

抑制 CDK4/6 活性化合物的晶型及其应用

技术领域

本发明涉及一种化合物(R)-N-(5-((4-乙基吡嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(6-氟-1-甲基-1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-8-基)嘧啶-2-胺的盐型及其晶型；本发明还涉及所述化合物和晶型的制备方法以及相关的中间体化合物，含有所述化合物的药物组合物，以及它们在抑制 CDK4/6 的活性中的应用。本发明也涉及应用至少上述之一的化合物或晶型及药物组合物治疗与 CDK4/6 调节相关的疾病、病症或病状的方法。

背景技术

10 细胞周期蛋白依赖性激酶 (Cyclin-dependent kinase, CDKs)，是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，在细胞周期、转录起始和某些特定代谢级联反应控制等过程中都参与调控。不同的CDK和细胞周期素 (cyclin) 形成CDK-cyclin复合物，若CDK活性失调会直接或间接引起细胞增殖失控、基因组不稳定 (DNA突变增加，染色体缺失等) 和染色体不稳定 (染色体数目变化) 等。

15 CDKs家族目前已经确认了20多个亚型，CDK1、CDK2、CDK4、CDK6等参与细胞周期调控；CDK7、CDK8、CDK9、CDK11等参与转录调节；以及其他激酶包括CDK3、CDK5等。其中CDK4/6 (细胞周期蛋白依赖性激酶4和6) 是调节细胞周期的关键因子，与癌症有关的细胞周期突变主要存在于G1期和G1/S期转化过程中，CDK4/6与CyclinD结合形成有激酶活性的复合物，通过抑癌基因Rb产物pRb磷酸化，释放结合的转录因子E2F，启动
20 与S期有关的基因转录，促使细胞通过检验点，并从G1期向S期转移。CDK4/6特异性的激活与一些肿瘤的增殖密切相关，大约80%的人类肿瘤中有cyclin D-CDK4/6-INK4-Rb通路的异常。CDK4/6 抑制剂将细胞周期阻滞于G1期，从而起到抑制肿瘤增殖的作用。

靶向CDK4/6激酶药物的研发是意义重大的领域，其抗肿瘤靶点的优势在于：(1) 大多数增殖的细胞依赖CDK2或者CDK4/6增殖，但CDK4/6的抑制剂不表现出“pan-CDK抑制剂”的细胞毒性，如骨髓抑制和肠道反应；(2) 临床前实验表明，如果细胞cyclin D水平升高或者P16INK4a失活，能够增加细胞对药物的敏感性，由于肿瘤细胞相对于正常细

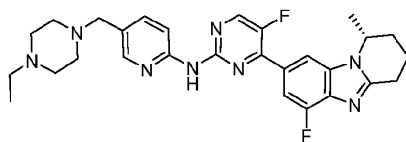
25

胞存在上述现象，所以一定程度上增加了药物的靶向性。

PCT国际申请PCT/CN2017/117950描述了一类用作CDK4/6蛋白激酶抑制剂的苯并咪唑衍生物，这些化合物中的大部分有效地抑制CDK4和CDK6。因为在激酶介导疾病的治疗选择方面仍有未满足的需求，在此我们进一步筛选苯并咪唑衍生物的盐型及其晶型以满

发明内容

本发明的目的在于提供一种如下结构式 I 所示化合物(R)-N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(6-氟-1-甲基-1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-8-基)嘧啶-2-胺的盐型及其晶型：

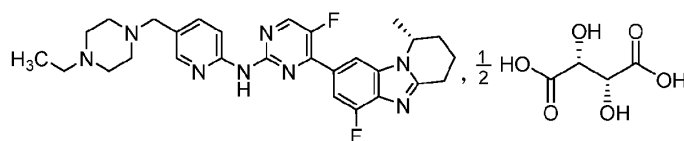


结构式 I (化合物 I)

结构式 I 的盐型

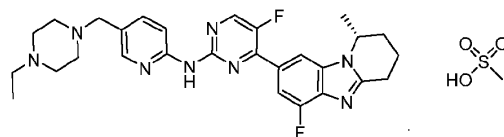
在一些实施方案中，一种酸和化合物 I 形成相应的盐。这些盐型化合物可以以各种物理形式存在。例如，可以是溶液、悬浮液或固体形式。在某些实施方式中，盐型化合物为固体形式。为固体形式时，所述化合物可以是无定形物，结晶物或其混合物。下面示范性列举了化合物 I 与两种酸所形成的盐型。分别是酒石酸盐化合物和甲磺酸盐化合物。在一些实施方式中，所述酒石酸盐是指 L-酒石酸盐。化合物 I 的 L-酒石酸盐和甲磺酸盐的结构如下结构式 II 和结构式 III 所示：

化合物 I 的 L-酒石酸盐 (结构式 II 所示化合物，化合物 II)



结构式 II (化合物 II)

化合物 I 的甲磺酸盐 (结构式 III 所示化合物，化合物 III)



结构式 III (化合物 III)

本发明还提供了上述化合物 II 和化合物 III 的多种晶型。例如，

化合物 II 的晶型 A

本发明提供了化合物 II 的晶型 A。

在一些实施方式中，化合物 II 的晶型 A 可以通过 X 射线粉末衍射进行鉴别。在一些
5 实施方式中，化合物 II 的晶型 A 的 X 射线粉末衍射谱图具有衍射角 2θ 为 $4.4\pm 0.2^\circ$ 、 $23.6\pm 0.2^\circ$ 和 $26.9\pm 0.2^\circ$ 的特征峰。为方便，本发明称之为晶型 A。

在一些实施方式中，上述晶型 A 的 X 射线粉末衍射谱图具有衍射角 2θ 为 $4.4\pm 0.2^\circ$ 、 $8.7\pm 0.2^\circ$ 、 $10.8\pm 0.2^\circ$ 、 $18.4\pm 0.2^\circ$ 、 $23.6\pm 0.2^\circ$ 和 $26.9\pm 0.2^\circ$ 的特征峰。

在一些实施方式中，上述晶型 A 的 X 射线粉末衍射谱图具有衍射角 2θ 为 $4.4\pm 0.2^\circ$ 、
10 $8.7\pm 0.2^\circ$ 、 $10.8\pm 0.2^\circ$ 、 $15.9\pm 0.2^\circ$ 、 $18.4\pm 0.2^\circ$ 、 $23.6\pm 0.2^\circ$ 和 $26.9\pm 0.2^\circ$ 的特征峰。

在一些实施方式中，本发明所述化合物 II 晶型 A 可用差式扫描量热分析进行鉴定。
在一些实施方式中，晶型 A 具有如图 11 所示的差式扫描量热分析曲线。在 DSC 图谱中，
晶型 A 的吸热峰约在 $230.1\sim 233.1^\circ\text{C}$ 。差式扫描量热分析测定是通过 NETZSCH 公司的 DSC
200F3 240-20-0954-L (吹扫气体：氮气；流速：60mL/min；升温速度： $10^\circ\text{C}/\text{分钟}$ ，测定
15 范围： $30^\circ\text{C}\sim 300^\circ\text{C}$) 测定。

在一些实施方式中，本发明所述化合物 II 的晶型 A 可以利用离子色谱法，电导检测器，
采用外标法计算主成分含量，测得 L-酒石酸含量约为 12.01%-13.27%。

在一些实施方式中，本发明所述化合物 II 的晶型 A 可以利用 ^1H NMR 进行鉴定， ^1H NMR
的数据如下： ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ ppm: 1.01-1.04 (t, 3H, CH_3 , $J=5.3\text{Hz}$), 1.50-1.52
20 (d, 3H, CH_3 , $J=6.5\text{Hz}$), 1.93-1.95 (m, 2H, CH_2), 2.03-2.06 (m, 1H, CH_2), 2.16-2.19 (m,
1H, CH_2), 2.50 (s, 8H, CH_2), 2.57 (s, 2H, CH_2), 2.93-3.09 (m, 2H, CH_2), 3.47 (s, 1H, CH_2),
4.02 (s, 1H, CH), 4.79 (s, 1H, CH), 7.68-7.70 (d, 1H, CH, $J=10.5$), 7.71-7.73 (d, 1H, Ar-H,
 $J=12.5$), 8.12 (s, 1H, Ar-H), 8.20 (s, 1H, Ar-H), 8.21 (s, 1H, Ar-H), 8.68-8.69 (d, 1H, Ar-H,
 $J=3.5$), 10.03 (s, 1H, N-H)。

25 作为优选，该晶型 A 纯度 $\geq 85\%$ 。

作为优选，该晶型 A 纯度 $\geq 95\%$ 。

作为优选，该晶型 A 纯度 $\geq 99\%$ 。

作为优选，该晶型 A 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

作为优选，该晶型 A 为无水物。

30 本发明提供的化合物 II 晶型 A 具有结晶性好、弱吸湿性、稳定性好的特性，而且具

有可接受的口服生物利用度。

化合物 II 的晶型 B

本发明还提供了化合物 II 的另一晶型，为方便，本发明称之为晶型 B。该晶型 B 的 X 射线粉末衍射谱图有约如图 2 所示的 X-射线粉末衍射图。

5 作为优选，该晶型 B 纯度 $\geq 85\%$ 。

作为优选，该晶型 B 纯度 $\geq 95\%$ 。

作为优选，该晶型 B 纯度 $\geq 99\%$ 。

作为优选，该晶型 B 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

作为优选，该晶型 B 为无水物。

10 化合物 II 的晶型 C

本发明还提供了化合物 II 的另一晶型，为方便，本发明称之为晶型 C。该晶型 C 的 X 射线粉末衍射谱图有约如图 3 所示的 X-射线粉末衍射图。

作为优选，该晶型 C 纯度 $\geq 85\%$ 。

作为优选，该晶型 C 纯度 $\geq 95\%$ 。

15 作为优选，该晶型 C 纯度 $\geq 99\%$ 。

作为优选，该晶型 C 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

本发明进一步提供了化合物 II 或其溶剂化物的无定型物，该无定型物具有约如图 4 所示的 X-射线粉末衍射图。

20 本发明还进一步提供了含有治疗有效量的化合物 II 的晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C 的药物组合物。

本发明还提供了上述药物组合物的优选实施方式：

作为优选，所述药物组合物含有治疗有效量的化合物 II 的晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C，和药学上可接受的辅料、辅助剂或载体。

25 作为优选，所述药物组合物含有治疗有效量的化合物 II 的晶型 A，和药学上可接受的辅料、辅助剂或载体。

作为优选，所述药物组合物含有治疗有效量的化合物 II 的晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C，并联用至少一种其他有效成分。

作为优选，所述药物组合物含有治疗有效量的化合物 II 的晶型 A，并联用至少一种其他有效成分。

30 作为优选，所述药物组合物为口服制剂。

作为优选，所述药物组合物为片剂或胶囊。

本发明还提供了所述化合物 II 的晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C 在制备治疗患者的疾病、病症或病状的药物中的用途，其中，所述的疾病、病症或病状由 CDK，如 CDK4 和/或 CDK6 介导。

5 本发明还提供了所述化合物 II 的晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C 上述用途的优选实施方式。

作为优选，所述疾病、病症或病状是癌症和/或增殖性疾病。

作为优选，所述的疾病、病症或病状是结肠癌、直肠癌、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤、鳞状细胞食管癌、脂肪肉瘤、T 细胞淋巴瘤、黑
10 素瘤、胰腺癌、脑癌或肺癌。

作为优选，所述疾病、病症或病状是乳腺癌。

本发明还提供了通过对患者施用化合物 II 的晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C 治疗患者的疾病、病症或病状的方法。

本发明进一步提供了上述利用化合物 II 的晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C 治疗患者的疾
15 病、病症或病状的方法的优选实施方式：

作为优选，所述的疾病、病症或病状是由 CDK，如 CDK4 和/或 CDK6 介导。

作为优选，所述的疾病、病症或病状是癌症和/或增殖性疾病。

作为优选，所述的疾病、病症或病状是结肠癌、直肠癌、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤、鳞状细胞食管癌、脂肪肉瘤、T 细胞淋巴瘤、黑
20 素瘤、胰腺癌、脑癌或肺癌。

作为优选，所述疾病、病症或病状是乳腺癌。

化合物 III 的晶型 D

本发明提供了化合物 III 和/或其溶剂化物的一种晶型，为方便，本发明称之为晶型 D。
该晶型 D 具有约如图 5 所示的 X-射线粉末衍射图。

25 作为优选，该晶型 D 纯度 $\geq 85\%$ 。

作为优选，该晶型 D 纯度 $\geq 95\%$ 。

作为优选，该晶型 D 纯度 $\geq 99\%$ 。

作为优选，该晶型 D 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

作为优选，该晶型 D 为无水物。

30 化合物 III 的晶型 E

本发明提供了化合物 III 和/或其溶剂化物的一种晶型, 为方便, 本发明称之为晶型 E。
该晶型 E 具有约如图 6 所示的 X-射线粉末衍射图。

作为优选, 该晶型 E 纯度 $\geq 85\%$ 。

作为优选, 该晶型 E 纯度 $\geq 95\%$ 。

5 作为优选, 该晶型 E 纯度 $\geq 99\%$ 。

作为优选, 该晶型 E 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

作为优选, 该晶型 E 为二水合物。

化合物 III 的晶型 F

本发明提供了化合物 III 和/或其溶剂化物的一种晶型, 为方便, 本发明称之为晶型 F。
10 该晶型 F 具有约如图 7 所示的 X-射线粉末衍射图。

作为优选, 该晶型 F 纯度 $\geq 85\%$ 。

作为优选, 该晶型 F 纯度 $\geq 95\%$ 。

作为优选, 该晶型 F 纯度 $\geq 99\%$ 。

作为优选, 该晶型 F 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

15 作为优选, 该晶型 F 为 1.5 水合物。

化合物 III 的晶型 G

本发明首先提供了化合物 III 和/或其溶剂化物的一种晶型, 为方便, 本发明称之为晶型 G。该晶型 G 具有约如图 8 所示的 X-射线粉末衍射图。

作为优选, 该晶型 G 纯度 $\geq 85\%$ 。

20 作为优选, 该晶型 G 纯度 $\geq 95\%$ 。

作为优选, 该晶型 G 纯度 $\geq 99\%$ 。

作为优选, 该晶型 G 纯度 $\geq 99.5\%$ 。

作为优选, 该晶型 G 为 2.5 水合物。

本发明进一步提供了化合物 III 和/或其溶剂化物的无定型物, 该无定型物具有约如图
25 9 所示的 X-射线粉末衍射图。

本发明还进一步提供了含有治疗有效量的化合物 III 的晶型 D、晶型 E、晶型 F 和/或晶型 G 的药物组合物。

本发明还提供了上述药物组合物的优选实施方式:

作为优选, 所述药物组合物含有治疗有效量的化合物 III 的晶型 D、晶型 E、晶型 F
30 和晶型 G, 和药学上可接受的辅料、辅助剂或载体。

作为优选，所述药物组合物含有治疗有效量的化合物 III 的晶型 D、晶型 E、晶型 F 和晶型 G，并联用至少一种其他有效成分。

作为优选，所述药物组合物为口服制剂。

作为优选，所述药物组合物为片剂或胶囊。

- 5 本发明还提供了化合物 III 的晶型 D、晶型 E、晶型 F 和/或晶型 G 在制备治疗患者的疾病、病症或病状的药物中的用途，其中，所述的疾病、病症或病状由 CDK，如 CDK4 和/或 CDK6 介导。

本发明还提供了化合物 III 的晶型 D、晶型 E、晶型 F 和/或晶型 G 的上述用途的优选实施方式：

- 10 作为优选，所述疾病、病症或病状是癌症和/或增殖性疾病。

作为优选，所述疾病、病症或病状是结肠癌、直肠癌、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤、鳞状细胞食管癌、脂肪肉瘤、T 细胞淋巴瘤、黑素瘤、胰腺癌、脑癌或肺癌。

作为优选，所述疾病、病症或病状是乳腺癌。

- 15 本发明还提供了通过对患者施用化合物 III 的晶型 D、晶型 E、晶型 F 和/或晶型 G 治疗患者的疾病、病症或病状的方法。

本发明进一步提供了上述利用化合物 III 的晶型 D、晶型 E、晶型 F 和/或晶型 G 治疗患者的疾病、病症或病状的方法的优选实施方式：

作为优选，所述的疾病、病症或病状是由 CDK，如 CDK4 和/或 CDK6 介导。

- 20 作为优选，所述的疾病、病症或病状是癌症和/或增殖性疾病

作为优选，所述的疾病、病症或病状是结肠癌、直肠癌、套细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、胶质母细胞瘤、鳞状细胞食管癌、脂肪肉瘤、T 细胞淋巴瘤、黑素瘤、胰腺癌、脑癌或肺癌。

作为优选，所述疾病、病症或病状是乳腺癌。

- 25 在一些实施方式中，本发明提供的化合物 I 的盐的晶型，所述晶型是由如下方法制备得到：

1) 将(R)-N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(6-氟-1-甲基-1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-8-基)嘧啶-2-胺(化合物 I)混悬于水和/或水溶性有机溶剂中，得到混悬物；

- 30 2) 将上述混悬物加热至 50℃ 以上；

3) 在保持 50℃ 以上的温度条件下,在上述混悬物中加入相应的酸,进行酸化处理,得到澄清溶液;

4) 降至室温后,搅拌过滤,滤饼经干燥后得到化合物 I 的盐的晶型。

例如,上述步骤 3) 中加入的酸为 L-酒石酸,步骤 4) 得到的就是化合物 I 的 L-酒石酸盐的晶型。

又例如,上述步骤 3) 中加入的酸为甲磺酸,步骤 4) 得到的就是化合物 I 的甲磺酸盐的晶型。

在一些实施方式中,化合物 II 的晶型 A 的制备方法如下:

50-70℃ 条件下将化合物 I 在甲醇中形成清液,将 L-酒石酸溶解在甲醇中,将 L-酒石酸的甲醇溶液滴加至化合物 I 的甲醇溶液中,搅拌后过滤,滤饼置于 40-70℃ 干燥,即得到化合物 II 的晶型 A。

在一些实施方式中,化合物 II 的晶型 B 的制备方法如下:

取化合物 II 的晶型 A,加入水和丙酮溶清,过滤搅拌,转至 0-20℃ 搅拌,析出固体,离心后干燥,得到化合物 II 的晶型 B。

在一些实施方式中,化合物 II 的晶型 C 的制备方法如下:

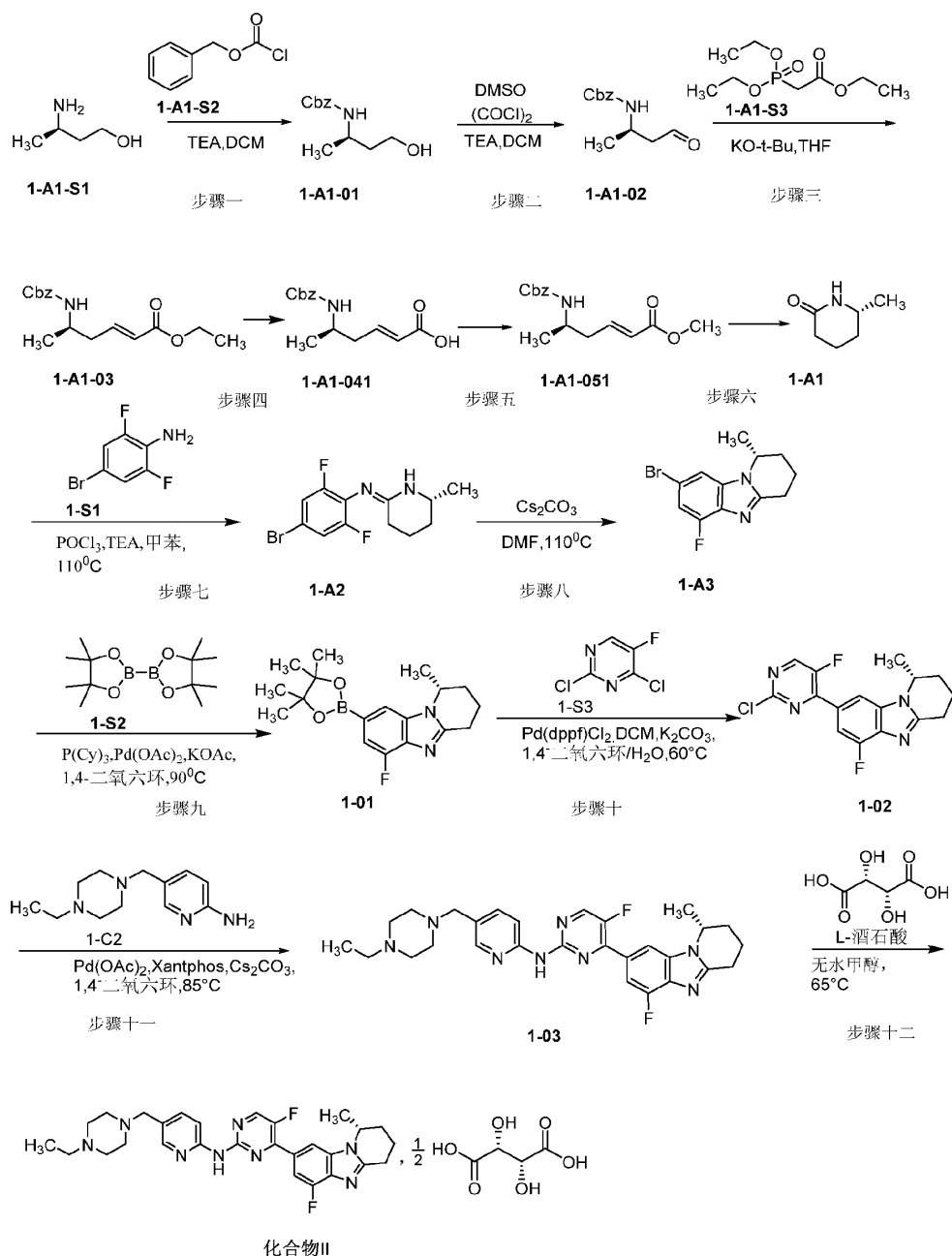
搅拌状态下,取 1-03 (100g)、无水甲醇 (1L),依次加入到 2L 反应釜中,加热至 65℃,待反应体系澄清 0.5 小时后滴加 L-酒石酸的甲醇溶液 (30.09g 酒石酸溶于 100mL 无水甲醇),控制滴加时间在 45 至 60 分钟,滴加完毕,65℃ 保温反应 4 小时,继续滴加 L-酒石酸的甲醇溶液 (7.48g 酒石酸溶于 100mL 无水甲醇),控制滴加时间在 30 至 45 分钟,滴加完毕,65℃ 保温反应 1.5 小时,继续滴加 L-酒石酸的甲醇溶液 (8.55g 酒石酸溶于 100mL 无水甲醇),控制滴加时间在 30 至 45 分钟,滴加完毕,65℃ 保温反应 1.5 小时,停止加热,降温至 10℃ 以下,过滤,滤饼用甲醇 (100mL×2) 淋洗,45℃ 真空干燥 36 小时,得淡黄色结晶性粉末 109.4g,即为化合物 II 的 L-酒石酸盐,通过 X 射线粉末衍射进行鉴定,显示该晶型为化合物 II 的 L-酒石酸盐的晶型 C。

在一些实施方式中,化合物 II 的无定形物的制备方法如下:

取化合物 II 的晶型 A,加入三氟乙醇溶清,减压浓缩,得到化合物 II 的无定型物。

化合物 II 的无定型物在室温环境中受水分影响容易形成化合物 II 的晶型 B。

本发明还示范性地列举了(R)-N-(5-((4-乙基吡啶-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(6-氟-1-甲基-1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-8-基)嘧啶-2-胺的 L-酒石酸盐 (化合物 II) 的制备方法,其包括如下步骤:



在一些实施方式中，化合物 III 的晶型 D 的制备方法如下：

50-70℃条件下将化合物 I 在甲醇中溶清，将甲磺酸溶解在甲醇中，取甲磺酸的甲醇溶液滴加至化合物 I 的甲醇溶液中，搅拌后滴加异丙醚，缓慢析出固体，搅拌后过滤，滤饼置于 40-70℃干燥得到固体。母液中再滴加异丙醚搅拌后过滤，滤饼置于 40-70℃干燥得到固体。将得到的固体继续干燥后得到化合物 III 的晶型 D。

在一些实施方式中，化合物 III 的晶型 E 的制备方法如下：

取化合物 III 的晶型 D 室温置于 52%RH 湿度条件下 1-4 天，得到化合物 III 的晶型 E。

在一些实施方式中，化合物 III 的晶型 F 的制备方法如下：

取化合物 III 的晶型 E 在室温 44%RH 湿度放置 1-14 天，得到化合物 III 的晶型 F。

5 在一些实施方式中，化合物 III 的晶型 G 的制备方法如下：

取化合物 III 的晶型 D，置于室温 97%RH 条件下敞口放置 1-4 天，即得到化合物 III 的晶型 G。

在一些实施方式中，化合物 III 的无定形物的制备方法如下：

10 取化合物 III 的晶型 D，加入水溶清，减压浓缩干成粘稠状固体，得到化合物 III 的无定型物。

化合物 III 的无定型物放大到 50mg 时不稳定，得到结晶态。

本发明的所有晶型都是基本上纯的。

15 本发明所用的术语“基本上纯的”是指至少 85 重量%，优选至少 95 重量%，更优选至少 99 重量%，最优选至少 99.5 重量%的结构式 I 所示的化合物存在于本发明的晶型中，尤其是在晶型 A、晶型 B 和/或晶型 C 中。

20 如本文所述，新品型可以通过粉末 X-射线衍射谱进行鉴定。然而，本领域技术人员知道，粉末 X-射线衍射的峰强度和/或峰情况可能会因为实验条件的不同而不同，如不同的衍射测试条件和/或取向优先等。同时由于不同仪器的精准度不同，测得的 2 θ 值会有约 $\pm 0.2^\circ$ 的误差。然而，已知的是峰的相对强度值比峰的位置更依赖于所测定样品的某些性质，例如样品中晶体的尺寸、结晶的取向作用和被分析的材料纯度，因此所显示的峰强度偏差在约 $\pm 20\%$ 或更大范围是可能出现的。但是，尽管存在试验误差、仪器误差和取向优先等，本领域技术人员还可以从本专利提供的 XRD 数据获取足够的鉴别晶型的信息。

25 本发明中，“具有约如图 1 所示的 X-射线粉末衍射图”或“具有约如图 2 所示的 X-射线粉末衍射图”，是指 X-射线粉末衍射图示出的主要的峰如图 1 或图 2 所示，其中主要的峰是指与图 1 或图 2 中最高的峰（其相对强度指定为 100%）相比，相对强度数值超过 10%，优选超过 30%的那些峰。

30 本发明中，晶型的制备方法中涉及的“加入甲醇/丙酮”等，是指在该制备方法中，先加入甲醇，再加入丙酮。类似地，“乙醇/水”是指先加入乙醇，再加入水；而“三氟乙醇/乙酸乙酯”，是指先加入三氟乙醇，再加入乙酸乙酯。同理，类似地如“溶剂 1/溶剂 2”是指先加入溶剂 1，再加入溶剂 2；而“溶剂 2/溶剂 1”是指先加入溶剂 2，再加入溶剂 1。

本发明中，术语“治疗有效量”是指一个化合物/晶型施用于治疗对象时对于治疗一种疾病、或一种疾病或病症的至少一种临床症状时，足以影响对疾病、病症或症状的这种治疗的量。“治疗有效量”可以随着化合物，疾病、病症和/或疾病或病症的症状，疾病、病症和/或疾病或病症的症状的严重程度，被治疗的患者的年龄，和/或被治疗的患者的体重等变化。在任意特定的情况下，一个合适的量对那些本领域的技术人员可以是显而易见的，也可以是用常规实验确定的。在联合治疗的情况下，“治疗有效量”是指有效治疗疾病、病症或病状的联用对象的总量。

本发明的药物组合物的所有剂型都可以通过药学领域的常规方法制备。例如，将活性成分与一种或多种辅料混合，然后制成所需的剂型。

“药学上可接受的载体”是指适合于期望药物制剂的常规的药用载体，例如：诸如水、各种有机溶剂等的稀释剂、赋形剂；诸如淀粉、蔗糖等的填充剂；诸如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮（PVP）的黏合剂；诸如甘油的湿润剂；诸如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠的崩解剂；诸如季铵化合物的吸收促进剂；诸如十六烷醇的表面活性剂；诸如高岭土和膨润土的吸收载体；诸如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁和聚乙二醇等的润滑剂。另外还可以在药物组合中加入其它药学上可接受的辅料，如分散剂、稳定剂、增稠剂、络合剂、缓冲剂、渗透促进剂、聚合物、芳香剂、甜味剂和染料。优选使用适合期望剂型和期望给药方式的辅料。

术语“疾病”、“病症”或“病状”是指任意的疾病、不适、病、症状或者适应症。

附图说明

图 1：化合物 II 晶型 A（小试样品，批号：1072P04-A14S01）的 XRD 图谱。

图 2：化合物 II 晶型 B 的 XRD 图谱。

图 3：化合物 II 晶型 C 的 XRD 图谱。

图 4：化合物 II 无定形物的 XRD 图谱。

图 5：化合物 III 晶型 D 的 XRD 图谱。

图 6：化合物 III 晶型 E 的 XRD 图谱。

图 7：化合物 III 晶型 F 的 XRD 图谱。

图 8：化合物 III 晶型 G 的 XRD 图谱。

图 9：化合物 III 无定形物的 XRD 图谱。

图 10：化合物 II 晶型 A（小试样品，批号：1072P04-A14S01）不同稳定性条件下的 XRD 对比图谱。由下往上，线条①至线条④分别代表的含义如下：

- ① 化合物 II 晶型 A 在 0 天进行 XRD 测试所得 XRD 图谱；
② 化合物 II 晶型 A 在温度为 25℃，湿度为 60%条件下放置 10 天后进行 XRD 测试所得 XRD 图谱；
③ 化合物 II 晶型 A 在温度为 40℃，湿度为 75%条件下放置 10 天后进行 XRD 测试所得 XRD 图谱；
④ 化合物 II 晶型 A 在温度为 80℃，干燥条件下放置 24 小时后进行 XRD 测试所得 XRD 图谱。

图 11: 化合物 II 晶型 A 的 DSC 图谱。横坐标 (X-轴) 表示温度, 单位: °C; 纵坐标 (Y-轴) 表示热流, 单位: 瓦/克。

图 12: 化合物 II 晶型 A (中试样品, 批号: 20170903) 的 XRD 图谱。

以上附图 1-附图 10 及附图 12 中, 横坐标 (X-轴) 均表示衍射角 2θ , 单位为 “°”; 纵坐标 (Y-轴) 均表示衍射强度, 单位为 “计数”。

具体实施方式

下面通过给出的实施例对本发明作出进一步说明, 但所述实施例并不对本发明要求保护的构成任何限制。在本发明的具体实施例中, 除非特别说明, 所述技术或方法为本领域的常规技术或方法等。

缩略语:

Cbz-Cl: 氯甲酸苄酯;

DCM: 二氯甲烷;

DMF: N, N-二甲基甲酰胺;

DMSO: 二甲基亚砷;

DSC: 差式扫描量热法;

DVS: 动态蒸汽吸附;

EtOH: 乙醇;

EtOAc: 乙酸乙酯;

KOAc: 醋酸钾;

KO-t-Bu: 叔丁醇钾;

MeOH: 甲醇;

P(Cy)₃: 三环己基磷;

Pd(OAc)₂: 乙酸钯;

Pd(dppf)Cl_2 : [1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯;

RT: 室温;

RH: 相对湿度;

TGA: 热解重量分析;

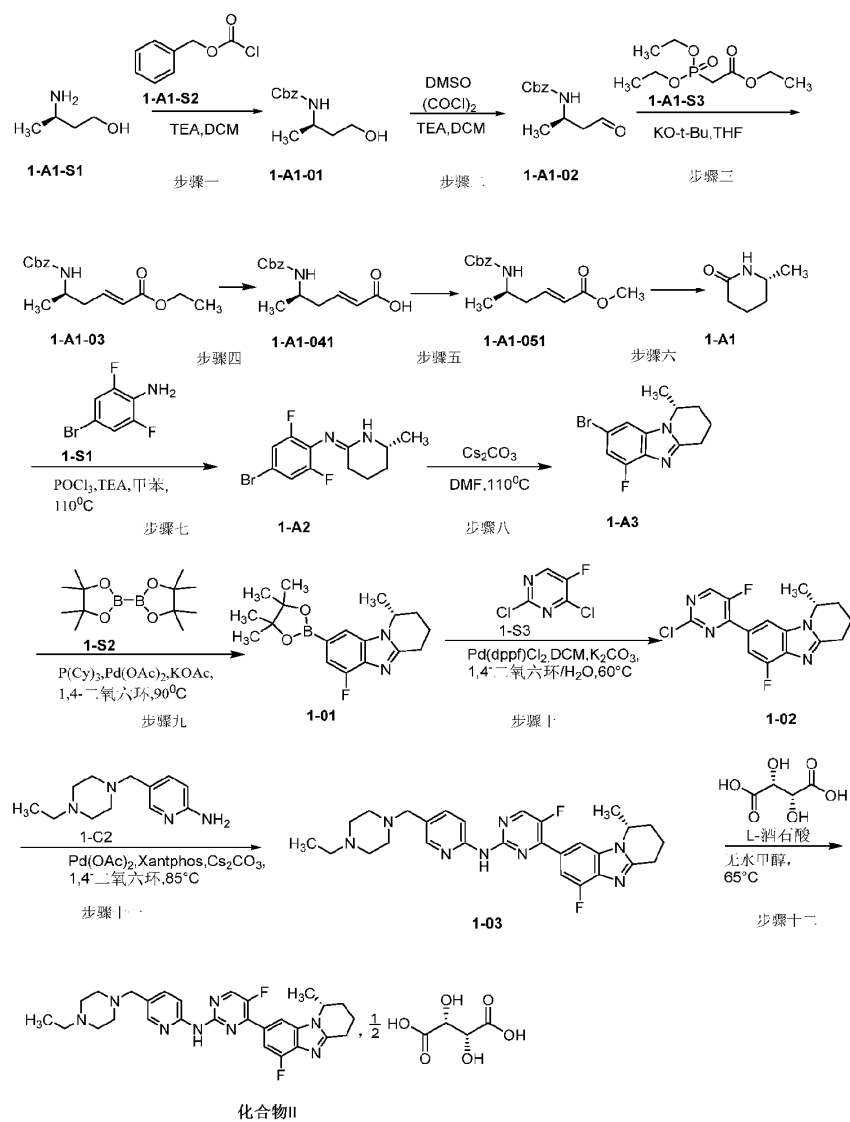
5 TEA: 三乙醇胺;

THF: 四氢呋喃;

Xantphos: 4,5-双(二苯基膦)-9,9-二甲基氧杂蒽;

XRD: X-射线粉末衍射图。

实施例 1 化合物 II 晶型 A 的合成



1-A1-01 的合成（步骤一）

在 50L 反应釜中加入 20L 二氯甲烷（DCM）、1-A1-S1（300g）、三乙胺（390g），搅拌状态下，降温至-5℃以下，滴加氯甲酸苄酯/Cbz-Cl（570g），5 小时滴加完毕，自然升至室温，TLC（乙酸乙酯：正己烷=1:3）监控至反应结束。加入水（1.5L），缓慢滴加浓盐酸（80mL），控制 pH 为 1-2，静置分液，有机相用 15L 水洗，无水硫酸钠干燥 0.5 小时后，过滤除去干燥剂，收集滤液并浓缩，得到 730g 淡黄色油状液体，即为 1-A1-01 粗品，收率 95.4%

1-A1-02 的合成（步骤二）

在 20L 反应瓶中加入 720mL 的 DCM，N,N-二甲基亚砜（90g），氮气保护，搅拌状态下，降温-65℃以下，滴加草酰氯（106g），2 小时滴加完毕，保温搅拌 20 分钟；滴加 1-A1-01 的二氯甲烷溶液（143g/500mL DCM），40 分钟滴加完毕，保温反应 15 分钟。控制在该温度下，滴加 TEA，2 小时滴加完毕后，自然升温至-20℃，体系加入 250L 水，用盐酸调节体系 pH 至 1-2，静置、分液，有机相用水（1L×2）洗涤、无水硫酸钠干燥，过滤除去干燥剂，收集滤液并浓缩，得到 432g 黄色油状液体，即为产品 1-A1-02 的粗品，直接用于下一步反应。

1-A1-03 的合成（步骤三）

搅拌状态下，依次将 400mL 四氢呋喃（THF）、叔丁醇钾（215g）加入 1L 反应釜中，降温至 5-15℃，滴加磷酰基乙酸三乙酯（430g），50 分钟滴加完毕。控制温度在 15℃下，滴加 1-A1-02 的四氢呋喃溶液（431g/100mL THF），1 小时滴加完毕，TLC（乙酸乙酯：正己烷=1:3）监测至反应完全，体系加入饱和氯化钠水溶液（1.5L），静置、分液，收集四氢呋喃相；水相再用二氯甲烷（2L）萃取，合并有机相后用无水硫酸钠干燥 0.5 小时，过滤除去干燥剂，收集滤液并浓缩，浓缩物经柱层析纯化后得 390g 淡黄色油状液体，即为 1-A1-03 产品。

1-A1-041 的合成（步骤四）

在 5L 反应釜中，将氢氧化钠的水溶液（301g/1.5L 水）加至 1-A1-03 的四氢呋喃（601g/2.3L THF）溶液中，加热回流，反应 3-4 小时，停止反应。温度降至 40-50℃，静置分层，收集有机相（THF）后浓缩至出现大量固体；固体加入水（20L）溶解，水相依次用甲基叔丁基醚（2L），乙酸乙酯（2L），甲基叔丁基醚（2L）洗涤；水相用浓盐酸调 pH 至 1-2，用乙酸乙酯（1.5L、3L）萃取两次，合并有机相，用无水硫酸钠干燥 0.5 小时；过滤除去干燥剂，收集滤液并浓缩至出现大量固体，固体加入异丙醚（3L）打浆 2

小时，过滤，收集固体，固体用异丙醚（1L）淋洗。固体在 50℃下鼓风干燥 3-4 小时，得 331g 浅黄色固体，即为 1-A1-041 产品，收率 52.7%。

1-051 的合成（步骤五）

搅拌状态下，依次将 1-A1-041（600g）、甲醇（25L）、浓硫酸加入 50L 反应釜中，
5 加热回流反应 3-4 小时，反应完毕，降至室温；体系浓缩至无溶剂旋出，浓缩物加二氯甲烷（15L），用碳酸钾水溶液调节 pH=9-10，搅拌、静置、分液，收集有机相，并用无水硫酸钠干燥 0.5 小时，过滤除去干燥剂，收集滤液并浓缩，得 6.37kg 类白色固体，即为 1-A1-051 产品，收率 97.3%。

1-A1 的合成（步骤六）

10 在 2L 加氢釜中，分别加入 1-A1-051（500g）、甲醇（1.8L）、钨碳，体系依次置换 3 次氮气和 3 次氢气；体系保持氢气氛围，升温至 85℃、压力 3.0Mpa 下反应 3 小时，反应完毕。降至室温，过滤除去钨碳，收集有机相，并浓缩至有大量浅黄色固体出现，加入异丙醚（3L）冷冻（-20℃）析晶 1 小时，过滤收集固体产物，固体用异丙醚（500mL）淋洗，得到 234g 浅黄色固体，即为 1-A1 产品，收率 90.5%。

15 1-A2 的合成（步骤七）

搅拌状态下，依次将 1-A1（200g）、4-溴-2,6-二氟苯胺（410g）、甲苯（1.2L）加入 50L 反应釜中，体系滴加三氯氧磷（413g），1 小时滴加完毕。冰浴下，滴加三乙胺，1 小时滴加完毕。升温至 110℃，反应 1 小时。将体系降温至 2-10℃，加入 1L 水，并用饱和碳酸钾水溶液调 pH=9-10，用乙酸乙酯（1.5L、1L）萃取两次，合并有机相后用 2L 饱和氯化钠水溶液洗涤，无水硫酸钠干燥 0.5 小时，过滤除去干燥剂，收集滤液并浓缩至出现固体产物，固体加入异丙醚（1L）打浆 10 分钟，过滤，收集黄色固体 460g，为 1-A2 产品。

1-A3 的合成（步骤八）

25 搅拌状态下，依次将 1-A2（450g）、N,N-二甲基甲酰胺（2L）、碳酸铯（700g）加入反应釜中，加热至 110℃保温反应 24 小时，TLC 检测至反应完全，体系加入乙酸乙酯（3L），过滤除去固体杂质，滤液用饱和氯化钠水溶液（1L×5）洗涤，有机相用无水硫酸钠干燥 0.5 小时，浓缩至出现大量固体，用甲基叔丁基醚（1L×2）打浆 30 分钟，过滤得到淡黄色固体产物 382g，即为 1-A3，收率 90.10%。

1-01 的合成（步骤九）

搅拌状态下,依次将 1-A3 (380g)、联硼酸频那醇酯 (400g)、醋酸钾 (340g)、醋酸钯 (6g)、三环己基磷 (7g)、1,4-二氧六环加入到反应釜中,氮气保护,升温至 90℃ 反应 2 小时。TLC 监控至反应完全。降至室温,过滤,滤液浓缩至除去大量 1,4-二氧六环,浓缩物经正己烷和二氯甲烷柱层析纯化、正己烷 (1.2L) 打浆 1 小时,得 334g 的灰色固体,即为 1-01,收率 70.10%。

1-02 的合成 (步骤十)

搅拌状态下,取 1-01 (128g)、1,4-二氧六环 (1L)、1-S3 (85g)、碳酸钾 (110g)、纯化水依次加入到 2L 三口瓶中,氮气保护,加入 [1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷络合物 (Pd(dppf)Cl₂.DCM)。加热升温至 60℃。反应 4 小时后,反应完全。将反应液冷却至室温,减压浓缩至除去大部分 1,4-二氧六环,加入二氯甲烷 (1.5L) 和纯化水 (1.1L),搅拌,静置分层,分液,水相用二氯甲烷 (10L) 萃取,合并有机相,用 0.5% 的稀盐酸洗涤 (1L×2),饱和氯化钠水溶液 (1L) 洗涤,分液。有机相用无水硫酸钠 (500g) 干燥,过滤除去干燥剂,滤液减压浓缩。浓缩物加入乙酸乙酯 (0.5L) 搅拌 30 分钟析出固体,过滤后,所得固体用乙酸乙酯 (0.5L) 淋洗,45℃ 真空干燥 3 小时,得黄色固体 120g。

1-03 的合成 (步骤十一)

搅拌状态下,取 1-02 (100g)、1,4-二氧六环 (1L)、1-C2 (80g)、碳酸铯 (163g) 依次加入 2L 三口瓶中,氮气保护,加入醋酸钯 (2g) 和 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 (Xantphos) (4g),加热至 85℃,直到反应完全。将反应液冷却至室温,过滤得固体产物,固体用乙酸乙酯淋洗后,加入至二氯甲烷 (1.5L) 和纯化水 (1.1L) 的混合体系中,搅拌,静置,分层。水相用二氯甲烷 (700mL) 萃取。合并有机相,用纯化水 (700mL×2) 洗涤。有机相加入无水硫酸钠 (700g) 干燥,过滤除去干燥剂,滤液浓缩,加入甲醇 (0.5L),加热至 55~65℃ 搅拌 0.5 小时,降至室温,过滤。过滤得固体产物,用乙酸乙酯 500mL 淋洗。固体在 45℃ 真空下干燥 8 小时,得淡黄色固体 1-03 共 111.79 g。

25 化合物 II 的合成 (步骤十二)

搅拌状态下,取 1-03 (500g)、无水甲醇 (3.8L),依次加入到 10L 反应釜中,加热至 65℃,待反应体系澄清 0.5 小时后滴加 L-酒石酸的甲醇溶液 (150.89g 酒石酸溶于 500mL 无水甲醇),控制滴加时间在 45 至 60 分钟,滴加完毕,65℃ 保温反应 4 小时,继续滴加 L-酒石酸的甲醇溶液 (35.58g 酒石酸溶于 250mL 无水甲醇),控制滴加时间在 30 至 45 分钟,滴加完毕,65℃ 保温反应 1 小时,继续滴加 L-酒石酸的甲醇溶液 (36.55g

酒石酸溶于 250mL 无水甲醇)，控制滴加时间在 30 至 45 分钟，滴加完毕，65℃保温反应 1.5 小时，停止加热，自然降温至 20-30℃，过滤，滤饼用甲醇（400mL×2）淋洗，45℃真空干燥 36 小时，得淡黄色结晶性粉末 530.64g，即为化合物 II，通过 X 射线粉末衍射进行鉴定，显示该晶型为化合物 II 的晶型 A。

5 实施例 2 XRD 分析结果

按实施例 1 的合成方法分别制备得到化合物 II 的小试样品（批号：1072P04-A14S01）和化合物 II 的中试样品（批号：20170903），然后采用 XRD 对其分别进行表征。

本发明的一个具体方案中，小试样品（批号：1072P04-A14S01）由杭州领业医药科技有限公司使用 Bruker D8 Advance Diffractometer 进行了 XRD 分析，使用的仪器和检测参数

10 见表 1，XRD 谱图解析数据见表 2。

表 1 小试样品 XRD 分析仪器和检测方法参数

设备名称	X-射线粉末衍射仪（XRD）&热台 XRD	
仪器	Bruker D8 Advance 衍射仪	
技术指标	铜靶波长为 1.54Å 的 Kα 射线（40kV, 40mA），θ-2θ 测角仪，Mo 单色仪，Lynxeye 探测器	
校准物质	Al ₂ O ₃	
采集软件	Diffrac Plus XRD Commander	
分析软件	MDI Jade 6	
方法参数	无反射样品板规格	24.6mm 直径×1.0mm 厚度
	变温热台样品板	铜板
	检测角度	3~40 度
	步长	0.02 度/步
	速度	0.2 秒/步

表 2 小试样品 XRD 谱图解析数据

峰#	2θ (°)	强度 (1%)
1	4.4	100.0
2	8.8	19.3
3	10.9	24.3
4	16.0	25.1
5	18.5	25.4
6	23.7	32.0
7	27.0	44.5

在另一具体实施方案中，中试样品（批号：20170903）由北京市理化分析测试中心使用 D8-Advance 型 X 射线衍射仪进行了 XRD 分析，参考的方法为 JY/T 009-1996《转靶多晶体 X 射线衍射方法通则》。使用的仪器和检测参数见表 3，XRD 谱图解析数据见表 4。

15

表 3 中试样品 XRD 分析仪器和检测方法参数

仪器	D8-Advance 型 X 射线衍射仪
技术指标	铜靶波长：1.5406nm 工作电压：40kV 工作电流：40mA

实验条件	2 θ 扫描范围	3~40 度
	步长	0.02 度/步
	停留时间	0.1 秒/步

表 4 中试样品 XRD 谱图解析数据

峰#	2 θ (°)	强度 (I%)
1	4.4	100.0
2	8.7	20.9
3	10.8	19.8
4	15.9	14.0
5	18.4	17.5
6	23.6	22.6
7	26.9	34.6

- 本领域技术人员可以理解，XRD 谱图的获取过程中，为减少误差可以将相关数据经过适当科学处理，如基线校正处理等。本领域技术人员也可以理解，在不同实验室条件下操作，所得 XRD 谱图的 2 θ 角或分离度等会存在少许差异。应当理解，本发明提供的化合物 II 晶型 A 的 XRD 谱图不限于图 1 或图 12 所示的 X 射线粉末衍射图谱，与图 1 或图 12 所示基本相同的 X 射线粉末衍射图的晶体都落在本发明的范围内。

实施例 3 晶型稳定性的测定

- 本发明的 X-射线粉末衍射图谱检测设备和方法如表 1 所示。将化合物 II 晶型 A、化合物 III 晶型 D 和化合物 III 晶型 F 样品在 80℃ 干燥放置 24 小时、25℃，60%RH 放置 10 天、40℃，75%RH 放置 10 天，检测 XRD 谱图见图 10，结果见表 5。

表 5 化合物 II 不同晶型稳定性测试结果

化合物晶型	80℃干燥放置 24h	25℃,60%RH 放置 10 天	40℃,75%RH 放置 10 天
化合物 II 晶型 A	XRD 不变	XRD 不变	XRD 不变
化合物 III 晶型 D	XRD 不变	XRD 改变	XRD 改变
化合物 III 晶型 F	XRD 改变	XRD 改变	XRD 改变

- 化合物 II 晶型 A 在不同稳定性条件下的 XRD 对比如附图 10 所示，由图可见，化合物 II 晶型 A 样品在 80℃ 干燥放置 24 小时、25℃，60%RH 放置 10 天、40℃，75%RH 放置 10 天，晶型均不变，化合物 II 晶型 A 稳定性良好。
- 此外，化合物 II 晶型 B 为亚稳晶型，晶态较差且升温至 180℃ 会转晶为晶型 A。

实施例 4 晶型长期稳定性测定

将化合物 I 和化合物 II 晶型 A 样品分别在温度 25℃ $\pm$ 2℃，相对湿度 60% $\pm$ 10%条件下放置 18 个月，并分别于 0 个月、3 个月和 18 个月时取样进行 HPLC 测定，检测结果见表 6。

表 6 化合物 I 和化合物 II 晶型 A 在 0 月、3 月和 18 月的 HPLC 检测结果

检测项	时间	待测样品	
		化合物 I	化合物 II 晶型 A
最大单杂含量 (%)	0 月	0.04%	0.05%
	3 月	0.10%	0.05%
	18 月	0.22%	0.06%
总杂质含量 (%)	0 月	0.11%	0.10%
	3 月	0.17%	0.13%
	18 月	1.0%	0.21%
含量>0.1% 未知杂质个数 (个)	0 月	0	0
	3 月	0	0
	18 月	4	0

由表 6 数据可知，在 18 个月后化合物 I 的最大单杂含量和总杂含量均为化合物 II 晶型 A 的 3 倍以上，化合物 II 晶型 A 在放置 18 个月后未产生含量大于 0.1% 的杂质，而化合物 I 产生 4 个含量大于 0.1% 的杂质。相较于化合物 I，化合物 II 晶型 A 的稳定性具有
5 显著提升。

实施例 5 动态水分吸附 (DVS) 测定

本发明的动态水分吸附仪检测设备和方法如表 7 所示，动态水分吸附测定结果如表 8 所示。

表 7 动态水分吸附仪检测设备和方法数据

设备名称	动态水分吸附仪 (DVS)	
仪器	TA Instruments Q5000TGA	
控制软件	Thermal Advantage	
分析软件	Universal Analysis	
样品盘	铂金坩埚	
样品检测量	1-10mg	
保护气体	氮气	
气体流速	10mL/min	
判断标准	不吸湿	不高于 0.2%
	轻微吸湿	高于 0.2%，但不高于 2.0%
	易吸湿	高于 2%，但不高于 15%
	极易吸湿	高于 15%

10

表 8 动态水分吸附测定结果

化合物晶型	0%RH 至 80%RH 范围内重量变化
化合物 II 晶型 A	5.3%
化合物 II 晶型 B	5.5%
化合物 III 晶型 D	17.2%
化合物 III 晶型 F	16.6%

化合物 II 晶型 A 和晶型 B: 0%RH 至 80%RH 范围内重量变化约为 5.3%和 5.5%，而化合物 III 晶型 D 和晶型 F: 0%RH 至 80%RH 范围内重量变化约为 17.2%和 16.6%。由此

可见，相比化合物 III 晶型而言，化合物 II 晶型的吸湿性较弱，更加适合于固体制剂的制备。

实施例 6 溶解度测定

对化合物 II 晶型 A、化合物 III 晶型 D 和化合物 I 进行了溶解度测试，室温时在水中溶解度结果见表 9。由此可见，化合物 II 不同晶型对其溶解性改善程度不同，化合物 II 晶型 A 表现出优异的溶解性能。

表 9 化合物 II 不同晶型溶解度测定结果

化合物晶型	室温时在水中的溶解度	溶解度分类
化合物 II 晶型 A	100-200mg/mL	易溶
化合物 III 晶型 D	50-100mg/mL	溶解
化合物 I	< 1mg/mL	极微溶

注：溶解度分类标准遵循《2015 年版中国药典》四部凡例中相关规定。

实施例 7 药代动力学测试

SD 大鼠 12 只，分为两组，每组 6 只，雌雄各半，分别单次灌胃 30mg/kg 给药化合物 II 晶型 A 和化合物 I；分别在指定的时间点通过眼底静脉丛采血，分离血浆，放入 -80℃ 冰箱保存。

上述血浆样品，乙腈沉淀蛋白，取上清用水稀释 3 倍，取 5μL 至 LC-MS/MS 检测，试验数据如表 10 所示：

表 10 药代动力学测试结果

化合物	给药方式	剂量 (mg/kg)	AUC _{last} (h*ng/mL)
化合物 I	PO	30	27670
化合物 II 的晶型 A	PO	30	47032

由以上结果提示，相较于化合物 I，化合物 II 的晶型 A 在体内吸收更好。

实施例 8 化合物 I 的 CDK4/6 抑制活性测定

为了证明化合物对 CDK 激酶 (CDK4 / CycD3, CDK6 / cycD3) 表现出亲和力，进行 CDK 激酶的测定。

反应缓冲液制备如下: CDK6 的激酶碱缓冲液 (50mM HEPES, pH7.5; 0.0015 % Brij-35; 10mM MgCl₂; 2mM DTT); CDK4 的激酶碱基缓冲液 (20mM HEPES, pH7.5; 0.01 % Triton X-100; 10mM MgCl₂; 2mM DTT); 停止缓冲液 (100mM HEPES, pH7.5; 0.015 % Brij-35; 0.2 % 涂层试剂 # 3; 50mM EDTA)

酶反应方案:

1) 采用 100 % DMSO 将化合物稀释到反应最终所需的最高浓度的 50 倍。将 100μL

该化合物的稀释液转移至 96 孔板的孔中。然后，在下一个孔中，按 30μL 的上述稀释液用 60μL 的 100%DMSO 稀释的比例依次稀释化合物共 10 个浓度。在相同的 96 孔板上，将 100μL 100 % DMSO 溶液加入到两个空孔中，作为无化合物对照和无酶对照。这张板记为源板。

5 2) 分别将 10μL 各浓度化合物从源板中转移到包含 90μL 激酶缓冲液的新的 96 孔板中以制备中间板。

3) 从 96 孔板的中间板中对应孔转移 5μL 化合物溶液到对应的 384 孔板中。

4) 将 10μL 2.5×酶溶液加入到 384 孔实验板的每个孔中。

5) 室温孵育 10 分钟。

10 6) 加入 10μl 2.5×底物溶液，该底物溶液通过在激酶基缓冲液中加入荧光素标记肽和 ATP 制备。酶和底物的反应浓度如下表所示（表 11）：

表 11 酶和底物的反应浓度

酶	酶 (nM)	ATP (μM)	肽	肽浓度 (μM)
CDK4	10	280	P8	3
CDK6	15	800	P8	3

7) 在 28℃孵育特定的时间

8) 加入 25μL 终止缓冲液终止反应。

15 9) 收集 Caliper 上的数据。然后将转换值转换为抑制值。

抑制率 = (最大值-转换值) / (最大值-最小值) *100

“最大值”为 DMSO 对照值；“最小值”为无激酶对照孔值。

10) 使用 XLFit 优化版本 4.3.1 中的百分比抑制曲线拟合来获得 IC₅₀ 值。方程是：Y=底 + (高-底) / (1+ (IC₅₀/X) ^斜率)。

20 结果用 IC₅₀ 值表示，如表 12 所示。

表 12 CDK4/6 抑制活性测定结果

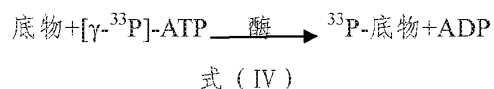
样品	IC ₅₀ (CDK4) /nM	IC ₅₀ (CDK6) /nM
LY2835219	2	22
化合物 I	1.9	22

实施例 9 在分子水平对 CDK 激酶其他亚型的抑制活性以及选择性试验

以化合物 I 为受试化合物，并与阳性对照药 LY2835219 (Abemaciclib) 比较两者在分子水平对 CDK 激酶的抑制活性以及选择特异性的高低。

25 本方法的作用机制如式 (IV) 所示，激酶催化蛋白质底物磷酸化，使反应体系中放射性同位素 ³³P 标记的 ATP (γ-³³P-ATP) 上的 ³³P 标记到蛋白质底物上，将反应体系点在 P81

离子交换滤膜上，用 0.75% 磷酸缓冲液充分洗涤滤膜，则有放射活性的磷酸化底物留在滤膜上，通过记录底物蛋白质放射性标记的强度反映激酶的活性。



5 用 Prism4 Software (GraphPad) 处理数据, 曲线拟合公式为:

$$Y = \text{最小抑制率} + (\text{最大抑制率} - \text{最小抑制率}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{斜率}))};$$

其中, Y 表示抑制百分数 (%); X 表示待测化合物浓度的对数。

结果:通过对多种 CDK 激酶的筛选,发现化合物 I 抑制 CDK1/2/7/9 的 IC_{50} 大于 $0.4\mu M$, 是 CDK4/6 的几十甚至上千倍 (见表 13)。

10 表 13 CDK 激酶抑制活性

激酶	IC ₅₀ (nM)	
	LY2835219	化合物 2b
CDK1/cyclin B	308	1683
CDK2/cyclin E	90	441
CDK7/cyclin H	2071	664
CDK9/cyclin T1	111	649

结论: 在分子水平上, 本发明化合物 I 对 CDK4/6 表现出很强的抑制作用, 对 CDK1/2/7/9 抑制作用极弱, 表明化合物 I 是一个具有极优选择性的 CDK4/6 激酶抑制剂。此外, 化合物 I 在 CDK1/2/9 和 CDK4/6 之间的选择性均明显高于 LY2835219 (Abemaciclib)。

实施例 10 JeKo-1 异种移植瘤动物模型的肿瘤抑制实验

15 JeKo-1 细胞培养在含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中。收集指数生长期的 JeKo-1 细胞, PBS 重悬至适合浓度用于 NOD/SCID 小鼠皮下肿瘤接种。70 只雌性小鼠右侧皮下接种 5×10^6 个 JeKo-1 细胞, 细胞重悬在 PBS 和 matrigel (1:1) 中。待肿瘤平均体积 134mm^3 时, 根据肿瘤大小随机分组开始给药。其中 48 只分入实验组内, 其余 22 只为分组剩余小鼠。肿瘤体积计算公式为: 长径 $\times$ 短径 $^2/2$ 。实验分为溶剂对照组、测试药代表性化合物

20 I (10mg/kg)、测试药代表性化合物 I (25mg/kg)、测试药代表性化合物 I (50 mg/kg)、测试药代表性化合物 I (100mg/kg), 共 6 组, 每组 8 只小鼠, 均为口服灌胃给药, 分组后每天给药一次, 连续给药 19 天。根据相对肿瘤增长抑制率 TGI 进行疗效评价, 结果见表 14。

计算公式如下: $TGI(\%) = (C - T) / C \times 100\%$ (C 和 T 分别为溶剂对照组平均肿瘤重量和治疗组平均肿瘤重量)。TGI (%) 值越大, 说明药效越好; 反之亦然。

25 结果: 化合物 I 显示出良好的抗肿瘤活性。

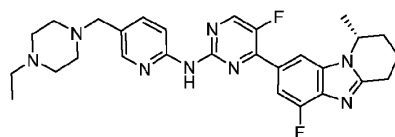
表 14 代表性化合物 I 对 JeKo-1 异种移植瘤模型的抑瘤药效评价

组别	剂量 (mg/kg)	相对肿瘤增长抑制率 TGI (%)	p 值 ^a
溶剂对照组	--	--	--
化合物 I	10	42.7	0.087
化合物 I	25	73.8	0.003
化合物 I	50	98.3	0.001
化合物 I	100	104.5	0.001

注: a: p 值为治疗组与溶剂对照组肿瘤体积的比较分析。

权利要求书

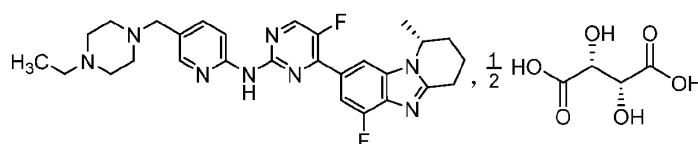
1. 一种结构式 I 所示化合物的盐型或所述盐型的晶型:



结构式 I。

2. 权利要求 1 所述的盐型或所述盐型的晶型, 其特征在于, 所述盐型为酒石酸盐, 并且所述酒石酸盐为 L-酒石酸盐。

3. 权利要求 2 所述的盐型或所述盐型的晶型, 其特征在于, 所述酒石酸盐具有如结构式 II 所示结构:



结构式 II。

4. 一种结构式 II 所示化合物的晶型。

5. 权利要求 4 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型的 X 射线粉末衍射谱图具有衍射角 2θ 为 $4.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.6 \pm 0.2^\circ$ 和 $26.9 \pm 0.2^\circ$ 的特征峰。

6. 权利要求 5 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型的 X 射线粉末衍射谱图具有衍射角 2θ 为 $4.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.6 \pm 0.2^\circ$ 和 $26.9 \pm 0.2^\circ$ 的特征峰。

7. 权利要求 6 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型的 X 射线粉末衍射谱图具有衍射角 2θ 为 $4.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $8.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $10.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $23.6 \pm 0.2^\circ$ 和 $26.9 \pm 0.2^\circ$ 的特征峰。

8. 权利要求 4 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型具有约如图 1 所示的 X-射线粉末衍射图。

9. 权利要求 4 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型具有约如图 12 所示的 X-射线粉末衍射图。

10. 权利要求 4 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型通过如下方法制备得到:

- 1) 将(R)-N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(6-氟-1-甲基-1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-8-基)嘧啶-2-胺(化合物 I)混悬于水和/或水溶性有机溶剂中, 得到混悬物;

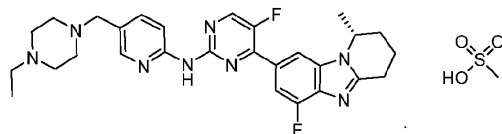
- 2) 将上述混悬物加热至 50℃ 以上;
- 3) 在保持 50℃ 以上的温度条件下, 在上述混悬物中加入 L-酒石酸, 进行酸化处理, 得到澄清溶液;
- 4) 降至室温后, 搅拌过滤, 滤饼经干燥后得到权利要求 4 所述的晶型。

5 11. 权利要求 4-10 任一项所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型通过如下方法制备得到:

50-70℃ 条件下将化合物 I 在甲醇中形成清液, 将 L-酒石酸溶解在甲醇中, 将 L-酒石酸的甲醇溶液滴加至化合物 I 的甲醇溶液中, 搅拌后过滤, 滤饼置于 40-70℃ 干燥, 即得到权利要求 4-10 任一项所述的晶型。

10 12. 一种结构式 I 所示化合物的 L-酒石酸盐的晶型, 其特征在于, 所述晶型具有约如图 3 所示的 X-射线粉末衍射图。

13. 一种结构式 III 所示化合物或其晶型:



结构式 III。

14. 权利要求 13 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型通过如下方法制备得到:

15 1) 将(R)-N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(6-氟-1-甲基-1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-8-基)嘧啶-2-胺(化合物 I)混悬于水和/或水溶性有机溶剂中, 得到混悬物;

2) 将上述混悬物加热至 50℃ 以上;

20 3) 在保持 50℃ 以上的温度条件下, 在上述混悬物中加入甲磺酸, 进行酸化处理, 得到澄清溶液;

4) 降至室温后, 搅拌过滤, 滤饼经干燥后得到权利要求 13 所述的晶型。

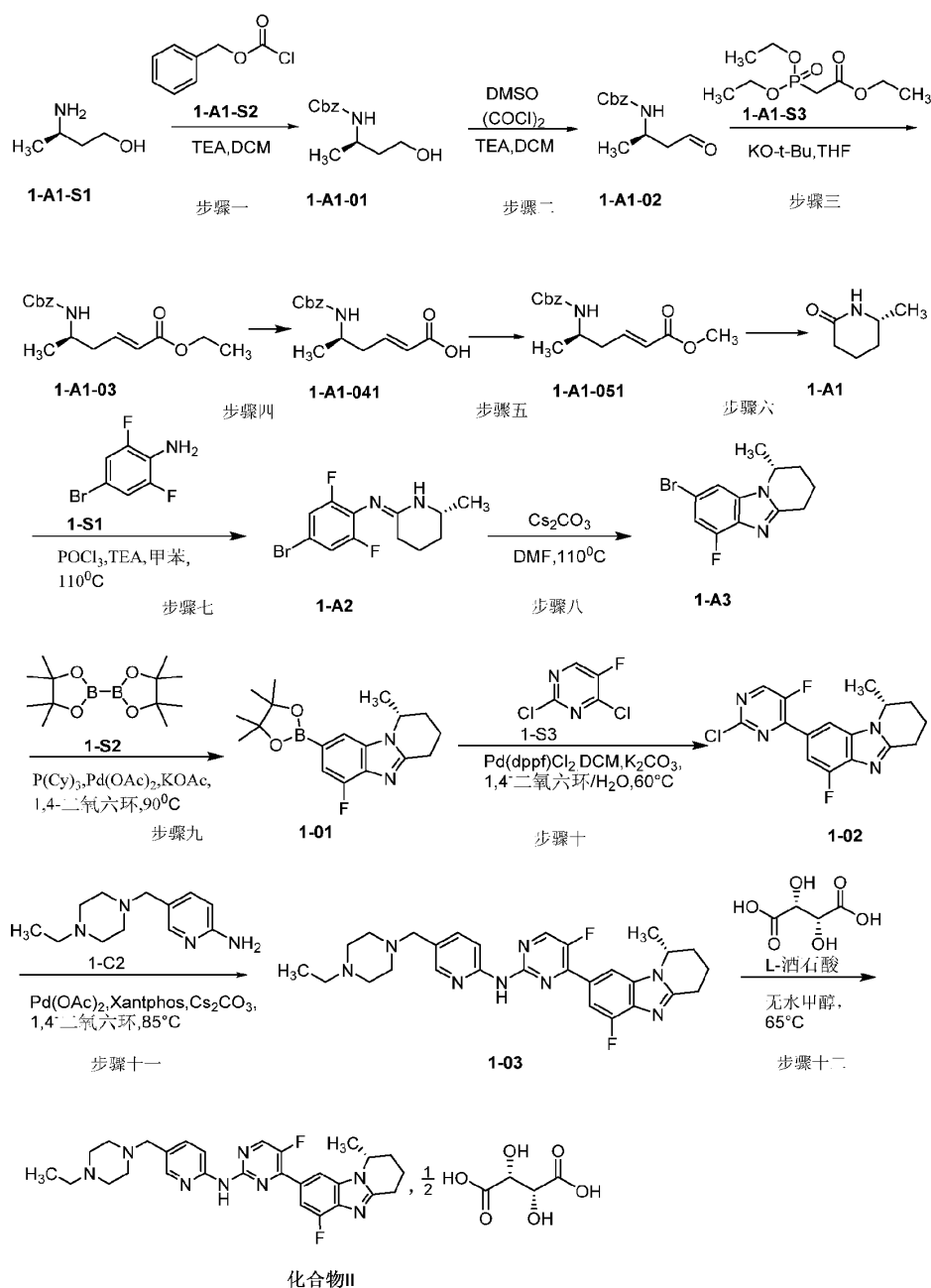
15. 权利要求 13 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型具有约如图 5 所示的 X-射线粉末衍射图。

25 16. 权利要求 13 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型具有约如图 6 所示的 X-射线粉末衍射图。

17. 权利要求 13 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型具有约如图 7 所示的 X-射线粉末衍射图。

18. 权利要求 13 所述的晶型, 其特征在于, 所述晶型具有约如图 8 所示的 X-射线粉末衍射图。

19. 一种(R)-N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(6-氟-1-甲基-1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡啶-8-基)嘧啶-2-胺的 L-酒石酸盐 (化合物 II) 的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:



20. 一种药物组合物, 其特征在于: 含有治疗有效量的权利要求 4-12 任一项所述的晶型, 和药学上可接受的辅料、辅助剂和/或载体。

21. 一种药物组合物，其特征在于：含有治疗有效量的权利要求 13-18 任一项所述的化合物和/或其晶型，和药学上可接受的辅料、辅助剂和/或载体。

22. 权利要求 1-18 任一项所述的盐型和/或晶型或权利要求 20-21 任一项所述的药物组合物在制备治疗患者的疾病、病症或病状的药物中的用途，其中所述疾病、病症或病状由
5 CDK 介导，如 CDK4 和/或 CDK6 介导。

23. 权利要求 22 所述的用途，其中所述疾病、病症或病状是癌症和/或增殖性疾病。

24. 权利要求 22 或 23 所述的用途，其中所述疾病、病症或病状是乳腺癌、肺癌、黑色素瘤、结肠癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、皮肤癌、骨癌、神经胶质瘤、淋巴瘤、成神经细胞瘤、肝细胞癌、乳头状肾细胞癌和/或头颈部鳞状细胞癌。

10 25. 一种治疗由 CDK 介导，如 CDK4 和/或 CDK6 介导的疾病的方法，其特征在于，向治疗对象施用包括权利要求 1-18 任一项所述的盐型和/或晶型或权利要求 20-21 任一项所述的药物组合物。

26. 权利要求 25 所述的方法，其中所述疾病是癌症和/或增殖性疾病。

27. 权利要求 25 或 26 所述的方法，其特征在于：所述疾病是乳腺癌、肺癌、黑色素
15 瘤、结肠癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、皮肤癌、骨癌、神经胶质瘤、淋巴瘤、成神经细胞瘤、肝细胞癌、乳头状肾细胞癌和/或头颈部鳞状细胞癌。

28. 根据权利要求 25-27 所述的方法，其特征在于，所述治疗对象为人类。