13(d, J=2.0Hz, 1H), 8.05(s, 1H), 7.56(dd, J=2.0, 9.6 Hz, 1H), 7.46-7.42(m, 3H), 7.37-7.33(m, 3H), 5.30(s, 2H); LCMS(ESI) m/z: 332.6(同位素 M+1)。

制备 7-溴-3-羟基-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(5)



化合物 5

将三氟醋酸(1.2 升)加入到 3 升圆底烧瓶中,加入 3-(苄氧基)-7-溴-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮(313 克, 897.9 毫摩尔),控制反应液温度在 80-90℃,搅拌反应 2 小时。取样检测,LCMS 显示基本反应完全。反应液冷却到 60℃,浓缩,蒸去溶剂。加入乙酸乙酯(1.2 升),搅拌 60 分钟后过滤,向滤饼中加入乙酸乙酯(400 毫升)搅拌 60 分钟,过滤,滤饼 40℃减压干燥 70 小时,得到黄色固体状化合物(191 克,含量 95.6%,纯度 100%,收率 84.59%)。

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) d=9.92(br, 1H), 8.90(s, 1H), 8.07(s, 1H), 7.73(dd, J=2.0, 9.6 Hz, 1H), 7.53(d, J=9.6 Hz, 1H); MS m/z: 240.9(M+1), 242.8(同位素 M+1)。

实施例 1 化合物 1 的制备

制备 7-溴-3-(2-(二甲氨基)乙氧基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (6)

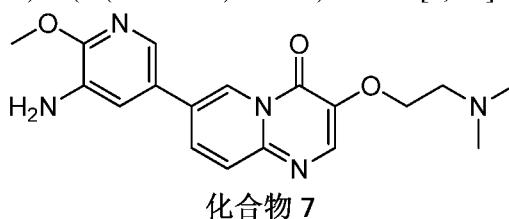


将 7-溴-3-羟基-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (300 克, 1.2 摩尔)、N,N-二甲基甲酰胺 (3 升) 加入圆底烧瓶中, 调节反应釜温度至 95-100°C, 将碳酸钾 (497.4 克, 3.6 摩尔) 加入反应瓶中, 搅拌 30 分钟, 然后将 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐分如下三批进行投料反应: 将 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐 (70.6 克, 0.49 摩尔) 加入反应瓶中, 搅拌 30 分钟, 将 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐 (70.6 克, 0.49 摩尔) 加入反应瓶中, 搅拌 30 分钟, 将 2-二甲氨基氯乙烷盐酸盐 (70.6 克, 0.49 摩尔) 加入反应瓶中, 搅拌 2-2.5 小时。

HPLC 监测反应完成后, 调节反应釜温度至 15±5°C。将反应液加入到水 (15 升) 中, 用二氯甲烷 (4.5 升×4) 萃取。合并有机相, 有机相 35±5°C 下减压浓缩至恒重。向浓缩所得物中加入正庚烷 (1.8 升), 在 15±5°C 下搅拌 15-16 小时。过滤, 滤饼在 35±5°C 下减压旋蒸, 得到绿色固体状产品 (280 克, 收率: 74.09%, 纯度: 98.22%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ=2.35 (s, 6 H), 2.78 (t, J=5.6Hz, 2H), 4.25 (t, J=6.0Hz, 2H), 7.45 (d, J=9.6Hz, 1H), 7.55 (dd, J=9.6Hz, 2H, 1H), 8.13 (s, 1H), 9.09 (d, J=2.0Hz, 1H); LCMS (ESI) m/z: 312 (同位素 M+1)。

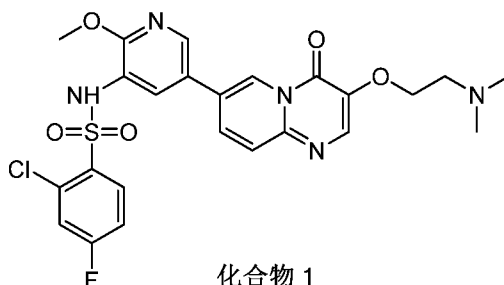
制备 7-(5-氨基-6-甲氧基嘧啶-3-基)-3-(2-(二甲氨基)乙氧基)-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (7)



将 7-溴-3-(2-(二甲氨基)乙氧基)-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (275 克, 0.87 摩尔)、2-甲氧基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼戊烷-2-基)吡啶-3-胺 (249 克, 0.96 摩尔)、1,4-二氧六环 (2.75 升)、水 (550 毫升) 和碳酸钾 (362 克, 2.62 摩尔) 依次加入反应瓶中, 鼓泡 30-60 分钟, 将 Pd(dppf)Cl₂ (19.2 克, 26 毫摩尔) 加入反应瓶中, 用氮气置换 5 次, 调节反应瓶温度至 95±5°C, 并在此温度下搅拌 2-2.5 小时。HPLC 监测反应结束后, 调节反应釜温度至 15±5°C。将反应液加到正庚烷 (6.6 升) 中, 温度调整至 15±5°C, 在此温度下搅拌 2-2.5 小时。过滤, 滤饼在 45±5°C 下减压旋干。向所得物中加入二氯甲烷/甲醇 (V/V=8/1, 2.75 升), 15±5°C 下搅拌 30-60 分钟, 过滤, 滤饼中加入二氯甲烷/甲醇 (V/V=8/1, 1.375 升), 15±5°C 下搅拌 30-60 分钟, 过滤, 滤饼用二氯甲烷/甲醇 (V/V=8/1, 1.375 升) 淋洗。合并两次滤液, 滤液 45±5°C 下减压浓缩。向浓缩残留物中加入二氯甲烷/甲醇 (V/V=2/1, 4.125 升), 搅拌溶解。加入硫氰尿酸 (13.93 克), 活性炭 (27.5 克), 15±5°C 下搅拌 15-16 小时。用硅藻土 (137.5 克) 过滤, 滤饼用二氯甲烷/甲醇 (V/V=2/1, 1.375 升×2) 淋洗。滤液 45±5°C 下减压浓缩。向浓缩残留物中加入甲醇 (1.1 升), 15±5°C 下搅拌 2-3 小时, 过滤, 滤饼用甲醇 (137.5 毫升) 淋洗, 滤饼在 45±5°C 下减压旋蒸, 得到黄色固体状产品 (270 克, 纯度: 97.98%, 收率: 84.24%)。

¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ=8.92 (d, J=1.6Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.04 (dd, J=9.6Hz, 2H, 1H), 7.80 (d, J=2Hz, 1H), 7.67 (d, J=9.6Hz, 1H), 7.27 (d, J=2.0Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.19 (t, J=6.0Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.66 (t, J=6.0Hz, 2H), 2.25 (s, 6H); LCMS (ESI) m/z: 356 (M+1)。

制备化合物 1



将 7-(5-氨基-6-甲氧基嘧啶-3-基)-3-(2-(二甲氨基)乙氧基)-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (265 克, 0.72 摩尔) 和吡啶 (2.65 升) 加入反应瓶中, 降温至 $5\pm 5^{\circ}\text{C}$, 向反应瓶中滴加 2-氯-4-氟苯磺酰氯 (252 克, 1.08 摩尔) 的吡啶 (504 毫升) 溶液, 滴加完毕, 调节反应液温度至 $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$, 在此温度下搅拌 2-3 小时。HPLC 监测反应结束后, 反应液在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下, 减压浓缩至化合物 7 的 2.5-3 倍重量。向浓缩所得物中加入二氯甲烷 (3.7 升), 在 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 30 分钟后在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩至化合物 7 的 2.5-3 倍重量。向浓缩所得物中加入二氯甲烷 (3.7 升), 在 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下, 打浆 2-3 小时。过滤, 收集滤饼, 滤饼在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下旋蒸至化合物 7 的 1.3-1.7 倍重量。向旋蒸所得物中加入二氯甲烷 (1.85 升), 在 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下, 打浆 2-3 小时。过滤, 收集滤饼, 滤饼在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下旋蒸至化合物 7 的 1.2-1.4 倍重量, 在 45°C 下真空干燥 3-4 小时至化合物 7 的 1.2-1.3 倍重量。向所得粗品加入乙腈 (2.12 升), 在 $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下打浆 15-16 小时。将打浆液冷却至 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, 过滤, 收集滤饼, 滤饼在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下旋蒸至化合物 7 的 1.1-1.2 倍重量。向旋蒸所得物加入乙腈 (1.9 升), 在 $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下打浆 15-16 小时。打浆液冷却至 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, 过滤, 滤饼在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下旋蒸至化合物 7 的 1.0-1.1 倍重量。向旋蒸所得物中加入甲醇 (5.3 升), 加入活性炭 (53g), 在 $75\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下, 搅拌 2-3 小时。用硅藻土 (132g) 过滤, 收集滤饼, 滤饼中加入二氯甲烷和甲醇的混合溶剂 (V/V=4/1, 7.95 升), 在 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 30-60 分钟。过滤, 合并两次滤液, 在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下浓缩至化合物 7 的 1.01-1.03 倍重量。向浓缩所得物加入水 (4.24 升) 和乙醇 (1.06 升), $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 5-10 分钟, 滴加饱和碳酸氢钠水溶液 (1.3 升), 并搅拌 2-3 小时。过滤, 滤饼在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下旋蒸至化合物 7 的 1.1-1.3 倍重量。向旋蒸所得物中加入乙醇 (1.59 升), 在 $75\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下打浆 15-16 小时。将打浆液冷却至 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, 过滤, 收集滤饼, 滤饼在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下旋干至化合物 7 的 0.89-0.92 倍重量。向旋蒸所得物中加入乙醇 (1.59 升), 在 $75\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下, 打浆 15-16 小时。将打浆液冷却至 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, 过滤, 收集滤饼, 滤饼在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下旋蒸至化合物 7 的 0.87-0.9 倍重量。向旋蒸所得物中加入水 (2.35 升), 在 $45\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 61 ± 1 小时。将混合液冷却至 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, 过滤。收集滤饼, 滤饼中加入水 (2.35 升), 在 $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下, 搅拌 2-3 小时, 过滤。收集滤饼, 滤饼在 60°C 下真空干燥 15-16 小时后过 60 目筛, 得到淡黄色固体状产品 (190g, 纯度: 98.33%, 产率 47.36%)。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6 - d) δ =2.96 (t, J =6.0Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 4.27 (t, J =5.2Hz, 2H), 7.32 (td, J =8.8, 2.8Hz, 1H), 7.60 (dd, J =8.4, 2.4Hz, 1H), 7.70 (d, J =9.2Hz, 1H), 7.75 (d, J =2.0Hz, 1H), 7.95-8.05 (m, 2H), 8.15 (d, J =1.6Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.85 (s, 1H); LCMS (ESI) m/z : 548 (M+1)。

实施例 2 化合物 1 的晶型 IX 的制备

将 7-(5-氨基-6-甲氧基嘧啶-3-基)-3-(2-(二甲氨基)乙氧基)-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (2.5g, 6.75mmol, 1.0eq) 溶于吡啶 (25mL) 中, 0°C 下滴加 2-氯-4-氟苯磺酰氯 (2.01g, 8.78mmol, 1.3eq), $10\text{-}20^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 16 小时。反应完毕, 将溶剂旋干得到粗品。粗品过柱 (DCM/MeOH: 10/1-4/1) 纯化。得到黄色固体状产品 (2.4g, 纯度 98.31%, 收率: 63.79%)。将上述黄色固体 (1.3g, 2.37mmol) 用制备 HPLC (中性) 分离。将制备 HPLC (中性) 分离回来的液体用 DCM (500mL \times 3) 萃取。有机相用无水硫酸钠 (100g) 干燥后过滤, 滤液旋干, 得到白色固体状产品, 为化合物 1 晶型 IX (970mg, 1.75mmol, 纯度 99%, 收率 73.94%)。

实施例 3 化合物 2 的晶型 I 的制备

向装有搅拌的 1.0L 三口圆底烧瓶 R1 中加入 7-(5-氨基-6-甲氧基嘧啶-3-基)-3-(2-(二甲氨基)乙氧基)-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (29.0g, 81.60mmol, 1.0eq) 和吡啶 (290mL)。将 R1 置于冰浴中冷却至 $0\text{-}5^{\circ}\text{C}$ 。向 R1 中滴加 2-氯-4-氟苯磺酰氯 (24.30g, 106.08mmol, 1.3eq) 的吡啶 (60mL) 溶液, 约 30 分钟滴加完毕, 反应自然升温至 20°C , 并搅拌反应 16 小时。反应完毕, 反应液减压浓缩除去吡啶, 得红色固体状粗品 80g。取上述粗品 64g 置于 1.0L 圆底烧瓶 R2 中, 向 R2 中加入二氯甲烷 (350mL), 将 R2 在 15°C 搅拌 2 小时, 过滤, 收集滤饼, 滤饼干燥得淡红色固体。固体中加入乙腈 (430mL), 将混合物于 85°C 回流 16 小时, 混合物冷却至 15°C , 并过滤, 滤饼干燥得淡红色固体 (33.4g, 产率 77%, 纯度 99.4%)。取上述固体 30g 置于 1L 圆底烧瓶 R3 中, 向 R3 中加入甲醇 (600mL)、活性炭 (6g, 20%)。混合物置于 70°C 油浴, 搅拌 12 小时。混合物趁热用硅藻土 (15g) 过滤。收集滤液并旋干, 得到黄色固体产品 (22.6g, 纯度 97.47%)。上述固体中加入乙腈 (150mL), 混合物置于 85°C 油浴搅拌 12 小时, 冷却至 20°C , 过滤, 收集滤饼, 滤饼干燥, 得到白色固体状目标产物化合物 2 的晶型 I (21g, 收率 44.3%, 纯度 100%)。经离子色谱测定, 化合物 2 中氯离子含量与化合物 1 的摩尔比为 1:1。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6 - d) δ =2.91 (s, 6H), 3.53 (t, 2H), 3.71 (s, 3H), 4.52 (t, 2H), 7.38 (m, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.97 (m, 2H), 8.16 (m, 1H), 8.45 (m, 2H), 8.98 (s, 1H)。

实施例 4 化合物 2 的晶型 II 的制备

取大约 50mg 的化合物 2 的晶型 I 加入 0.4mL 丙酮形成悬浊液。悬浊液样品置于恒温均匀仪上 (40°C)

振摇 2 天（避光）。残留的固体物离心分离，并在 40℃真空干燥箱中干燥过夜，得到化合物 2 的晶型 II。

实施例 5 化合物 2 的晶型 III 的制备

晶型 III 的制备过程同晶型 II，仅把溶剂丙酮改为异丙醇，得到化合物 2 的晶型 III。

实施例 6 化合物 2 的晶型 IV 的制备

晶型 IV 的制备过程同晶型 II，仅把溶剂丙酮改为乙酸乙酯，得到化合物 2 的晶型 IV。

实施例 7 化合物 2 的晶型 V 的制备

化合物 2 的晶型 I (2.0g, 3.42mmol) 置于 500mL 单口瓶 R1, 搅拌条件下加入 DCM/MeOH(2/1, 200mL) 将固体溶清。溶液 40℃减压除去溶剂, 得黄色固体 2.0g, 取 1g 固体置于 50mL 单口瓶, 并加入乙醇 (6mL), 混合物置于 80℃油浴搅拌 12 小时, 停止加热。搅拌条件下降温至 20℃, 过滤, 滤饼干燥, 得到化合物 2 的晶型 V。

实施例 7 化合物 2 的晶型 VI 的制备

向装有机械搅拌的 2.0L 三口圆底烧瓶 R1 中加入 7-(5-氨基-6-甲氧基嘧啶-3-基)-3-(2-(二甲氨基)乙氧基)-吡啶并[1,2-a]嘧啶-4-酮 (70.0g, 222.90mmol, 1.0eq, 纯度 99.4%) 和吡啶 (700mL), 将 R1 置于冰浴中冷却至 0-5℃。向 R1 中滴加 2-氯-4-氟苯磺酰氯 (70.81g, 293.67mmol, 1.5eq, 纯度 95%) 的吡啶 (140mL) 溶液, 约 30 分钟滴加完毕。R1 置于 30℃油浴, 搅拌反应 2 小时。反应完毕, 反应液减压浓缩除去溶剂吡啶得红色固体粗品 (200g)。残余物中加入二氯甲烷 (1.0L), 并在 20℃搅拌 3 小时。过滤, 收集滤饼。滤饼中加入乙腈 (1.2L), 反应液在 85℃回流 12 小时, 反应液冷却至 20℃, 过滤并收集滤饼, 滤饼干燥得固体 (92g)。滤饼加甲醇 (2L)、活性炭 (14g), 回流搅拌 3 小时, 用硅藻土 (40g) 趁热过滤, 并用 500mL 淋洗, 滤液 40℃减压旋干 (83g)。固体中加乙腈 (800mL), 混合物在 85℃回流过夜, 混合液冷却至 20℃, 过滤, 滤饼干燥得 77g 白色固体。取 72g 白色固体, 用甲醇溶清并旋干, 得到化合物 2 的晶型 VI。

实施例 8 化合物 3 的晶型 VII 的制备

将化合物 1 (997.34mg, 1.82mmol, 1.00eq) 置于 5mL 玻璃瓶中, 向瓶中加入乙醇/水 (7.5mL/2.5mL), 溶液在室温 (15℃) 下搅拌 0.1 小时, 有大量固体未溶。向混合液中加入马来酸 (211.25mg, 1.82mmol, 1.00eq), 溶液在室温 (15℃) 下搅拌 18 小时, 固体全部溶解, 成黄色溶液。将此溶液在 40℃下减压旋至 2mL, 加入 EA (20mL), 搅拌 0.5 小时, 过滤, 滤饼 40℃减压旋干, 得到化合物 3 晶型的 VII。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.94 (s, 6H) 3.51 - 3.56 (m, 2H) 3.71 (s, 3H) 4.36 - 4.59 (m, 2H) 6.03 (s, 2H) 7.18 - 7.48 (m, 1H) 7.65 - 7.90 (m, 2H) 7.92 - 8.09 (m, 2H) 8.17 (dd, *J*=9.29, 1.76Hz, 1H) 8.35 - 8.55 (m, 2H) 8.99 (s, 1H)。

实施例 9 化合物 4 的晶型 VIII

将化合物 1 (997.34mg, 1.82mmol, 1.00eq) 置于 5mL 玻璃瓶中, 向瓶中加入乙醇/水 (7.5mL/2.5mL), 溶液在室温 (15℃) 下搅拌 0.5 小时, 有大量固体未溶。向混合液中加入柠檬酸 (382.45mg, 1.82mmol, 1.00eq), 溶液在室温 (15℃) 下搅拌 18 小时, 反应瓶中为乳白色泥浆。将此混合液在 40℃下减压旋至 2mL, 加入 EA (20mL), 搅拌 0.5 小时, 过滤, 滤饼 40℃减压旋干, 得到化合物 4 的晶型 VIII。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.56-2.68 (m, 4H) 2.76 (s, 6H) 3.31 (m, 2H) 3.72 (s, 3H) 4.37 - 4.40 (m, 2H) 7.35-7.37 (m, 1H) 7.71 - 7.78 (m, 2H) 7.91 - 7.95 (m, 1H) 7.95-8.09 (m, 1H) 8.11-8.13 (m, 1H) 8.36 - 8.37 (m, 2H) 8.96 (d, *J*=1.6, 1H)

试验例 1 化合物 1 的晶型 IX 在不同溶剂中的稳定性试验

取适量的化合物 1 的晶型 IX 多份, 分别加入 0.3-0.4mL 的下表中的单一或混合溶剂, 40℃条件下搅拌。搅拌 2 天后, 离心样品。收集所有样品中的固体, XRPD 检测其晶型状态。结果见表 10。

表 10 游离碱晶型 IX 在不同溶剂中的稳定性实验

序号	溶剂	外观 (2 天)	结果
1	甲醇	混悬液	晶型 IX
2	乙醇	混悬液	晶型 IX
3	异丙醇	混悬液	晶型 IX
4	丙酮	混悬液	晶型 IX

5	乙腈	混悬液	晶型IX
6	四氢呋喃	混悬液	晶型IX
7	乙酸乙酯	混悬液	晶型IX
8	甲醇-水 (3:1)	混悬液	晶型IX
9	乙醇-水 (3:1)	混悬液	晶型IX
10	丙酮-水 (1:2)	混悬液	晶型IX
11	异丙醇-水 (1:1)	混悬液	晶型IX

试验例 2 化合物 1 的晶型IX在高温、高湿及强光照条件下的固体稳定性试验

称取化合物 1 的晶型IX样品约 10mg，置于玻璃样品瓶的底部，摊成薄薄一层。60℃及室温/92.5%RH 条件下放置的样品用铝箔纸封瓶口，并在铝箔纸上扎些小孔，保证样品能与环境空气充分接触；强光照（5Klx）条件下放置的样品用螺纹瓶盖密封。另取 15mg 晶型IX样品，按上述方法放样，用于检测样品晶型。不同条件下放置的样品于第 5 天、第 10 天取样检测，检测结果与第 0 天的初始检测结果进行比较，试验结果见下表 11 所示：

表 11 化合物 1 晶型的IX的固体稳定性试验

试验条件	时间点 (天)	外观	晶型	含量 (%)	总杂质 (%)
-	0	白色粉末	晶型IX	101.02	0.32
高温 60℃ (敞口)	5	白色粉末	晶型IX	100.64	0.32
	10			100.55	0.33
室温/92.5%RH (敞口)	5	白色粉末	晶型IX	101.05	0.32
	10			101.16	0.32
光照 5Klx (密闭)	5	白色粉末	晶型IX	100.43	0.31
	10			101.10	0.32

实验结论：本发明晶型稳定性好，易于成药。

试验例 3 体外酶活性测试

ADP-Glo 实验方法一

化合物稀释：

3 倍梯度稀释待测化合物，共 10 个浓度点（10000nM 到 0.5nM）。

实验方法：

转移 50nL 本发明的待测化合物至反应板 (PerkinElmer #6007299) 中，加入 3μL 酶/底物混合物 (0.33nM PI3Kalpha, Millipore #14-602-K/166.5μM PIP2)，孵育 20min 后加入 2μL ATP 溶液 (100μM) 起始反应，室温反应 2 小时后，加入 5μL ADP-Glo 试剂终止激酶反应，室温孵育 60 分钟完全消化剩余未反应 ATP，加入 10μL 激酶检测试剂，室温孵育 40 分钟后，在 Envision 上读取荧光。PIP2、ATP、ADP-Glo 试剂及激酶检测试剂均来自 ADP-Glo 激酶检测试剂盒 (Promega #V1792)。

数据分析：

采用标准 4 参数拟合法计算 IC₅₀ (Model 205, XL-fit, iDBS)。

本发明的待测化合物对 mTOR 激酶活性分别通过以下测试方法进行测试。

反应缓冲液：20mM Hepes (pH 7.5)，10mM MgCl₂，2mM MnCl₂，1mM EGTA，0.02% Brij35，0.02mg/ml BSA，0.1mM Na₃VO₄，2mM DTT，2%DMSO。

反应用酶：在昆虫细胞中表达的 N-末端带 GST 标记的人源重组 mTOR 片段（氨基酸 1360-2549，分子量=163.9kDa）

反应用底物：在细菌中表达的 N-末端带 His 标记的人源重组全长 4EBP1（分子量=13.6kDa）

反应条件：3μM 4EBP1 和 10μM ATP

反应步骤：

1. 在新鲜制备的反应缓冲液中加入反应底物和其它反应因子。
2. 将激酶加入底物反应液中，轻柔地混合。
3. 利用 Acoustic 技术 (Echo550; nanoliter rang) 将溶解在 100% DMSO 的化合物转移入激酶反应液中，在室温下孵育 20 分钟。
4. 在反应体系中加入合适浓度的 ³²P-ATP。
5. 室温中孵育两个小时。
6. 利用 P81 filter-binding 方法检测激酶活性。

实验结果见表 12。

表 12 体外酶活性测试结果一

化合物	PI3K (p110 α) 酶活性 IC ₅₀	mTOR 酶活性 IC ₅₀
化合物 1	A	D

注: A \leq 1nM; 200nM<D。

结论: 化合物 1 对 PI3K (p110 α) 的抑制作用显著, 但对 mTOR 的抑制作用较弱。

ADP-Glo 实验方法二

实验步骤

- 1) 使用 Labcyte 公司的 Echo 稀释并转移 50 nL 化合物至检测板, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒。
- 2) 配制激酶/脂质底物混合溶液和激酶反应缓冲溶液/脂质底物混合溶液, 在检测板的 3-24 列加入激酶/脂质底物混合溶液, 3 μ L 每孔, 在第 1-2 列加入激酶反应缓冲溶液/脂质底物混合溶液, 3 μ L 每孔, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒。
- 3) 配制 ATP 溶液, 在检测板加入 ATP 溶液, 2 μ L 每孔, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒, 振板机 2 档位置振荡混匀 1 分钟, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒, 将检测板在 23 $^{\circ}$ C 孵育 120 分钟。
- 4) 配制 ADP-Glo $^{\circledR}$ 试剂, 在检测板加入 ADP-Glo $^{\circledR}$ 试剂, 5 μ L 每孔, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒, 振板机 2 档位置振荡混匀 1 分钟, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒, 将检测板在 23 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟。
- 5) 配制激酶检测试剂, 在检测板加入激酶检测试剂, 10 μ L 每孔, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒, 振板机 2 档位置振荡混匀 1 分钟, 以 1000 转/分钟的速度离心 10 秒, 将检测板在 23 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 在多标记检测仪 Envision 上读板。

数据分析

IC₅₀ 结果由 IDBS 公司的 XLfit5 (205 公式) 进行分析。

采用化合物 BKM-120 作为阳性对照药物, 采用上述相同的实验过程进行了实验和分析。

实验结果

化合物 1 对 PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ 、PI3K γ 活性抑制的 IC₅₀ 值分别为 0.6 \pm 0.2 nM、9.9 \pm 2.7 nM、0.5 \pm 0.1 nM 和 7.0 \pm 0.9 nM (n = 2)。与之相比, 阳性对照药物 BKM120 (PI3K 抑制剂 Buparlisib) 对 PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ 、PI3K γ 活性抑制的 IC₅₀ 值分别为 24.7 \pm 4.7 nM、241.6 \pm 50.6 nM、68.8 \pm 25.0 nM、111.9 \pm 15.2 nM。

结论: 化合物 1 对 PI3K 的四种亚型均展现了很高的抑制活性。

试验例 4 体外细胞活性测试

实验步骤和方法:

1. 将 MCF-7 细胞以每孔 2.5 \times 10⁴ 个的密度接种进 96 孔板中(使用的培养液需为含 10%FBS 的完整培养液)。
2. 第二天将孔中的培养液抽走, 将某一个浓度(初步筛选)或一系列浓度(IC₅₀ 测试)的本发明的待测化合物溶解在不含血清的培养液中, 加入 96 孔板培养细胞 2 小时。
3. 把胰岛素溶解在不含血清的培养液中, 加入细胞培养 30 分钟, 胰岛素终浓度为 10 微克/毫升。
4. 等待反应时, 按如下方法准备裂解液:
 - a) 增强液 (Enhancer Solution) 需要提前从冰箱里取出融化。
 - b) 将增强液用 5X 的裂解缓冲液 (Lysis Buffer) 稀释 10 倍, 制备成浓缩裂解液。
 - c) 将浓缩裂解液用双蒸水稀释 5 倍, 制成裂解液。
5. 将孔内的培养液吸净, 并用 PBS 迅速润洗一次。
6. 每个孔加入 150 μ L 新鲜制备的裂解液, 然后室温震荡 10 分钟。
7. 确认所有细胞都已脱落后, 将裂解液同细胞碎片一起转移到 1.5 毫升管内。
8. 涡旋几次, 使裂解液和细胞完全混合, 然后将混合液在 4 $^{\circ}$ C 用 12000g 离心 10 分钟。
9. 计算出需要的 ELISA-one 微板条的数目。把多出的微板条从框架上取下, 放回储存袋中密封好。使用微板条之前, 先用 200 μ L 双蒸水润洗一下每个孔, 以除去上面的防腐剂。
10. 往每个孔中加入 50 μ L 的抗体混合液。(抗体混合液是通过将媒介抗体试剂和酶标抗体试剂等比例混合而成, 注意制备抗体混合液时不要涡旋)
11. 向 ELISA-One 微板的每个孔中加入 25 μ L 细胞裂解产物。用粘性封口膜盖住微板, 室温下在微板震荡仪上孵育 1 小时。
12. 每个孔用 150 μ L 1X 清洗缓冲液洗 3 次。最后一次洗完后, 将孔内的清洗缓冲液抽净。如果需要, 可让 1X 清洗缓冲液在微板中停留最长 30 分钟, 以留出时间准备底物混合液。
13. 底物混合液应随用随配。向每个孔内加入 100 μ L 底物混合液, 然后用锡箔纸封住微板, 室温下在

微板震荡仪上孵育 10 分钟。

14. 向每个孔内加入 10 μ L 终止液，然后在微板震荡仪上稍微（5-10 秒）混匀一下。

15. 装配好相应的 ELISA-One 滤镜组，读出荧光信号强度。

实验结果见表 13。

表 13 体外细胞活性测试结果

化合物	细胞活性 IC ₅₀
化合物 1	A

注：A \leq 50nM。

试验例 5 体内药效实验部分

研究受试药物在人源结肠癌 CO-04-0032 动物模型以及胃癌 ST-02-0013 动物模型是否具有体内药效。有关实验中对动物饲养，饲料成分，实验观察，实验指标，实验终止以及数据分析的描述如下：

动物饲养：动物到达后在实验环境饲养 3-7 天后方能开始实验。动物在 SPF 级动物房以 IVC（独立送风系统）笼具饲养（每笼 5 只）。所有笼具、垫料及饮水在使用前均需灭菌，灭菌消毒记录见附件。所有实验人员在动物房操作时应穿着防护服和乳胶手套。每笼动物信息卡应注明笼内动物数目，性别，品系，接收日期，给药方案，实验编号，组别以及实验开始日期。笼具、饲料及饮水每周更换两次。饲养环境及光照情况如下：

温度：20~26 °C

湿度：40~70%

光照周期：12小时光照，12小时无光照

饲料成分：饲料符合实验动物食物鉴定标准。污染物最高含量在可控范围内并由生产厂家负责例检。饮水采用高压灭菌的饮用水。

动物分组：给药前称重动物，测量瘤体积。根据瘤体积随机分组（随机区组设计）。

观察：本实验方案的拟定及任何修改将在上海药明康德实验动物伦理委员会(IACUC)进行评估核准后方可实行。实验动物的使用及福利将遵照国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC)的规则执行。每天监测动物的健康状况及死亡情况，例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响如行为活动，摄食摄水量，体重变化（每周测量两次体重），外观体征或其它不正常情况。基于各组动物数量记录组内动物死亡数和副作用，相关记录见附件。

实验指标：实验指标是考察肿瘤生长是否被抑制、延缓或治愈。每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为： $V = 0.5a \times b^2$ ， a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。化合物的抑瘤疗效(TGI)用 T-C (天)和 T/C (%)评价。T-C (天)反映肿瘤生长延迟指标，T 表示用药组肿瘤达到预先设定体积（如 1,000 mm³）所用的平均天数，C 表示对照组肿瘤达到相同体积所用的平均天数。T/C(%)的百分比值反映肿瘤生长抑制率，T 和 C 分别表示给药组和对照组在某一天的瘤重（瘤体积）。

肿瘤生长抑制率用下列公式计算： $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ，其中 T_i 为某一天某给药组的平均肿瘤体积， T_0 为此给药组在开始给药时的平均肿瘤体积； V_i 为某一天（与 T_i 同一天）溶媒对照组的平均肿瘤体积， V_0 为溶媒对照组在开始给药时的平均肿瘤体积。在实验结束后将检测肿瘤重量，并计算 T/C 百分比，T 和 C 分别表示给药组和溶媒对照组的瘤重。

实验终止：若动物健康状况持续恶化或瘤体积超过 2,000mm³，或有严重疾病，或疼痛，须处以安乐死。有以下情况者，通知兽医并处以安乐死：

明显消瘦，体重降低大于20%；

不能自由取食和饮水；

对照组瘤体积平均值达到2,000 mm³，实验终止。

动物出现以下临床表现且持续恶化：

- 立毛
- 弓背
- 耳、鼻、眼或足色发白
- 呼吸仓促
- 抽搐
- 连续腹泻
- 脱水
- 行动迟缓
- 发声

数据分析：三组或多组间比较用 one-way ANOVA。如果 F 值有显著性差异，应在 ANOVA 分析之后再
进行多重比较。用 SPSS 17.0 进行所有数据分析。 $p < 0.05$ 认为有显著性差异。

受试药对人源结肠癌 CO-04-0032 皮下异种移植肿瘤模型的体内药效学研究：

实验设计：

人源移植肿瘤模型建立：人源结肠癌 CO-04-0032 模型最初来源于临床外科手术中切除的肿瘤样本，标本的采集使用严格遵守国家、医院以及公司有关伦理的法律法规，包括病人的知情同意。模型建立流程严格按照公司内部 SOP。传代命名规则为肿瘤样本接种于裸鼠后为 P0 代，继续传代为 P1 代，以此类推，复苏的标本命名为 FP。本次实验中使用的肿瘤组织是 FP4 代。

动物：BALB/c 裸小鼠，雌性，6-8 周龄，体重 18-20 克。由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

肿瘤接种：将体积约 30mm^3 CO-04-0032 肿瘤块皮下接种于每只小鼠的右后背，肿瘤平均体积达到约 $100\text{-}200\text{mm}^3$ 时开始分组给药。

实验结果：给予本发明的化合物 1（包括其晶型 IX），15-30 天以来，肿瘤体积几乎未增大，同时相对于阳性对照药物 BKM120，本发明的化合物 1（包括其晶型 IX）对于结肠癌具有更为优异的抗肿瘤活性。

受试药对人胃癌 ST-02-0013 皮下异种移植小鼠模型的体内药效学研究

实验设计：

人源移植肿瘤模型建立：ST-02-0013 的 PDX 模型最初来源于外科手术割除的临床样本，植入裸鼠体内定义为 P0 代。下一代植入 P0 代肿瘤被定义为 P1 代，以及之后在小鼠体内的持续代代移植，可依此类推。FP2 代肿瘤复苏得到 FP3 代肿瘤。FP3 代肿瘤传代得到 FP4 代肿瘤。FP4 代肿瘤组织将用于该研究。

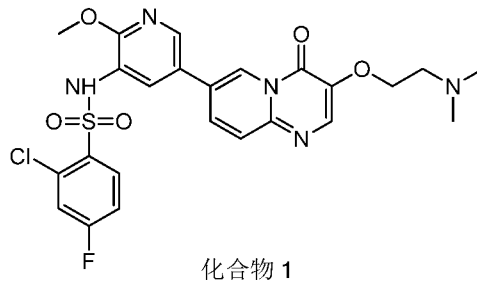
动物：BALB/c 裸小鼠，雌性，6-8 周龄，体重 18-22 克。由上海灵畅生物科技有限公司提供。

肿瘤接种：将体积约 30mm^3 ST-02-0013 FP4 代肿瘤组织皮下接种于每只小鼠的右后背，肿瘤平均体积达到约 $150\text{-}200\text{mm}^3$ 时开始分组给药。

实验结果：给予本发明的化合物 1（包括其晶型 IX），15-30 天以来，肿瘤体积几乎未增大，同时相对于阳性对照药物 BKM120，本发明的化合物 1（包括其晶型 IX）对于胃癌具有更为优异的抗肿瘤活性。

权利要求书

1. 如下式所示的化合物 1 的晶型 IX,



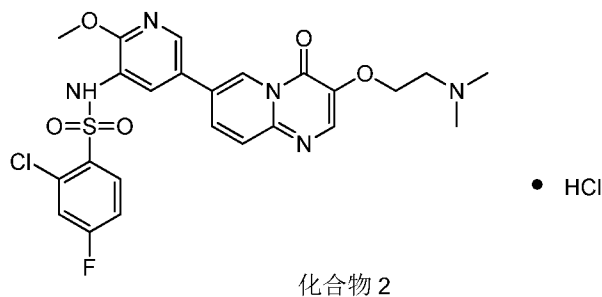
其特征在于, 在 X-射线衍射图谱中, 具有 $2\theta = 7.947^\circ$ 、 10.073° 、 14.531° 、 19.187° 、 21.237° 、 24.055° 、 25.497° 的衍射峰; 典型地具有 $2\theta = 7.947^\circ$ 、 10.073° 、 11.970° 、 13.468° 、 14.531° 、 15.911° 、 19.187° 、 21.237° 、 24.055° 、 25.497° 的衍射峰; 更典型地具有 $2\theta = 7.947^\circ$ 、 10.073° 、 11.970° 、 13.468° 、 14.531° 、 15.911° 、 19.187° 、 19.561° 、 21.237° 、 23.446° 、 24.055° 、 25.497° 、 27.074° 的衍射峰。

2. 如权利要求 1 所述的晶型 IX, 其特征在于, 其 XRPD 图谱解析数据如下:

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	6.014	2.5	24	24.847	6.6
2	7.947	29.0	25	25.497	60.4
3	10.073	54.2	26	26.265	1.3
4	11.970	23.3	27	27.074	28.0
5	13.053	5.9	28	27.448	10.1
6	13.468	14.4	29	27.862	22.8
7	14.531	62.5	30	28.081	15.6
8	14.828	49.7	31	29.005	4.5
9	15.911	31.1	32	29.445	3.3
10	17.369	21.8	33	30.171	13.0
11	17.569	26.1	34	31.014	1.5
12	17.941	4.5	35	31.437	0.7
13	18.377	1.6	36	31.963	19.5
14	19.187	55.2	37	32.381	23.5
15	19.561	41.3	38	33.937	9.1
16	19.855	61.5	39	34.565	4.7
17	20.233	22.2	40	35.218	6.8
18	21.237	62.8	41	36.403	5.8
19	21.984	22.0	42	36.897	3.7
20	22.373	3.2	43	38.103	7.1
21	23.073	2.2	44	38.605	6.8
22	23.446	32.9	45	39.502	2.6
23	24.055	100.0			

3. 如权利要求 1 或 2 所述的晶型 IX, 其特征在于, 其 XRPD 图谱如图 25 所示。

4. 下式所示的化合物 2



5. 如权利要求 4 所述的化合物 2 的晶型 I, 其特征在于, 在 X-射线衍射图谱中, 具有 $2\theta = 10.154^\circ$ 、 12.285° 、 14.511° 、 16.328° 、 24.311° 、 26.188° 的衍射峰; 典型地具有 $2\theta = 7.270^\circ$ 、 10.154° 、 12.285° 、 13.206° 、 14.511° 、 16.328° 、 24.311° 、 26.188° 、 27.724° 的衍射峰; 更典型地具有 $2\theta = 7.270^\circ$ 、 10.154° 、 12.285° 、 13.206° 、 14.511° 、 16.328° 、 19.008° 、 20.702° 、 21.259° 、 24.311° 、 26.188° 、 27.724° 的衍射峰; 最典型的具有如下的 XRPD 图谱解析数据:

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	7.270	18.4	19	23.567	12.7
2	10.154	80.7	20	24.311	32.1
3	11.745	1.5	21	24.903	14.3
4	12.285	39.9	22	25.318	6.8
5	13.206	31.7	23	26.188	55.8
6	14.511	100.0	24	27.724	31.3
7	15.119	8.1	25	28.809	12.4
8	15.771	4.6	26	29.225	3.7
9	16.328	40.2	27	30.288	14.2
10	16.861	2.7	28	30.584	7.4
11	17.568	10.7	29	31.196	5.5
12	18.653	9.9	30	31.531	20.5
13	19.008	18.0	31	31.767	20.5
14	19.919	7.5	32	32.735	23.6
15	20.702	14.1	33	33.860	1.8
16	21.259	14.0	34	35.356	9.4
17	21.712	5.4	35	36.585	1.4
18	23.169	86.9	36	38.236	6.7

6. 如权利要求 4 所述的化合物 2 的晶型 II, 其特征在于, 在 X-射线衍射图谱中, 具有 $2\theta = 6.524^\circ$ 、 7.782° 、 13.895° 、 15.495° 、 17.487° 、 19.322° 的衍射峰; 典型地具有 $2\theta = 6.524^\circ$ 、 7.782° 、 11.628° 、 13.895° 、 15.495° 、 17.487° 、 19.322° 、 20.962° 、 23.269° 的衍射峰; 更典型地具有 $2\theta = 6.524^\circ$ 、 7.782° 、 11.628° 、 13.895° 、 15.495° 、 17.487° 、 19.322° 、 20.962° 、 23.269° 、 24.257° 、 26.009° 、 31.533° 的衍射峰; 最典型的具有如下的 XRPD 图谱解析数据:

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	6.524	11.3	22	20.962	11.4
2	7.782	22.3	23	21.474	3.5
3	8.879	1.0	24	23.269	10.9
4	9.977	4.7	25	23.481	9.6
5	10.494	4.4	26	24.257	13.8
6	11.628	6.7	27	24.515	4.9
7	11.804	7.5	28	25.515	8.0
8	12.122	4.5	29	26.009	13.9
9	12.973	4.7	30	26.818	8.4
10	13.406	1.1	31	27.095	5.1
11	13.895	6.7	32	27.350	3.3
12	15.495	100.0	33	27.648	5.5
13	16.423	3.0	34	27.922	9.0
14	16.860	1.9	35	28.477	2.5
15	17.131	2.0	36	28.810	2.9
16	17.487	41.7	37	29.343	3.4
17	17.807	4.7	38	31.533	16.1
18	18.181	1.8	39	32.733	6.0
19	18.749	3.3	40	33.263	2.9
20	19.322	22.3	41	35.260	4.9
21	19.740	1.9	42	37.173	5.8

7. 如权利要求 4 所述的化合物 2 的晶型 III, 其特征在于, 在 X-射线衍射图谱中, 具有 $2\theta = 6.979^\circ$ 、 9.939° 、 14.392° 、 16.107° 、 20.982° 、 25.990° 的衍射峰; 典型地具有 $2\theta = 6.187^\circ$ 、 6.979° 、 9.939° 、 11.910° 、

14.392°、16.107°、20.982°、22.755°、25.990°的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 6.187^\circ$ 、 6.979° 、 9.939° 、 11.910° 、 13.148° 、 14.392° 、 16.107° 、 20.982° 、 22.755° 、 23.975° 、 25.990° 、 29.006° 的衍射峰；最典型的具有如下的XRPD图谱解析数据：

编号	20角	相对强度%	编号	20角	相对强度%
1	6.187	29.0	15	22.755	25.0
2	6.979	46.3	16	23.436	6.8
3	9.939	80.4	17	23.975	10.9
4	10.425	19.8	18	24.811	8.7
5	11.910	38.0	19	25.990	86.1
6	12.206	29.4	20	27.224	2.9
7	13.148	12.2	21	29.006	25.6
8	14.392	100.0	22	29.522	15.5
9	16.107	66.4	23	30.979	5.3
10	17.531	9.5	24	31.373	8.5
11	18.648	16.3	25	31.966	9.7
12	20.665	3.7	26	32.556	29.3
13	20.982	37.9	27	35.061	11.2
14	21.772	4.4	28	35.527	5.6

8. 如权利要求4所述的化合物2的晶型IV，其特征在于，在X-射线衍射图谱中，具有 $2\theta = 6.388^\circ$ 、 7.278° 、 11.076° 、 15.454° 、 21.256° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 6.388^\circ$ 、 7.278° 、 11.076° 、 12.102° 、 15.454° 、 16.091° 、 18.912° 、 21.256° 的衍射峰；更典型地具有 $2\theta = 6.388^\circ$ 、 7.278° 、 11.076° 、 12.102° 、 15.103° 、 15.454° 、 16.091° 、 18.912° 、 21.256° 、 21.846° 的衍射峰；最典型的具有如下的XRPD图谱解析数据：

编号	20角	相对强度%	编号	20角	相对强度%
1	6.388	100.0	20	21.846	14.6
2	7.278	34.3	21	24.093	6.3
3	10.498	0.3	22	24.651	8.7
4	11.076	20.0	23	24.925	0.9
5	12.102	7.4	24	25.502	6.8
6	12.732	1.7	25	25.830	7.6
7	13.447	1.7	26	26.466	5.3
8	14.513	5.5	27	26.819	12.5
9	15.103	19.3	28	27.214	14.1
10	15.454	27.6	29	29.226	6.8
11	16.091	24.8	30	30.069	0.9
12	17.299	1.6	31	30.507	4.8
13	17.906	8.6	32	31.137	3.1
14	18.552	6.2	33	31.724	2.3
15	18.912	21.7	34	32.965	3.0
16	19.107	18.6	35	34.353	1.7
17	20.051	2.1	36	34.906	3.7
18	20.998	20.8	37	36.798	4.4
19	21.256	52.5			

9. 如权利要求4所述的化合物2的晶型V，其特征在于，在X-射线衍射图谱中，具有 $2\theta = 7.116^\circ$ 、 14.137° 、 15.911° 、 22.223° 、 24.610° 的衍射峰；典型地具有 $2\theta = 7.116^\circ$ 、 14.137° 、 15.911° 、 21.691° 、 22.223° 、 24.213° 、 24.610° 、 28.987° 的衍射峰；最典型的具有如下的XRPD图谱解析数据：

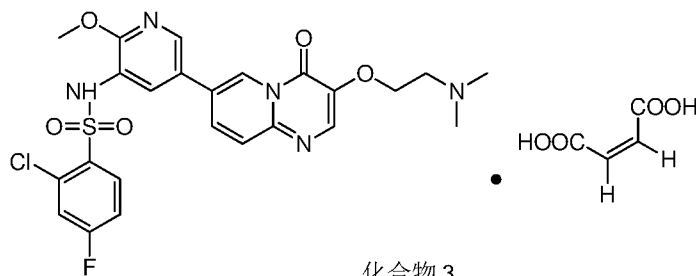
编号	20角	相对强度%	编号	20角	相对强度%
1	7.116	100.0	19	22.223	12.0
2	10.631	2.6	20	23.525	0.7
3	11.553	3.8	21	24.213	7.2
4	12.000	0.8	22	24.610	10.2
5	12.950	0.6	23	26.166	7.3
6	13.703	3.3	24	26.956	6.5
7	14.137	13.7	25	27.369	4.0

8	14.473	3.2	26	27.823	2.6
9	15.911	10.8	27	28.042	1.0
10	16.304	0.4	28	28.987	14.2
11	17.078	4.5	29	30.825	5.2
12	17.664	1.6	30	31.611	1.8
13	18.004	2.3	31	33.368	1.6
14	18.199	3.4	32	35.416	7.3
15	18.380	2.1	33	35.651	13.3
16	19.050	1.9	34	36.326	1.7
17	21.237	2.4	35	37.980	2.1
18	21.691	9.5			

10. 如权利要求 4 所述的化合物 2 的晶型 VI, 其特征在于, 在 X-射线衍射图谱中, 具有 $2\theta = 5.775^\circ$ 、 11.770° 、 14.415° 、 15.753° 、 22.518° 、 26.623° 的衍射峰; 典型地具有 $2\theta = 5.775^\circ$ 、 11.770° 、 14.415° 、 15.753° 、 17.132° 、 20.939° 、 22.518° 、 26.623° 的衍射峰; 更典型地具有 $2\theta = 5.775^\circ$ 、 11.770° 、 14.415° 、 15.753° 、 17.132° 、 20.939° 、 22.518° 、 23.745° 、 26.623° 、 31.295° 的衍射峰; 最典型的具有如下的 XRPD 图谱解析数据:

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	5.775	100.0	13	22.518	63.9
2	7.795	5.6	14	23.745	24.4
3	11.770	58.9	15	25.969	14.2
4	12.869	3.8	16	26.623	40.8
5	13.841	2.5	17	27.136	9.2
6	14.415	43.6	18	27.703	9.2
7	15.753	79.9	19	28.116	9.1
8	16.724	9.3	20	29.538	20.2
9	17.132	29.7	21	31.295	61.4
10	17.825	5.1	22	31.882	18.2
11	20.070	10.3	23	34.211	19.1
12	20.939	31.9	24	34.705	18.9

11. 下式所示化合物 3,

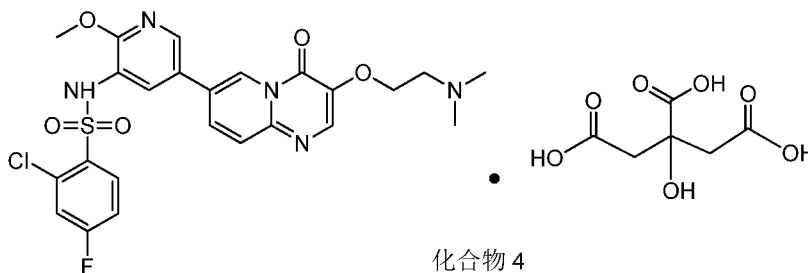


12. 如权利要求 11 所述的化合物 3 的晶型 VII, 其特征在于, 在 X-射线衍射图谱中, 具有 $2\theta = 6.325^\circ$ 、 12.677° 、 15.813° 、 21.395° 、 22.519° 、 27.133° 的衍射峰; 典型地具有 $2\theta = 6.325^\circ$ 、 12.677° 、 13.251° 、 15.813° 、 18.954° 、 21.395° 、 22.519° 、 25.161° 、 27.133° 的衍射峰; 更典型地具有 $2\theta = 6.325^\circ$ 、 12.677° 、 13.251° 、 15.813° 、 16.565° 、 18.954° 、 21.395° 、 22.519° 、 24.117° 、 25.161° 、 26.405° 、 27.133° 的衍射峰; 最典型的具有如下的 XRPD 图谱解析数据:

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	6.325	84.5	15	22.953	39.9
2	12.677	56.5	16	23.820	24.1
3	13.251	39.1	17	24.117	24.2
4	13.642	35.5	18	25.161	47.1
5	14.768	10.0	19	25.855	11.4
6	15.813	51.3	20	26.405	41.6
7	16.565	23.8	21	27.133	100.0
8	17.073	17.0	22	28.551	17.7

9	17.316	4.7	23	29.265	16.7
10	18.038	13.3	24	31.190	7.5
11	18.954	32.1	25	32.873	7.3
12	20.582	4.1	26	33.581	21.2
13	21.395	79.3	27	35.155	12.1
14	22.519	80.4			

13. 下式所示化合物 4,



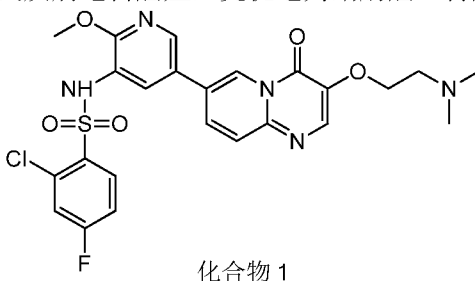
14. 如权利要求 13 所述的化合物 4 的晶型 VIII, 其特征在于, 在 X-射线衍射图谱中, 具有 $2\theta = 5.889^\circ$ 、 11.002° 、 12.518° 、 14.906° 、 17.825° 、 22.814° 、 25.555° 的衍射峰; 典型地具有 $2\theta = 5.889^\circ$ 、 7.173° 、 11.002° 、 11.396° 、 12.518° 、 12.895° 、 14.906° 、 17.825° 、 22.814° 、 25.555° 的衍射峰; 更典型地具有 $2\theta = 5.889^\circ$ 、 7.173° 、 11.002° 、 11.396° 、 12.518° 、 12.895° 、 14.906° 、 16.169° 、 17.825° 、 19.875° 、 21.574° 、 22.814° 、 25.555° 、 27.254° 的衍射峰; 最典型的具有如下的 XRPD 图谱解析数据:

编号	20 角	相对强度%	编号	20 角	相对强度%
1	5.889	47.4	13	21.061	11.1
2	7.173	10.4	14	21.574	35.3
3	11.002	42.2	15	21.829	35.6
4	11.396	32.6	16	22.814	47.5
5	12.518	77.6	17	23.598	2.1
6	12.895	62.0	18	25.555	59.3
7	14.906	79.7	19	26.522	10.0
8	15.563	8.8	20	27.254	32.3
9	16.169	44.0	21	28.717	28.4
10	17.825	100.0	22	29.712	3.9
11	18.456	48.5	23	30.702	15.5
12	19.875	26.1	24	31.871	7.7

15. 含有如权利要求 1-3、5-10、12、14 任一项所述晶型的晶型组合物, 其中, 所述晶型占所述晶型组合物重量的 50%以上, 较好的是 80%以上, 更好的是 90%以上, 最好的是 95%以上。

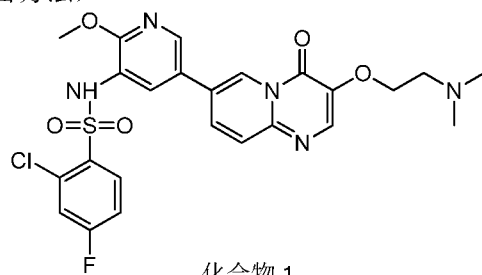
16. 药物组合物, 含有如权利要求 4、11、13 任一项所述的化合物或权利要求 1-3、5-10、12、14 任一项所述的晶型或权利要求 15 所述的晶型组合物, 其中, 所述药物组合物中包括治疗有效量的所述化合物或所述晶型或所述晶型组合物以及任选地药学上可接受的载体、赋形剂和/或介质。

17. 权利要求 1-3、5-10、12、14 任一项所述的晶型或者如下式所示的化合物 1、权利要求 4、11、13 任一项所述的化合物或它们的晶型组合物或它们的药物组合物在制备治疗与 PI3K 激酶有关疾病的药物中的应用, 优选地, 所述 PI3K 激酶有关疾病选自癌症, 更优选为结肠癌、胃癌,

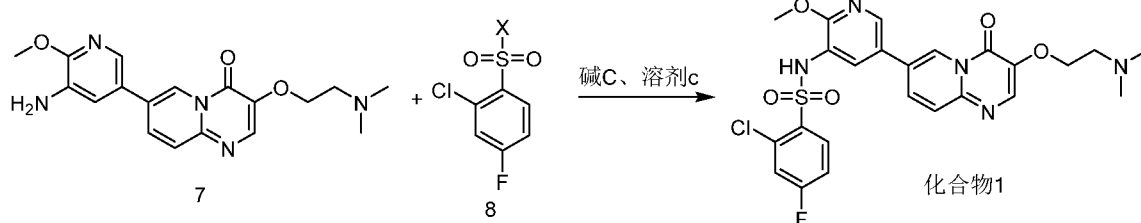


17. 一种治疗与 PI3K 激酶有关疾病的方法，所述方法包括将治疗有效量的权利要求 1-3、5-10、12、14 任一项所述的晶型或权利要求 4、11、13 任一项所述的化合物或它们的晶型组合物或它们的药物组合物给予有需要的患者，优选地，所述 PI3K 激酶有关疾病选自癌症，更优选为结肠癌、胃癌。

19. 如下式所示的化合物 1 的制备方法，



其包含如下步骤：



其中，

X 选自 Cl 或 Br；

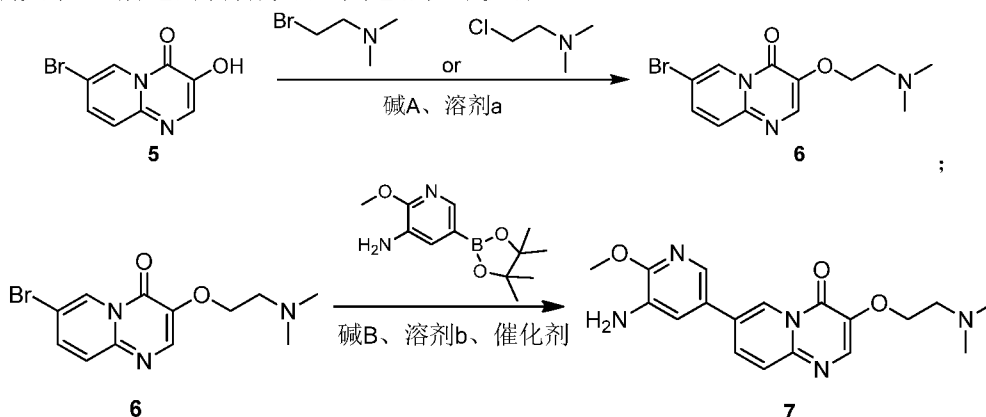
碱 C 选自吡啶、2,6-二甲基吡啶、Et₃N、4-DMAP、LiOH、Cs₂CO₃ 或 K₂CO₃；

溶剂 c 选自吡啶、二氯甲烷、甲苯、乙腈、丙酮、DMF 或 THF；

化合物 7 与化合物 8 的摩尔比为 1:1~3，优选 1:1.2~1.6；

化合物 7 与碱 C 的摩尔比为 1:1~3。

20. 根据权利要求 18 所述的制备方法，其包括如下步骤，



其中，

碱 A 选自碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯、氢氧化钾或氢氧化钠；

溶剂 a 选自 DMF、DMSO 或 NMP；

碱 B 选自碳酸钾、碳酸钠、氢氧化钡、磷酸钾、碳酸铯、氟化钾、氟化铯、氢氧化钠、叔丁醇钾、叔丁醇钠、醋酸钾或醋酸钠；

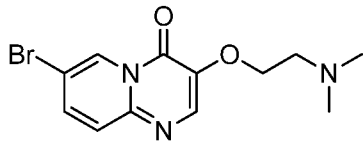
溶剂 b 选自 1,4-二氧六环、DMSO、THF、1,4-二氧六环/水或 THF/水；

所述溶剂 b 中，1,4-二氧六环或 THF 与水的体积比为 3~6:1，优选为 5:1；

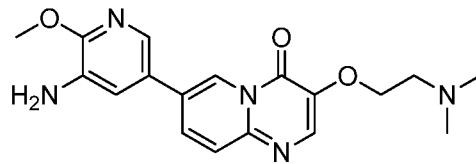
催化剂选自 Pd(dppf)Cl₂ 或 Pd(PPh₃)₄；

2-二甲氨基氯乙烷或 2-二甲氨基溴乙烷可以是其盐的形式。

21. 作为制备化合物 1 中间体的下式化合物：



6



7

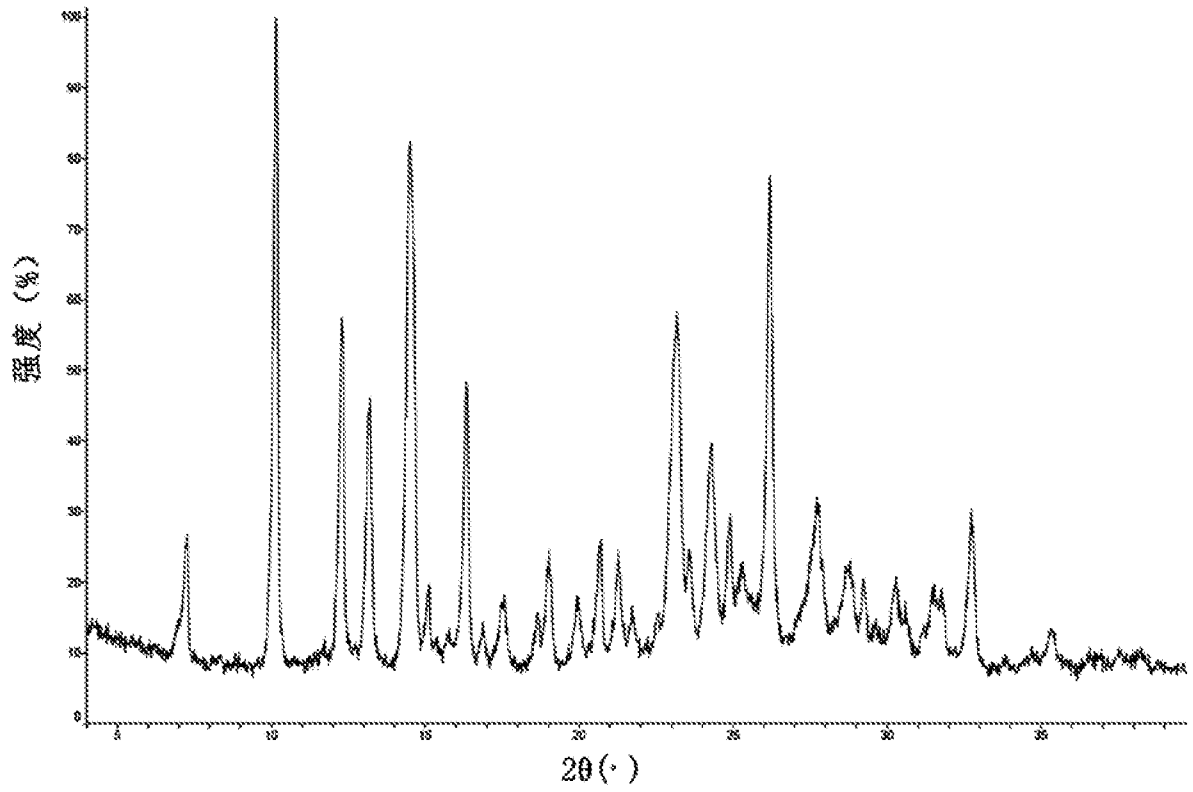


图1

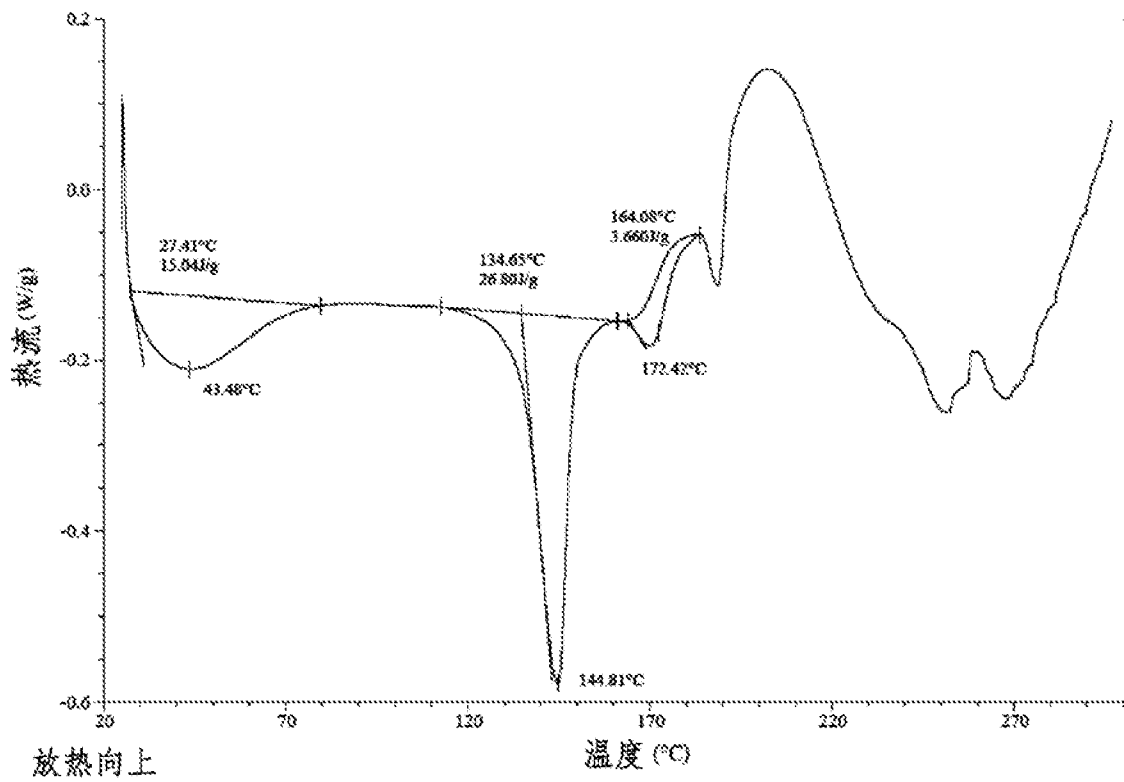


图2

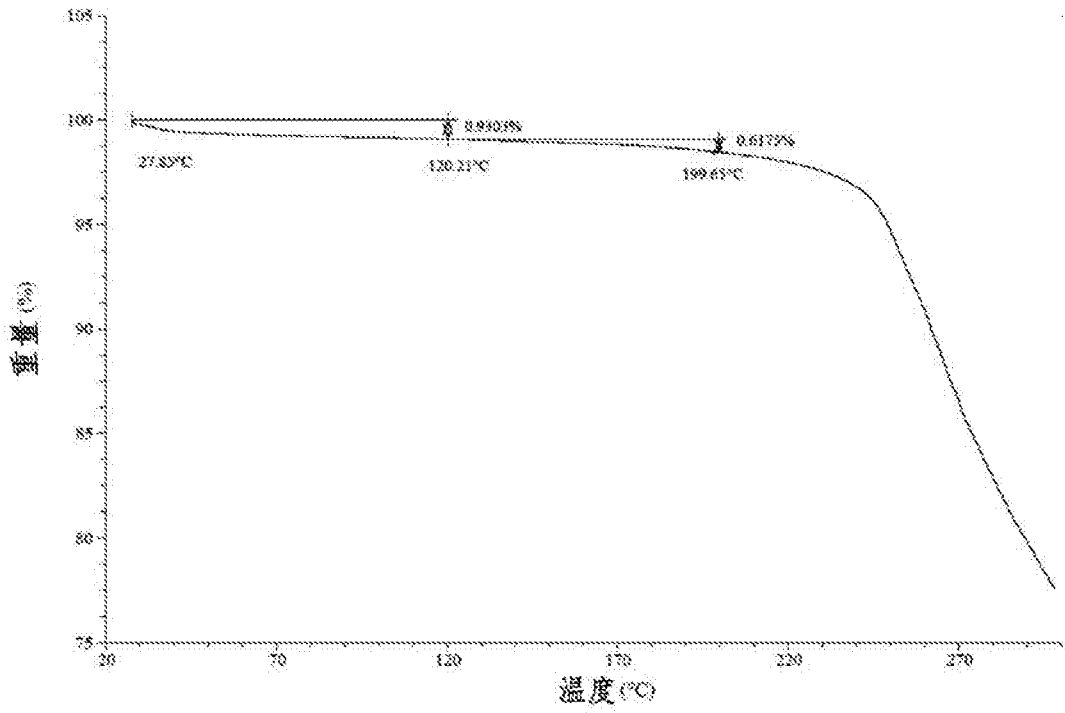


图3

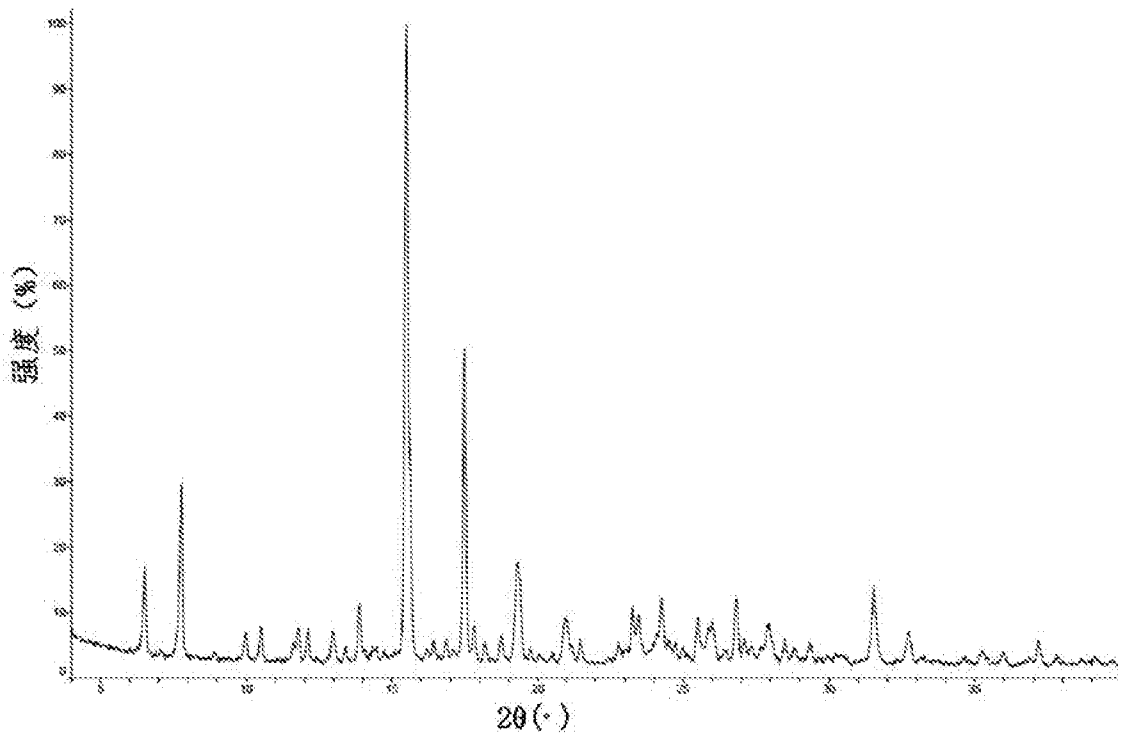


图4

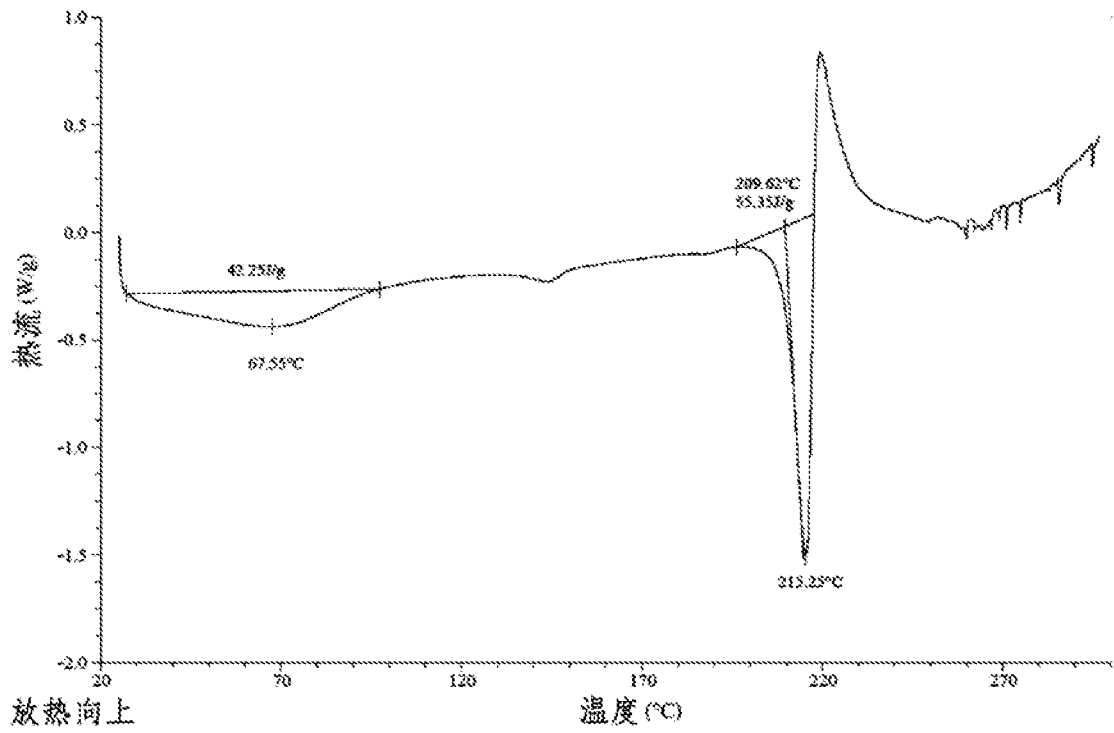


图5

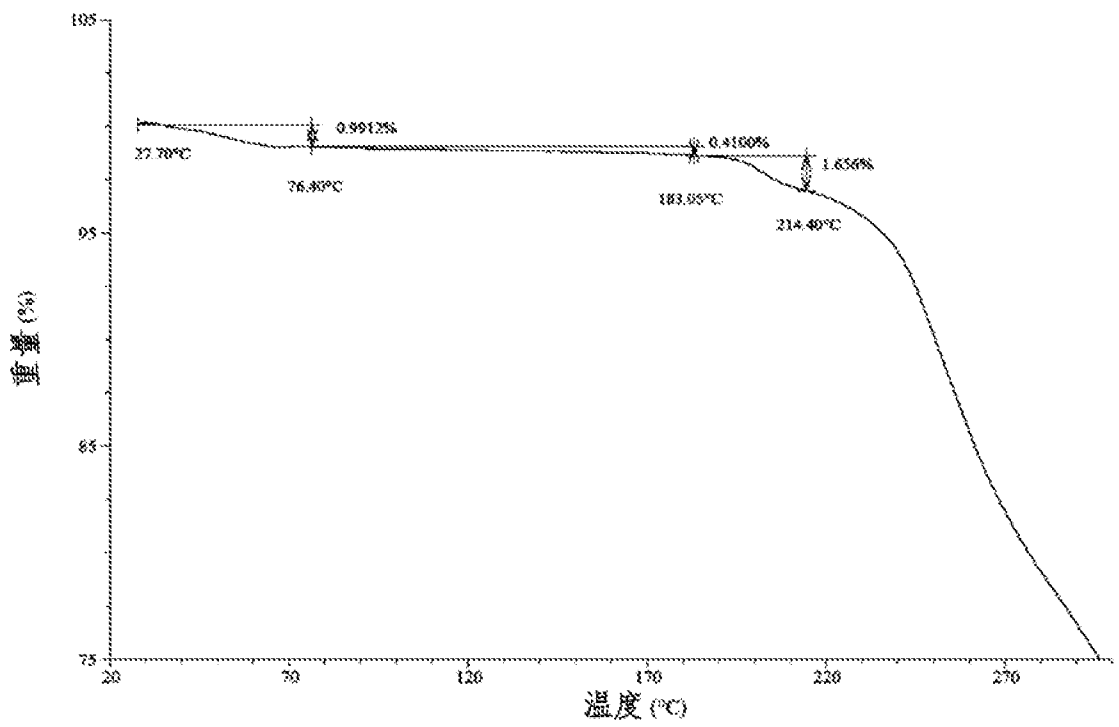


图6

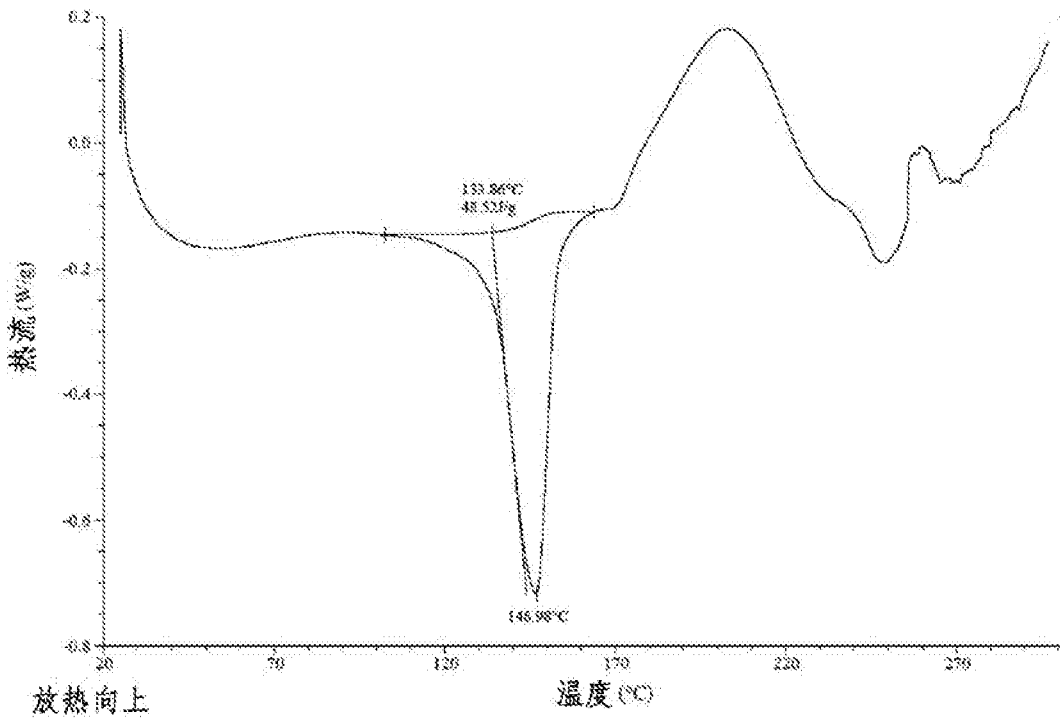
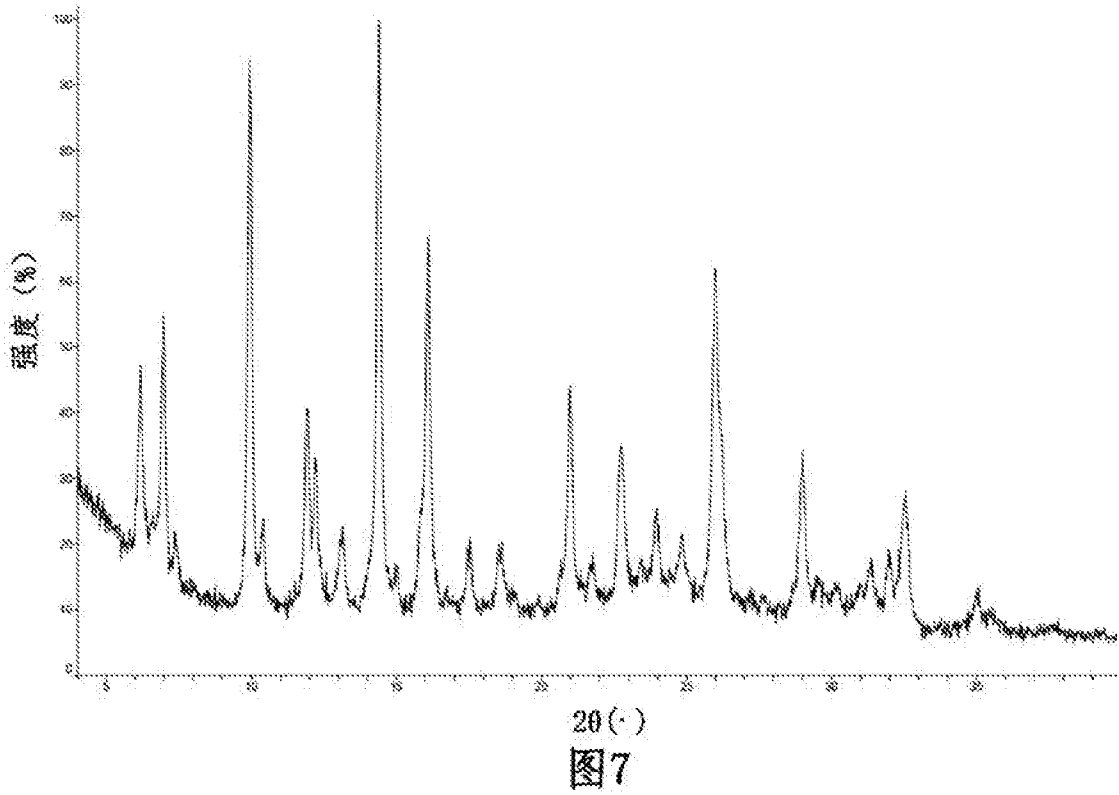


图8

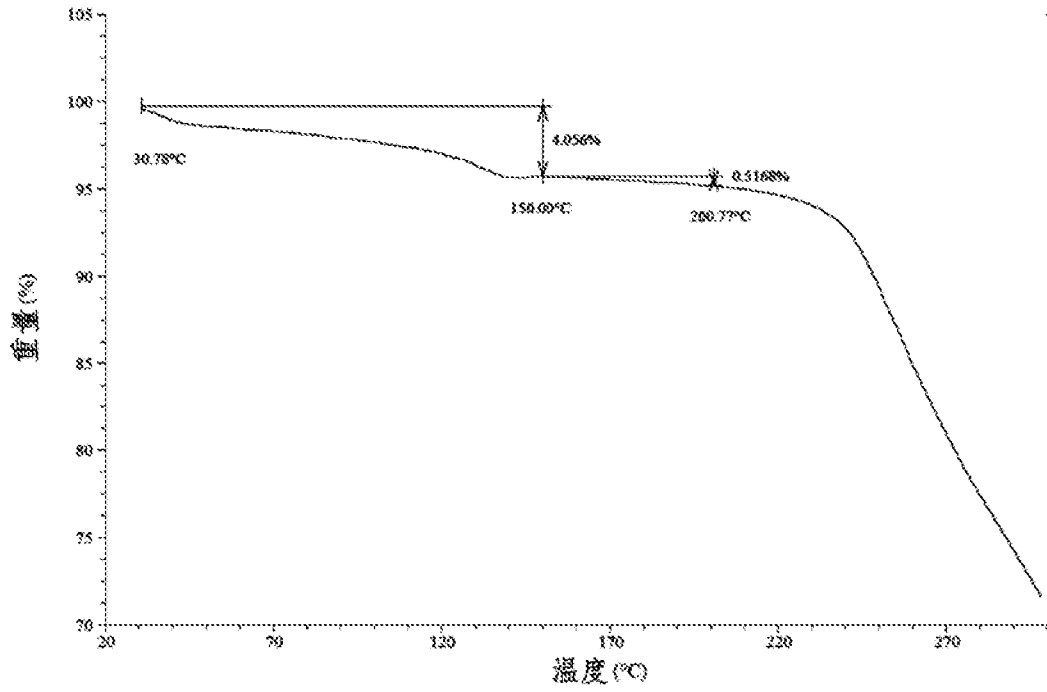


图9

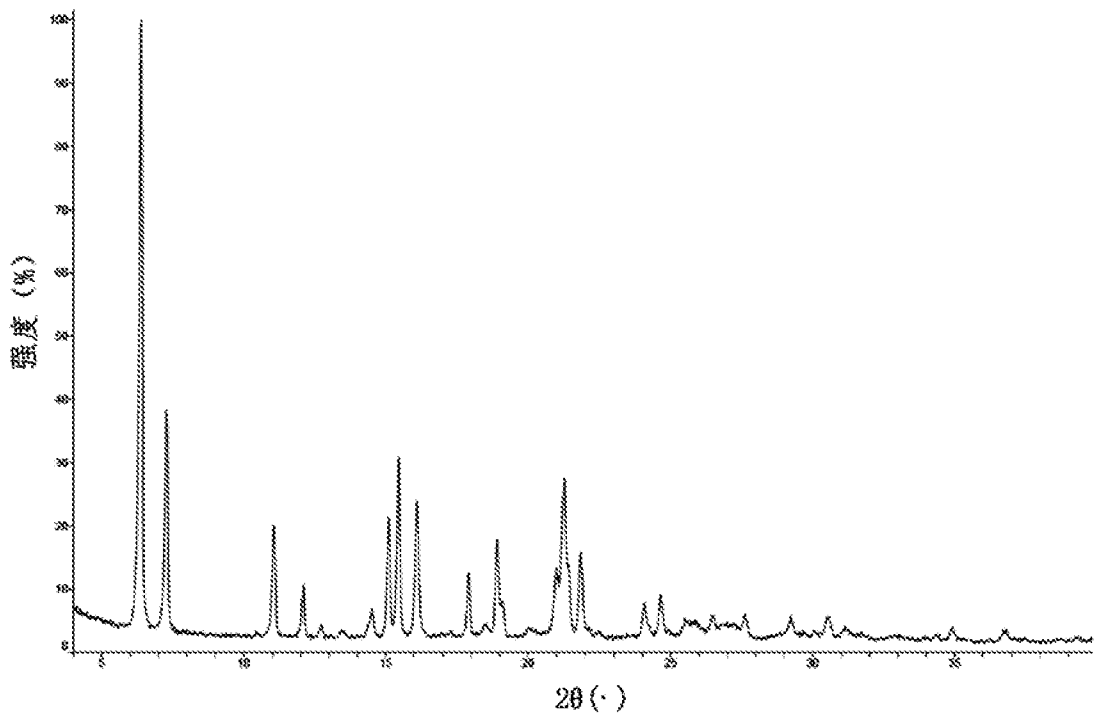


图10

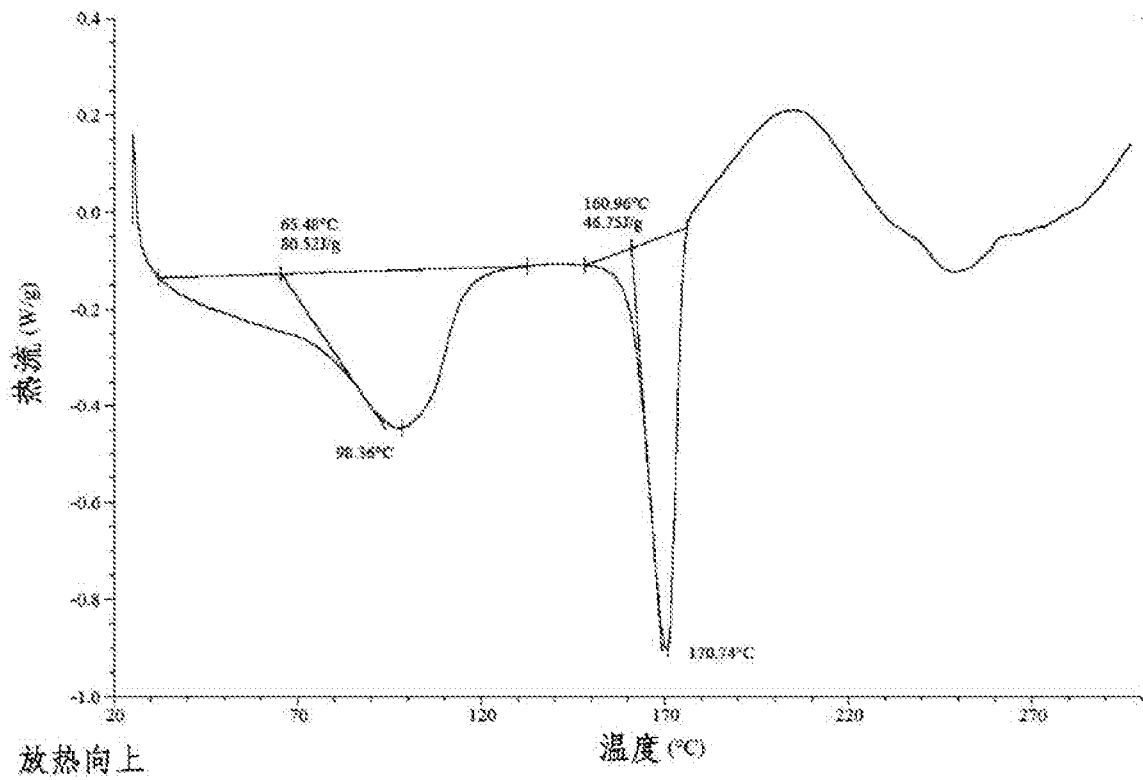


图11

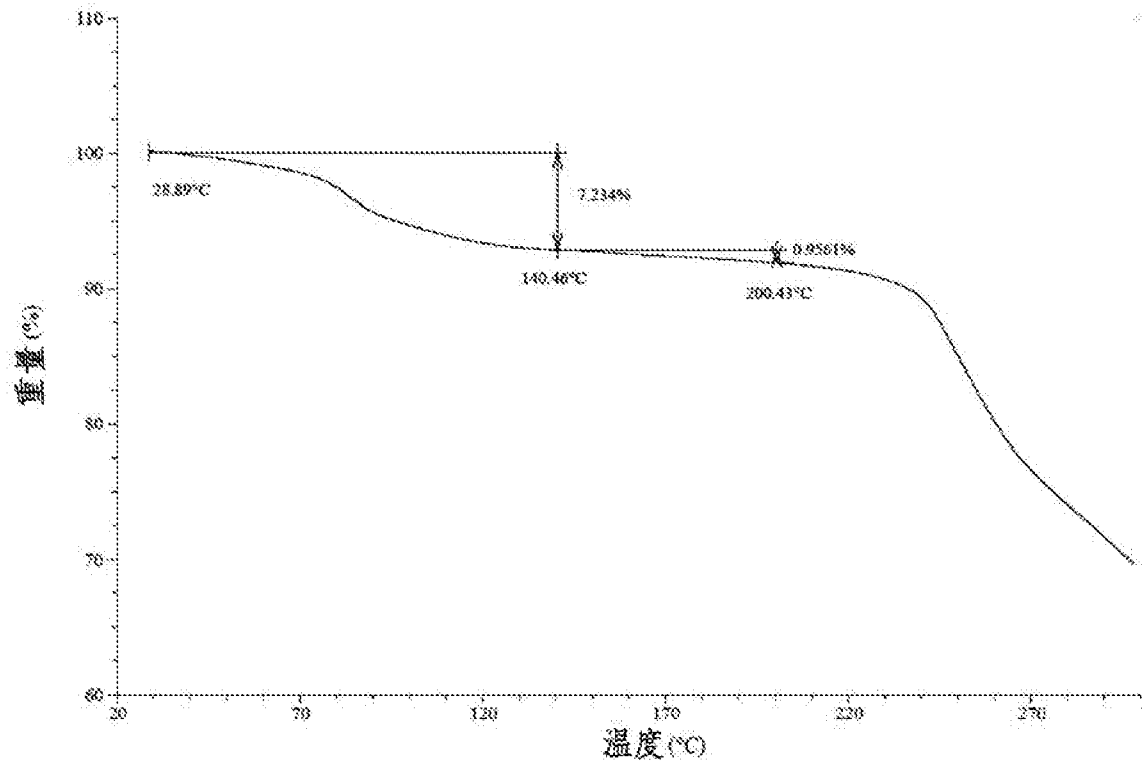


图12

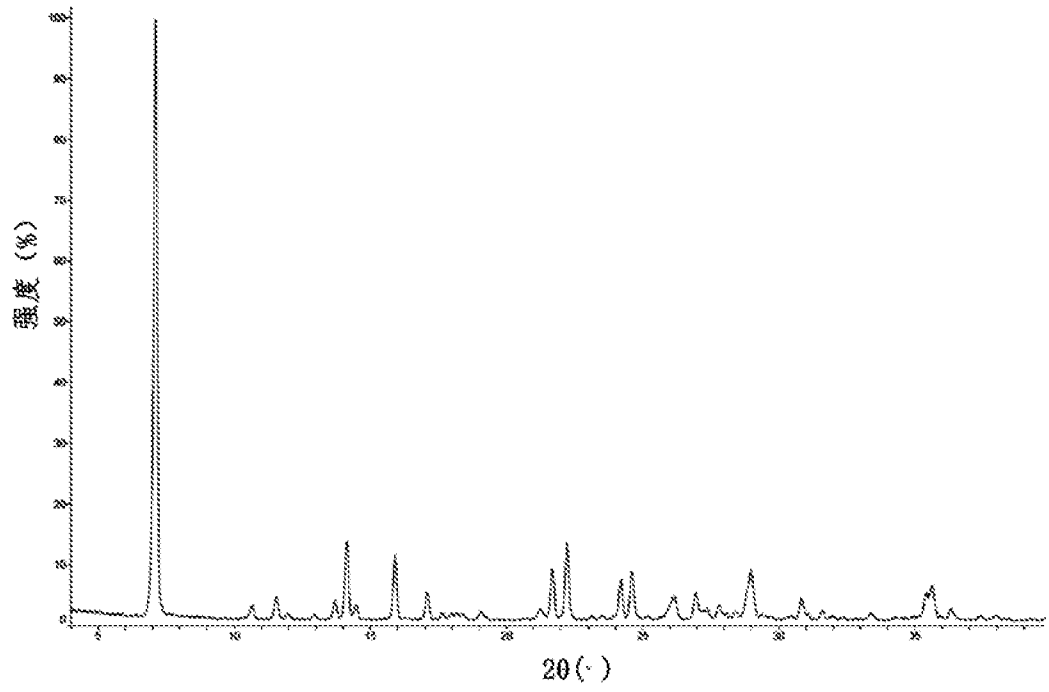


图13

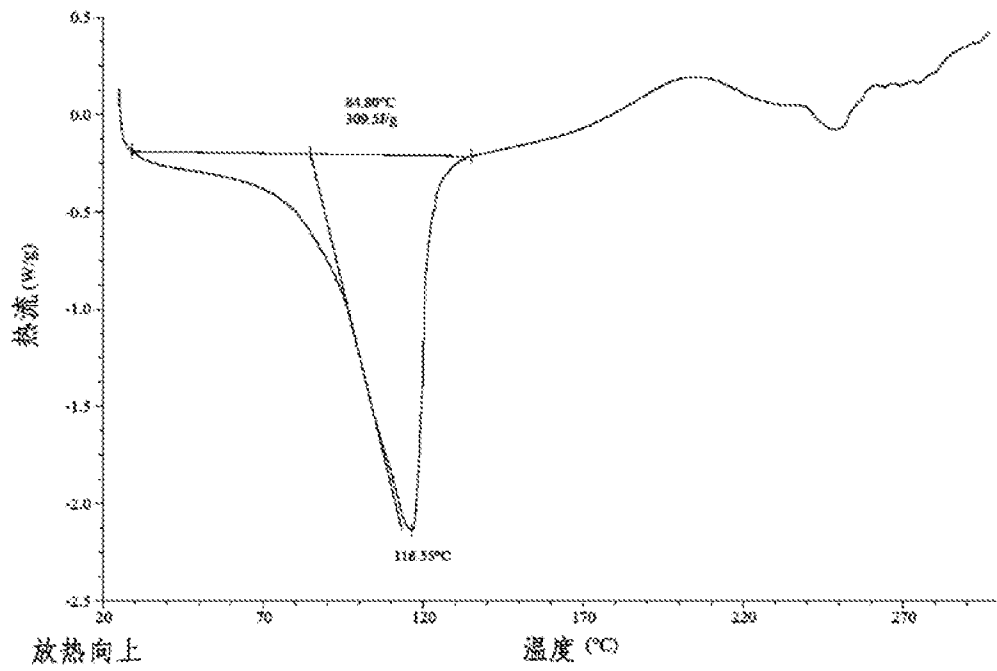


图14

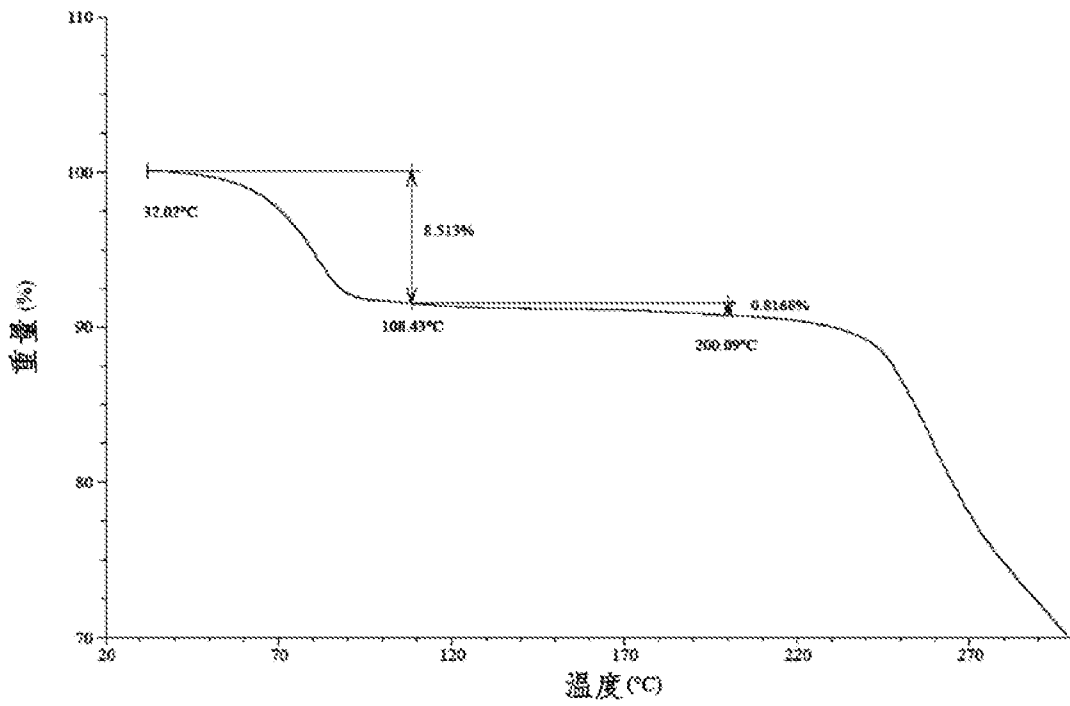


图15

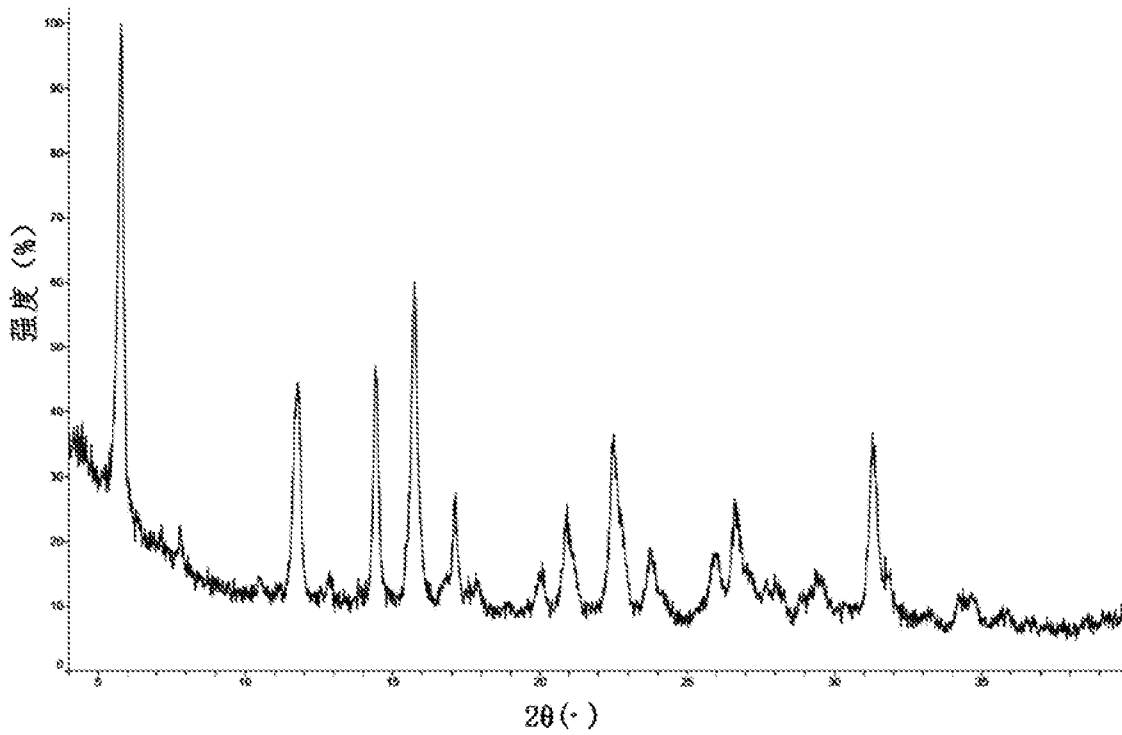


图16

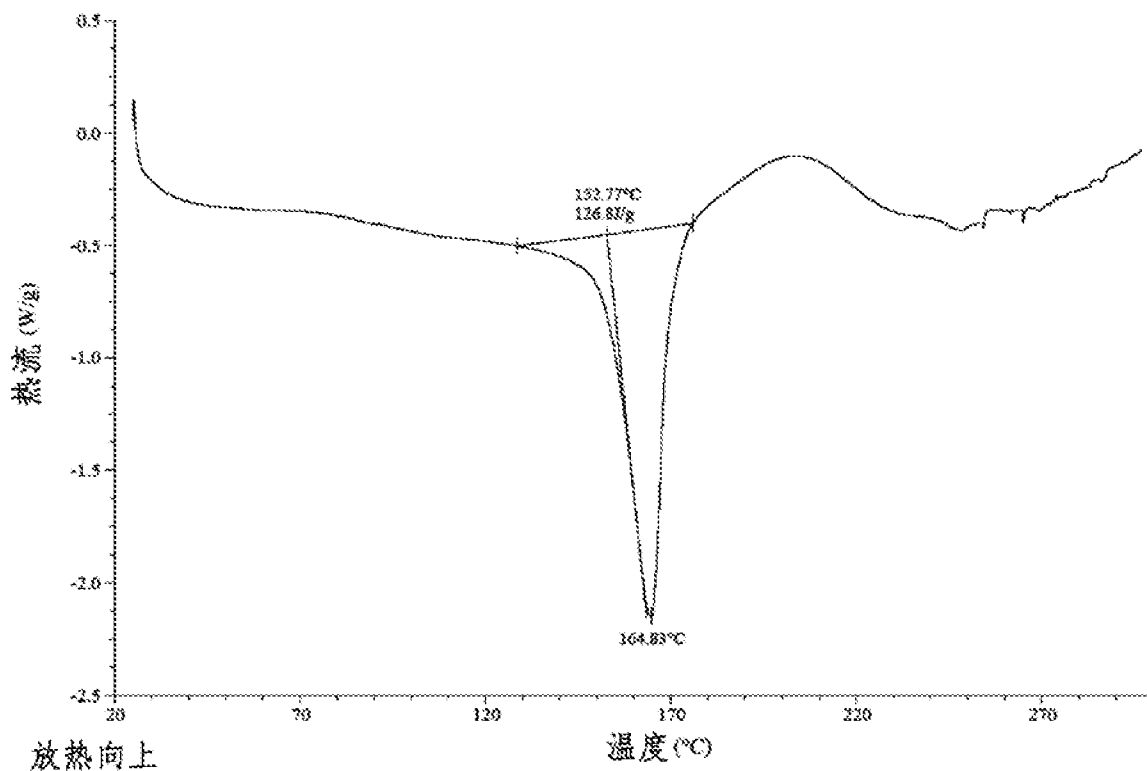


图17

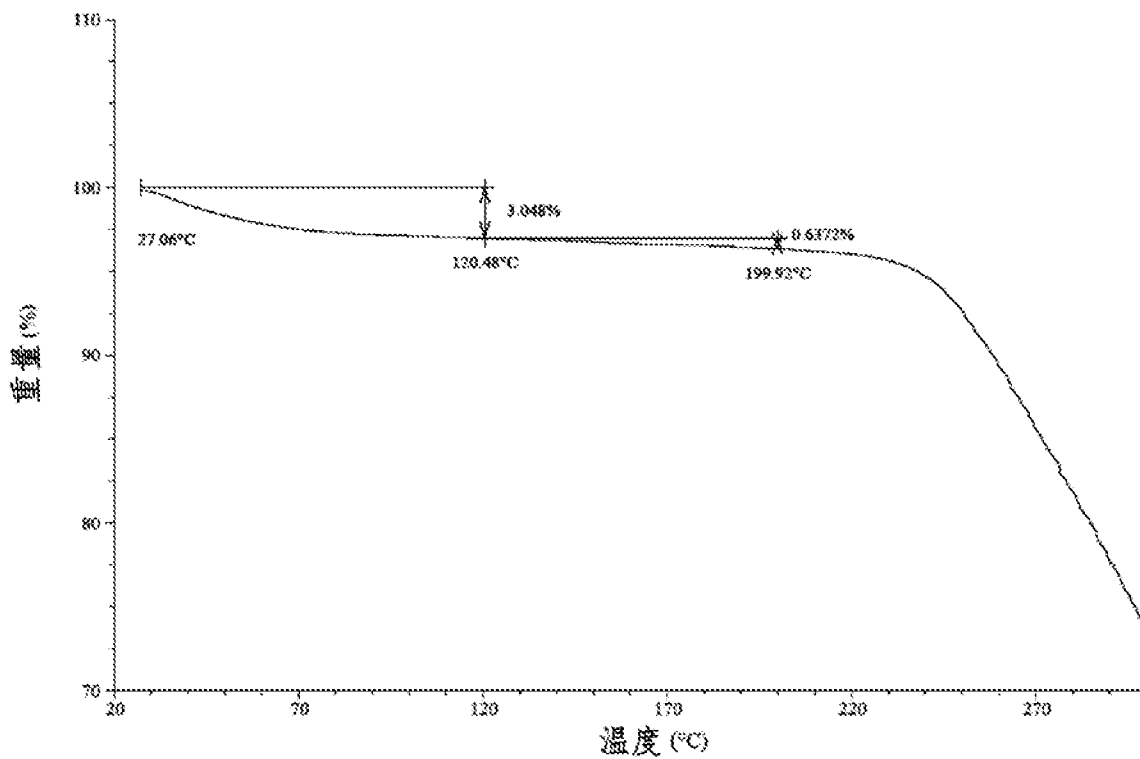


图18

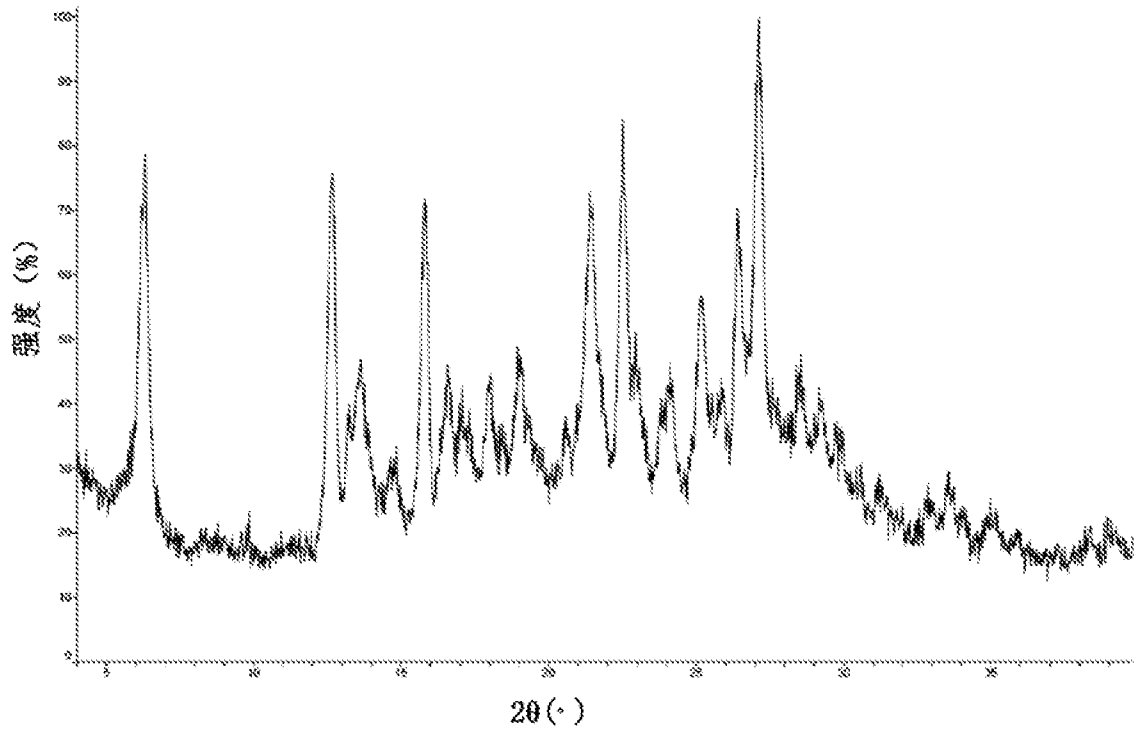


图19

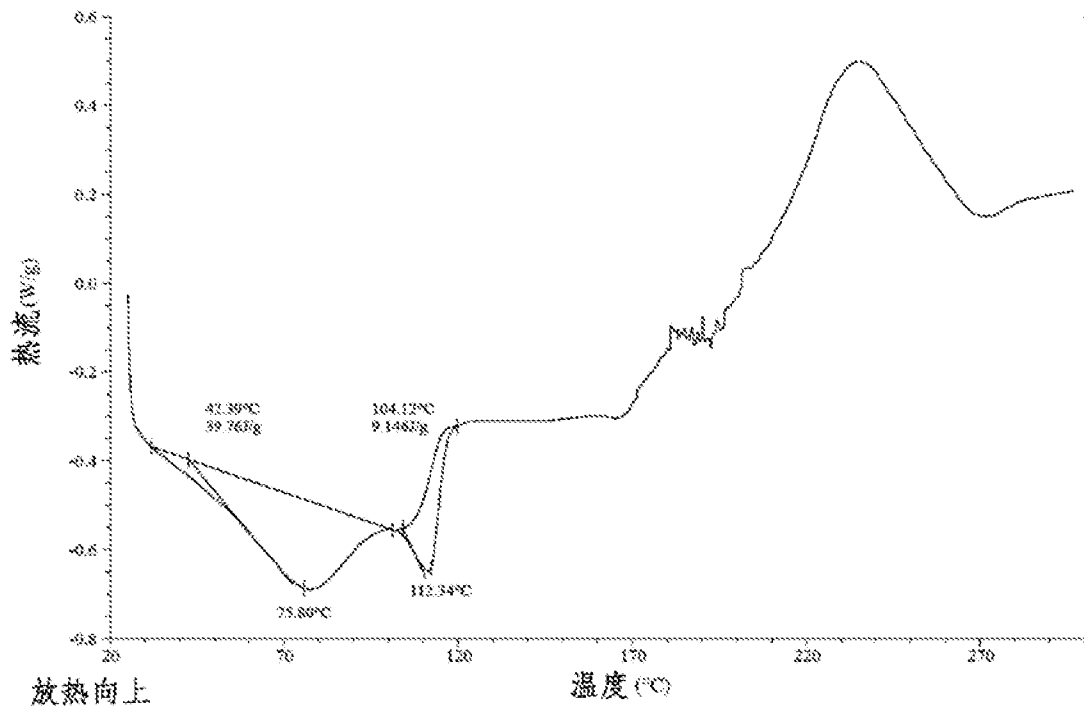


图20

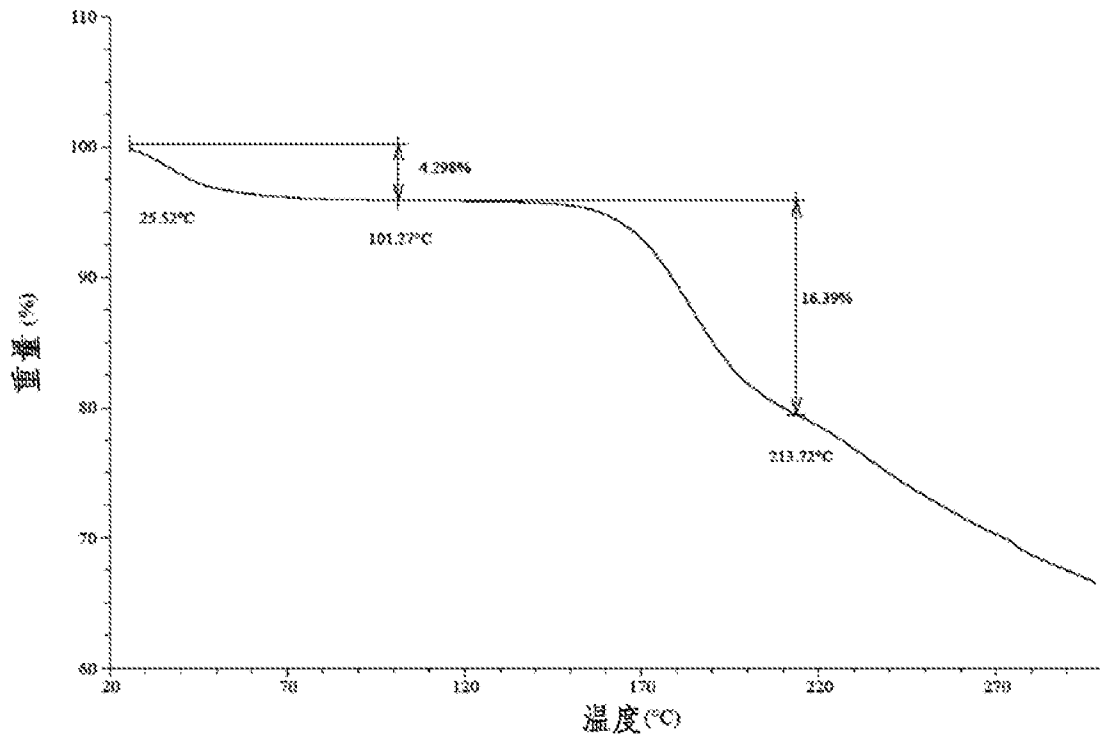


图21

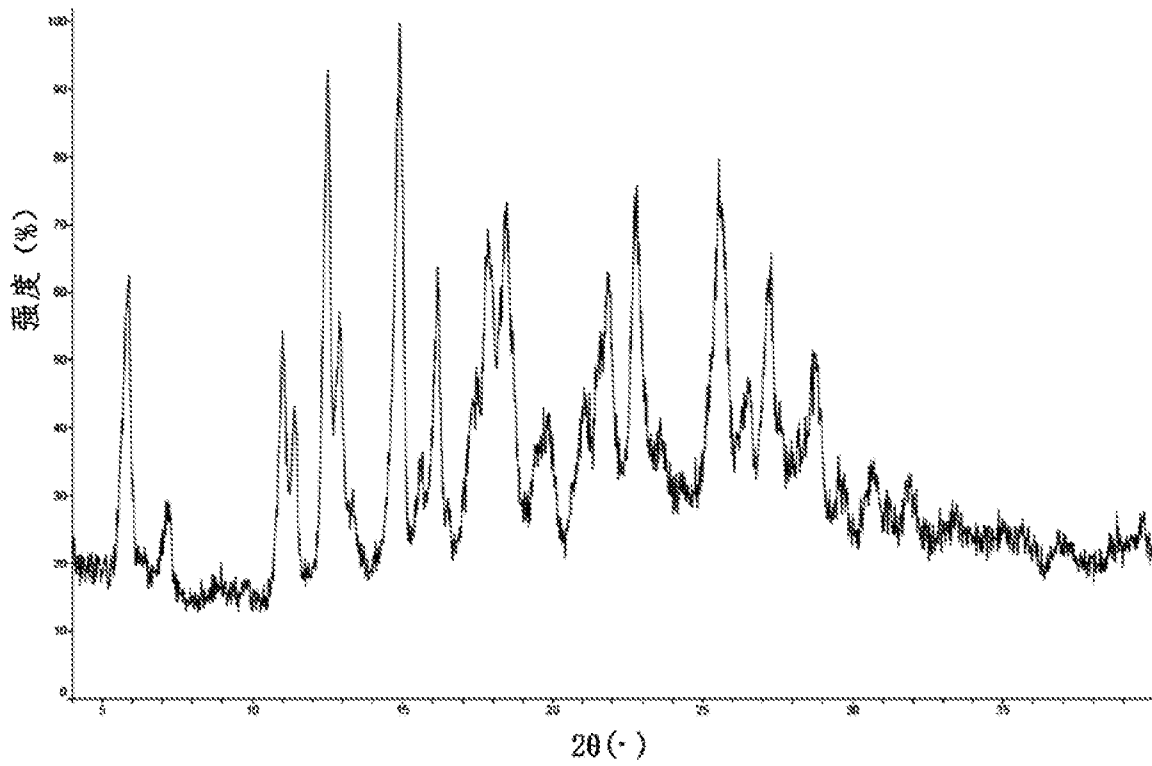


图22

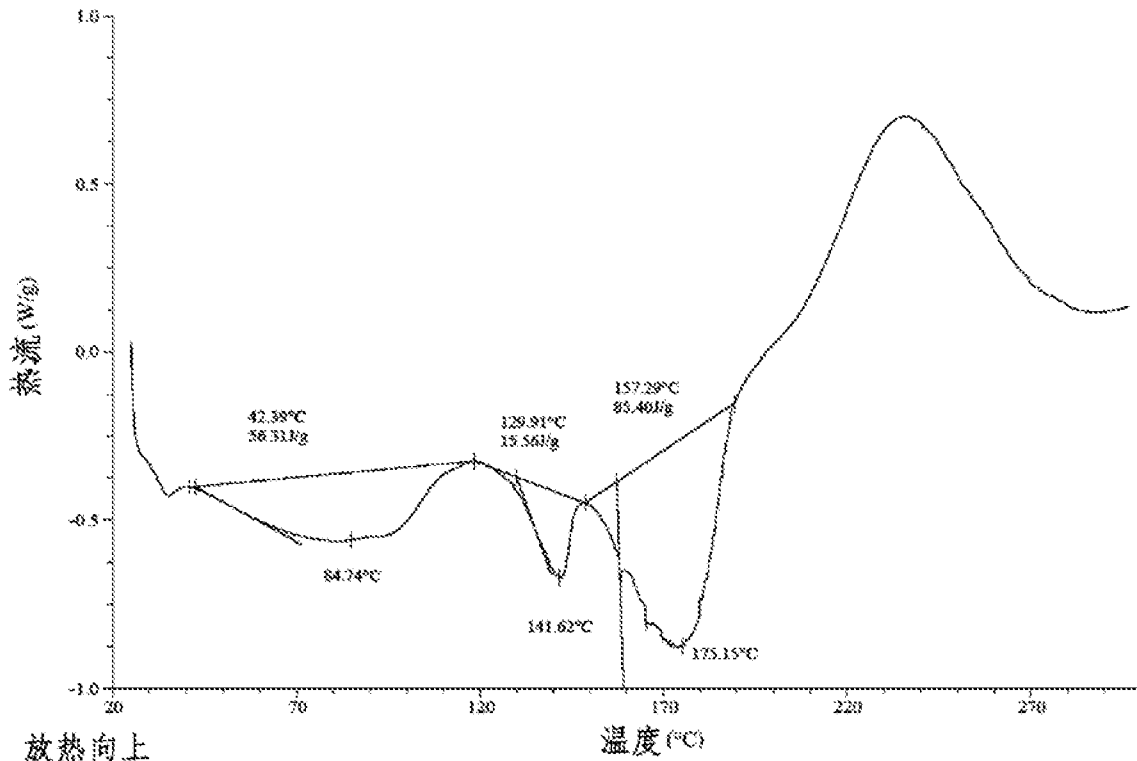


图23

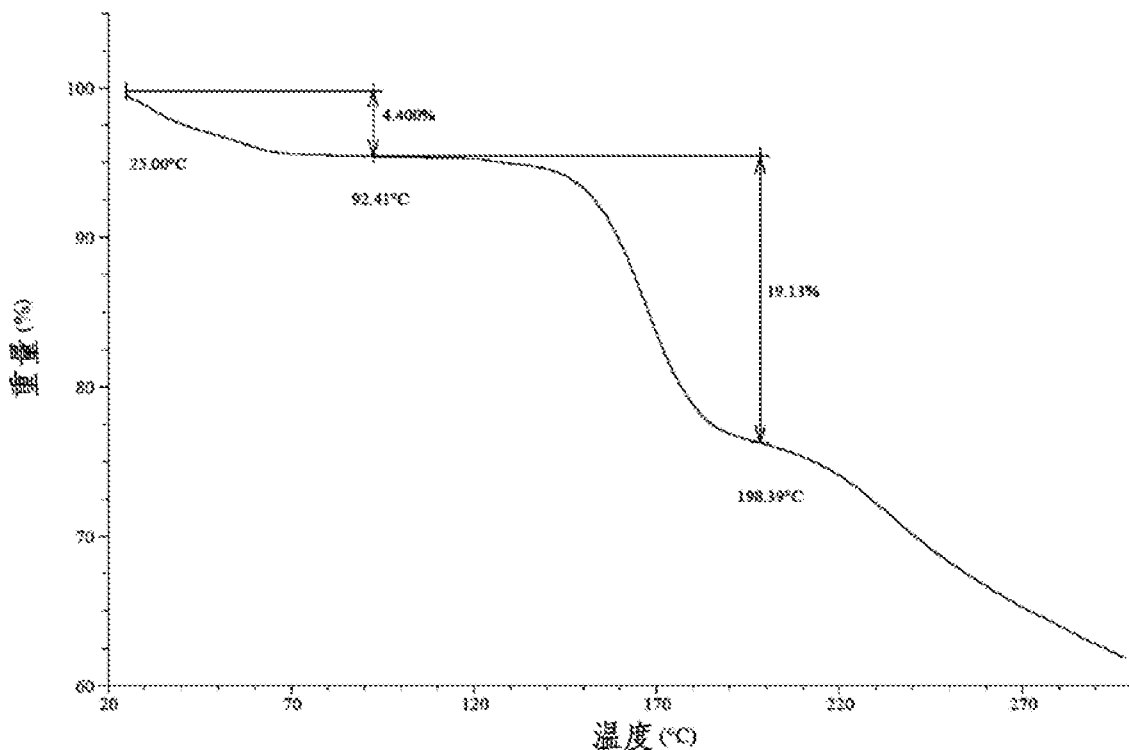
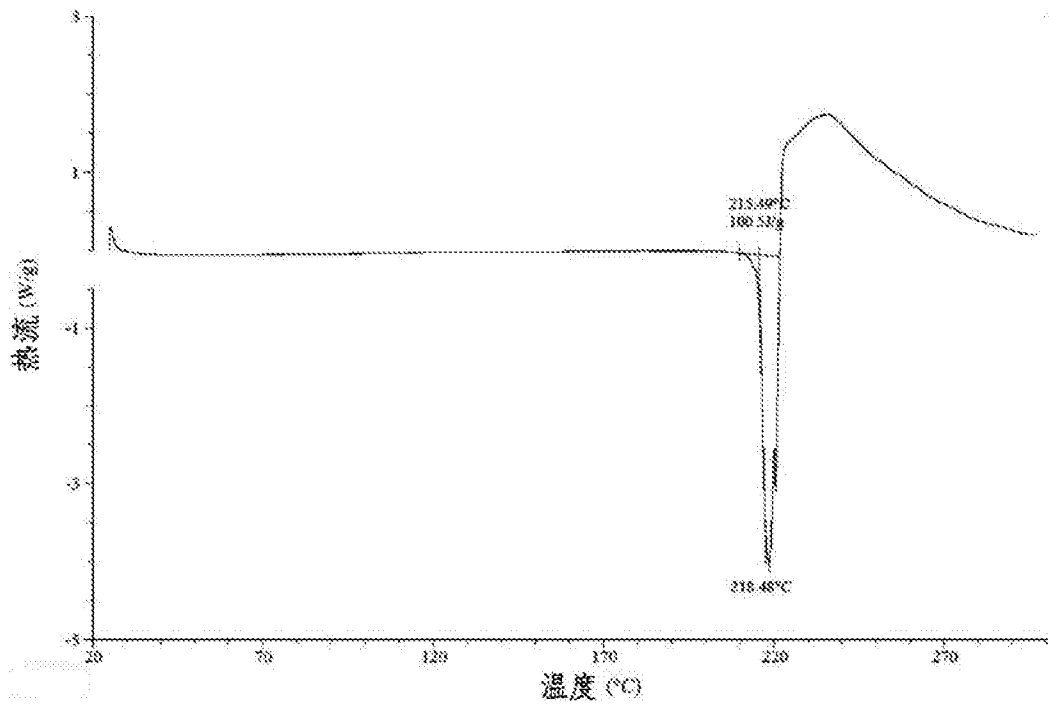
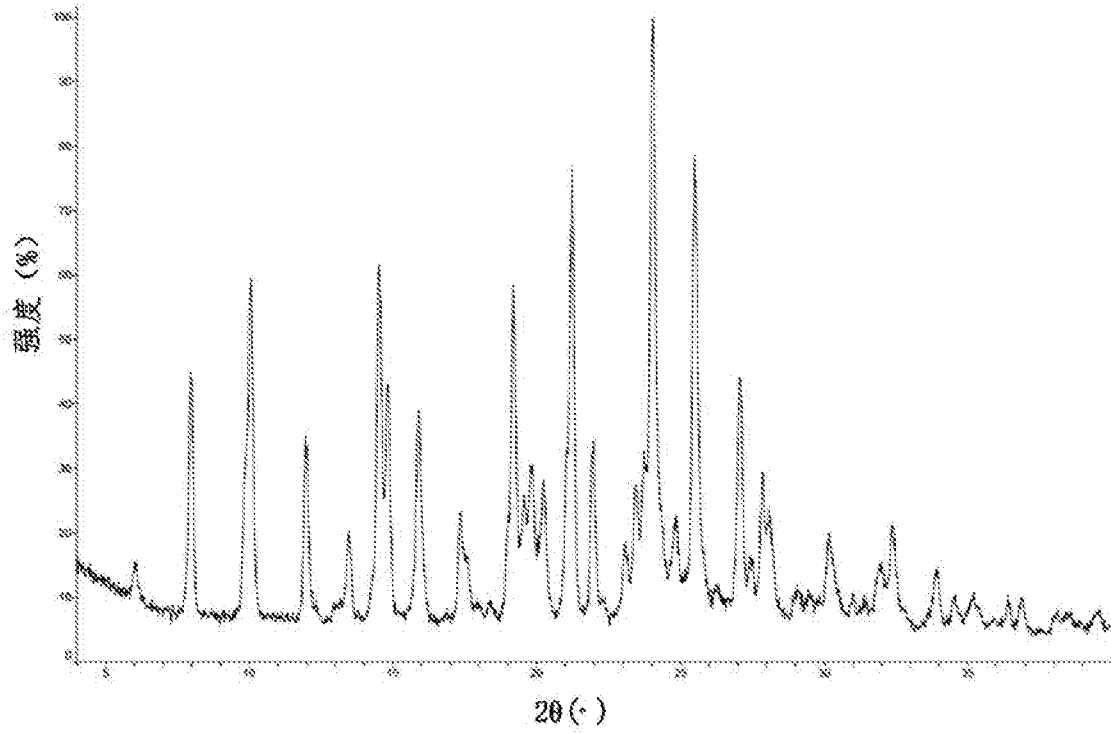


图24



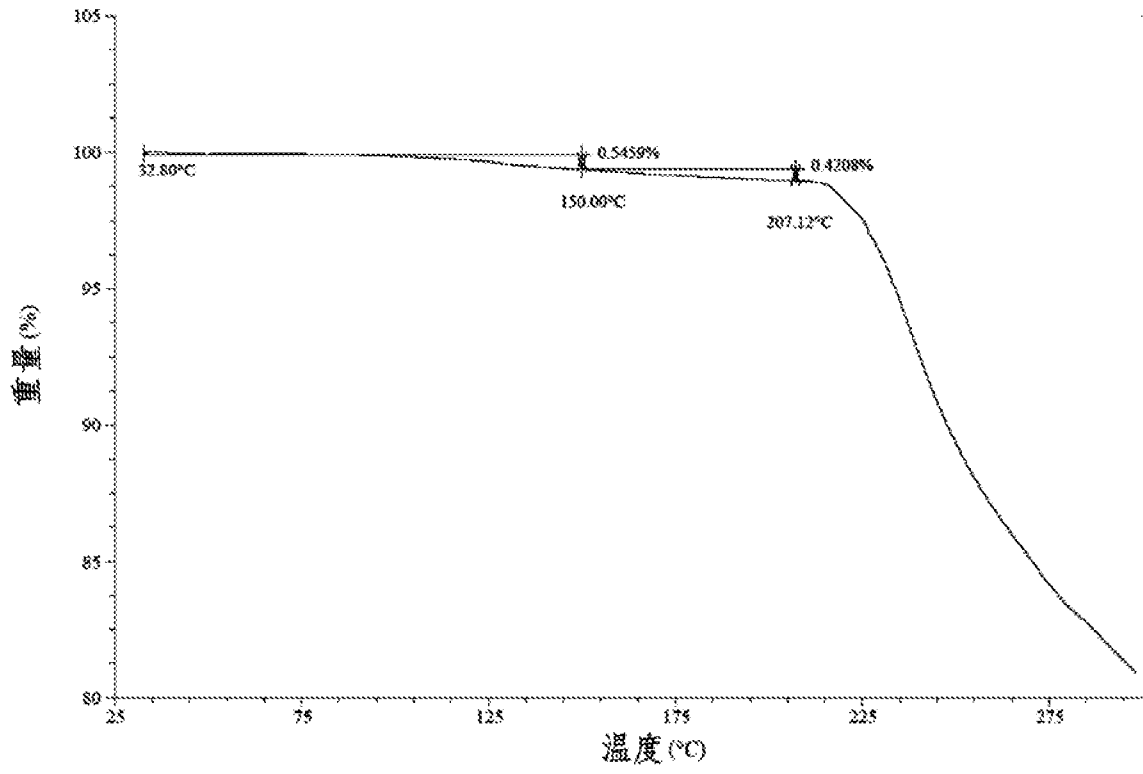


图27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/110284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 471/04 (2006.01) i; A61K 31/519 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 471/+; A61K 31/519

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Data bases: WPI, EPODOC, CNABS, CNKI, REGISTRY, CAPLUS

Search terms: alkone, benzene sulfonic amide, diffraction, kinase, pyridin, pyrimidin, one, PI3K, sulfonyl, crystal, structure search carried out according to the structure of compounds 1 and 6-7

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105461711 A (MEDSHINE DISCOVERY INC.), 06 April 2016 (06.04.2016), see the whole document, particularly description, pages 1, 28 and 34	1-21
PX	WO 2015192760 A1 (MEDSHINE DISCOVERY INC.), 23 December 2015 (23.12.2015), see the whole document, particularly description, pages 23 and 26-28	1-21
A	WO 2014022128 A1 (CALITOR SCIENCES LLC et al.), 06 February 2014 (06.02.2014), see the whole document, particularly claim 1, and description, page 3	1-21
A	CN 103539777 A (HEC PHARM CO., LTD. et al.), 29 January 2014 (29.01.2014), see the whole document, particularly claim 1, and description, page 3	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search

14 March 2017 (14.03.2017)

Date of mailing of the international search report

23 March 2017 (23.03.2017)

Name and mailing address of the ISA/CN:
 State Intellectual Property Office of the P. R. China
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
 Haidian District, Beijing 100088, China
 Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

FU, Wei

Telephone No.: (86-10) **62086335**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/110284

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] although claim 17 relates to a method of treatment of the human or animal body by therapy (PCT Rule 39.1(iv)), a search is still carried out based on the claimed effects of said crystal forms, compounds or composition.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/110284

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105461711 A	06 April 2016	None	
WO 2015192760 A1	23 December 2015	AU 2015276699 A1 CA 2951971 A1 TW 201625612 A	19 January 2017 23 December 2015 16 July 2016
WO 2014022128 A1	06 February 2014	None	
CN 103539777 A	29 January 2014	CN 103539777 B	02 March 2016

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07D 471/04(2006.01)i; A61K 31/519(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07D 471/+; A61K 31/519</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>数据库: WPI, EPODOC, CNABS, CNKI, REGISTRY, CAPLUS 检索词: 嘧啶, 吡啶, 酮, 苯磺酰胺, 晶体, 衍射, 激酶, pyridin, pyrimidin, one, PI3K, sulfonyl, crystal, 根据化合物1, 6-7结构进行的结构式检索</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 105461711 A (南京明德新药研发股份有限公司) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 参见全文, 特别是说明书第1, 28, 34页</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>WO 2015192760 A1 (MEDSHINE DISCOVERY INC) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 参见全文, 特别是说明书第23, 26-28页</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014022128 A1 (CALITOR SCIENCES LLC等) 2014年 2月 6日 (2014 - 02 - 06) 参见全文, 特别是权利要求1, 说明书第3页</td> <td>1-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103539777 A (广东东阳光药业有限公司等) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见全文, 特别是权利要求1, 说明书第3页</td> <td>1-21</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 105461711 A (南京明德新药研发股份有限公司) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 参见全文, 特别是说明书第1, 28, 34页	1-21	PX	WO 2015192760 A1 (MEDSHINE DISCOVERY INC) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 参见全文, 特别是说明书第23, 26-28页	1-21	A	WO 2014022128 A1 (CALITOR SCIENCES LLC等) 2014年 2月 6日 (2014 - 02 - 06) 参见全文, 特别是权利要求1, 说明书第3页	1-21	A	CN 103539777 A (广东东阳光药业有限公司等) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见全文, 特别是权利要求1, 说明书第3页	1-21
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 105461711 A (南京明德新药研发股份有限公司) 2016年 4月 6日 (2016 - 04 - 06) 参见全文, 特别是说明书第1, 28, 34页	1-21															
PX	WO 2015192760 A1 (MEDSHINE DISCOVERY INC) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 参见全文, 特别是说明书第23, 26-28页	1-21															
A	WO 2014022128 A1 (CALITOR SCIENCES LLC等) 2014年 2月 6日 (2014 - 02 - 06) 参见全文, 特别是权利要求1, 说明书第3页	1-21															
A	CN 103539777 A (广东东阳光药业有限公司等) 2014年 1月 29日 (2014 - 01 - 29) 参见全文, 特别是权利要求1, 说明书第3页	1-21															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 3月 14日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 3月 23日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>付伟</p> <p>电话号码 (86-10)62086335</p>															

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 尽管权利要求17中涉及对人体或动物体实施的治疗方法（细则39.1(iv) PCT），仍基于所述晶型、化合物或组合物所声称的效果进行了检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/110284

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105461711	A	2016年 4月 6日	无			
WO	2015192760	A1	2015年 12月 23日	AU	2015276699	A1	2017年 1月 19日
				CA	2951971	A1	2015年 12月 23日
				TW	201625612	A	2016年 7月 16日
WO	2014022128	A1	2014年 2月 6日	无			
CN	103539777	A	2014年 1月 29日	CN	103539777	B	2016年 3月 2日