

Wee1 抑制剂化合物的晶型及其应用

相关申请的交叉引用

CN201910364694.X, 申请日: 2019 年 04 月 30 日。

技术领域

本发明公开了式 (I) 化合物的晶型, 及其晶型在制备治疗 Wee1 相关疾病的药物中的应用。

背景技术

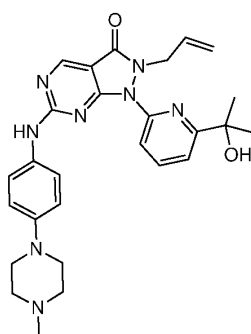
细胞周期的进程是由一系列细胞周期调控系统控制的复杂过程, 细胞周期调控系统的核心成分是周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)与周期蛋白(Cyclins)结合形成的 CDKs/Cyclins 复合物, 这些复合物能促进细胞进入增殖周期, 其中 CDK1 (人类的同源体也称为 CDC2) /Cyclin B 的复合物对控制细胞进入 M 期起关键性的作用。

在细胞进入 M 期之前需要完成 DNA 的复制, 由于受到各种内源性和外源性因素的干扰 DNA 经常会发生突变或损伤, 这些发生异常的 DNA 必须完成修复, 否则会引起有丝分裂灾难, 造成细胞死亡。细胞周期检查点的主要功能就是暂停细胞周期, 让细胞完成 DNA 的修复后再进入 M 期。位于 G1 末期的 G1/S 检查点和 G2 期的 G2/M 检查点是两个主要的细胞周期检查点, 它们共同担负 DNA 损伤的识别和修复功能。正常细胞利用 G1/S 检查点在 G1 期就可以完成 DNA 的修复, 而近 50% 的癌变细胞存在抑癌基因 p53 缺陷, 这也同时使它们缺失了 G1/S 检查点功能, 它们需要更多地依赖 G2/M 检查点完成 DNA 的修复。G2/M 检查点很少发生突变, 正是因为有了它, 癌细胞可以逃过 DNA 损伤剂和放射的治疗。

Wee1 蛋白激酶是一种细胞周期调节因子, 属于核内的丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶家族的一员, 是 G2/M 检查点的关键激酶。人类的 “Wee” 蛋白激酶家族主要包括 Wee1 和 Myt1 两种, 均可使 CDC2 上的 Tyr15 位点磷酸化, 抑制 CDC2/CyclinB 复合物的激活, 阻滞细胞进入 M 期, 直到完成 DNA 的修复, 而 Myt1 还可磷酸化 CDC2 上的 Thr14 位点, 这也是针对 CDC2 活性进行的负调控。在很多种癌变细胞中 Wee1 激酶高表达, 通过对 Wee1 激酶的抑制, 可以使肿瘤细胞直接跳过 G2 期的 DNA 修复, 提前进入有丝分裂, 致肿瘤细胞死亡, 达到治疗癌症的目的。

目前 AstraZeneca 的 Wee1 抑制剂 AZD1775 已进入临床 II 期, 有超过 30 项的临床实验正在开发, 并已显示出良好的治疗效果。AZD1775 最早由 Merck 开发, 因此又称为 MK-1775, 2013 年 9 月 Merck 向 AstraZeneca 在全球范围内转让了该化合物, 与之相关的专利主要有 US20070254892、WO2007126122、EP2213673、WO2008133866、WO2011034743 等。Abbott 和 Abbvie 对 Wee1 抑制剂也展开过研究, 相关专利主要有 US2012220572、WO2013126656、WO2013012681、WO2013059485、WO2013013031、WO2013126656 等。Almac 公司关于 Wee1 抑制剂的专利包括 WO2014167347、WO2015019037、WO2015092431。

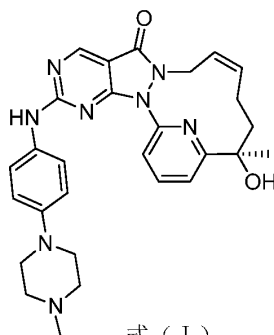
WO2008133866 公开了化合物 AZD1775，结构如下：



AZD1775

发明内容

本发明提供了式 (I) 化合物的 A 晶型，其 X 射线粉末衍射 (XRPD) 图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：5.71±0.2°、12.68±0.2°和 15.32±0.2°。



式 (I)

本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：5.71±0.2°、12.68±0.2°、15.32±0.2°、19.72±0.2°、21.44±0.2°、23.61±0.2°和 25.68±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：5.71±0.2°、12.68±0.2°、15.32±0.2°、18.04±0.2°、19.72±0.2°、21.44±0.2°、23.61±0.2°和 25.68±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 XRPD 图谱如图 1 所示。

本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 XRPD 图谱解析数据如表 1 所示：

表 1: A 晶型的 XRPD 图谱解析数据

编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)
1	5.046	17.4994	0.7	17	20.08	4.4184	0.4
2	5.046	17.4994	0.7	18	20.413	4.3471	0.3
3	5.711	15.4612	100	19	21.2	4.1874	0.6

4	7.904	11.176	0.6	20	21.435	4.142	2.1
5	11.218	7.881	0.5	21	21.669	4.0979	0.5
6	12.677	6.9773	27.4	22	22.268	3.989	0.9
7	14.71	6.0172	1.4	23	23.234	3.8252	0.8
8	14.948	5.9216	0.8	24	23.607	3.7656	4.2
9	15.318	5.7794	1.5	25	25.517	3.488	1.9
10	16.051	5.5173	0.5	26	25.678	3.4665	2.2
11	17.159	5.1634	0.9	27	26.043	3.4187	0.5
12	17.768	4.9877	0.5	28	27.765	3.2104	0.4
13	18.043	4.9125	1	29	28.007	3.1832	1
14	18.597	4.7672	0.4	30	29.289	3.0467	0.4
15	18.906	4.69	0.9	31	30.426	2.9354	0.4
16	19.719	4.4984	1.7	-			

本发明的一些方案中,上述 A 晶型的差示扫描量热曲线(DSC)在 $34.95 \pm 3^\circ\text{C}$ 、 $174.75 \pm 3^\circ\text{C}$ 和 $219.12 \pm 3^\circ\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点。

本发明的一些方案中,上述 A 晶型的 DSC 图谱如图 2 所示。

本发明的一些方案中,上述 A 晶型的热重分析曲线(TGA)在 $70.33 \pm 3^\circ\text{C}$ 时失重达 0.7367%; 在 $209.42 \pm 3^\circ\text{C}$ 时又失重达 3.123%。

本发明的一些方案中,上述 A 晶型的 TGA 图谱如图 3 所示。

本发明还提供了式(I)化合物的 B 晶型,其 X 射线粉末衍射(XRPD)图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.58 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.44 \pm 0.2^\circ$ 和 $22.16 \pm 0.2^\circ$ 。

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.58 \pm 0.2^\circ$ 、 $11.71 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.44 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.48 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.13 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.64 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.16 \pm 0.2^\circ$ 和 $26.33 \pm 0.2^\circ$ 。

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.58 \pm 0.2^\circ$ 、 $11.71 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.44 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.48 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.13 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.57 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.64 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.16 \pm 0.2^\circ$ 和 $26.33 \pm 0.2^\circ$ 。

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的 XRPD 图谱如图 4 所示。

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的 XRPD 图谱解析数据如表 2 所示:

表 2: B 晶型的 XRPD 图谱解析数据

编号	2θ 角 ($^\circ$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 ($^\circ$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)
1	5.577	15.8346	100	17	19.582	4.5295	4.3
2	7.838	11.2705	1.1	18	20.016	4.4325	5.3

3	9.807	9.0113	1.5	19	21.831	4.0677	3.2
4	11.028	8.0162	2.4	20	22.164	4.0075	18.7
5	11.713	7.549	6.4	21	23.018	3.8607	2.8
6	12.056	7.3351	1.3	22	23.626	3.7626	2.1
7	12.439	7.1098	30.4	23	25.007	3.5579	2.3
8	13.706	6.4552	4.6	24	25.261	3.5227	1.4
9	14.233	6.2177	2.9	25	25.808	3.4493	1.3
10	14.476	6.1138	5.7	26	26.327	3.3824	8.5
11	15.127	5.8522	5.8	27	28.535	3.1255	1
12	16.717	5.2989	1.1	28	30.939	2.8879	0.9
13	17.146	5.1674	1.2	29	31.076	2.8755	0.9
14	17.567	5.0443	7.7	30	32.083	2.7875	0.7
15	18.241	4.8596	2	31	34.201	2.6196	0.7
16	18.637	4.757	6.5	-			

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的差示扫描量热曲线(DSC)在 $42.88\pm3^{\circ}\text{C}$ 、 $198.79\pm3^{\circ}\text{C}$ 和 $222.36\pm3^{\circ}\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点。

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的 DSC 图谱如图 5 所示。

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的热重分析曲线(TGA)在 $64.21\pm3^{\circ}\text{C}$ 时失重达 3.265%; 在 $243.05\pm3^{\circ}\text{C}$ 时又失重达 1.516%。

本发明的一些方案中,上述 B 晶型的 TGA 图谱如图 6 所示。

本发明还提供了式 (I) 化合物的 C 晶型,其 X 射线粉末衍射 (XRPD) 图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.05\pm0.2^{\circ}$ 、 $5.58\pm0.2^{\circ}$ 和 $12.44\pm0.2^{\circ}$ 。

本发明的一些方案中,上述 C 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.05\pm0.2^{\circ}$ 、 $5.58\pm0.2^{\circ}$ 、 $12.44\pm0.2^{\circ}$ 、 $15.91\pm0.2^{\circ}$ 、 $16.68\pm0.2^{\circ}$ 、 $17.61\pm0.2^{\circ}$ 、 $22.19\pm0.2^{\circ}$ 和 $26.37\pm0.2^{\circ}$ 。

本发明的一些方案中,上述 C 晶型的 XRPD 图谱如图 7 所示。

本发明的一些方案中,上述 C 晶型的 XRPD 图谱解析数据如表 3 所示:

表 3: C 晶型的 XRPD 图谱解析数据

编号	2θ 角 ($^{\circ}$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 ($^{\circ}$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)
1	5.047	17.4944	12.4	17	19.6	4.5254	0.8
2	5.577	15.8334	100	18	20.032	4.4288	0.7
3	10.945	8.077	0.6	19	21.275	4.1728	0.5
4	11.137	7.9381	1.4	20	21.436	4.1418	0.7

5	11.712	7.5495	1.2	21	21.869	4.0608	0.8
6	12.438	7.1105	12.8	22	22.186	4.0036	6.1
7	13.726	6.4461	0.6	23	23.035	3.8578	1.8
8	14.221	6.2226	0.8	24	23.627	3.7626	0.9
9	14.496	6.1055	0.9	25	24.832	3.5826	0.3
10	15.126	5.8527	1.1	26	25.002	3.5586	0.6
11	15.911	5.5654	6.4	27	25.278	3.5203	0.5
12	16.108	5.4978	2.8	28	26.367	3.3773	3
13	16.685	5.309	3.3	29	26.98	3.302	0.4
14	17.61	5.0322	2.6	30	28.633	3.1151	0.2
15	17.921	4.9455	0.4	31	28.939	3.0828	0.4
16	18.694	4.7427	2.2	32	34.293	2.6127	0.2

本发明的一些方案中，上述 C 晶型的差示扫描量热曲线（DSC）在 $37.06\pm3^{\circ}\text{C}$ 、 $189.16\pm3^{\circ}\text{C}$ 和 $218.61\pm3^{\circ}\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点。

本发明的一些方案中，上述 C 晶型的 DSC 图谱如图 8 所示。

本发明的一些方案中，上述 C 晶型的热重分析曲线(TGA)在 $64.98\pm3^{\circ}\text{C}$ 时失重达 2.211%；在 $224.71\pm3^{\circ}\text{C}$ 时又失重达 1.127%。

本发明的一些方案中，上述 C 晶型的 TGA 图谱如图 9 所示。

本发明还提供了式（I）化合物的 D 晶型，其 X 射线粉末衍射（XRPD）图谱在下列 2 θ 角处具有特征衍射峰： $5.22\pm0.2^{\circ}$ 、 $15.99\pm0.2^{\circ}$ 和 $16.57\pm0.2^{\circ}$ 。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2 θ 角处具有特征衍射峰： $5.22\pm0.2^{\circ}$ 、 $15.99\pm0.2^{\circ}$ 、 $16.57\pm0.2^{\circ}$ 和 $21.22\pm0.2^{\circ}$ 。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2 θ 角处具有特征衍射峰： $5.22\pm0.2^{\circ}$ 、 $15.18\pm0.2^{\circ}$ 、 $15.99\pm0.2^{\circ}$ 、 $16.57\pm0.2^{\circ}$ 、 $17.08\pm0.2^{\circ}$ 、 $18.60\pm0.2^{\circ}$ 、 $21.22\pm0.2^{\circ}$ 和 $21.89\pm0.2^{\circ}$ 。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2 θ 角处具有特征衍射峰： $5.22\pm0.2^{\circ}$ 、 $15.18\pm0.2^{\circ}$ 、 $15.99\pm0.2^{\circ}$ 、 $16.57\pm0.2^{\circ}$ 、 $17.08\pm0.2^{\circ}$ 、 $17.90\pm0.2^{\circ}$ 、 $18.60\pm0.2^{\circ}$ 、 $21.22\pm0.2^{\circ}$ 、 $21.89\pm0.2^{\circ}$ 、 $25.24\pm0.2^{\circ}$ 和 $27.00\pm0.2^{\circ}$ 。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的 XRPD 图谱如图 10 所示。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的 XRPD 图谱解析数据如表 4 所示：

表 4：D 晶型的 XRPD 图谱解析数据

编号	2 θ 角 ($^{\circ}$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)	编号	2 θ 角 ($^{\circ}$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)
----	-----------------------------	----------------------	----------	----	-----------------------------	----------------------	----------

1	5.224	16.9027	100	16	25.242	3.5253	8.2
2	10.424	8.4794	4	17	26.048	3.418	3.5
3	12.774	6.9241	1.9	18	26.609	3.3472	2
4	15.18	5.8316	7.9	19	26.997	3.3	7.6
5	15.595	5.6774	22.3	20	27.492	3.2417	2.9
6	15.992	5.5373	58.7	21	28.517	3.1274	1.6
7	16.567	5.3466	18.1	22	29.898	2.986	3.5
8	17.075	5.1886	15.3	23	30.55	2.9238	3.8
9	17.904	4.9503	4.9	24	31.333	2.8525	2
10	18.201	4.87	5.1	25	32.348	2.7653	1.7
11	18.599	4.7668	12.1	26	32.95	2.7161	1.3
12	19.506	4.5472	4.1	27	34.522	2.596	1.9
13	21.22	4.1834	25.5	28	34.545	2.5943	2
14	21.888	4.0573	4.8	29	36.655	2.4496	2.1
15	22.936	3.8743	1.6	30	39.522	2.2783	1.7

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的差示扫描量热曲线（DSC）在 56.07±3℃、193.93±3℃和 216.54±3℃处分别有一个吸热峰的起始点。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的差示扫描量热曲线（DSC）在 56.07±3℃、193.93±3℃和 216.54±3℃处分别有一个吸热峰的起始点；在 206.82 ±3℃有一个放热峰的峰值。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的 DSC 图谱如图 11 所示。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的热重分析曲线（TGA）在 79.35±3℃时失重达 1.977%；在 223.66±3℃时又失重达 1.589%。

本发明的一些方案中，上述 D 晶型的 TGA 图谱如图 12 所示。

本发明还提供了式（I）化合物的 E 晶型，其 X 射线粉末衍射（XRPD）图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：8.65±0.2°、14.22±0.2°和 24.58±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 E 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：8.65±0.2°、11.41±0.2°、13.13±0.2°、14.22±0.2°、17.35±0.2°、18.34±0.2°、20.39±0.2°、20.94±0.2°和 24.58±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 E 晶型的 XRPD 图谱如图 13 所示。

本发明的一些方案中，上述 E 晶型的 XRPD 图谱解析数据如表 5 所示：

表 5：E 晶型的 XRPD 图谱解析数据

编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)
----	----------	---------	----------	----	----------	---------	----------

1	6.507	13.5715	8.8	17	23.173	3.8352	2.8
2	8.653	10.2107	100	18	24.575	3.6195	28.2
3	11.414	7.7457	15.2	19	25.243	3.5252	11
4	13.132	6.7365	26.9	20	26.188	3.4001	6.7
5	14.217	6.2247	66.8	21	26.428	3.3697	6.9
6	16.211	5.4632	4.5	22	26.882	3.3139	1.7
7	17.354	5.1058	16.5	23	28.358	3.1446	5.4
8	18.065	4.9065	4.8	24	28.612	3.1173	2.2
9	18.341	4.8332	18.1	25	30.409	2.937	5.5
10	18.974	4.6733	1.8	26	31.1	2.8733	1.9
11	20.39	4.3518	22.8	27	31.688	2.8213	2.9
12	20.941	4.2386	23.4	28	32.322	2.7674	1.6
13	21.594	4.1119	9.6	29	32.874	2.7222	1.6
14	22.169	4.0065	5.5	30	33.876	2.6439	2
15	22.68	3.9174	9.9	31	34.711	2.5822	2.2
16	22.954	3.8713	4	32	35.02	2.5602	1.6

本发明的一些方案中，上述 E 晶型的差示扫描量热曲线（DSC）在 $121.57 \pm 3^\circ\text{C}$ 、 $197.26 \pm 3^\circ\text{C}$ 和 $217.23 \pm 3^\circ\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点；在 $168.31 \pm 3^\circ\text{C}$ 和 $212.95 \pm 3^\circ\text{C}$ 分别有一个放热峰的峰值。

本发明的一些方案中，上述 E 晶型的 DSC 图谱如图 14 所示。

本发明的一些方案中，上述 E 晶型的热重分析曲线（TGA）在 $143.31 \pm 3^\circ\text{C}$ 时失重达 6.775%；在 $213.62 \pm 3^\circ\text{C}$ 时又失重达 0.3184%。

本发明的一些方案中，上述 E 晶型的 TGA 图谱如图 15 所示。

本发明还提供了式（I）化合物的 F 晶型，其 X 射线粉末衍射（XRPD）图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $5.06 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.91 \pm 0.2^\circ$ 和 $16.68 \pm 0.2^\circ$ 。

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $5.06 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.34 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.98 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.13 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.91 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.68 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.63 \pm 0.2^\circ$ 和 $18.87 \pm 0.2^\circ$ 。

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $5.06 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.34 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.98 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.13 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.91 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.68 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.63 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.87 \pm 0.2^\circ$ 、 $20.33 \pm 0.2^\circ$ 、 $21.44 \pm 0.2^\circ$ 、 $22.01 \pm 0.2^\circ$ 、 $24.04 \pm 0.2^\circ$ 、 $25.32 \pm 0.2^\circ$ 和 $25.66 \pm 0.2^\circ$ 。

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的 XRPD 图谱如图 16 所示。

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的 XRPD 图谱解析数据如表 6 所示：

表 6：F 晶型的 XRPD 图谱解析数据

编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)
1	5.062	17.4414	100	13	21.44	4.1411	5.3
2	8.341	10.5913	3.3	14	22.006	4.0358	3.2
3	10.077	8.7708	1.8	15	23.328	3.81	1.2
4	10.98	8.0515	4.7	16	23.898	3.7204	2.7
5	15.128	5.8518	6.1	17	24.181	3.6776	3
6	15.911	5.5653	59	18	25.325	3.5139	3.1
7	16.685	5.3089	30	19	25.656	3.4694	2.5
8	17.628	5.027	12	20	26.96	3.3045	1.2
9	17.945	4.939	1.8	21	27.271	3.2674	1.9
10	18.869	4.6992	2.6	22	29.026	3.0738	1.8
11	19.719	4.4983	0.9	23	32.834	2.7254	0.8
12	20.332	4.3641	4	N/A			

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的差示扫描量热曲线（DSC）在 $48.69\pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $225.26\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点。

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的 DSC 图谱如图 17 所示。

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的热重分析曲线（TGA）在 $100\pm 3^{\circ}\text{C}$ 时失重达 3.404%。

本发明的一些方案中，上述 F 晶型的 TGA 图谱如图 18 所示。

本发明还提供了式 (I) 化合物 F 晶型的制备方法，包括：

- (a) 将式 (I) 化合物加入醇类溶剂中搅拌加热至油浴 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ ；
- (b) $47^{\circ}\text{C}\sim 53^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 72 小时；
- (c) 关闭加热，保持搅拌自然降温 1 小时后至 27°C ；
- (d) 静置 18 小时，过滤，再用甲醇淋洗滤饼；
- (e) 60°C 真空烘干 48 小时。

本发明的一些方案中，上述醇类溶剂为甲醇。

本发明还提供了上述的 A 晶型、上述的 B 晶型、上述的 C 晶型、上述的 D 晶型、上述的 E 晶型或上述的 F 晶型在制备治疗 Weel 相关疾病的药物的应用。

技术效果

本发明化合物的 A 晶型、B 晶型、C 晶型、D 晶型、E 晶型及 F 晶型稳定、受光热湿度影响小、溶解性非常高好，成药前景广阔。

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上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。

下面会通过实施例具体描述本发明，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。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。本发明采用下述缩略词：DCM 代表二氯甲烷；DMF 代表 *N,N*-二甲基甲酰胺；DMSO 代表二甲亚砜；EtOH 代表乙醇；MeOH 代表甲醇；TFA 代表三氟乙酸；TsOH 代表对甲苯磺酸；mp 代表熔点；EtSO₃H 代表乙磺酸；MeSO₃H 代表甲磺酸；ATP 代表三磷酸腺苷；HEPES 代表 4-羟乙基哌嗪乙磺酸；EGTA 代表乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸；MgCl₂ 代表氯化镁；MnCl₂ 代表氯化锰；DTT 代表二硫苏糖醇；DCC 代表二环己基碳二亚胺；DMAP 代表 4-二甲氨基吡啶；DIEA 代表 *N,N*-二异丙基乙胺；wt%：质量百分比；THF 代表四氢呋喃。

仪器及分析方法

1.1 X-射线粉末衍射 (X-ray powder diffractometer, XRPD)

仪器型号：布鲁克 D8 advance X-射线衍射仪

测试方法：大约 10 ~ 20 mg 样品用于 XRPD 检测。

详细的 XRPD 参数如下：

光管：Cu, $k\alpha$, ($\lambda=1.54056\text{\AA}$).

光管电压：40 kV，光管电流：40 mA

发散狭缝：0.60 mm

探测器狭缝：10.50 mm

防散射狭缝：7.10 mm

扫描范围：4-40 deg

步径：0.02 deg

步长：0.12 秒

样品盘转速：15 rpm

1.2 差热分析 (Differential Scanning Calorimeter, DSC)

仪器型号：TA Q2000差示扫描量热仪

测试方法：取样品 (~ 1 mg) 置于DSC铝锅内进行测试，在50 mL/min N₂条件下，以10°C /min的升温速率，加热样品从30°C到300°C。

1.3 热重分析 (Thermal Gravimetric Analyzer, TGA)

仪器型号：TA Q5000热重分析仪

测试方法：取样品 (2 ~ 5 mg) 置于TGA铂金锅内进行测试，在25 mL/min N₂条件下，以10 °C /min的升温速率，加热样品从30°C (室温) 到300°C或失重20%。

附图说明

图 1 为 (I) 化合物的 A 晶型的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图；

图 2 为 (I) 化合物的 A 晶型的 DSC 谱图；

图 3 为 (I) 化合物的 A 晶型的 TGA 谱图；

图 4 为 (I) 化合物的 B 晶型的 Cu-K α 辐射 XRPD 谱图；

图 5 为 (I) 化合物的 B 晶型的 DSC 谱图；

图 6 为 (I) 化合物的 B 晶型的 TGA 谱图；

图 7 为 (I) 化合物的 C 晶型的 Cu-K α 辐射 XRPD 谱图；

图 8 为 (I) 化合物的 C 晶型的 DSC 谱图；

图 9 为 (I) 化合物的 C 晶型的 TGA 谱图；

图 10 为 (I) 化合物的 D 晶型的 Cu-K α 辐射 XRPD 谱图；

图 11 为 (I) 化合物的 D 晶型的 DSC 谱图；

图 12 为 (I) 化合物的 D 晶型的 TGA 谱图；

图 13 为 (I) 化合物的 E 晶型的 Cu-K α 辐射 XRPD 谱图；

图 14 为 (I) 化合物的 E 晶型的 DSC 谱图；

图 15 为 (I) 化合物的 E 晶型的 TGA 谱图；

图 16 为 (I) 化合物的 F 晶型的 Cu-K α 辐射 XRPD 谱图；

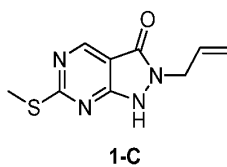
图 17 为 (I) 化合物的 F 晶型的 DSC 谱图；

图 18 为 (I) 化合物的 F 晶型的 TGA 谱图。

具体实施方式

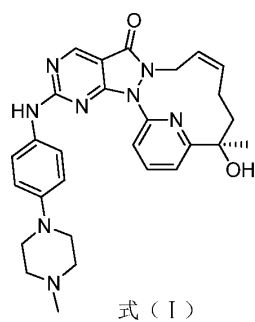
下面通过实施例对本发明进行详细描述，但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明，其中也公开了其具体实施方式，对本领域的技术人员而言，在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进将是显而易见的。

中间体 1

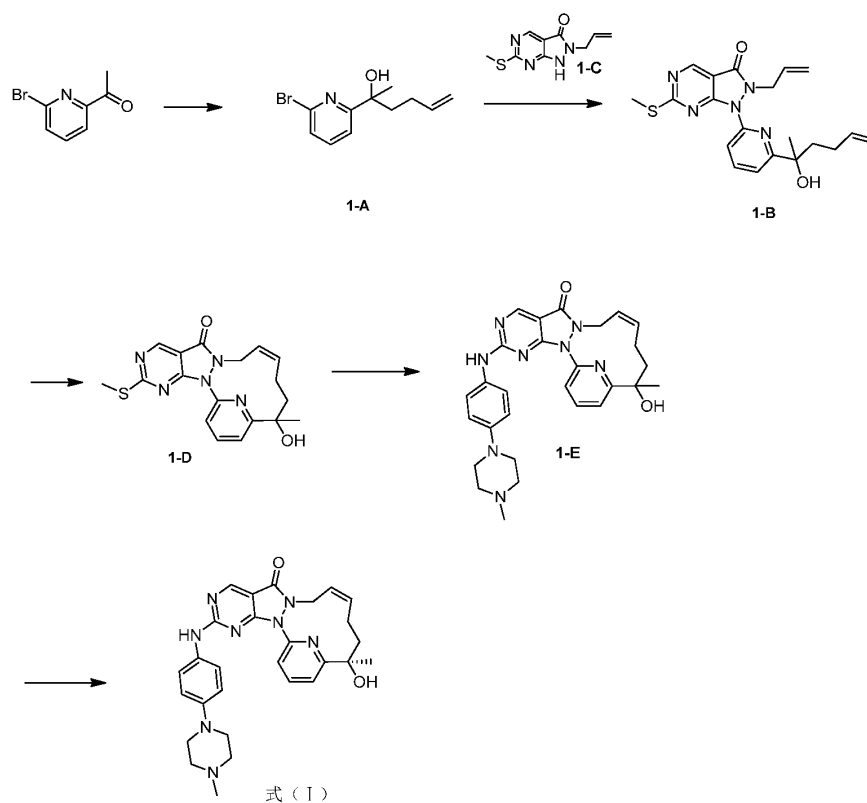


参考专利 WO2007126122 中的合成方法制备。

实施例 1: 式 (I) 化合物



合成路线:



步骤 1: 化合物 **1-A** 的合成。

在 0~15 °C 下, 氮气保护下往 2-乙酰基-6-溴吡啶 (7.35 g, 36.74 mmol) 的 THF (150 mL) 溶液中滴加入 3-丁烯基溴化镁 (1 M, 55.12 mL), 然后此反应液 10~20°C 搅拌 3 小时。加入饱和氯化铵溶液 100 mL 淬

灭反应，分液拿到有机层，再用饱和氯化钠 50 mL 洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩旋干得到棕色油状物。此棕色油状物，再用硅胶柱层析纯化（PE/EA=7/1）得到 **1-A**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.73 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.64 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 7.46 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 5.78~5.7 (m, 1H), 4.94~4.85 (m, 2H), 2.07~2.01 (m, 1H), 1.90~1.71 (m, 3H), 1.41 (s, 3H)。

步骤 2: 化合物 **1-B** 的合成。

往 **1-A** (3.47 g, 13.55 mmol) 和 **1-C** (3.01 g, 13.55 mmol) 的二氧六环 (150 mL) 混合物中加入 *N,N'*-二甲基乙二胺 (1.31 g, 14.90 mmol, 1.60 mL)，碘化亚铜 (2.58 g, 13.55 mmol) 和碳酸钾 (2.62 g, 18.97 mmol)，氮气置换三次，然后此混合物在氮气保护下 95℃ 搅拌 1.5 小时，加入氨水 (28%) 200 mL，然后用乙酸乙酯萃取 (300 mL×2)，合并有机层，饱和食盐水洗涤 200 mL，无水硫酸钠干燥，减压浓缩至干。混合物用硅胶柱层析 (PE/EA=3/1) 纯化得到 **1-B**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.02 (s, 1H), 8.04 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.76 (d, *J*=7.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 5.77~5.67 (m, 2H), 5.01~4.79 (m, 6H), 2.56 (s, 3H), 2.15~2.11 (m, 1H), 1.85~1.75 (m, 2H), 1.70~1.60 (m, 1H), 1.46 (s, 3H)。

步骤 3: 化合物 **1-D** 的合成。

往 **1-B** (2.06 g, 5.18 mmol) 的甲苯 (700 mL) 溶液中加入 Grubbs 第二代催化剂 (1.32 g, 1.55 mmol)，然后此混合物在 80℃ 和氮气氛围下搅拌 6 小时。补加 Grubbs 第二代催化剂 (0.65 g, 0.775 mmol)，然后此混合物在 80℃ 和氮气氛围下搅拌 3 小时。冷却到室温，过滤，滤液浓缩至干得到褐色残留物。经硅胶柱层析纯化 (PE/EA=1/1) 得到 **1-D**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.07 (s, 1H), 8.06 (t, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.79 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.70 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 5.39~5.25 (m, 3H), 4.66 (d, *J*=5.2 Hz, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.40~1.95 (m, 3H), 1.85~1.65 (m, 1H), 1.64 (s, 3H)。

步骤 4: 化合物 **1-E** 的合成。

在化合物 **1-D** (360 mg, 974.45 μmol) 的甲苯 (35 mL) 溶液中加入间氯过氧苯甲酸 (265.09 mg, 1.31 mmol, 85% 纯度)，反应在 25℃ 下搅拌 2 小时。向反应液中加入 4-(4-甲基哌嗪)苯胺 (242.30 mg, 1.27 mmol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺 (503.76 mg, 3.90 mmol)。反应液在 25℃ 搅拌 12 小时。向反应液中加入 25 mL 水，并搅拌，用乙酸乙酯 (30 mL×3) 萃取水相。合并有机相，用饱和碳酸氢钠溶液 (30 mL) 和饱和食盐水 (30 mL) 各洗涤一次，无水硫酸钠干燥。过滤，真空下浓缩得粗品，粗品经制备液相 (中性) 分离得到 **1-E**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.70 (s, 3 H) 1.78 (br d, *J*=13.54 Hz, 2 H) 2.04 (br d, *J*=6.54 Hz, 1 H) 2.08 - 2.23 (m, 2 H) 2.39 (s, 3 H) 2.62 - 2.64 (m, 4 H) 3.21 - 3.24 (m, 4 H) 4.24 (br s, 1 H) 4.51 (br d, *J*=13.54 Hz, 1 H) 5.61 - 5.88 (m, 2 H) 6.95 (d, *J*=9.04 Hz, 2 H) 7.49 (d, *J*=9.04 Hz, 3 H) 7.81 - 7.90 (m, 2 H) 8.87 (s, 1 H); MS *m/z*: 513.1 [M+H]⁺。

步骤 5: 式 (I) 化合物的合成。

化合物1-E (100 mg, 195.08 μ mol)经过SFC手性拆分(色谱柱: AD 250 $\times$ 50mm I.D., 10 μ m流动相: A: 超临界 CO₂, B: EtOH(0.1%NH₃H₂O), A:B =55:45 at 200mL/min), 保留时间: 21 min, 得到式(I)化合物。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.60 (s, 3 H) 1.68 (br s, 2 H) 1.94 (br d, *J*=7.04 Hz, 1 H) 2.00 - 2.20 (m, 2 H) 2.30 (s, 3 H) 2.52 - 2.55 (m, 4 H) 3.12 - 3.15 (m, 4 H) 4.24 (br s, 1 H) 4.42 (br d, *J*=9.54 Hz, 1 H) 5.65 (br s, 2 H) 6.85 (d, *J*=9.04 Hz, 2 H) 7.17 (s, 1 H) 7.40 (d, *J*=9.04 Hz, 2 H) 7.69 - 7.81 (m, 2 H) 8.77 (s, 1 H)。MS *m/z*: 513.1 [M+H]⁺。

实施例 2: 式(I)化合物 A 晶型的制备

大约 50 mg 式(I)化合物分别加入到不同的玻璃瓶中, 分别加入丙酮 0.5 mL 使其成悬浊液。将上述悬浊液样品置于恒温振荡仪(40 $^{\circ}$ C)进行试验。悬浊液样品在 40 $^{\circ}$ C下振摇两天后离心, 去上层液体, 然后将残留样品置于真空干燥箱中(40 $^{\circ}$ C)干燥过夜, 得到式(I)化合物 A 晶型。

实施例 3: 式(I)化合物 B 晶型的制备

大约 50 mg 式(I)化合物分别加入到不同的玻璃瓶中, 分别加入乙醇 0.3 mL 使其成悬浊液。将上述悬浊液样品置于恒温振荡仪(40 $^{\circ}$ C)进行试验。悬浊液样品在 40 $^{\circ}$ C下振摇两天后离心, 去上层液体, 然后将残留样品置于真空干燥箱中(40 $^{\circ}$ C)干燥过夜, 得到式(I)化合物 B 晶型。

实施例 4: 式(I)化合物 C 晶型的制备

大约 50 mg 式(I)化合物分别加入到不同的玻璃瓶中, 分别加入甲醇 0.2 mL 使其成悬浊液。将上述悬浊液样品置于恒温振荡仪(40 $^{\circ}$ C)进行试验。悬浊液样品在 40 $^{\circ}$ C下振摇两天后离心, 去上层液体, 然后将残留样品置于真空干燥箱中(40 $^{\circ}$ C)干燥过夜, 得到式(I)化合物 C 晶型。

实施例 5: 式(I)化合物 D 晶型的制备

大约 50 mg 式(I)化合物分别加入到不同的玻璃瓶中, 分别加入甲醇/水(1/1) 0.4 mL 使其成悬浊液。将上述悬浊液样品置于恒温振荡仪(40 $^{\circ}$ C)进行试验。悬浊液样品在 40 $^{\circ}$ C下振摇两天后离心, 去上层液体, 然后将残留样品置于真空干燥箱中(40 $^{\circ}$ C)干燥过夜, 得到式(I)化合物 D 晶型。

实施例 6: 式(I)化合物 E 晶型的制备

大约 50 mg 式(I)化合物分别加入到不同的玻璃瓶中, 分别加入 乙腈 0.5 mL 使其成悬浊液。将上述悬浊液样品置于恒温振荡仪(40 $^{\circ}$ C)进行试验。悬浊液样品在 40 $^{\circ}$ C下振摇两天后离心, 去上层液体, 然后将残留样品置于真空干燥箱中(40 $^{\circ}$ C)干燥过夜, 得到式(I)化合物 E 晶型。

实施例 7: 式(I)化合物 F 晶型的制备

25~26 $^{\circ}$ C下, 在装有 560 mL MeOH 的 1L 三口瓶中加入式(I)化合物 134.19 g), 搅拌, 加热至油浴 55~65 $^{\circ}$ C, 20 分钟后内温保持在 47 $^{\circ}$ C-53 $^{\circ}$ C。保温搅拌 72 小时。关闭加热, 保持搅拌自然降温 1 小时后至 27 $^{\circ}$ C。静置 18 小时, 过滤, 再用 30 mL MeOH 淋洗滤饼。滤饼于 60 $^{\circ}$ C真空烘干 48 小时。得到式(I)化合物 F 晶型。

实验例 1：式 (I) 化合物 F 晶型在高温，高湿 光照条件下的固体稳定性试验

根据影响因素和加速试验条件，准确称重式 (I) 化合物 F 晶型约 5mg 置于干燥洁净的玻璃瓶中，一式两份，摊成薄薄一层，作为正式供试样品，放置于影响因素试验条件下（60℃，92.5%RH（相对湿度））和加速条件下（40℃/75% RH 和 60℃/75% RH），其样品为完全暴露放样，用铝箔纸盖上，扎上小孔。另分别取少量样品放置在 40 mL 玻璃样品瓶同样条件下待测定晶型状态。在 5 天、10 天、1 月进行取样分析，分析方法见表 7，分析结果如表 8 所示。光照（可见光 1200000Lux，紫外 200W）条件下放置的样品为室温完全暴露放样。

表 7 有关物质的高效液相色谱分析方法

色谱柱	waters xbridge shield RP18(4.6mm×150mm，3.5μm)，PN：186003045																													
波长	230nm																													
柱温	40℃																													
流速	0.8 mL/min																													
进样体积	10μL																													
流动相	A：5mmol/L 醋酸铵水溶液(pH4.5)(V/V) B：100% ACN																													
流动相程序	<table><tr><td>时间(分)</td><td>A%</td><td>B%</td></tr><tr><td>0.01</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>10.00</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>50.00</td><td>30</td><td>70</td></tr><tr><td>51.00</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>55.00</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>56.00</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>62.00</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>62.01</td><td colspan="2">停止</td></tr></table>			时间(分)	A%	B%	0.01	95	5	10.00	95	5	50.00	30	70	51.00	10	90	55.00	10	90	56.00	95	5	62.00	95	5	62.01	停止	
	时间(分)	A%	B%																											
	0.01	95	5																											
	10.00	95	5																											
	50.00	30	70																											
	51.00	10	90																											
	55.00	10	90																											
	56.00	95	5																											
	62.00	95	5																											
	62.01	停止																												

数据采集时间	62 min
溶剂	乙腈：水 (V/V)=50:50
洗针溶剂	乙腈：水 (V/V)=50:50

表 8 式 (I) 化合物 F 晶型固体稳定性样品含量和有关物质分析结果 (5 天、10 天、1 月)

条件和时间点	晶型	总杂质%	含量%
0 天	F 晶型	0.63	99.38
60°C_5 天	F 晶型	0.74	99.39
60°C_10 天	F 晶型	0.84	99.98
92.5%湿度_5 天	F 晶型	0.61	98.72
92.5%湿度_10 天	F 晶型	0.64	98.38
避光	F 晶型	0.61	97.77
光照	F 晶型	0.67	98.58
40°C-75%湿度-10 天	F 晶型	0.63	98.01
40°C-75%湿度-1 个月	F 晶型	0.62	97.94
60°C-75%湿度-10 天	F 晶型	0.69	100.43
60°C-75%湿度-1 个月	F 晶型	0.75	99.46

结论：式(I)化合物 F 晶型在为期 1 个月的固体影响因素和加速试验中，原料化合物晶型未发生改变，有良好的物理稳定性。在有关物质分析中杂质在高温（60°C）和加速条件（60°C/75%RH）下略有增加，其余条件下杂质总量几乎不变，对温度略有敏感。

实验结论：本发明晶型稳定性好，易于成药。

实验例 2：式 (I) 化合物的体外酶学抑制活性

实验测试在 Eurofins 公司进行，实验结果由该公司提供。

在测试体系中，加入 20 mM Tris-HCl，pH 8.5，0.2 mM EDTA，500 μM 多肽底物 (LSNLYHQGKFLQTFCSPLYRRR)，10 mM 醋酸镁和 10 μM $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ (强度大约 500 cpm/pmol)。加入 Mg^{2+} 和 ATP 混合液后，反应起始，室温孵育 40 min。加入 3%磷酸缓冲液，终止反应。取 10 μL 反应液在连续过滤机 P30 上过滤，用 75 mM 磷酸缓冲液清洗三次，甲醇清洗一次，每次清洗 5 min。干燥后闪烁计数法读值。试验结果如表 9 所示。

表 9：本发明化合物体外酶学活性测定结果 (IC_{50})

化合物编号	Wce1 (IC_{50} nM)
AZD1775	47
式 (I) 化合物	29

实验例 3：本发明化合物的体外渗透性测试

研究采用经荷兰癌症研究所 Piet Borst 实验室授权的 MDR1-MDCK II 细胞，它是一种转染了人的多耐药基因（MDR1）的 Madin-Darby 犬肾细胞，该细胞能稳定表达外排转运体 P 糖蛋白（P-gp），因此适用于筛选 P-gp 底物或者抑制剂，并预测化合物在如十二指肠、血脑屏障、肝细胞核和肾单元等具有高外排作用屏障的渗透性。我们将第 5-35 代 MDR1-MDCK II 细胞用于渗透性研究。

MDR1-MDCK II 细胞用 α -MEM 培养基（ α -Minimum Essential Media）培养，培养条件为 $37\pm1^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 和饱和相对湿度。之后将细胞接种于 BD Transwell-96 孔板里，接种密度为 2.3×10^5 个细胞/ cm^2 ，然后将细胞置于二氧化碳培养箱中培养 4-7 天后用于转运实验。其 α -MEM 培养基的制备方法如下：液体培养基采用粉末（ α -MEM powder 来至 Gibco, Cat#:11900）溶于纯水配制，添加了 L-（左旋谷酰胺）和 NaHCO_3 。之后使用时添加 10% FBS（胎牛血清），1% PS（双抗） and 1% NEAA 使之成为完全培养基。 α -MEM 培养基配料如表 10 所示。

表 10. α MEM (1L $\times$)配料表

α MEM (1L $\times$)配料表			
化合物(1L $\times$)	分子量.	浓度(mM)	用量 (mg/L)
培养基粉	/	/	1 包
左旋谷酰胺	146	2	292
NaHCO_3	84	17.85	1500

AZD1775（或本发明化合物）和地高辛（Digoxin）给药浓度为 2 μM ，双向（A-B 和 B-A 方向）给药，均做二个复孔。非诺特罗（Fenoterol）和普萘洛尔（Propranolol）测试浓度均为 2 μM ，单向（A-B 方向）给药，均做二个复孔。

将待使用的溶液置 $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 水浴锅预孵育 30 分钟。将给药液和接收液分别加入到对应的细胞板孔位（每个顶端和基底端孔分别加样 75 和 250 μL ），启动双向转运实验。加样后，将细胞板置于 $37\pm1^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 和饱和相对湿度的培养箱中孵育 150 分钟。样品收集信息见表 11。

表 11. 样品收集信息

样品类型	每孔收样体积 (μL)	终止液的体积 (μL)	转运缓冲液的体积 (μL)
A-B 给药端	50	250	100
A-B 接收端	150	250	0

B-A 给药端	50	250	100
B-A 接收端	50	250	100
T ₀	50	250	100

注：T₀ 表示起始给药液样品。

所有的样品漩涡震荡后于 3220 g 离心 10 分钟，转移适量体积的上清液到样品分析板，封板后样品若不立即分析则储存于 2-8℃，采用 LC-MS/MS 的方法进行分析。

转运实验结束后，采用荧光黄检测实验（Lucifer Yellow Rejection Assay）测试 MDRI-MDCK II 细胞的完整性。荧光黄溶液孵育 30 分钟后，收取荧光黄样品，2e 读板仪在 425/528 nm（激发/发射）波谱处检测样品中荧光黄的相对荧光强度（the relative fluorescence unit, RFU）。

采用半定量分析供试品 AZD1775（或本发明化合物）、对照品非诺特罗（Fenoterol）、普萘洛尔（Propranolol）以及地高辛（Digoxin），用被分析物与内标的峰面积比值作为对照品的浓度。实验结果如表 12 所示。

表 12. 渗透速率（10⁻⁶ cm/s）

	AZD1775	式（I）化合物
A to B	2.83	4.55
B to A	29.3	17.38
外排比率	10.37	3.82

实验结论：

式（I）化合物的渗透性性质相对于 AZD1775 有了很大的提高，有利于生物体对于药物的利用。

实验例 4：化合物药代动力学评价

本实验旨在研究 AZD1775（或本发明化合物）单次静脉，单次口服给药后，在雌性 Balb/c Nude 小鼠血浆中的药代动力学情况。

12 只小鼠（灵畅提供）随机分为两组，每组 6 只雌性，采用交叉采血方式进行样品采集。静脉组所有动物静脉注射给予 1 mg/kg 的 AZD1775（或本发明化合物），溶媒配制制剂为含 0.2 mg/mL AZD1775（或本发明化合物）的 5% HP-betaCD（昆山瑞斯克化工原料有限公司）的澄清溶液。口服组动物灌胃给予 10mg/kg 的 AZD1775（或 本发明化合物），溶媒配制制剂为含 1 mg/mL AZD1775（或本发明化合

物) 的 0.5%甲基纤维素的均一混悬液。

静脉组动物在给药后5分钟、15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时及24小时的9个时间点采集血浆样品；口服组在给药后15分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、8小时及24小时的8个时间点采集血浆样品；样品经过LC-MS/MS分析获得AZD1775（或本发明化合物）血浆浓度数据，并计算药代参数，如达峰浓度，达峰时间，清除率，半衰期，药时曲线下面积，生物利用度等。实验结果如表13所示。

表13. 药代动力学测试结果

给药方式/剂量	静脉给药, 1 mg/kg		灌胃给药, 10 mg/kg	
供试品(各实施例所制得的化合物)	清除率 (mL/min/kg)	半衰期 T _{1/2} (h)	药时曲线下面积 AUC _{0-last} (nM.hr)	生物利用度 F (%)
AZD1775	85.7	0.252	1200	31
式 (I) 化合物	33.5	1.69	6037	62.4

实验结论：式 (I) 化合物对比 AZD1775 可以显著提高小鼠药代动力学多项指标，其中体内清除率，半衰期，体内浓度积分以及生物利用度都有明显优势。

实验例 5：体内研究

(1) 化合物对人结肠癌 LoVo 细胞皮下异种移植肿瘤 BALB/c 裸小鼠模型的体内药效学研究

实验方法：选用的实验动物（上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供）是 BALB/c 裸小鼠， 6-8 周龄，体重 18-22 克。

人结肠癌 LoVo 细胞，体外单层培养，培养条件为 Ham’s F-12 培养基中加 10%胎牛血清，100 U/mL 青霉素，100 µg/mL 链霉素和 2 mM 谷氨酰胺，37℃，5% CO₂ 培养。一周两次用胰酶-EDTA 进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80%-90%时，收取细胞，计数，接种。将 0.1 mL (10 × 10⁶ 个) LoVo 细胞皮下接种于每只裸小鼠的右后背，肿瘤平均体积达到 213 mm³ 时开始分组给药。灌胃给药剂量：40 毫克/公斤，每日两次。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 × b²，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。

化合物的抑瘤疗效用 TGI(%)或相对肿瘤增殖率 T/C(%)评价。TGI(%), 反映肿瘤生长抑制率。TGI(%) 的计算：TGI(%)=【(1-（某处理组给药结束时平均瘤体积－该处理组开始给药时平均瘤体积）)/(溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积－溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积)】×100%。

最终给药 16 天实验结果如表 14 所示。

表 14. 人结肠癌 LoVo 细胞异种移植瘤小鼠模型药效试验结果

化合物	TGI (%)
AZD1775	26.73
式 (I) 化合物	84.74

结论：本发明化合物对比 AZD1775 可以显著提高对小鼠身体肿瘤的抑制作用，而且化合物的手性对于体内药效有着意想不到的影响。

(2) 化合物对人胰腺癌 BxPC-3 BALB/c 裸小鼠皮下移植瘤模型的体内药效学研究

实验方法：选用的实验动物是 BALB/c nude 裸小鼠，6—8 周龄，体重 18-22 克。

BxPC-3 细胞第 10 代，体外单层培养，培养条件为 RPMI 1640 培养基(生产厂家: gibco, 货号: 22400-089) 中加 10% 胎牛血清，100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素，37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养，传代 4 次。传代方法为一周两次用胰酶-EDTA 进行常规消化处理传代。当细胞饱和度达到 80%-90% 时，细胞用胰酶-EDTA 消化，计数，重悬于 PBS，密度为 5×10^7 个细胞/mL。每只动物于右后背位置接种 0.1 mL (5×10^6 个) BxPC-3 细胞，当肿瘤平均体积达到 153 mm³ 时，根据瘤体体积随机分组，并开始给药。灌胃给药剂量：25 毫克/公斤，每日一次。

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。化合物的抑瘤疗效用 TGI(%) 或相对肿瘤增殖率 T/C(%) 评价。TGI(%)，反映肿瘤生长抑制率。TGI(%) 的计算： $TGI(\%) = \frac{(1 - (\text{某处理组给药结束时平均瘤体积} - \text{该处理组开始给药时平均瘤体积}))}{(\text{溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积} - \text{溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积})} \times 100\%$ 。

最终给药 27 天实验结果如表 15 所示。

表 15. 人胰腺癌 BxPC-3 细胞异种移植瘤小鼠模型药效试验结果

化合物	TGI (%)
AZD1775	24.3
式 (I) 化合物	73.3

结论：通过表 15 可以看出，式 (I) 化合物对比 AZD1775 可以显著提高对小鼠身体肿瘤的抑制作用。

(3) 化合物对 CT26 小鼠结肠癌细胞动物移植瘤模型的体内抗肿瘤药效研究

实验方法：选用的实验动物是 BALB/c 裸小鼠，7 周龄，体重 16-20 克，雌性。

细胞：小鼠结肠癌 CT26 细胞（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）体外单层培养，培养条件为采用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基，37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。用胰酶-EDTA 进行常规消化处理传代。当细胞处于指数生长期，饱和度为 80 %-90 % 时，收取细胞，计数，接种。将 0.1 mL DPBS（含 3×10⁵ 个 CT26 细胞）皮下接种于每只小鼠的右后背，待肿瘤平均体积达到 50~70 mm³ 时，根据肿瘤体积进行随机分组给药。灌胃给药剂量：30 毫克/公斤，每日两次。

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。化合物的抑瘤疗效用 TGI(%) 或相对肿瘤增殖率 T/C(%) 评价。TGI(%), 反映肿瘤生长抑制率。TGI(%) 的计算：
$$TGI(\%) = \left[\frac{1 - (\text{某处理组给药结束时平均瘤体积} - \text{该处理组开始给药时平均瘤体积})}{(\text{溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积} - \text{溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积})} \right] \times 100\%$$

最终给药 18 天实验结果如表 16 所示。

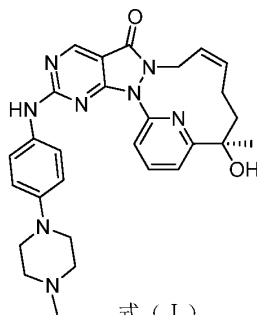
表 16. 小鼠结肠癌 CT26 细胞同种移植瘤模型体内药效试验结果

化合物	TGI (%)
AZD1775	66.43
式 (I) 化合物	93.38

结论：通过表 16 可以看出，式 (I) 化合物对比 AZD1775 可以显著提高对小鼠身体肿瘤的抑制作用。

权利要求

1. 式(I)化合物的A晶型,其X射线粉末衍射(XRPD)图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.71\pm 0.2^\circ$ 、 $12.68\pm 0.2^\circ$ 和 $15.32\pm 0.2^\circ$,



2. 根据权利要求1所述的A晶型,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.71\pm 0.2^\circ$ 、 $12.68\pm 0.2^\circ$ 、 $15.32\pm 0.2^\circ$ 、 $18.04\pm 0.2^\circ$ 、 $19.72\pm 0.2^\circ$ 、 $21.44\pm 0.2^\circ$ 、 $23.61\pm 0.2^\circ$ 和 $25.68\pm 0.2^\circ$ 。
3. 根据权利要求2所述的A晶型的XRPD图谱如图1所示。
4. 根据权利要求1~3任意一项所述的A晶型,其差示扫描量热曲线(DSC)在 $34.95\pm 3^\circ\text{C}$ 、 $174.75\pm 3^\circ\text{C}$ 和 $219.12\pm 3^\circ\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点。
5. 根据权利要求4所述的A晶型的DSC图谱如图2所示。
6. 根据权利要求1~3任意一项所述的A晶型,其热重分析曲线(TGA)在 $70.33\pm 3^\circ\text{C}$ 时失重达0.7367%;在 $209.42\pm 3^\circ\text{C}$ 时又失重达3.123%。
7. 根据权利要求6所述的A晶型的TGA图谱如图3所示。
8. 式(I)化合物的B晶型,其X射线粉末衍射(XRPD)图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.58\pm 0.2^\circ$ 、 $12.44\pm 0.2^\circ$ 和 $22.16\pm 0.2^\circ$ 。
9. 根据权利要求8所述的B晶型,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.58\pm 0.2^\circ$ 、 $11.71\pm 0.2^\circ$ 、 $12.44\pm 0.2^\circ$ 、 $14.48\pm 0.2^\circ$ 、 $15.13\pm 0.2^\circ$ 、 $18.64\pm 0.2^\circ$ 、 $22.16\pm 0.2^\circ$ 和 $26.33\pm 0.2^\circ$ 。
10. 根据权利要求9所述的B晶型,其XRPD图谱如图4所示。
11. 根据权利要求8~10任意一项所述的B晶型,其差示扫描量热曲线(DSC)在 $42.88\pm 3^\circ\text{C}$ 、 $198.79\pm 3^\circ\text{C}$ 和 $222.36\pm 3^\circ\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点。
12. 根据权利要求11所述的B晶型,其DSC图谱如图5所示。
13. 根据权利要求8~10任意一项所述的B晶型,其热重分析曲线(TGA)在 $64.21\pm 3^\circ\text{C}$ 时失重达3.265%;在 $243.05\pm 3^\circ\text{C}$ 时又失重达1.516%。
14. 根据权利要求13所述的B晶型,其TGA图谱如图6所示。
15. (I)化合物的C晶型,其X射线粉末衍射(XRPD)图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.05\pm 0.2^\circ$ 、

5.58±0.2°和 12.44±0.2°。

16.根据权利要求 15 所述的 C 晶型,其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰:5.05±0.2°、5.58±0.2°、12.44±0.2°、15.91±0.2°、16.68±0.2°、17.61±0.2°、22.19±0.2°和 26.37±0.2°。

17.根据权利要求 16 所述的 C 晶型,其 XRPD 图谱如图 7 所示。

18.根据权利要求 15~17 任意一项所述的 C 晶型,其差示扫描量热曲线(DSC)在 37.06±3℃、189.16±3℃和 218.61±3℃处分别有一个吸热峰的起始点。

19.根据权利要求 18 所述的 C 晶型,其 DSC 图谱如图 8 所示。

20.根据权利要求 15~17 任意一项所述的 C 晶型,其热重分析曲线(TGA)在 64.98±3℃时失重达 2.211%;在 224.71±3℃时又失重达 1.127%。

21.根据权利要求 20 所述的 C 晶型,其 TGA 图谱如图 9 所示。

22.式(I)化合物的 D 晶型,其 X 射线粉末衍射(XRPD)图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰:5.22±0.2°、15.99±0.2°和 16.57±0.2°。

23.根据权利要求 22 所述的 D 晶型,其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰:5.22±0.2°、15.18±0.2°、15.99±0.2°、16.57±0.2°、17.08±0.2°、18.60±0.2°、21.22±0.2°和 21.89±0.2°。

24.根据权利要求 23 所述的 D 晶型,其 D 晶型的 XRPD 图谱如图 10 所示。

25.根据权利要求 22~24 任意一项所述的 D 晶型,其差示扫描量热曲线(DSC)在 56.07±3℃、193.93±3℃和 216.54±3℃处分别有一个吸热峰的起始点。

26.根据权利要求 25 所述的 D 晶型,其 DSC 图谱如图 11 所示。

27.根据权利要求 22~24 任意一项所述的 D 晶型,其热重分析曲线(TGA)在 79.35±3℃时失重达 1.977%;在 223.66±3℃时又失重达 1.589%。

28.根据权利要求 27 所述的 D 晶型,其 TGA 图谱如图 12 所示。

29.式(I)化合物的 E 晶型,其 X 射线粉末衍射(XRPD)图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰:8.65±0.2°、14.22±0.2°和 24.58±0.2°。

30.根据权利要求 29 所述的 E 晶型,其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰:8.65±0.2°、11.41±0.2°、13.13±0.2°、14.22±0.2°、17.35±0.2°、18.34±0.2°、20.39±0.2°、20.94±0.2°和 24.58±0.2°。

31.根据权利要求 30 所述的 E 晶型,其 XRPD 图谱如图 13 所示。

32.根据权利要求 29~31 任意所述的 E 晶型,其差示扫描量热曲线(DSC)在 121.57±3℃、197.26±3℃和 217.23±3℃处分别有一个吸热峰的起始点;在 168.31±3℃和 212.95±3℃分别有一个放热峰的峰值。

33.根据权利要求 32 所述的 E 晶型,其 DSC 图谱如图 14 所示。

34.根据权利要求 29~31 任意所述的 E 晶型, 其热重分析曲线(TGA)在 $143.31\pm 3^{\circ}\text{C}$ 时失重达 6.775%; 在 $213.62\pm 3^{\circ}\text{C}$ 时又失重达 0.3184%。

35.根据权利要求 34 所述的 E 晶型, 其 TGA 图谱如图 15 所示。

36.式(I)化合物的 F 晶型, 其 X 射线粉末衍射(XRPD)图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.06\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.91\pm 0.2^{\circ}$ 和 $16.68\pm 0.2^{\circ}$ 。

37.根据权利要求 36 所述的 F 晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $5.06\pm 0.2^{\circ}$ 、 $8.34\pm 0.2^{\circ}$ 、 $10.98\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.13\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.91\pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.68\pm 0.2^{\circ}$ 、 $17.63\pm 0.2^{\circ}$ 和 $18.87\pm 0.2^{\circ}$ 。

38.根据权利要求 37 所述的 F 晶型, 其 XRPD 图谱如图 16 所示。

39.根据权利要求 36~38 任意一项所述的 F 晶型, 其差示扫描量热曲线(DSC)在 $48.69\pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $225.26\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处分别有一个吸热峰的起始点。

40.根据权利要求 39 所述的 F 晶型, 其 DSC 图谱如图 17 所示。

41.根据权利要求 36~38 任意一项所述的 F 晶型, 其热重分析曲线(TGA)在 $100\pm 3^{\circ}\text{C}$ 时失重达 3.404%。

42.根据权利要求 41 所述的 F 晶型, 其 TGA 图谱如图 18 所示。

43.根据权利要求 1~7 任意一项所述的 A 晶型、根据权利要求 8~14 任意一项所述的 B 晶型、根据权利要求 15~21 任意一项所述的 C 晶型、据权利要求 22~28 任意一项所述的 D 晶型、据权利要求 29~34 任意一项所述的 E 晶型或根据权利要求 35~42 任意一项所述的 F 晶型在制备治疗 Wee1 相关疾病的药物的应用。

44.式(I)化合物的F晶型的制备方法, 包括:

- (a) 将式(I)化合物加入醇类溶剂中搅拌加热至油浴 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$;
- (b) $47^{\circ}\text{C}\sim 53^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 72 小时;
- (c) 关闭加热, 保持搅拌自然降温 1 小时后至 27°C ;
- (d) 静置 18 小时, 过滤, 再用甲醇淋洗滤饼;
- (e) 60°C 真空烘干 48 小时。

45.根据权利要求 44 所述的制备方法, 其中, 醇类溶剂为甲醇。