



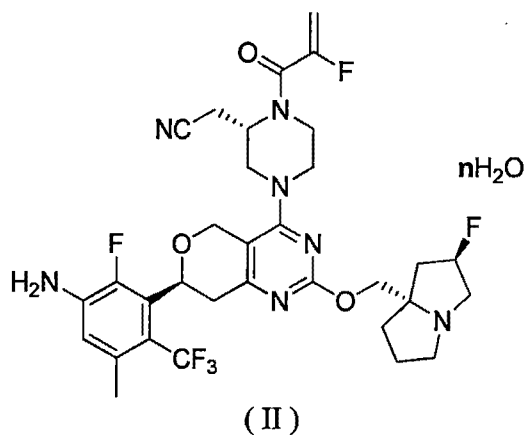
- (21)申請案號：111134200 (22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 09 月 08 日
- (51)Int. Cl. : **C07D491/052(2006.01)** **A61K31/519 (2006.01)**  
**A61P35/00 (2006.01)**
- (30)優先權：2021/09/10 中國大陸 202111062619.1  
 2022/08/26 中國大陸 202211034826.0
- (71)申請人：大陸商德昇濟醫藥（無錫）有限公司（中國大陸）D3 BIO (WUXI) CO., LTD (CN)  
 中國大陸
- (72)發明人：徐洋洋 XU, YANGYANG (CN)；孫繼奎 SUN, JIKUI (CN)；伍文韜 WU, WENTAO (CN)；張楊 ZHANG, YANG (CN)；陳曙輝 CHEN, SHUHUI (US)
- (74)代理人：李彥慶；林宗武
- (56)參考文獻：  
 TW 202035392A TW 202140490A
- 審查人員：葉士緯
- 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：6 共 46 頁

## (54)名稱

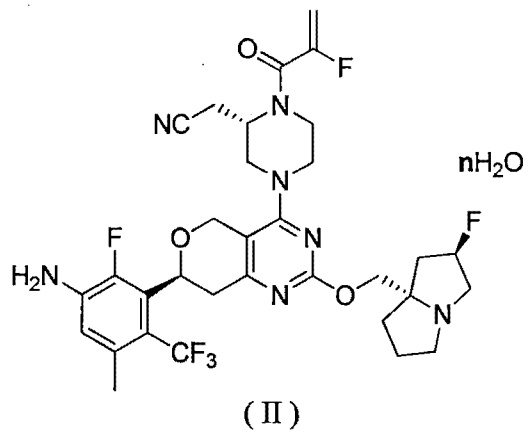
嘓啞並雜環類化合物的晶型及其製備方法

## (57)摘要

本發明公開了一類嘓啞並雜環類化合物的晶型及其製備方法，具體公開了式(II)化合物及其晶型的製備方法和應用。



The invention discloses a crystal form of pyrimido-heterocyclic compounds and a preparation method thereof, and specifically discloses a preparation method and application of a compound of formula (II) and a crystal form thereof.



# 公告本

I820901

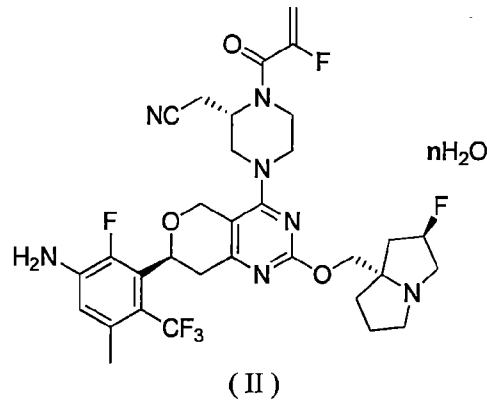
## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 嘧啶並雜環類化合物的晶型及其製備方法

【英文發明名稱】 Crystal Form of Pyrimido-heterocyclic Compounds and Preparation Method Thereof

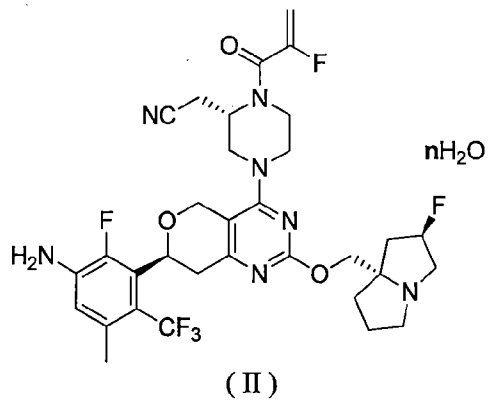
### 【中文】

本發明公開了一類嘧啶並雜環類化合物的晶型及其製備方法，具體公開了式 (II) 化合物及其晶型的製備方法和應用。



### 【英文】

The invention discloses a crystal form of pyrimido-heterocyclic compounds and a preparation method thereof, and specifically discloses a preparation method and application of a compound of formula (II) and a crystal form thereof.



【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 嘧啶並雜環類化合物的晶型及其製備方法

【英文發明名稱】 Crystal Form of Pyrimido-heterocyclic Compounds and Preparation Method Thereof

### 【技術領域】

【0001】本發明涉及一類嘧啶並雜環類化合物的晶型及其製備方法，具體涉及式 (II) 所示化合物及其晶型的製備方法和應用。

### 【先前技術】

【0002】RAS癌基因突變是人類癌症中最常見的激活突變，發生在30%的人類腫瘤中。RAS基因家族包括三個亞型(KRAS、HRAS和NRAS)，其中85%的RAS驅動的癌症是由KRAS亞型突變引起的。KRAS突變常見於實體腫瘤中，如：肺腺癌、胰腺導管癌和結直腸癌等。在KRAS突變腫瘤中，80%的致癌突變發生在密碼子12上，最常見的突變包括：p.G12D (41%)、p.G12V (28%) 和p.G12C (14%)。

【0003】KRAS基因的全名是Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog(Kristen 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物)。KRAS在細胞生長的信號調控中起著一個樞紐的作用，上游的EGFR(ErbB1)、HER2(ErbB2)、ErbB3和ErbB4等細胞表面受體，在接受了外界信號之後，會通過RAS蛋白，把信號傳遞到下游。KRAS蛋白沒有被激活的時候，與GDP(鳥嘌呤核苷酸二磷酸)緊密結合。在被SOS1等鳥嘌呤核苷酸交換因子激活後，與GTP(鳥嘌呤核苷酸三磷酸)結合，變成激酶活性的狀態。

KRAS基因突變後，可以不依賴於上游生長因子受體信號，獨立向下游通路傳輸生長和增殖的信號，造成不受控制的細胞生長和腫瘤進展，同時KRAS基因是否有突變，也是腫瘤預後的一個重要指標。

【0004】儘管KRAS是第一個被發現的癌基因，但長期以來被認為是不可成藥靶點。直到2019年，Amgen和Mirati Therapeutics先後公佈了的KRAS小分子抑制劑AMG510和MRTX849的臨床研究結果，首次在臨床上證實了KRAS抑制劑在臨床上治療腫瘤的有效性。AMG 510和MRTX849都屬於不可逆小分抑制劑，通過與KRAS G12C突變蛋白的半胱氨酸殘基形成不可逆共價鍵，從而抑制KRAS活性。

【0005】KRAS在細胞生長的信號調控中起著一個樞紐的作用，上游的EGFR(ErbB1)、HER2(ErbB2)、ErbB3和ErbB4等細胞表面受體，在接受了外界信號之後，會通過RAS蛋白，把信號傳遞到下游。KRAS蛋白在沒有被激活的時候，是與GDP（鳥嘌呤核苷酸二磷酸）緊密結合的，在被SOS1等鳥嘌呤核苷酸交換因子激活後，轉到與GTP（鳥嘌呤核苷酸三磷酸）結合，變成激酶活性的狀態。KRAS是RAS蛋白中的重要一員，KRAS基因突變後，可以不依賴於上游生長因子受體信號，獨立向下游通路傳輸生長和增殖的信號，造成不受控制的細胞生長和腫瘤進展，同時KRAS基因是否有突變，也是腫瘤預後的一個重要指標。

【0006】統計結果顯示，肺腺癌有12-36%病人KRAS突變驅動的；27-56%結腸癌病人由KRAS驅動，此外90%的胰腺癌、21%的子宮內膜癌和12-36%的肺腺癌等都是由KRAS驅動的，病人群體巨大；在KRAS的基因突變中，97%是發生在第12位或者第13位的胺基酸殘基發生了突變，其中G12D，G12V和G13D這三種突變，但是這三種突變的成藥較

差，KRAS(G12C)突變：12位的甘胺酸被半胱胺酸替換後為共價抑制劑的開發提供了一個很好的方向。

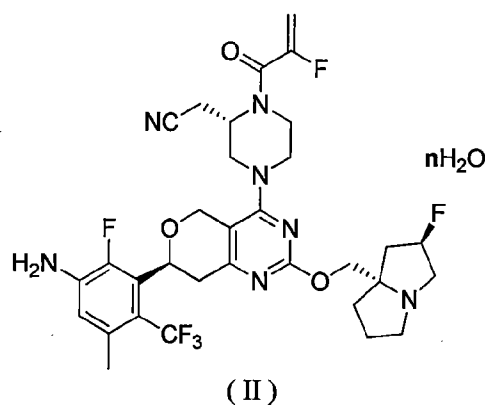
### 【發明內容】

【0007】本發明主張如下優先權：

CN202111062619.1，申請日：2021年09月10日；

CN202211034826.0，申請日：2022年08月26日。

【0008】本發明提供了式（II）化合物，



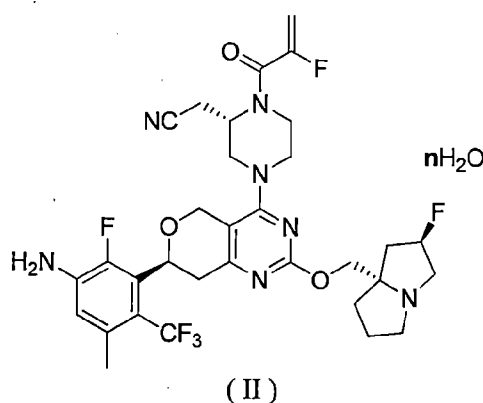
其中，n選自0~3。

【0009】在本發明的一些方案中，所述n選自0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9和3.0。

【0010】在本發明的一些方案中，所述n選自0.5、1、1.5、2、2.5和3。

【0011】在本發明的一些方案中，所述n選自2。

【0012】本發明還提供了式（II）化合物，



其中， $n$ 選自0~2。

【0013】在本發明的一些方案中，所述 $n$ 選自0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9和2。

【0014】在本發明的一些方案中，所述 $n$ 選自0.5、1、1.5和2。

【0015】在本發明的一些方案中，所述 $n$ 選自2。

【0016】本發明還提供了式(II)化合物的A晶型，其特徵在於其X射線粉末繞射圖譜在下列 $2\theta$ 角處具有特徵繞射峰： $8.514\pm 0.200^\circ$ 、 $14.689\pm 0.200^\circ$ 、 $18.122\pm 0.200^\circ$ 。

【0017】在本發明的一些方案中，上述A晶型的X射線粉末繞射圖譜在下列 $2\theta$ 角處具有特徵繞射峰： $6.218\pm 0.200^\circ$ 、 $8.514\pm 0.200^\circ$ 、 $12.299\pm 0.200^\circ$ 、 $14.689\pm 0.200^\circ$ 、 $16.903\pm 0.200^\circ$ 、 $18.122\pm 0.200^\circ$ 、 $18.927\pm 0.200^\circ$ 、 $25.580\pm 0.200^\circ$ 。

【0018】在本發明的一些方案中，上述A晶型的X射線粉末繞射圖譜在下列 $2\theta$ 角處具有特徵繞射峰： $6.218\pm 0.200^\circ$ 、 $8.514\pm 0.200^\circ$ 、 $11.663\pm 0.200^\circ$ 、 $12.299\pm 0.200^\circ$ 、 $14.689\pm 0.200^\circ$ 、 $16.903\pm 0.200^\circ$ 、 $18.122\pm 0.200^\circ$ 、 $18.927\pm 0.200^\circ$ 、 $19.364\pm 0.200^\circ$ 、 $20.386\pm 0.200^\circ$ 、 $21.914\pm 0.200^\circ$ 、 $25.580\pm 0.200^\circ$ 。



【0019】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的 X 射線粉末繞射圖譜在下列  $2\theta$  角處具有特徵繞射峰： $6.218\pm 0.200^\circ$ 、 $8.514\pm 0.200^\circ$ 、 $11.663\pm 0.200^\circ$ 、 $12.299\pm 0.200^\circ$ 、 $14.689\pm 0.200^\circ$ 、 $16.903\pm 0.200^\circ$ 、 $18.122\pm 0.200^\circ$ 、 $18.927\pm 0.200^\circ$ 、 $19.364\pm 0.200^\circ$ 、 $20.386\pm 0.200^\circ$ 、 $21.914\pm 0.200^\circ$ 、 $22.640\pm 0.200^\circ$ 、 $25.580\pm 0.200^\circ$ 、 $25.988\pm 0.200^\circ$ 、 $27.147\pm 0.200^\circ$ 、 $27.715\pm 0.200^\circ$ 。

【0020】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的 X 射線粉末繞射圖譜在下列  $2\theta$  角處具有特徵繞射峰： $6.218^\circ$ 、 $8.514^\circ$ 、 $11.663^\circ$ 、 $12.299^\circ$ 、 $14.689^\circ$ 、 $16.903^\circ$ 、 $18.122^\circ$ 、 $18.554^\circ$ 、 $18.927^\circ$ 、 $19.364^\circ$ 、 $20.386^\circ$ 、 $21.914^\circ$ 、 $22.640^\circ$ 、 $23.867^\circ$ 、 $24.553^\circ$ 、 $24.806^\circ$ 、 $25.580^\circ$ 、 $25.988^\circ$ 、 $27.147^\circ$ 、 $27.715^\circ$ 、 $29.135^\circ$ 、 $31.799^\circ$ 。

【0021】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的 X 射線粉末繞射圖譜在下列  $2\theta$  角處具有特徵繞射峰： $8.514\pm 0.200^\circ$ 、 $14.689\pm 0.200^\circ$ ，還可以在  $6.218\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $11.663\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $12.299\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $16.903\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $18.122\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $18.554\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $18.927\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $19.364\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $20.386\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $21.914\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $22.64\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $23.867\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $24.553\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $24.806\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $25.58\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $25.988\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $27.147\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $27.715\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $29.135\pm 0.200^\circ$ ，和/或  $31.799\pm 0.200^\circ$  處有特徵繞射峰。

【0022】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的 A 晶型，其 XRPD 圖譜如圖 1 所示。

【0023】本發明的一些方案中，上述 A 晶型的 XRPD 圖譜解析數據如表 1 所示：

表 1

編號	2θ角 (°)	面間距 (Å)	相對強度 (%)	強度	編號	2θ角 (°)	面間距 (Å)	相對強度 (%)	強度
1	6.218	14.2023 5	49.70%	1417.4 1	18	24.806	3.58629	6.50%	343.087
2	8.514	10.3775 3	53.00%	1500.5 5	19	25.580	3.47959	44.40%	1327.10
3	11.663	7.58177	27.40%	865.09 7	20	25.988	3.42591	11.80%	473.421
4	12.299	7.19077	36.40%	1111.7 3	21	27.147	3.28222	12.90%	486.080
5	12.888	6.86372	3.20%	251.58 2	22	27.715	3.21613	9.70%	395.792
6	14.689	6.02570	100.00%	2804.3 9	23	28.521	3.12708	4.30%	249.149
7	16.255	5.44860	2.80%	288.11 8	24	29.135	3.06256	8.00%	344.276
8	16.903	5.24119	48.50%	1486.9 0	25	29.638	3.01175	2.10%	183.706
9	18.122	4.89132	73.90%	2150.2 5	26	30.569	2.92211	3.20%	206.383
10	18.554	4.77818	23.10%	823.07 8	27	31.125	2.87113	3.10%	202.852
11	18.927	4.68486	44.30%	1370.1 8	28	31.799	2.81180	5.30%	256.503
12	19.364	4.58024	21.10%	758.95 4	29	32.789	2.72916	1.20%	139.579
13	20.386	4.35286	17.50%	640.60 8	30	33.855	2.64562	2.60%	169.028
14	21.914	4.05261	24.20%	803.12 5	31	34.827	2.57393	1.40%	129.355
15	22.640	3.92439	9.60%	421.04 9	32	36.782	2.44153	4.80%	216.242
16	23.867	3.72533	6.30%	335.66 8	33	38.522	2.33512	1.60%	124.831
17	24.553	3.62272	5.40%	315.15 9	34	39.646	2.27149	1.40%	126.875

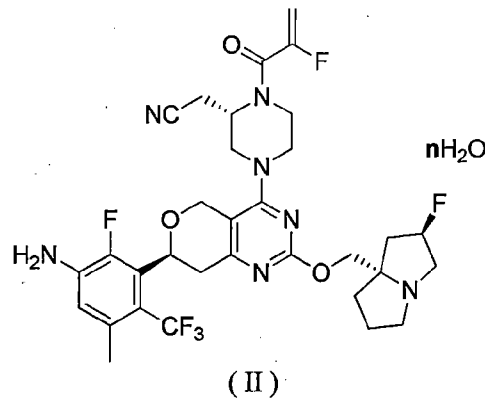
【0024】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的差示掃描量熱曲線在  $115.37^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  處具有吸熱峰的峰值。

【0025】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的 DSC 圖譜如圖 2 所示。

【0026】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的熱重分析曲線在  $150.0^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  時失重達 5.379%。

【0027】在本發明的一些方案中，上述 A 晶型的 TGA 圖譜如圖 3 所示。

【0028】本發明還提供式 (II) 化合物 A 晶型的製備方法，包括：



- (a) 將式 (I) 化合物加入乙醇中攪拌至澄清；
- (b) 在攪拌下將水緩慢加入到體系中，在 20~30°C 加入晶種；
- (c) 20~30°C 下攪拌 15 小時；
- (d) 20~30°C 緩慢將水滴加到反應體系中，繼續攪拌 1~3 小時。
- (e) 過濾，收集固體。

【0029】本發明還提供了上述化合物和 A 晶型在製備治療實體瘤藥物中的應用。

【0030】在本發明的一些方案中，上述實體瘤為肺癌和直腸癌。

【0031】技術效果

【0032】本發明化合物對 KRASG12C 突變的 MIA-PA-CA-2 細胞系、NCI-H358 細胞具有良好的細胞增殖抑制活性，有良好的肝微粒體、肝細胞、血漿、全血穩定性，有良好的 PK 性質，並且有顯著的抑瘤作用。A 晶型穩定、受光熱影響小，有良好的 PK 性質。

【0033】定義和說明

【0034】除非另有說明，本文所用的下列術語和短語旨在含有下列含義。一個特定的短語或術語在沒有特別定義的情況下不應該被認為是不

確定的或不清楚的，而應該按照普通的含義去理解。當本文出現商品名時，旨在指代其對應的商品或其活性成分。

**【0035】**本發明的中間體化合物可以通過本發明所屬技術領域具通常知識者所熟知的多種合成方法來製備，包括下面列舉的具體實施方式、其與其他化學合成方法的結合所形成的實施方式以及本發明所屬技術領域具通常知識者所熟知的等同替換方式，優選的實施方式包括但不限於本發明的實施例。

**【0036】**本發明具體實施方式的化學反應是在合適的溶劑中完成的，所述的溶劑須適合於本發明的化學變化及其所需的試劑和物料。為了獲得本發明的化合物，有時需要本發明所屬技術領域具通常知識者在已有實施方式的基礎上對合成步驟或者反應流程進行修改或選擇。

**【0037】**下面會通過實施例具體描述本發明，這些實施例並不意味著對本發明的任何限制。

**【0038】**本發明所使用的所有溶劑是市售的，無需進一步純化即可使用。

**【0039】**本發明的化合物可以通過本發明所屬技術領域具通常知識者所熟知的常規方法來確認結構，如果本發明涉及化合物的絕對構型，則該絕對構型可以通過本領域常規技術手段予以確證。例如單晶 X 射線繞射法（SXRD），把培養出的單晶用 Bruker D8 venture 繞射儀收集繞射強度數據，光源為 CuK $\alpha$  輻射，掃描方式： $\varphi/\omega$  掃描，收集相關數據後，進一步採用直接法(Shelxs97)解析晶體結構，便可以確證絕對構型。

**【0040】**化合物依據本領域常規命名原則或者使用 ChemDraw®軟體命名，市售化合物採用供應商目錄名稱。

**【0041】**本發明粉末 X-射線繞射（X-ray powder diffractometer, XRPD）方法

儀器型號：布魯克Bruker D2 PhaserX-射線繞射儀

測試方法：大約 10 ~ 20 mg 樣品用於 XRPD 檢測。

詳細的 XRPD 參數如下：

光管：Cu,  $k\alpha$ , ( $\lambda=1.54184\text{\AA}$ ).

光管電壓：30 kV，光管電流：10 mA

發散狹縫：0.60 mm

探測器狹縫：5.827 mm

防散射狹縫：0 mm

掃描範圍：3-40 deg

步徑：0.02 deg

步長：0.2 秒

**【0042】** 本發明差熱分析 (Differential Scanning Calorimeter, DSC) 方法

儀器型號：NETZSCH DSC 214 DSC21400A-0958-L

測試方法：取樣品 (~ 4.02 mg) 置於 DSC 鋁鍋內進行測試，在 50mL/min N<sub>2</sub> 條件下，以 10°C/min 的升溫速率，加熱樣品從 30°C (室溫) 到 400°C。

**【0043】** 本發明熱重分析 (Thermal Gravimetric Analyzer, TGA) 方法

儀器型號：TA Discovery TGA 5500 熱重分析儀

測試方法：取樣品 (2~5mg) 置於 TGA 鉑金鍋內進行測試，在 25mL/min N<sub>2</sub> 條件下，以 10°C/min 的升溫速率，加熱樣品從室溫到 350°C 或失重 20%。

**【0044】** 本發明 X-射線單晶繞射方法

儀器型號：Bruker D8 VENTURE CMOS Photon II diffractometer with helios mx multilayer monochromator.

測試方法：取 0.0133g 式 (II) 化合物 A 晶型在室溫條件下溶解於 2mL 乙腈中。將樣品溶液置於 4 mL 半密封樣品瓶中，在室溫下緩慢揮發。十天後得到無色塊狀晶體。繞射實驗溫度  $T = 173(2)$  K。

儀器參數：

Bruker D8 VENTURE CMOS Photon II diffractometer with helios mx multilayer monochromator.

Cryogenic system: Oxford Cryostream 800

Cu:  $\lambda = 1.54184$  Å, 2.5kW,

Distance from the crystal to detector:  $d = 45$  mm

Tube Voltage: 50 kV

Tube Current: 50 mA

【0045】為讓本發明之上述和其他目的、特徵和優點能更明顯易懂，下文特舉實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下。

#### 【圖式簡單說明】

##### 【0046】

圖 1 為式 (II) 化合物 A 晶型的 Cu-K $\alpha$  輻射的 XRPD 譜圖；

圖 2 為式 (II) 化合物 A 晶型的 DSC 譜圖；

圖 3 為式 (II) 化合物 A 晶型的 TGA 譜圖；

圖 4 為式 (I) 化合物不同給藥量隨著時間延長的腫瘤體積變化；

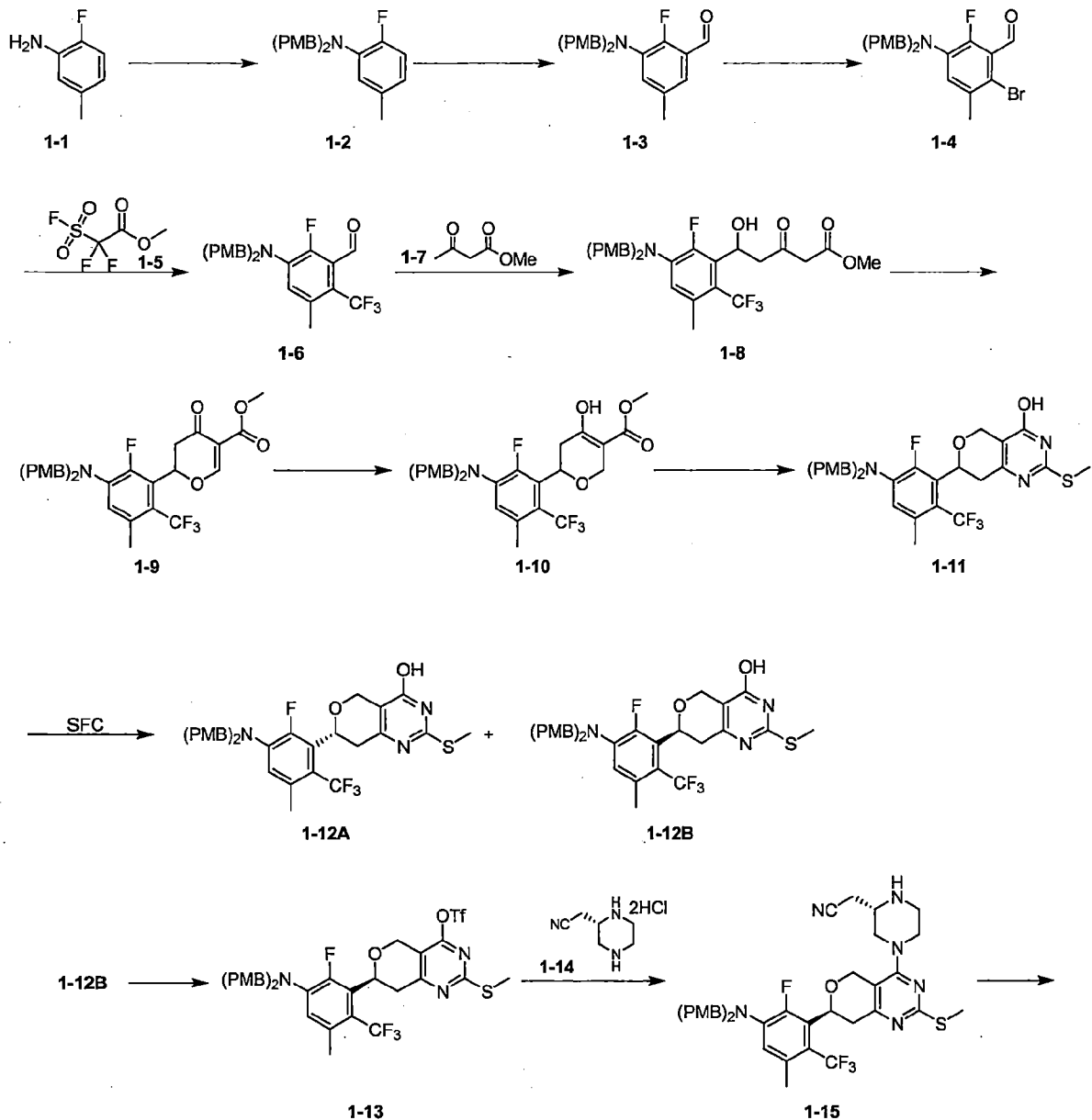
圖 5 為式 (I) 化合物不同給藥量隨著時間延長的動物體重變化；

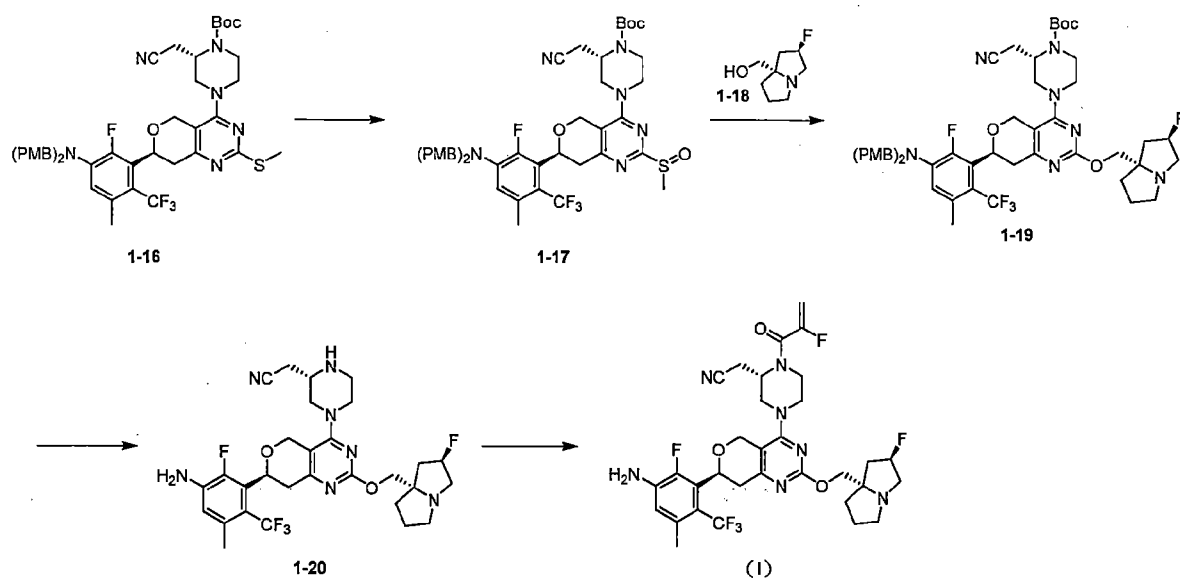
圖 6 為式 (III) 化合物的單晶 X 射線繞射立體結構橢球圖。

## 【實施方式】

【0047】為了更好的理解本發明的內容，下面結合具體實施例來做進一步的說明，但具體的實施方式並不是對本發明的內容所做的限制。

## 【0048】實施例 1：式 (I) 化合物的製備





#### 【0049】步驟 1：化合物 1-2 的合成

準備好 5 升三口瓶，將化合物 1-1(250 g, 2.00 mol, 1 eq) 和無水碳酸鉀 (690.26 g, 4.99 mol, 2.5 eq)，碘化鉀(331.62 g, 2.00 mol, 1 eq) 加入到 N-甲基吡咯烷酮(2.5 L) 中，然後滴加對甲氧基苯甲基氯 (641.36 g, 4.10 mol, 557.71 mL, 2.05 eq)，反應液成黃色渾濁，在氮氣保護下置於 120°C 油浴中攪拌反應 5 小時。合併 6 批反應液 (250×6)，倒入 20 升水中，再加入 10 升甲基第三丁基醚攪拌，分液後收集有機相，水相用甲基第三丁基醚萃取(5 L x 1)，合併有機相，飽和食鹽水洗滌(10 L x 2)，無水硫酸鈉乾燥，減壓濃縮得到化合物 1-2 品。向粗品中加入 3 升石油醚，打漿過夜。打漿體系成乳白色渾濁，通過布氏漏斗過濾。濾餅用石油醚 (500 mL x 3) 淋洗，得到的濾餅，得到化合物 1-2。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.23-7.18 (m, 4H), 6.91-6.87(m, 1H), 6.82-6.76 (m, 4H), 6.65-6.59(m, 2H), 4.20 (s, 4H), 3.79(s, 6H), 2.19 (s, 3H)。LCMS: MS m/z = 366.1 [M+H]<sup>+</sup>。

#### 【0050】步驟 2：化合物 1-3 的合成



將 2,2,6,6-四甲基哌啶(2.44 kg, 17.29 mol, 2.94 L, 4 eq) 加入到無水四氫呋喃 (15 L) 中，降溫至 $-5-0^{\circ}\text{C}$ ，氮氣置換三次，氮氣保護下滴加正丁基鋰(2.5 M, 6.92 L, 4 eq)， $-5-0^{\circ}\text{C}$ 反應 15min，降溫至 $-60^{\circ}\text{C}$ ，滴加化合物 1-2(1.58 kg, 4.32 mol, 1 eq) 的四氫呋喃(1.5 L)溶液，滴加完畢後 $-65\sim-60^{\circ}\text{C}$ 反應 0.5 小時，快速加入 N,N-二甲基甲醯胺 (3.16 kg, 43.24 mol, 3.33L, 10 eq)， $-60^{\circ}\text{C}$ 反應 10min，向反應液加入 20 L 飽和氯化銨，用 5 L 的甲基第三丁基醚萃取分液，有機相繼續用 20 L 飽和氯化銨洗滌，然後水相用 10 L 的甲基第三丁基醚繼續萃取分液，合併有機相，有機相用飽和食鹽水洗滌 (12 L x 2)，無水硫酸鈉乾燥過濾後濃縮，粗品用石油醚/甲基第三丁基醚(3/1, 3L)打漿 5 小時，過濾，收集濾餅得到化合物 1-3。 $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 10.43 - 10.35$  (m, 1H), 7.21-7.18 (m, 5H), 6.92 - 6.81 (m, 5H), 4.25 (s, 4H), 3.80 (s, 6H), 2.23 (s, 3H)。LCMS:MS  $m/z = 394.2[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

### 【0051】步驟 3：化合物 1-4 的合成

將化合物 1-3 (1.17 kg, 2.83 mol, 95%純度, 1 eq) 加入到 N,N-二甲基甲醯胺 (5.7 L) 中， $5^{\circ}\text{C}$  下分批加入溴代丁二醯亞胺 (603.35 g, 3.39 mol, 1.2 eq)， $5-15^{\circ}\text{C}$  反應 1 小時，向反應液中，緩慢加入 5.7 L 水，有固體析出，攪拌 20 min 後，繼續緩慢加入 11.4 L 水，繼續攪拌 40 min，過濾，將濾餅用水 (2 L x 2) 的淋洗。粗品用石油醚：甲基第三丁基醚=10:1 的混合溶劑 7.7 L 打漿 12 小時，過濾，濾餅用石油醚：甲基第三丁基醚=10:1 的混合溶劑 500 mL 淋洗後進行真空濃縮後，用氮氣吹 12 小時，得到化合物 1-4。 $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 10.39$  (s, 1H), 7.17 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 6.89 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.85-6.82 (m, 4H), 4.22 (s, 4H), 3.79 (s, 6H), 2.28 (s, 3H)。LCMS:MS  $m/z = 472.1[\text{M}+\text{H}]^+$ , 474.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

**【0052】** 步驟 4：化合物 1-6 的合成

將化合物 1-4 (130 g, 275.22 mmol, 1 eq), 碘化亞酮 (104.83g, 550.44 mmol, 2 eq), 化合物 1-5 (264.37 g, 1.38 mol, 175.08 mL, 5 eq) 溶於 DMF (1.3 L) 中, 氮氣保護, 在 100°C 下攪拌 4 小時。降溫, 體系過濾, 倒入水 (1.3 L) 中淬滅, 甲基第三丁基醚 (400 mL x 2) 萃取, 飽和食鹽水洗滌 (300mL) 洗滌, 無水硫酸鈉乾燥, 過濾, 收集母液濃縮得到粗品。粗品打漿 (石油醚/甲基第三丁基醚 = 8/1, 300 mL) 得到化合物 1-6, 收集母液, 母液濃縮柱層析 (石油醚/乙酸乙酯 = 100/1~5/1) 得到粗品, 粗品打漿 (石油醚/甲基第三丁基醚 = 8/1, 100 mL) 得到化合物 1-6。兩批次固體用石油醚打漿混合, 過濾, 收集固體, 得到化合物 1-6。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 10.37 (q, J = 4.0 Hz, 1H), 7.18 - 7.11 (m, 4H), 6.89 - 6.82 (m, 4H), 6.73 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.36 (s, 4H), 3.81 (s, 6H), 2.37 - 2.29 (m, 3H)。LCMS: MS m/z = 484.0[M+Na]<sup>+</sup>。

**【0053】** 步驟 5：化合物 1-8 的合成

將鈉氫 (70.21 g, 1.76 mol, 60% 純度, 1.8 eq) 加入到無水四氫呋喃 (4.5 L) 中, 降溫至 -5°C, 置換氮氣三次, 氮氣保護下滴加化合物 1-7 (203.82 g, 1.76 mol, 188.72 mL, 1.8 eq), -5~0°C 反應 10min 後, 滴加正丁基鋰 (2.5 M, 702.14 mL, 1.8 eq), 繼續在氮氣保護下 -5~0°C 反應 10min, 降溫至 -10°C, 滴加化合物 1-6 (450 g, 975.19 mmol, 1 eq) 的四氫呋喃 (450 mL) 溶液, -10°C 下反應 10min, 將反應液緩慢加入到 5 L 飽和氯化銨中, 分液萃取, 有機相用 4 L 的飽和食鹽水洗滌, 無水硫酸鈉乾燥過濾後濃縮, 向濃縮後的粗品中加入 900 mL x 4 的石油醚, 晃蕩洗滌後, 將石油醚上清液傾倒掉, 將粗品進行真空濃縮得到化合物 1-8。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.18-7.15 (m, 4H), 6.90 - 6.78 (m, 4H),

6.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 5.72 - 5.57 (m, 1H), 4.31 (m, 4H), 3.81(s, 6H), 3.76(s, 3H), 3.56 (s, 2H), 3.50 - 3.38 (m, 1H), 2.98 - 2.93 (m, 1H), 2.38 - 2.26 (m, 3H)。LCMS: MS  $m/z = 578.1[M+H]^+$ 。

**【0054】** 步驟 6：化合物 1-9 的合成

將化合物 1-8 (1.15 kg, 1.77 mol, 89% 純度, 1 eq) 加入到二氯甲烷 (5.7 L) 中，加入 N,N-二甲基甲醯胺二甲基縮醛 (337.86 g, 2.84 mol, 376.66 mL, 1.6 eq)，25°C 反應 1 小時，降溫至 0°C，0-5°C 下滴加入三氟化硼乙醚 (377.27 g, 2.66 mol, 328.06 mL, 1.5 eq)，反應 10 min。LCMS 表明原料消失，出現產物 Ms 信號。將反應液緩慢加入到 10 L 的半飽和碳酸氫鈉溶液中，分液萃取，有機相用 5 L 的飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥過濾後濃縮將粗品平均分成六份，每份加入 0.83 L 的甲基第三丁基醚，攪拌 20 min 後析出固體，繼續加入石油醚：甲基第三丁基醚 = 1:1 的混合溶劑 0.5 L 後，打漿過夜 16 小時，六份一起過濾，將濾餅用石油醚：甲基第三丁基醚 = 1:1 的混合溶劑 800 mL x 2 淋洗後，旋乾，母液經柱層析石油醚：乙酸乙酯 = 100:0-0:1 得到化合物 1-9。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 8.43$  (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 7.21 - 7.10 (m, 4H), 6.91 - 6.81 (m, 4H), 6.70 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 5.93 (dd,  $J = 3.2, 14.8$  Hz, 1H), 4.35 (s, 4H), 3.8(s, 3H), 3.81 (s, 6H), 3.38-3.29 (m, 1H), 2.68 (dd,  $J = 3.6, 16.8$  Hz, 1H), 2.39 - 2.24 (m, 3H)。LCMS: MS  $m/z = 588.2[M+H]^+$ 。

**【0055】** 步驟 7：化合物 1-10 的合成

將化合物 1-9 (775 g, 1.32 mol, 1 eq) 加入到四氫呋喃 (4 L) 中，降溫至 -60°C，置換氮氣三次，氮氣保護下滴加三第二丁基硼氫化理 (1 M, 1.45 L, 1.1 eq)，-60°C 下反應 10 min。將反應液緩慢加入到 3.5 L 的 1M 鹽酸溶液中，加入 2 L 的水分液萃取，水相繼續用 2 L 的乙酸乙

酯萃取，合併有機相中並繼續加入 1 L 的乙酸乙酯，用 5 L 飽和食鹽水洗滌，無水硫酸鈉乾燥過濾後濃縮，將粗品分為 4 批，分別加入 200 mL 的甲基第三丁基醚，攪拌 10 min，緩慢加入 200 mL 的石油醚，攪拌 0.5-1 小時後析出固體，繼續分批次加入 1.6L 的石油醚，打漿攪拌 12 小時，過濾，將濾餅用石油醚：甲基第三丁基醚=10:1 的溶劑 300 mL x 3 淋洗，收集固體得到化合物 1-10 (1.15 kg)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.167-7.14(m, 4H), 6.87-6.83 (m, 4H), 6.63 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.05-5.00 (m, 1H), 4.61-4.58 (m, 1H), 4.42 - 4.24 (m, 5H), 3.85-3.73 (m, 10H), 3.13-3.05 (m, 1H), 2.47 - 2.38 (m, 1H), 2.35-2.31 (m, 3H)。LCMS: MS m/z = 590.3.[M+H]<sup>+</sup>。

#### 【0056】步驟 8：化合物 1-11 的合成

將化合物 1-10 (310 g, 525.80 mmol, 1 eq) 加入到乙醇 (1.55 L) 中，加入 S-甲基異硫脲硫酸鹽 (439.11 g, 1.58 mol, 3 eq) 和碳酸鈉 (111.46 g, 1.05 mol, 2 eq)，45~50°C (內溫) 氮氣保護下反應 16 小時。將大部分乙醇濃縮除去，向粗品中加入 500 毫升水和 400 毫升乙酸乙酯，攪拌，用 500 mL 1M 鹽酸調節 pH=3~4 後有灰白色固體析出，再加入 600 mL 石油醚，攪拌，體系中有大量灰白色固體析出。將體系經布氏漏斗過濾，濾餅用乙酸乙酯淋洗 (200 mL x 2)，得到的濾餅即為產品。將濾餅用 2 L 二氯甲烷溶解，分液，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到化合物 1-11。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.22 - 7.14 (m, 4H), 6.91 - 6.82 (m, 4H), 6.65 (dd, J = 8.4 Hz 1H), 5.12-5.08 (m, 1H), 4.97-4.91 (m, 1H), 4.67 - 4.57 (m, 1H), 4.45 - 4.22 (m, 4H), 3.88 - 3.74 (m, 6H), 3.43-3.35 (m, 1H), 2.77-2.72 (m, 1H), 2.59 (m, 3H), 2.40-2.31 (m, 3H)。LCMS:MS m/z =630.2[M+H]<sup>+</sup>。

**【0057】步驟 9：化合物 1-12B 的合成**

化合物 1-11 進行 SFC 拆分，色譜柱:DAICEL CHIRALPAK AD(250mm\*50mm,10 $\mu$ m);流動相:[0.1%NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O EtOH]; EtOH%: 45%-45%,6.3min。得化合物 1-12B(出峰時間:1.665 min),化合物 1-12A (出峰時間:2.446 min)。

**【0058】步驟 10：化合物 1-13 的合成**

將化合物 1-12B (2 g, 3.18 mmol, 1 eq) 溶於二氯甲烷(20 mL) 中，加入 N,N-二異丙基乙胺 (1.23 g, 9.53 mmol, 1.66 mL, 3 eq)，降溫至 0~10°C，將三氟甲磺酸酐 (1.34 g, 4.76 mmol, 786.11  $\mu$ L, 1.5 eq) 緩慢加入到體系中，在此溫度下反應 15min。倒入飽和氯化銨水溶液 (15 mL)，分液，水相用二氯甲烷(15 mL x 2)萃取，合併有機相，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮得到粗品。粗品經柱層析 (石油醚/乙酸乙酯 =100/1~0/1) 分離得到化合物 1-13。LCMS m/z =762.2[M+H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 7.21 - 7.11 (m, 4H), 6.90 - 6.80 (m, 4H), 6.66 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.19-5.15 (m, 1H), 5.04 - 4.93 (m, 1H), 4.77-4.72 (m, 1H), 4.41 - 4.19 (m, 4H), 3.80 (s, 6H), 3.62-3.54 (m, 1H), 3.11 - 2.97 (m, 1H), 2.56 (s, 3H), 2.42 - 2.31 (m, 3H)。LCMS:MS m/z =762.2[M+H]<sup>+</sup>。

**【0059】步驟 11：化合物 1-15 的合成**

將化合物 1-13(147 g, 186.74 mmol, 96.767% 純度, 1 eq) 溶於 N,N-二甲基甲醯胺(1.5 L) 中，加入 N,N-二異丙基乙胺(72.40 g, 560.23 mmol, 97.58 mL, 3 eq)，再加入化合物 1-14(42.54 g, 214.76 mmol, 1.15 eq, 2HCl)，升溫至 50°C 攪拌 0.5 小時。反應液直接用於下一步，得到化合物 1-15 的 N,N-二甲基甲醯胺溶液。

**【0060】步驟 12：化合物 1-16 的合成**

將化合物 1-15(137.8 g, 187.02 mmol, 1 eq) 的 N,N-二甲基甲醯胺溶液 (1.5 L) 溶液加入到攪拌器中，加入三乙胺(18.92 g, 187.02 mmol, 26.03 mL, 1 eq)，將二碳酸二第三丁酯 (48.98 g, 224.42 mmol, 51.56 mL, 1.2 eq) 加到反應液中，18°C 攪拌 10 小時。倒入水中 (1.5 L)，加入乙酸乙酯 (400 mL x 3)，飽和氯化銨水溶液 (400 mL x 4)，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濃縮得到化合物 1-16。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 6.85 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H), 6.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.90 - 4.68 (m, 2H), 4.61 (s, 1H), 4.41 - 4.21 (m, 4H), 4.04 (s, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.71 (s, 1H), 3.50 (d, *J* = 11.0 Hz, 2H), 3.30 (s, 1H), 3.24 - 3.02 (m, 2H), 2.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 2.78 - 2.58 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.34 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H), 1.51 (s, 9H)。LCMS *m/z* = 837.2[M+H]<sup>+</sup>。

**【0061】** 步驟 13：化合物 1-17 的合成

將化合物 1-16(245 g, 278.10 mmol, 95% 純度, 1 eq) 溶於無水二氯甲烷(2500 mL)，降溫至 0~10°C，然後將間氯過氧苯甲酸 (56.46 g, 278.10 mmol, 85% 純度, 1 eq) 分批加入，10°C 攪拌 0.5 小時。補加間氯過氧苯甲酸(8.47 g, 41.71 mmol, 85% 純度, 0.15 eq)，10°C 繼續攪拌 0.5 小時。將該反應與 (化合物 1-16 10g 批次) 合併處理。反應液用飽和碳酸氫鈉洗 (1500 mL)，5% 硫代硫酸鈉洗 (1500 mL) (濕潤澱粉碘化鉀試紙檢測合格後)，半飽和食鹽水洗 (1500 mL)，無水硫酸鈉乾燥過濾濃縮。柱層析純化乙酸乙酯:石油醚 = 10%-15%-20%-30%。得到化合物 1-17。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7.15 (d, *J* = 8.00 Hz, 4 H), 6.85 (d, *J* = 8.80 Hz, 4 H), 6.65 (d, *J* = 8.80 Hz, 1 H), 5.27 (m, 1 H), 4.78 - 4.91 (m, 2 H), 4.61 (s, 1 H), 4.24 - 4.38 (m, 4 H), 3.90 - 4.18 (m, 2 H), 3.78 - 3.82 (m, 6

H), 3.42 - 3.70 (m, 3 H), 3.33 (br s, 1 H), 3.06 - 3.28 (m, 2 H), 2.90 (s, 3 H), 2.66 (m, 2 H), 2.29 - 2.41 (s, 3 H), 1.51 (s, 9 H) 。 LCMS  $m/z = 853.2[M+H]^+$  。

**【0062】** 步驟 14：化合物 1-19 的合成

將化合物 1-18 (18.24 g, 114.59 mmol, 1.2 eq) 溶於無水四氫呋喃 (900 mL)，降溫至  $-20^{\circ}\text{C}$ ，然後加入第三丁醇鈉 (11.01 g, 114.59 mmol, 1.2 eq)，攪拌 15min。然後加入化合物 1-17 (90.5 g, 95.49 mmol, 90% 純度, 1 eq) 的無水四氫呋喃 (180 mL)，繼續攪拌 0.5 小時。該反應與 (化合物 1-18 50g 批次) 合併處理。向反應液中加入 1000 mL 飽和氯化銨淬滅反應，分液，水相用乙酸乙酯萃取 (1000 mL) 分液，無水硫酸鈉乾燥過濾，濃縮。柱層析純化 (乙酸乙酯：石油醚 = 20%-50%-100%) 得白色固體化合物 1-19。LCMS  $m/z = 948.4[M+H]^+$  。

**【0063】** 步驟 15：化合物 1-20 的合成

將化合物 1-19 (97.00 g, 97.20 mmol, 95% 純度, 1 eq) 溶於 2-甲基四氫呋喃 (500 mL)，降溫至  $0^{\circ}\text{C}$ ，然後將鹽酸 (8 M, 614.80 mL, 50.6 eq) 滴加到反應液中，升至  $25^{\circ}\text{C}$  攪拌 2 小時。加入正庚烷 (200 mL) 分液，收集水相，加入 2-甲基四氫呋喃 (300 mL)，用碳酸鈉調節  $\text{pH}=8\sim 9$ ，攪拌澄清，分液，收集有機相，水相用 2-甲基四氫呋喃 (300 mL x 2)，收集有機相，飽和食鹽水洗 (200 mL)，無水硫酸鎂乾燥，過濾，收集有機相，濃縮得到粗品，用二氯甲烷 (1000 mL) 溶解，將三氟乙酸 (283.73 g, 2.49 mol, 184.24 mL, 25.6 eq) 緩慢加入到二氯甲烷中控制溫度在  $10^{\circ}\text{C}$  以下， $25^{\circ}\text{C}$  攪拌 3 小時。將反應液倒入 500 mL 冰水，攪拌至澄清，分液。有機相用水 (300 mL x 3) 萃取。合併兩個批次水相，然後用二氯甲烷 (500 mL x 4) 反萃，棄去有機相。將水相降溫至  $10^{\circ}\text{C}$ ，向水相在

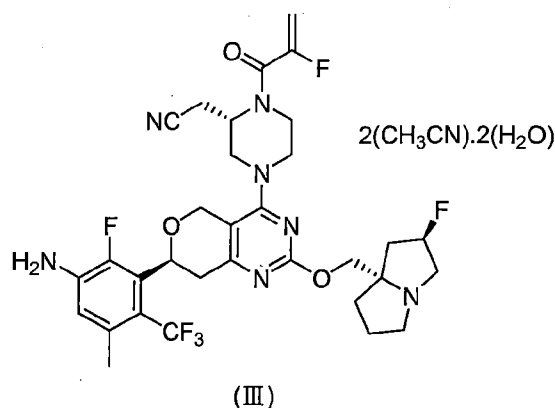
加入 500mL 2-甲基四氫呋喃(會放熱)，然後用碳酸鈉調 pH = 9，2-甲基四氫呋喃(400 mL x 2)萃取，合併有機相，水洗 (300 mL x 4)，飽和食鹽水洗 (300 mL)，無水硫酸鈉乾燥過濾濃縮得灰色固體化合物 1-20。LCMS m/z = 608.27[M+H]<sup>+</sup>。

**【0064】** 步驟 16：式( I )化合物的合成

將化合物 1-20 (58 g, 84.00 mmol, 88% 純度, 1 eq)，N,N-二異丙基乙胺 (21.71 g, 168.00 mmol, 29.26 mL, 2 eq)、2-(7-氮雜苯並三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(38.33 g, 100.80 mmol, 1.2 eq)溶於 DMF (600 mL)，然後降溫至 0°C，分批加入 2-氟丙烯酸(6.81 g, 75.60 mmol, 0.9 eq)，0°C 攪拌 10 min。將反應液倒入 900 mL 水中，然後乙酸乙酯萃取 (200 mL x 3)，合併有機相，飽和氯化銨洗 (200 mL x 3)，飽和碳酸鈉洗 (200 mL x 3)，飽和食鹽水洗 (200 mL)，無水硫酸鈉乾燥過濾濃縮。然後用乙腈：水 (100mL：150 mL) 打漿 16 小時，過濾得到式( I )化合物。SFC 分析方法(柱子：Chiralcel OD-3, 50×4.6 mm I.D., 3 μm；流動相：A (CO<sub>2</sub>) 和 B (甲醇，含 0.05% 二異丙基胺)；梯度：B%=5~50%，3 min；流速：3.4 mL/min；波長：220 nm；壓力：1800psi，光學純度：99.21%，出峰時間：1.840 min。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ = 6.80 - 6.68 (m, 1H), 5.73 - 5.51 (m, 1H), 5.46 - 5.19 (m, 3H), 5.05 - 4.90 (m, 3H), 4.74 - 4.58 (m, 2H), 4.37 - 4.26 (m, 1H), 4.20 - 4.06 (m, 2H), 4.05 - 3.84 (m, 3H), 3.79 - 3.59 (m, 2H), 3.54 - 3.43 (m, 1H), 3.42 - 3.35 (m, 1H), 3.31 - 3.24 (m, 1H), 3.13 - 2.89 (m, 3H), 2.82 - 2.52 (m, 2H), 2.50 - 2.42 (m, 1H), 2.41 - 2.30 (m, 5H), 2.29 - 2.18 (m, 1H)。

**【0065】** 實施例 2：式( III )化合物的單晶 X-射線繞射檢測分析





取 0.0133g 式(II)化合物 A 晶型在室溫條件下溶解於 2mL 乙腈中。將樣品溶液置於 4 mL 半密封樣品瓶中，在室溫下緩慢揮發。十天後得到無色塊狀晶體。收集晶體，用單晶 X 射線繞射儀 (D8-VENTURE) 收集繞射強度數據。式 (III) 化合物的晶體結構數據見表 2，式 (III) 化合物立體結構橢球圖見附圖 6。

表 2. 式 (III) 化合物的晶體數據

Crystal Size	0.180 x 0.160 x 0.120 mm
Radiation Type	Cu K $\alpha$ ( $\lambda = 1.54184\text{\AA}$ )
Crystal system	Tetragonal
Space Group	P4(1)
Cell Size	a = 10.9496(3) $\text{\AA}$ b = 10.9496(3) $\text{\AA}$ c = 64.126(2) $\text{\AA}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Cell Volume	V = 7688.3 (5) $\text{\AA}^3$
Cell Formula Units	Z = 8
Crystal Density	$D_c = 1.375 \text{ Mg/m}^3$
Crystal F(000)	3328

Absorption Coefficient $\mu$	$\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.971 \text{ mm}^{-1}$
Limiting Indices	$-12 \leq h \leq 12$ $-9 \leq k \leq 12$ $-75 \leq l \leq 73$
Cell Measurement Temperature	$T = 173 (2) \text{ K.}$
Theta range for data collection	$2.756 \sim 65.272^\circ$
Goodness-of-fit on $F^2$	1.028
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0718, wR_2 = 0.1968$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0802, wR_2 = 0.2030$
Largest diff. peak and hole	$0.310, -0.335 \text{ e.}\text{\AA}^{-3}$
Reflections collected / unique	68300 / 12934 [ $R_{(\text{int})} = 0.0906$ ]

**【0066】** 實施例 3：式 (II) 化合物 A 晶型的製備

方法一：將式 (I) 化合物 (0.2 g) 加入到乙醇 (2.4 mL) 中，加熱至 50°C，溶清後將水 (0.48 mL) 緩慢加入到反應液中，在 50°C 下攪拌 72 小時，過濾，收集固體得到式 (II) 化合物 A 晶型。

方法二：將式 (I) 化合物 (5.0g) 加入到乙醇 (4 V) 攪拌至澄清，將水 (1 V) 緩慢加入到體系中，在 20~30°C 下加入晶種 (0.5g)，在此溫度下攪拌 15 小時，再緩慢滴加水 (3V)，繼續攪拌 1~3 小時。過濾收集濾餅，得到式 (II) 化合物 A 晶型。

**【0067】** 實施例 4：式 (II) 化合物 A 晶型的固體穩定性試驗

依據《原料藥與製劑穩定性試驗指導原則》(中國藥典 2015 版四部通則 9001)，考察式 (II) 化合物 A 晶型在高溫 (60°C，敞口)，高濕 (室溫/相對濕度 92.5%，敞口) 及強光照 (5000 lx，敞口) 條件下

的穩定性，以及長期實驗（ $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{RH}$ ），加速實驗（ $40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\% \text{RH}$ ）條件下的晶型穩定性。

稱取式（II）化合物 A 晶型約 20 mg，置於玻璃樣品瓶的底部，攤成薄薄一層。高溫及高濕條件下放置的樣品用鋁箔紙封瓶口，並在鋁箔紙上紮些小孔，保證樣品能與環境空氣充分接觸；強光照條件下放置的樣品用鋁箔紙封瓶口，並在鋁箔紙上紮些小孔。不同條件下放置的樣品於第 5 天，10 天取樣檢測（XRPD），檢測結果與 0 天的初始檢測結果進行比較，試驗結果見下表 3 所示。

將式（II）化合物 A 晶型放入雙層藥用低密度聚乙烯袋中，每份藥用低密度聚乙烯袋分別用紮帶紮緊，再放入單層鋁箔袋中並熱封，最後將樣品儲存在塑料桶中，儲存在穩定性恒溫恒濕箱中。穩定性試驗所用的包裝模擬物料存儲包裝，在紅光下將物料分裝為 1.5 g/包的穩定性樣品，每份樣都以相同的方式包裝並貼好穩定性樣品標籤，在不同條件下放置的樣品於第 3 個月，第 6 個月取樣檢測（XRPD），檢測結果與 0 天的初始檢測結果進行比較，試驗結果見下表 3 所示。

表 3 式（II）化合物 A 晶型的固體穩定性試驗結果

試驗條件	時間點	晶型
-	0 天	A 晶型
高溫（ $60^{\circ}\text{C}$ ，敞口）	5 天	A 晶型
	10 天	A 晶型
高濕（ $25^{\circ}\text{C}/$ 相對濕度 92.5%，敞口）	5 天	A 晶型
	10 天	A 晶型
光照對照* <sup>1</sup>	5 天	A 晶型
	10 天	A 晶型

25±2°C/60 ±5%相對濕度	3 個月	A 晶型
	6 個月	A 晶型
40±2°C/75 ±5%相對濕度	3 個月	A 晶型
	6 個月	A 晶型

光照對照<sup>\*1</sup>：需同時放置光照對照樣品，光照對照樣品採用螺紋瓶蓋密封，再用錫箔紙完全包裹。

結論：式 (II) 化合物 A 晶型在高溫、高濕、強光照條件下，以及長期實驗和加速實驗的條件下具有良好的穩定性。

【0068】生物測試數據：

【0069】實驗例 1：化合物對 KRAS<sup>G12C</sup> 突變的 MIA-PA-CA-2 細胞增殖抑制作用的測試

#### 1.1 實驗目的

測試化合物對 KRAS<sup>G12C</sup> 突變的 MIA-PA-CA-2 細胞增殖抑制的 IC<sub>50</sub>。

#### 1.2 試劑

本研究使用的主要試劑包括 CellTiter-Glo (Promega, 貨號：G7573)。

#### 1.3 儀器

本研究所使用主要儀器為 PerkinElmer EnVision 多功能酶標儀。

#### 1.4 實驗方法

1) 貼壁細胞經胰酶消化處理成細胞懸液，並對細胞懸液進行計數備用。

2) 取適量細胞至離心管並用細胞培養液補足至需要體積，鋪至 96 孔板，終密度為 2000 細胞/孔，100 μL 培養液。

3) 培養 24 小時後，將化合物用 DMSO 配置成 10 mM，並用 DPBS（杜比可磷酸緩衝鹽）以 3 倍梯度稀釋 9 個點，每孔加入 10  $\mu$ L，兩複孔。實驗對照孔（Con）每孔加入 10  $\mu$ L DPBS。

4) 同天，取一塊未加藥處理的細胞培養板，加入 50  $\mu$ L CellTiter Glo，利用 EnVision 進行螢光讀值，標記為 Day0 讀值。

5) 加藥處理後的細胞培養 72 h 後，去除培養板，向細胞板中加入 50  $\mu$ L CellTiter Glo，利用 EnVision 進行螢光讀值。

6) 數據分析：按下列公式計算各孔對細胞的抑制率：

$$\text{抑制率}\% = \left(1 - \frac{F_{\text{Cpd}}}{F_{\text{Con}} - F_{\text{Day0}}}\right) * 100\%$$

\*  $F_{\text{Day0}}$  為未加藥處理的原始細胞數目測試孔的讀值；

$F_{\text{Con}}$  為培養 72 小時後，Con 組的螢光讀值。

$F_{\text{Cpd}}$  為培養 72 小時後，各化合物孔的螢光讀值。

7) 使用 GraphPad Prism 軟體對化合物的抑制率數據（抑制率%）進行 log(agonist) vs. response -- Variable slope 非線性擬合分析，得到化合物的  $IC_{50}$  值，擬合公式為：

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log}IC_{50} - X) * \text{HillSlope}))})$$

### 1.5 實驗結果

表 4. 本發明化合物對 KRASG12C 突變的 MIA-PA-CA-2 細胞增殖抑制的測試結果

受試品	$IC_{50}$ (nM)
式 (I) 化合物	0.44

實驗結果顯示式 (I) 化合物對 KRASG12C 突變的 MIA-PA-CA-2 細胞系具有良好的細胞增殖抑制活性。

**【0070】實驗例 2：化合物對 KRAS<sup>G12C</sup> 突變的 H358 細胞增殖抑制作用的測試**

### 2.1 實驗目的

測試化合物對 KRAS<sup>G12C</sup> 突變的 H358 細胞增殖抑制的 IC<sub>50</sub>。

### 2.2 試劑

本研究使用的主要試劑包括 RPMI-1640 培養基，盤尼西林/鏈黴素 抗生素購自維森特，胎牛血清購自 Biosera。CellTiter-Glo（細胞活率化學發光檢測試劑）試劑購自 Promega。NCI-H358 細胞系購自中國科學院細胞庫。

### 2.3 儀器

本研究所使用主要儀器為 Nivo 多標記分析儀(PerkinElmer)。

### 2.4 實驗方法：

1) 將 NCI-H358 細胞種於白色 96 孔板中，80 $\mu$ L 細胞懸液每孔，其中包含 4000 個 NCI-H358 細胞。細胞板置於二氧化碳培養箱中過夜培養。

2) 將待測化合物用排槍進行 5 倍稀釋至第 9 個濃度，即從 2 mM 稀釋至 5.12nM，設置雙複孔實驗。向中間板中加入 78  $\mu$ L 培養基，再按照對應位置，轉移 2  $\mu$ L 每孔的梯度稀釋化合物至中間板，混勻後轉移 20 $\mu$ L 每孔到細胞板中。轉移到細胞板中的化合物濃度範圍是 10 $\mu$ M 至 0.0256nM。細胞板置於二氧化碳培養箱中培養 5 天。另準備一塊細胞板，在加藥當天讀取信號值作為最大值（下面方程式中 Max 值）參與數據分析。向此細胞板每孔加入 25  $\mu$ L 細胞活率化學發光檢測試劑，室溫孵育 10 分鐘使發光信號穩定。採用多標記分析儀讀數。

3) 向細胞板中加入每孔 25  $\mu\text{L}$  的細胞活率化學發光檢測試劑，室溫孵育 10 分鐘使發光信號穩定。採用多標記分析儀讀數。

數據分析：

利用方程式  $(\text{Sample}-\text{Min})/(\text{Max}-\text{Min}) * 100\%$  將原始數據換算成抑制率， $\text{IC}_{50}$  的值即可通過四參數進行曲線擬合得出（GraphPad Prism 中 "log(inhibitor) vs. response -- Variable slope" 模式得出）。表 5 提供了本發明的化合物對 NCI-H358 細胞增殖的抑制活性。

表 5. 本發明化合物對 KRASG12C 突變的 H358 細胞增殖抑制的測試結

果

受試品	NCI-H358 $\text{IC}_{50}$ (nM)
式 (I) 化合物	0.6

結論：式 (I) 化合物對 NCI-H358 細胞增殖展現出較好的抑制活性。

### 【0071】實驗例 3：肝細胞代謝穩定性

實驗目的：評定受試化合物分別在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝細胞中的代謝穩定性

實驗操作：準備若干 96 孔樣品沉澱板，分別命名為 T0、T15、T30、T60、T90、T120、T0-MC、T120-MC 和空白基質。提前取出復蘇培養液和孵育培養液，放置在 37°C 水浴鍋中預熱。從液氮罐中取出凍存的肝細胞，立即浸沒到 37°C 水浴中（約 90 秒）。待凍存部分溶化鬆動後，分別倒入含有 40 mL 復蘇培養液的離心管中，輕柔的顛倒讓細胞在復蘇培養液中重懸。室溫條件下，100  $\times g$  離心 5 分鐘，移除上清液，用適當體積的孵育培養液重懸肝細胞，用台盼藍染色法計算細胞活率。將 198  $\mu\text{L}$  的肝細胞混懸液 ( $0.51 \times 10^6$  cells/mL) 加入到已預熱的孵育板中，培養液對照組加入 198  $\mu\text{L}$  不含肝細胞的孵育培養液至 T0-MC 和 T120-MC

孵育板中，所有孵育板在 37°C 培養箱中預孵育 10 分鐘。然後加入 2  $\mu$ L 供試品和對照化合物工作液，混勻，立即將孵育板放入培養箱內的搖板機中，啟動計時器開始反應。每個化合物的每個時間點準備 2 個重複樣本。孵育條件為 37°C、飽和濕度、含 5%CO<sub>2</sub>。測試體系中，供試品的終濃度為 1  $\mu$ M，對照品的終濃度為 3  $\mu$ M，肝細胞的終濃度為 0.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells /mL，總有機溶劑的終濃度為 0.96%，其中 DMSO 的終濃度為 0.1%。相應時間點孵育結束時，取出孵育板，取出 25  $\mu$ L 化合物和對照化合物與細胞的混合液加入到含有 125  $\mu$ L 終止液（含有 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和拉貝諾爾的乙腈溶液）的樣品板中。對於 Blank 樣品板，直接加入 25  $\mu$ L 不含肝細胞的孵育培養液。所有樣品板封膜後在搖板機上以 600 rpm 搖 10 分鐘後，3220 $\times$ g 離心 20 分鐘。供試品和對照品上清液用超純水以 1:3 的比例稀釋。所有樣品混勻後用 LC/MS/MS 的方法進行分析。

實驗結果：實驗結果如表 6 所示。

表 6. 受試化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝細胞中的代謝穩定性

受試品	種屬	T <sub>1/2</sub> (min)	CL <sub>int(hep)</sub>	CL <sub>int(liver)</sub>
			( $\mu$ L/min/10 <sup>6</sup> )	(mL/min/kg)
式 (I) 化合物	CD-1 小鼠	9.5	146.3	1738.1
	SD 大鼠	20.6	67.4	315.2
	食蟹猴	27.0	51.3	184.7
	比格犬	182.2	7.6	52.3
	人	99.5	13.9	38.7



實驗結論：多種屬肝細胞代謝實驗顯示式 (I) 化合物具有良好的代謝穩定性。

**【0072】實驗例 4: 體外肝微粒體穩定性研究**

實驗目的：評定受試化合物分別在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝微粒體中的代謝穩定性

實驗操作：準備2塊96孔孵育板，分別命名為T60孵育板和NCF60孵育板。在T60孵育板和NCF60孵育板上分別加入445 $\mu$ L微粒體工作液（肝微粒體蛋白濃度為0.56 mg/mL），然後將上述孵育板放置於37°C水浴鍋中預孵育大約10分鐘。

預孵育結束後，在 T60 孵育板和 NCF60 孵育板上分別加入 5 $\mu$ L 供試品或對照化合物工作液，混勻。在 NCF60 孵育板上每孔添加 50 $\mu$ L 磷酸鉀鹽緩衝液啟動反應；在 T0 終止板中加入 180 $\mu$ L 的終止液（含 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和 200 ng/mL 拉貝洛爾的乙腈溶液）和 6  $\mu$ L 的 NADPH 再生體系工作液，從 T60 孵育板中取出 54  $\mu$ L 樣品至 T0 終止板（T0 樣品產生）。在 T60 孵育板上每孔添加 44  $\mu$ L NADPH 再生體系工作液啟動反應。在 Blank 板中只添加 54  $\mu$ L 微粒體工作液、6  $\mu$ L 的 NADPH 再生體系工作液和 180  $\mu$ L 的終止液。因此，在供試品或對照化合物的樣品中，化合物、羥酮、雙氯芬酸和普羅帕酮的反應終濃度為 1  $\mu$ M，肝微粒體的濃度為 0.5 mg/mL，DMSO 和乙腈在反應體系中的終濃度分別為 0.01% (v/v) 和 0.99% (v/v)。孵育適當時間（如 5、15、30、45 和 60 分鐘）後，分別在每個終止板的樣品孔中加入 180  $\mu$ L 的終止液（含 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和 200 ng/mL 拉貝洛爾的乙腈溶液），之後從 T60 孵育板中取出 60  $\mu$ L 樣品以終止反應。所有樣品板搖勻並在 3220  $\times$ g 離心 20 分鐘，然後每孔取 80  $\mu$ L 上清液稀釋到 240  $\mu$ L 純水中

用於液相色譜串聯質譜分析，液相色譜串聯質譜分析所有樣品進樣分析。

實驗結果：實驗結果如表 7 所示。

表 7. 受試化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝微粒體的代謝穩定性

受試品	種屬	T <sub>1/2</sub> (min)	CL <sub>int(hep)</sub>	CL <sub>int(liver)</sub>
			(μL/min/10 <sup>6</sup> )	(mL/min/kg)
式 (I) 化合物	CD-1 小鼠	4.9	284.6	1126.8
	SD 大鼠	23.0	60.2	108.3
	食蟹猴	6.2	224.6	303.2
	比格犬	>145	<9.6	<13.8
	人	20.4	67.9	61.1

實驗結論：肝微粒體代謝穩定性研究顯示式 (I) 化合物具有良好的代謝穩定性

#### 【0073】實驗例 5: 血漿穩定研究

實驗目的：評定受試化合物分別在 CD-1 小鼠、人的血漿穩定性

實驗操作：將凍存的血漿解凍 10~20 分鐘，待血漿完全解凍後，將其置於離心機中以 3220×g 離心 5 分鐘，去除其中存在的懸浮物和沉澱物。準備 96 孔孵育板，分別命名為 T0、T10、T30、T60、T120。將孵育板中對應的加入 98 μL 的小鼠、大鼠、犬、猴和人空白血漿，然後加入 2 μL 化合物或對照化合物的工作液加入到對應的孵育板中，每個樣品準備兩個平行孔。所有的樣品在 37°C 水浴鍋中進行孵育。化合物和對照化合物比沙可啶、馬來酸依那普利、普魯卡因和普魯本辛的最終孵

育濃度為 2  $\mu\text{M}$ ，最終有機相含量為 2.0%。每一個孵育時間點結束時，取出相應的孵育板，向每個對應的樣品孔中加入 400  $\mu\text{L}$  含有 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和拉貝諾爾的乙腈溶液沉澱蛋白。所有樣品板封膜並搖勻後，3220 $\times$ g 離心 20 分鐘。取 50  $\mu\text{L}$  上清液加入 100  $\mu\text{L}$  超純水稀釋，所有樣品混勻後用 LC/MS/MS 的方法分析。

實驗結果：實驗結果如表 8 所示。

表 8. 受試化合物 CD-1 小鼠、人的血漿穩定性

受試品	種屬	120min 下受試化合物含量檢測
式 (I) 化合物	CD-1 小鼠	94%
	人	93%

實驗結論：式 (I) 化合物在人和小鼠血漿中的穩定性良好。

#### 【0074】實驗例 6: 全血穩定研究

實驗目的：評定受試化合物分別在評定受試化合物分別在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴的全血穩定性

實驗操作：在實驗當天或實驗的前一天，採用抗凝劑 EDTA-K2 採集新鮮的 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴全血。在實驗開始前，將全血與 PBS 進行 1:1 (v:v) 混合，放置於 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴鍋中預熱 10~20 分鐘。準備 96 孔孵育板，分別命名為 T0、T30、T60、T240。在對應的孵育板中，包括 T0、T30、T60 和 T240 孵育板，將 2  $\mu\text{L}$  化合物或對照化合物的工作液與 98  $\mu\text{L}$  的小鼠、大鼠、犬、猴和人空白全血混合，每個樣品準備兩個平行孔。所有的樣品在 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴鍋中進行孵育。化合物的最終孵育濃度為 5  $\mu\text{M}$ ，對照化合物的最終孵育濃度為 2  $\mu\text{M}$ 。每一個時間點孵育結束時，取出相應的孵育板，立即向對應的樣品孔中加

入 100  $\mu\text{L}$  超純水，混勻，然後加入 800  $\mu\text{L}$  含有 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和拉貝諾爾的乙腈溶液沉澱蛋白。樣品板封膜並搖勻後，3220 $\times\text{g}$  離心 20 分鐘。取 150  $\mu\text{L}$  上清液用 LC/MS/MS 的方法分析。

實驗結果：實驗結果如表 9 所示。

表 9. 受試化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴的全血穩定性

受試品	種屬	240min 下受試化合物含量檢測
式 (I) 化合物	CD-1 小鼠	117%
	SD 大鼠	115%
	食蟹猴	77%
	比格犬	102%

實驗結論：多種屬全血穩定性研究顯示式 (I) 化合物在全血中的穩定性良好。

#### 【0075】實驗例 7: 蛋白結合率研究

實驗目的：採用平衡透析法測定受試化合物在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴和人血漿中的蛋白結合率。

實驗操作：採用上述五個物種的血漿分別配製化合物濃度為 2 $\mu\text{M}$  的血漿樣品，置於 96 孔平衡透析裝置中，在 37 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$  下用磷酸鹽緩衝液透析 4 h。本實驗採用華法林作為對照化合物。血漿和透析緩衝液中待測物的濃度用 LC-MS/MS 法進行測定。

實驗結果：實驗結果如表 10 所示。

表 10. 受試化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人的蛋白結合率

受試品	種屬	蛋白未結合率 (%)
-----	----	------------

式 (I) 化合物	CD-1 小鼠	1.5
	SD 大鼠	4.8
	食蟹猴	7.8
	比格犬	3.3
	人	4.8

實驗結論：多種屬血漿結合率研究顯示式 (I) 化合物在血漿中具有更高的蛋白未結合率。

**【0076】實驗例 8: 體內藥代動力學研究**

1) SD 大鼠口服及靜脈注射受試化合物的藥代動力學研究

受試化合物與5%二甲基亞砷/95% (10%羥丙基-β-環糊精) 溶液混合，渦旋並超聲，製備得到1 mg/mL澄清溶液，微孔濾膜過濾後備用。選取7至10周齡的雄性SD大鼠，靜脈注射、口服給予候選化合物溶液。收集一定時間的全血，製備得到血漿，以LC-MS/MS方法分析藥物濃度，並用Phoenix WinNonlin 軟體(美國Pharsight公司)計算藥代參數。實驗結果如表11所示：

表 11. 受試化合物的藥代動力學結果

給藥途徑	藥代動力學參數	式 (I) 化合物
	血漿蛋白未結合率 PPB(Unbond%)	4.8
靜脈注射給藥	劑量 Dose(mg/kg)	2.0
	半衰期 $T_{1/2}$ (h)	1.9
	清除率 CL (ml/min/kg)	71.5
	表觀分佈容積 $V_{d_{ss}} / V_{d_{ss,u}}$ (L/kg)	10.6/221

	血漿濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-last}/AUC_u$ (nM.h)	653/31.3
口服給藥	劑量 Dose(mg/kg)	9.8
	達峰時間 $T_{max}$ (h)	1.5
	達峰濃度 $C_{max}/C_{max,u}$ (nM)	220/10.6
	血漿濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-last}/AUC_u$ (nM.h)	995/47.8
	生物利用度 F (%)	30.5%

注： $Vd_{ss,u}$  為血漿蛋白未結合下的表觀容積分佈 ( $Vd_{ss,u}=Vd_{ss}/PPB(Unbond\%)$ )； $C_{max,u}$ 、 $AUC_{0-last,u}$  都是血漿蛋白未結合下的相應數值 ( $C_{max,u}=C_{max} \times PPB(Unbond\%)$ )； $AUC_{0-last,u}=AUC_{0-last} \times PPB(Unbond\%)$ )

實驗結論：PK 研究顯示，式 (I) 化合物在大鼠中具有較高的非結合血漿暴露量和良好的口服生物利用度。

## 2) SD 大鼠口服式 (II) 化合物的 A 晶型的藥代動力學研究

精確稱量 109.72 mg 的受試化合物到玻璃瓶中，加入 774  $\mu$ L 0.5% 甲基纖維素(400粘度)水溶液，攪拌 5 分鐘，加入 10 mL 的 0.5% 甲基纖維素(400粘度)水溶液，攪拌 5 分鐘，得均勻的不透明的混懸液。選取 7 至 10 周齡的雄性 SD 大鼠，口服給予候選化合物溶液。收集一定時間的全血，製備得到血漿，以 LC-MS/MS 方法分析藥物濃度，並用 Phoenix WinNonlin 軟體(美國 Pharsight 公司)計算藥代參數。實驗結果如表 12 所示：

表 12. 受試化合物的藥代動力學結果

給藥途徑	藥代動力學參數	式 (II) 化合物的 A
------	---------	---------------

		晶型
口服給藥	劑量 Dose(mg/kg)	92.3
	達峰時間 $T_{max}$ (h)	5.33
	達峰濃度 $C_{max}$	1397
	血漿濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-last}$	11532

實驗結論：PK 研究顯示，式 (II) 化合物 A 晶型在大鼠中具有高的暴露量

### 3) CD 小鼠口服及靜脈注射受試化合物的藥代動力學研究

受試化合物與 5% 二甲基亞砷/95% (10% 羥丙基- $\beta$ -環糊精) 溶液混合，渦旋並超聲，製備得到 1 mg/mL 澄清溶液，微孔濾膜過濾後備用。選取 7 至 10 周齡的雄性 CD 小鼠，靜脈注射、口服給予候選化合物溶液。收集一定時間的全血，製備得到血漿，以 LC-MS/MS 方法分析藥物濃度，並用 Phoenix WinNonlin 軟體(美國 Pharsight 公司)計算藥代參數。實驗結果如表 13 所示：

表 13. 受試化合物的藥代動力學結果

給藥途徑	藥代動力學參數	式 (I) 化合物
	血漿蛋白未結合率 PPB(Unbond%)	12.0
靜脈注射給藥	劑量 Dose(mg/kg)	2.0
	半衰期 $T_{1/2}$ (h)	1.7
	清除率 CL (ml/min/kg)	40.6
	表觀分佈容積 $Vd_{ss}/Vd_{ss,u}$ (L/kg)	3.9/32.3
	血漿濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-last}/AUC_u$ (nM.h)	1297/155.6

口服給藥	劑量 Dose(mg/kg)	10.3
	達峰時間 $T_{max}$ (h)	1.0
	達峰濃度 $C_{max}/C_{max,u}$ (nM)	431/51.7
	血漿濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-last}/AUC_u$ (nM.h)	1422/170.6
	生物利用度 F (%)	21.9%

注： $Vd_{ss,u}$  為血漿蛋白未結合下的表觀容積分佈 ( $Vd_{ss,u}=Vd_{ss}/PPB(Unbond\%)$ )； $C_{max,u}$ 、 $AUC_{0-last,u}$  都是血漿蛋白未結合下的相應數值 ( $C_{max,u}=C_{max} \times PPB(Unbond\%)$ )； $AUC_{0-last,u}=AUC_{0-last} \times PPB(Unbond\%)$ )

實驗結論：PK 研究顯示，式 (I) 化合物在小鼠中具有較高的非結合血漿暴露量和良好的口服生物利用度。

#### 4) 比格犬口服受試化合物的藥代動力學研究

精確稱量 680.397mg 受試化合物的粉末，加入 50 mL 的 0.5% 甲基纖維素(400 粘度)水溶液，攪拌 10min，超聲 10min。加入 50 mL 0.5% 甲基纖維素 (400 粘度)水溶液，使用勻漿機均質化 10min。加入 11 mL，超聲 5min，攪拌 10min，加入 358  $\mu$ L 0.5% 甲基纖維素 (400 粘度)水溶液，攪拌 2min。選取六個月以上雄性比格犬，口服給予候選化合物溶液。收集一定時間的全血，製備得到血漿，以 LC-MS/MS 方法分析藥物濃度，並用 Phoenix WinNonlin 軟體(美國 Pharsight 公司)計算藥代參數。實驗結果如表 14 所示：收集一定時間的全血，製備得到血漿，以 LC-MS/MS 方法分析藥物濃度，並用 Phoenix WinNonlin 軟體(美國 Pharsight 公司)計算藥代參數。實驗結果如表 14 所示：

表 14. 受試化合物的藥代動力學結果



給藥途徑	藥代動力學參數	式 (II) 化合物的 A 晶型
口服給藥	劑量 Dose(mg/kg)	24.5
	達峰時間 $T_{max}$ (h)	2.50
	達峰濃度 $C_{max}$	2435
	血漿濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-last}$	16700

實驗結論：PK 研究顯示，式 (II) 化合物的 A 晶型在犬中具有高的暴露量。

#### 【0077】實驗例 9：體內藥效學研究

人胰腺癌 Mia PaCa-2 細胞裸小鼠皮下移植腫瘤 Balb/c Nude 小鼠模型的體內藥效學研究

##### 1. 細胞培養和腫瘤組織準備

細胞培養：人胰腺癌 Mia PaCa-2 細胞 (ATCC-CRL-1420) 體外單層培養，培養條件為 DMEM 培養基中加 10% 胎牛血清，2.5% 馬血清，37 °C 5% 二氧化碳孵箱培養。一周兩次用胰酶-EDTA 進行常規消化處理傳代。當細胞飽和度為 80%-90%，數量到達要求時，收取細胞，計數，重懸於適量 PBS 中，1:1 加入基質膠，獲取細胞密度為  $25 \times 10^6$  cells/mL 的細胞懸液。

細胞接種：將 0.2 mL ( $5 \times 10^6$  cells/mouse 個) Mia PaCa-2 細胞 (加基質膠，體積比為 1:1) 皮下接種於每只小鼠的右後背，腫瘤平均體積達到  $190 \text{ mm}^3$  時，根據腫瘤體積進行隨機分組，按照表 15 中的方案開始給藥。

表 15. 實驗動物分組及給藥方案

組別	動物數	化合物	劑量 (mg/kg)	給藥體積(μL/g)	給藥途徑	給藥頻次
1	6	溶媒	--	10	PO	QD x22
2	6	式 (I) 化合物	10	10	PO	QD x22
3	6	式 (I) 化合物	30	10	PO	QD x22

注：PO 代表口服；QD 代表每日一次。

## 2. 腫瘤測量和實驗指標

每週兩次用遊標卡尺測量腫瘤直徑。腫瘤體積的計算公式為： $V = 0.5a \times b^2$ ，a 和 b 分別表示腫瘤的長徑和短徑。

化合物的抑瘤療效用 TGI(%)或相對腫瘤增殖率 T/C(%)評價。相對腫瘤增殖率 T/C (%) = TRTV / CRTV × 100% (TRTV：治療組 RTV；CRTV：陰性對照組 RTV)。根據腫瘤測量的結果計算出相對腫瘤體積 (relative tumor volume, RTV)，計算公式為  $RTV = V_t / V_0$ ，其中  $V_0$  是分組給藥時 (即 D0) 測量所得平均腫瘤體積， $V_t$  為某一次測量時的平均腫瘤體積，TRTV 與 CRTV 取同一天數據。

TGI (%)，反映腫瘤生長抑制率。 $TGI(\%) = [(1 - (\text{某處理組給藥結束時平均瘤體積} - \text{該處理組開始給藥時平均瘤體積})) / (\text{溶劑對照組治療結束時平均瘤體積} - \text{溶劑對照組開始治療時平均瘤體積})] \times 100\%$ 。

## 3. 實驗結果

實驗結果如圖 4、5 所示。

給藥 22 天時結果如表 16 所示

表 16. 給藥第 22 天天下的 T/C 及 TGI

化合物	給藥量	腫瘤體積均值	T/C	TGI
溶媒	N/A	2016.29 mm <sup>3</sup>	N/A	N/A

式 (I) 化合物	10 mg/kg	249.87 mm <sup>3</sup>	12.39%	93.06%
式 (I) 化合物	30 mg/kg	124.14 mm <sup>3</sup>	6.16%	99.64%

實驗結論：式 (I) 化合物具有顯著的抑瘤作用，且小鼠各個劑量組的體重平穩，無明顯不耐受現象。

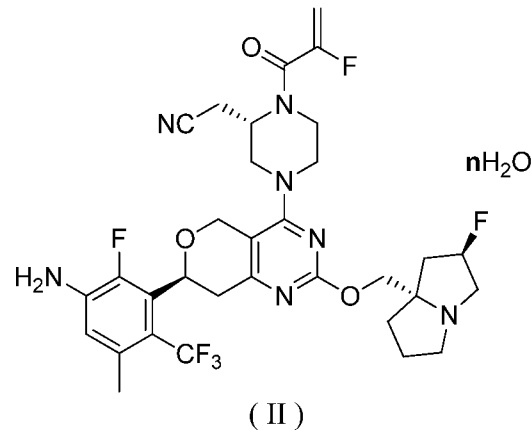
【0078】雖然本發明已以實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，本發明所屬技術領域中具有通常知識者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

#### 【符號說明】

【0079】無

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種式 (II) 化合物，

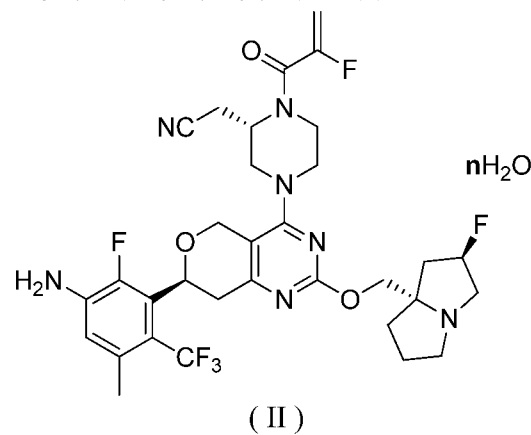


其中，n 選自 0.1~2。

【請求項2】 根據請求項 1 所述的化合物，其中 n 選自 0.1、0.5、1、1.5 和 2。

【請求項3】 根據請求項 2 所述的化合物，其中 n 選自 2。

【請求項4】 一種式 (II) 化合物的 A 晶型，



其中，n 選自 1~2，

其特徵在於其 X 射線粉末繞射圖譜在下列 2θ 角處具有特徵繞射峰：  
8.514±0.200°、14.689±0.200°、18.122±0.200°。

【請求項5】 根據請求項 4 所述的 A 晶型，其 X 射線粉末繞射圖譜在下列 2θ 角處具有特徵繞射峰：6.218±0.200°、8.514±0.200°、12.299±0.200°、

14.689±0.200°、16.903±0.200°、18.122±0.200°、18.927±0.200°、25.580±0.200°。

【請求項6】根據請求項5所述的A晶型，其X射線粉末繞射圖譜在下列2θ角處具有特徵繞射峰：6.218±0.200°、8.514±0.200°、11.663±0.200°、12.299±0.200°、14.689±0.200°、16.903±0.200°、18.122±0.200°、18.927±0.200°、19.364±0.200°、20.386±0.200°、21.914±0.200°、25.580±0.200°。

【請求項7】根據請求項6所述的A晶型，其X射線粉末繞射圖譜在下列2θ角處具有特徵繞射峰：6.218°、8.514°、11.663°、12.299°、14.689°、16.903°、18.122°、18.554°、18.927°、19.364°、20.386°、21.914°、22.640°、23.867°、24.553°、24.806°、25.580°、25.988°、27.147°、27.715°、29.135°、31.799°。

【請求項8】根據請求項7所述的A晶型，其XRPD圖譜如圖1所示。

【請求項9】根據請求項4~8任意一項所述的A晶型，其差示掃描量熱曲線在115.37°C±3°C處具有吸熱峰的峰值。

【請求項10】根據請求項9所述的A晶型，其DSC圖譜如圖2所示。

【請求項11】根據請求項4~8任意一項所述的A晶型，其熱重分析曲線在150.0°C±3°C時失重達5.379%。

【請求項12】根據請求項11所述的A晶型，其TGA圖譜如圖3所示。

【請求項13】根據請求項4~8任意一項所述的A晶型，其中n選自2。

【請求項14】一種根據請求項1~3任意一項所述的化合物或請求項4~13任意一項所述的A晶型在製備治療實體瘤藥物中的應用。

【請求項15】根據請求項14所述的應用，其中，實體瘤選自肺癌和直腸癌。

【發明圖式】

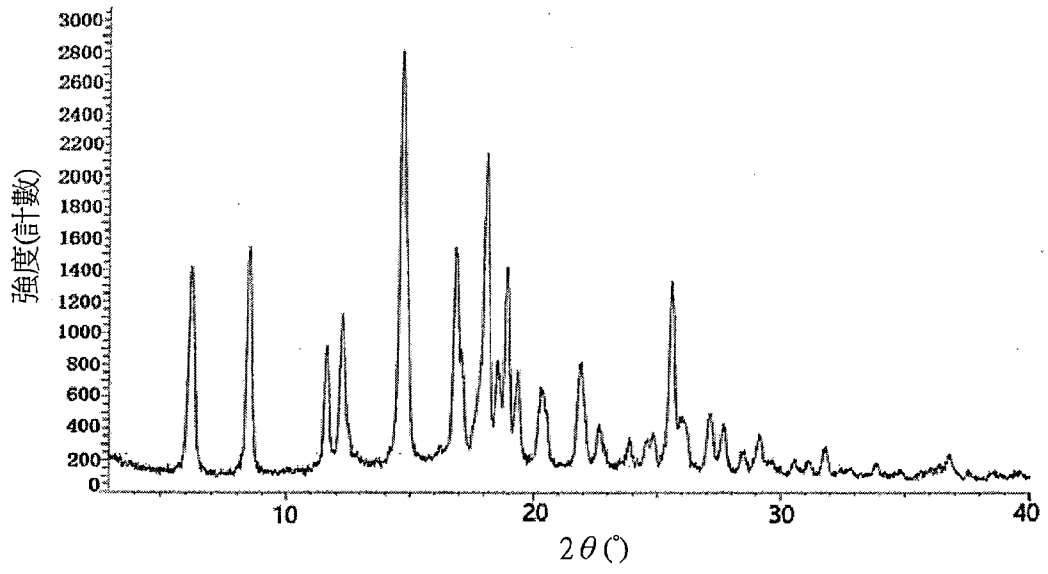


圖1

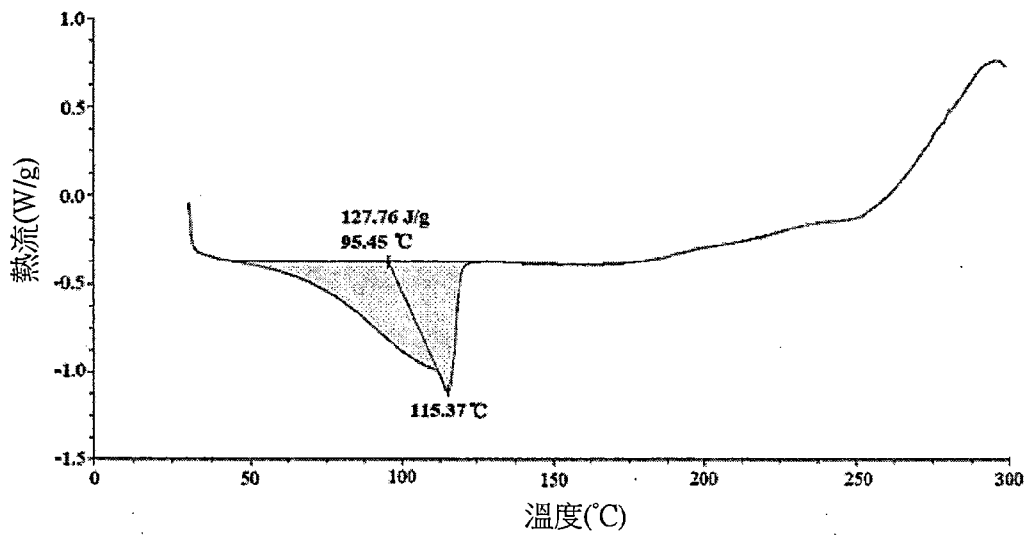


圖2

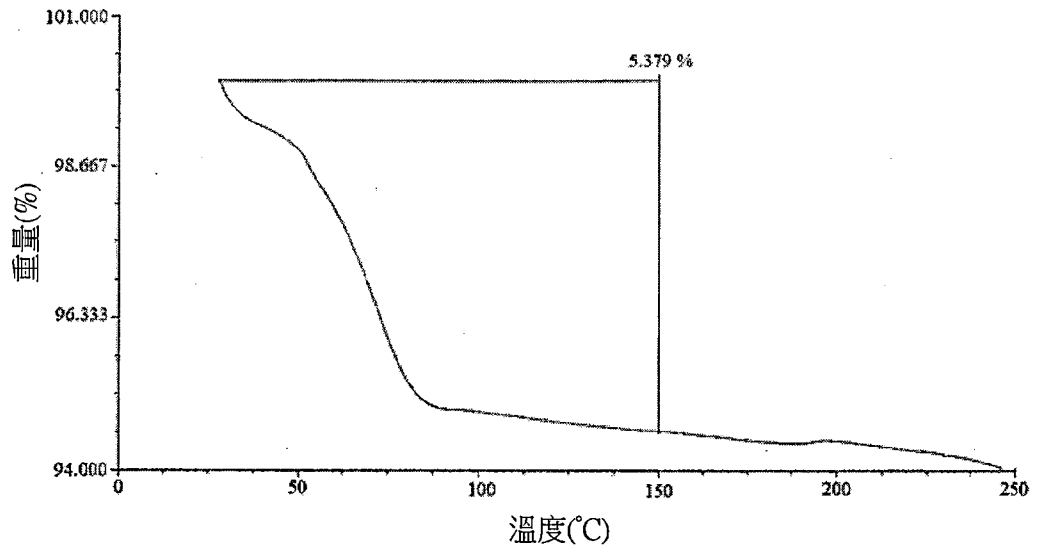


圖 3

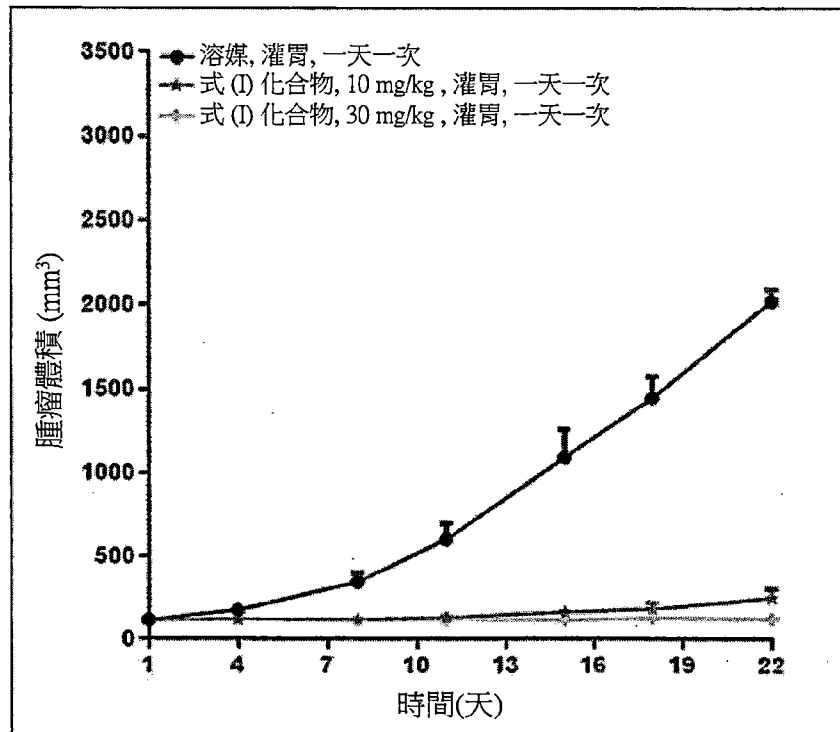


圖 4

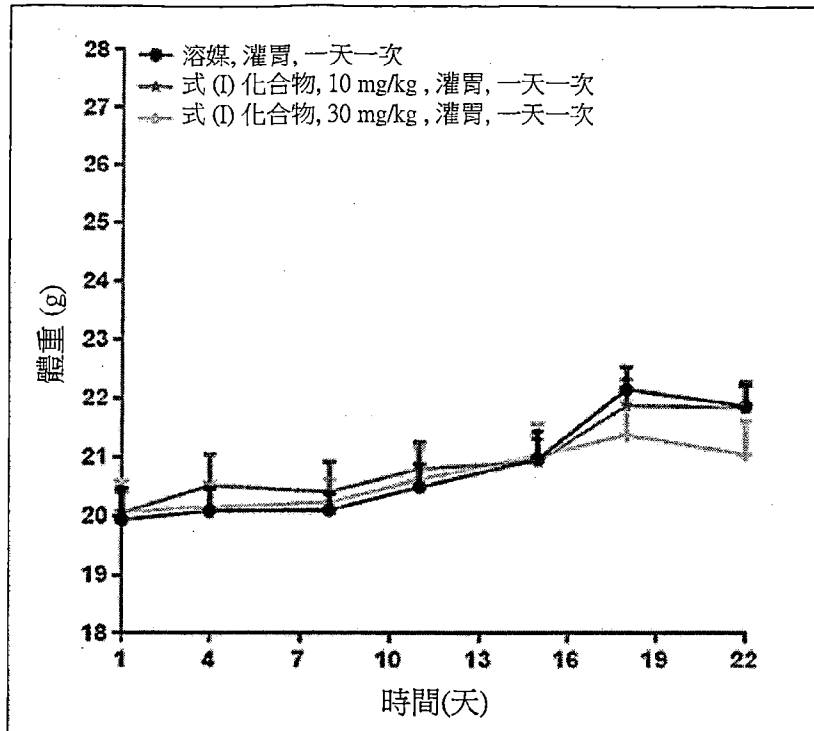


圖5

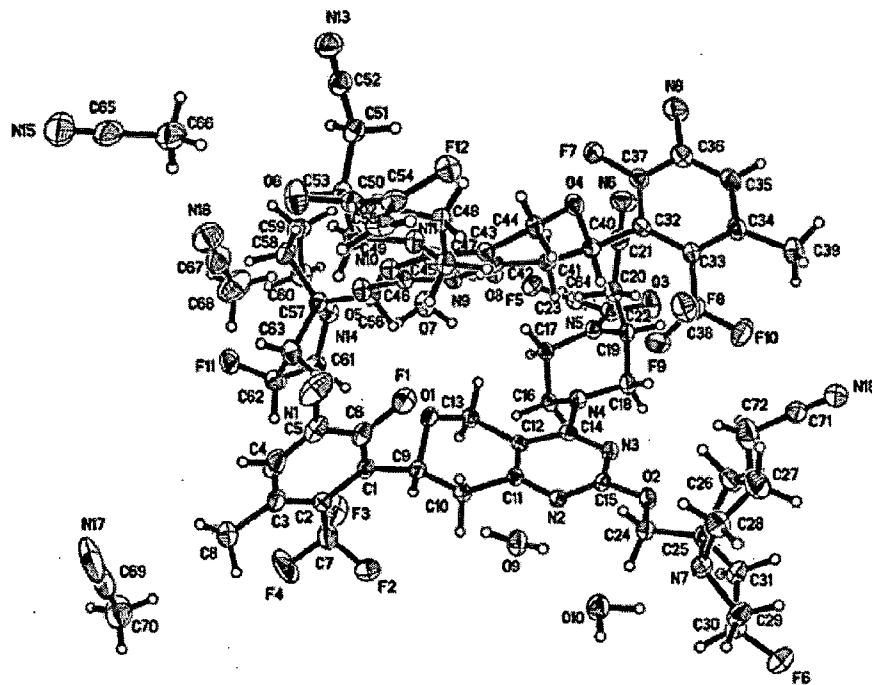


圖6