

嘧啶并杂环类化合物的晶型及其制备方法

本发明主张如下优先权：

CN202111062619.1，申请日：2021 年 09 月 10 日；

CN202211034826.0，申请日：2022 年 08 月 26 日。

技术领域

本发明涉及一类嘧啶并杂环类化合物的晶型及其制备方法，具体涉及式 (II) 所示化合物及其晶型的制备方法和应用。

背景技术

RAS 癌基因突变是人类癌症中最常见的激活突变，发生在 30% 的人类肿瘤中。RAS 基因家族包括三个亚型 (KRAS、HRAS 和 NRAS)，其中 85% 的 RAS 驱动的癌症是由 KRAS 亚型突变引起的。KRAS 突变常见于实体肿瘤中，如：肺腺癌、胰腺导管癌和结直肠癌等。在 KRAS 突变肿瘤中，80% 的致癌突变发生在密码子 12 上，最常见的突变包括：p.G12D (41%)、p.G12V (28%) 和 p.G12C (14%)。

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 在细胞生长的信号调控中起着枢纽的作用，上游的 EGFR(ErbB1)、HER2(ErbB2)、ErbB3 和 ErbB4 等细胞表面受体，在接受了外界信号之后，会通过 RAS 蛋白，把信号传递到下游。KRAS 蛋白没有被激活的时候，与 GDP (鸟嘌呤核苷酸二磷酸) 紧密结合。在被 SOS1 等鸟嘌呤核苷酸交换因子激活后，与 GTP (鸟嘌呤核苷酸三磷酸) 结合，变成激酶活性的状态。KRAS 基因突变后，可以不依赖于上游生长因子受体信号，独立向下游通路传输生长和增殖的信号，造成不受控制的细胞生长和肿瘤进展，同时 KRAS 基因是否有突变，也是肿瘤预后的一个重要指标。

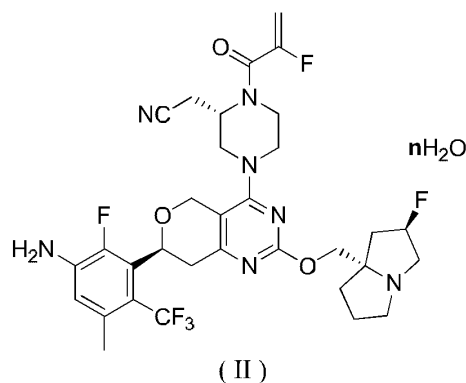
尽管 KRAS 是第一个被发现的癌基因，但长期以来被认为是不可成药靶点。直到 2019 年，Amgen 和 Mirati Therapeutics 先后公布了 KRAS 小分子抑制剂 AMG510 和 MRTX849 的临床研究结果，首次在临床上证实了 KRAS 抑制剂在临床上治疗肿瘤的有效性。AMG 510 和 MRTX849 都属于不可逆小分子抑制剂，通过与 KRAS G12C 突变蛋白的半胱氨酸残基形成不可逆共价键，从而抑制 KRAS 活性。

KRAS 在细胞生长的信号调控中起着枢纽的作用，上游的 EGFR(ErbB1)、HER2(ErbB2)、ErbB3 和 ErbB4 等细胞表面受体，在接受了外界信号之后，会通过 RAS 蛋白，把信号传递到下游。KRAS 蛋白在没有被激活的时候，是与 GDP (鸟嘌呤核苷酸二磷酸) 紧密结合的，在被 SOS1 等鸟嘌呤核苷酸交换因子激活后，转到与 GTP (鸟嘌呤核苷酸三磷酸) 结合，变成激酶活性的状态。KRAS 是 RAS 蛋白中的重要一员，KRAS 基因突变后，可以不依赖于上游生长因子受体信号，独立向下游通路传输生长和增殖的信号，造成不受控制的细胞生长和肿瘤进展，同时 KRAS 基因是否有突变，也是肿瘤预后的一个重要指标。

统计结果显示，肺腺癌有 12-36% 病人 KRAS 突变驱动的；27-56% 结肠癌病人由 KRAS 驱动，此外 90% 的胰腺癌、21% 的子宫内膜癌和 12-36% 的肺腺癌等都是由 KRAS 驱动的，病人群体巨大；在 KRAS 的基因突变中，97% 是发生在第 12 位或者第 13 位的氨基酸残基发生了突变，其中 G12D, G12V 和 G13D 这三种突变，但是这三种突变的成药较差，KRAS(G12C) 突变：12 位的甘氨酸被半胱氨酸替换后为共价抑制剂的开发提供了一个很好的方向。

发明内容

本发明提供了式 (II) 化合物,



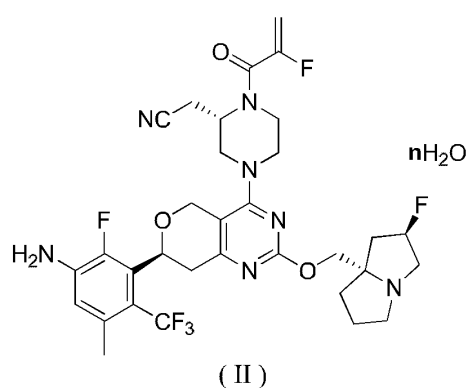
其中, n 选自 0~3。

在本发明的一些方案中, 所述 n 选自 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。

在本发明的一些方案中, 所述 n 选自 0.5、1、1.5、2、2.5 和 3。

在本发明的一些方案中, 所述 n 选自 2。

本发明还提供了式 (II) 化合物,



其中, n 选自 0~2。

在本发明的一些方案中, 所述 n 选自 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。

在本发明的一些方案中, 所述 n 选自 0.5、1、1.5 和 2。

在本发明的一些方案中, 所述 n 选自 2。

本发明还提供了式 (II) 化合物的 A 晶型, 其特征在于其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.514 \pm 0.200^\circ$ 、 $14.689 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.122 \pm 0.200^\circ$ 。

在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: $6.218 \pm 0.200^\circ$ 、 $8.514 \pm 0.200^\circ$ 、 $12.299 \pm 0.200^\circ$ 、 $14.689 \pm 0.200^\circ$ 、 $16.903 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.122 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.927 \pm 0.200^\circ$ 、 $25.580 \pm 0.200^\circ$ 。

在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：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°。

在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：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°、22.640±0.200°、25.580±0.200°、25.988±0.200°、27.147±0.200°、27.715±0.200°。

在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：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°。

在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：8.514±0.200°、14.689±0.200°，还可以在 6.218±0.200°，和/或 11.663±0.200°，和/或 12.299±0.200°，和/或 16.903±0.200°，和/或 18.122±0.200°，和/或 18.554±0.200°，和/或 18.927±0.200°，和/或 19.364±0.200°，和/或 20.386±0.200°，和/或 21.914±0.200°，和/或 22.64±0.200°，和/或 23.867±0.200°，和/或 24.553±0.200°，和/或 24.806±0.200°，和/或 25.58±0.200°，和/或 25.988±0.200°，和/或 27.147±0.200°，和/或 27.715±0.200°，和/或 29.135±0.200°，和/或 31.799±0.200°处有特征衍射峰。

在本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 A 晶型，其 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

编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)	强度	编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)	强度
1	6.218	14.20235	49.70%	1417.41	18	24.806	3.58629	6.50%	343.087
2	8.514	10.37753	53.00%	1500.55	19	25.580	3.47959	44.40%	1327.10
3	11.663	7.58177	27.40%	865.097	20	25.988	3.42591	11.80%	473.421
4	12.299	7.19077	36.40%	1111.73	21	27.147	3.28222	12.90%	486.080
5	12.888	6.86372	3.20%	251.582	22	27.715	3.21613	9.70%	395.792
6	14.689	6.02570	100.00%	2804.39	23	28.521	3.12708	4.30%	249.149
7	16.255	5.44860	2.80%	288.118	24	29.135	3.06256	8.00%	344.276
8	16.903	5.24119	48.50%	1486.90	25	29.638	3.01175	2.10%	183.706
9	18.122	4.89132	73.90%	2150.25	26	30.569	2.92211	3.20%	206.383
10	18.554	4.77818	23.10%	823.078	27	31.125	2.87113	3.10%	202.852
11	18.927	4.68486	44.30%	1370.18	28	31.799	2.81180	5.30%	256.503
12	19.364	4.58024	21.10%	758.954	29	32.789	2.72916	1.20%	139.579
13	20.386	4.35286	17.50%	640.608	30	33.855	2.64562	2.60%	169.028
14	21.914	4.05261	24.20%	803.125	31	34.827	2.57393	1.40%	129.355
15	22.640	3.92439	9.60%	421.049	32	36.782	2.44153	4.80%	216.242
16	23.867	3.72533	6.30%	335.668	33	38.522	2.33512	1.60%	124.831

17	24.553	3.62272	5.40%	315.159	34	39.646	2.27149	1.40%	126.875
----	--------	---------	-------	---------	----	--------	---------	-------	---------

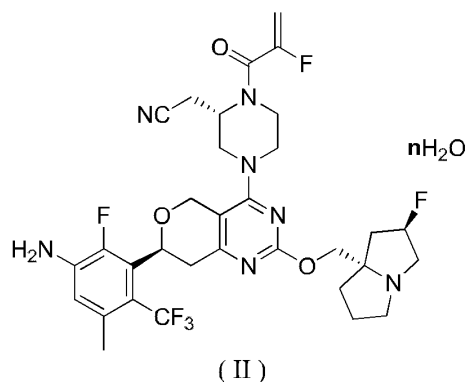
在本发明的一些方案中，上述 A 晶型的差示扫描量热曲线在 $115.37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 处具有吸热峰的峰值。

在本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 DSC 图谱如图 2 所示。

在本发明的一些方案中，上述 A 晶型的热重分析曲线在 $150.0^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 时失重达 5.379%。

在本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 TGA 图谱如图 3 所示。

本发明还提供式 (II) 化合物 A 晶型的制备方法，包括：



- (a) 将式 (I) 化合物加入乙醇中搅拌至澄清；
- (b) 在搅拌下将水缓慢加入到体系中，在 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ 加入晶种；
- (c) $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 15 小时；
- (d) $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ 缓慢将水滴加到反应体系中，继续搅拌 1~3 小时。
- (e) 过滤，收集固体。

本发明还提供了上述化合物和 A 晶型在制备治疗实体瘤药物中的应用。

在本发明的一些方案中，上述实体瘤为肺癌和直肠癌。

技术效果

本发明化合物对 KRASG12C 突变的 MIA-PA-CA-2 细胞系、NCI-H358 细胞具有良好的细胞增殖抑制活性，有良好的肝微粒体、肝细胞、血浆、全血稳定性，有良好的 PK 性质，并且有显著的抑瘤作用。A 晶型稳定、受光热影响小，有良好的 PK 性质。

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。

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构，如果本发明涉及化合物的绝对构型，则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶X射线衍射法（SXRD），把培养出的单晶用Bruker D8 venture衍射仪收集衍射强度数据，光源为CuK α 辐射，扫描方式： ϕ/ω 扫描，收集相关数据后，进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构，便可以确证绝对构型。

化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw®软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

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

仪器型号：布鲁克Bruker D2 PhaserX-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 α , ($\lambda=1.54184\text{\AA}$).

光管电压：30 kV，光管电流：10 mA

发散狭缝：0.60 mm

探测器狭缝：5.827 mm

防散射狭缝：0 mm

扫描范围：3-40 deg

步径：0.02 deg

步长：0.2 秒

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

仪器型号：NETZSCH DSC 214 DSC21400A-0958-L

测试方法：取样品（~4.02 mg）置于 DSC 铝锅内进行测试，在 50mL/min N₂ 条件下，以 10°C/min 的升温速率，加热样品从 30°C（室温）到 400°C。

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

仪器型号：TA Discovery TGA 5500 热重分析仪

测试方法：取样品（2~5mg）置于 TGA 铂金锅内进行测试，在 25mL/min N₂ 条件下，以 10°C/min 的升温速率，加热样品从室温到 350°C 或失重 20%。

本发明 X-射线单晶衍射方法

仪器型号：Bruker D8 VENTURE CMOS Photon II diffractometer with helios mx multilayer monochromator.

测试方法：取 0.0133g 式（II）化合物 A 晶型在室温条件下溶解于 2mL 乙腈中。将样品溶液置于 4 mL 半密封样品瓶中，在室温下缓慢挥发。十天后得到无色块状晶体。衍射实验温度 T = 173(2) K。

仪器参数：

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

Cryogenic system: Oxford Cryostream 800

Cu: $\lambda=1.54184\text{\AA}$, 2.5kW,

Distance from the crystal to detector: $d = 45 \text{ mm}$

Tube Voltage: 50 kV

Tube Current: 50 mA

附图说明

图 1 为式 (II) 化合物 A 晶型的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图；

图 2 为式 (II) 化合物 A 晶型的 DSC 谱图；

图 3 为式 (II) 化合物 A 晶型的 TGA 谱图；

图 4 为式 (I) 化合物不同给药量随着时间延长的肿瘤体积变化；

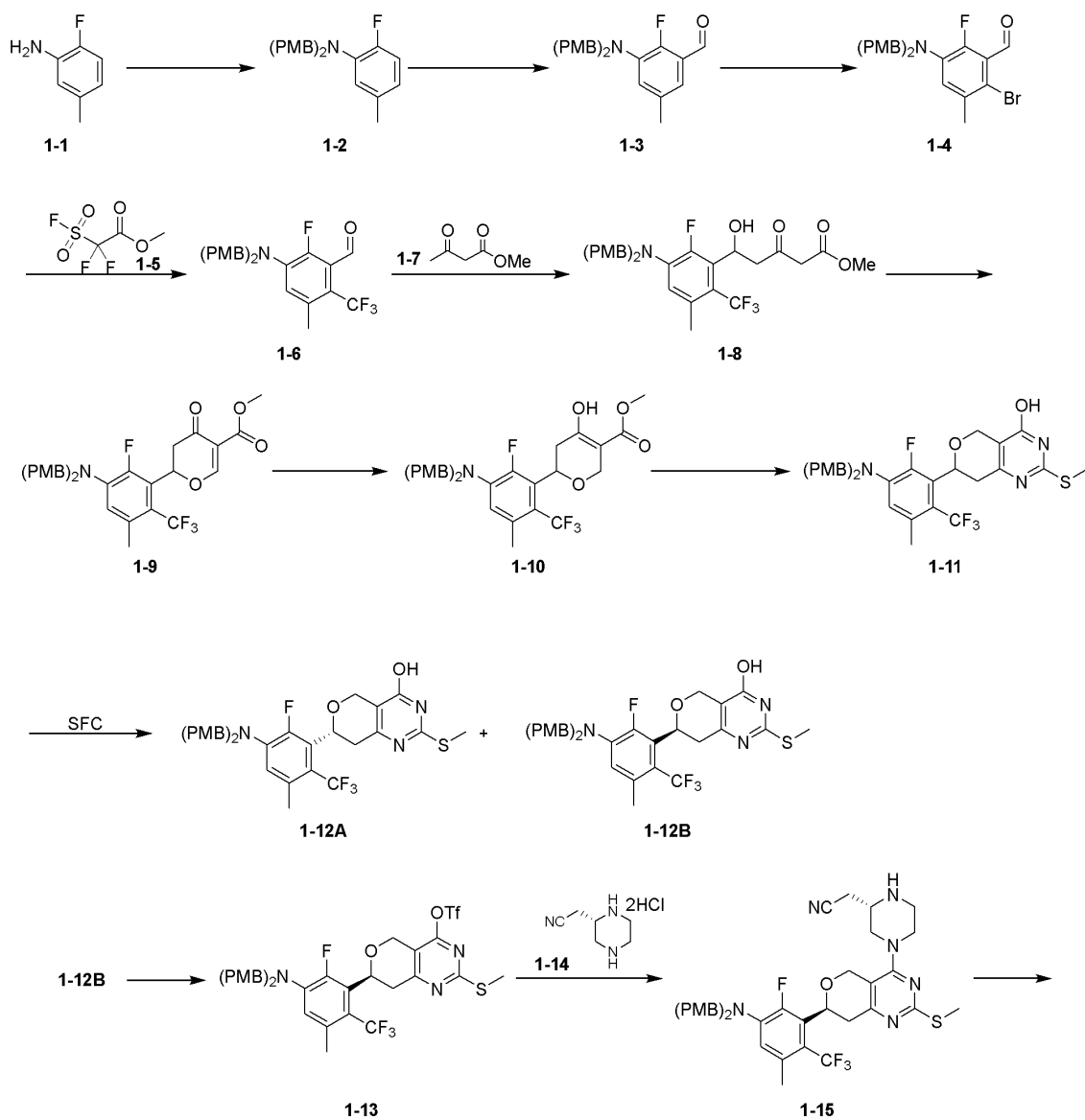
图 5 为式 (I) 化合物不同给药量随着时间延长的动物体重变化；

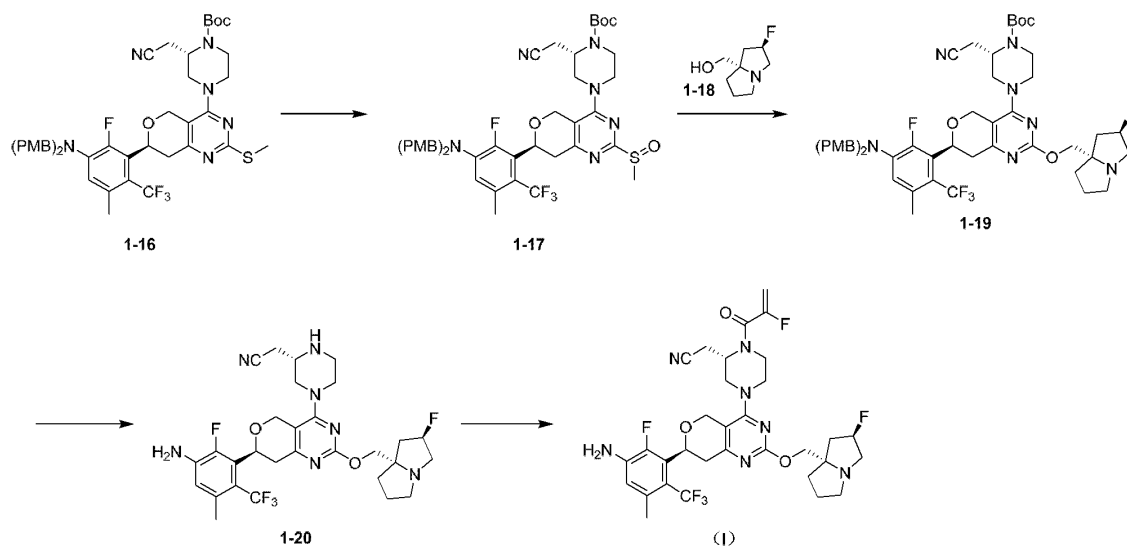
图 6 为式 (III) 化合物的单晶 X 射线衍射立体结构椭球图。

具体实施方式

为了更好的理解本发明的内容，下面结合具体实施例来做进一步的说明，但具体的实施方式并不是对本发明的内容所做的限制。

实施例 1：式 (I) 化合物的制备





步骤 1: 化合物 1-2 的合成

准备好5升三口瓶, 将化合物1-1(250 g, 2.00 mol, 1 eq) 和无水碳酸钾 (690.26 g, 4.99 mol, 2.5 eq), 碘化钾(331.62 g, 2.00 mol, 1 eq) 加入到N-甲基吡咯烷酮(2.5 L) 中, 然后滴加对甲氧基苯甲基氯 (641.36 g, 4.10 mol, 557.71 mL, 2.05 eq), 反应液成黄色浑浊, 在氮气保护下置于120°C油浴中搅拌反应5小时。合并6批反应液 (250×6), 倒入20升水中, 再加入10升甲基叔丁基醚搅拌, 分液后收集有机相, 水相用甲基叔丁基醚萃取(5 L x 1), 合并有机相, 饱和食盐水洗涤(10 L x 2), 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到化合物1-2品。向粗品中加入3升石油醚, 打浆过夜。打浆体系成乳白色浑浊, 通过布氏漏斗过滤。滤饼用石油醚 (500 mL x 3)淋洗, 得到的滤饼, 得到化合物1-2。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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]⁺。

步骤 2: 化合物 1-3 的合成

将2,2,6,6-四甲基哌啶(2.44 kg, 17.29 mol, 2.94 L, 4 eq) 加入到无水四氢呋喃 (15 L) 中, 降温至-5-0°C, 氮气置换三次, 氮气保护下滴加正丁基锂(2.5 M, 6.92 L, 4 eq), -5-0°C反应15min, 降温至-60°C, 滴加化合物1-2(1.58 kg, 4.32 mol, 1 eq) 的四氢呋喃(1.5 L)溶液, 滴加完毕后-65~-60°C反应0.5小时, 快速加入N,N-二甲基甲酰胺 (3.16 kg, 43.24 mol, 3.33L, 10 eq), -60°C反应10min, 向反应液加入20 L饱和氯化铵, 用5 L的甲基叔丁基醚萃取分液, 有机相继续用20 L饱和氯化铵洗涤, 然后水相用10 L的甲基叔丁基醚继续萃取分液, 合并有机相, 有机相用饱和食盐水洗涤 (12 L x 2), 无水硫酸钠干燥过滤后浓缩, 粗品用石油醚/甲基叔丁基醚(3/1, 3L)打浆5小时, 过滤, 收集滤饼得到化合物1-3。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 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[M+H]⁺。

步骤 3: 化合物 1-4 的合成

将化合物 1-3 (1.17 kg, 2.83 mol, 95%纯度, 1 eq)加入到 N,N-二甲基甲酰胺 (5.7 L) 中, 5°C 下分批加入溴代丁二酰亚胺 (603.35 g, 3.39 mol, 1.2 eq), 5-15°C 反应 1 小时, 向反应液中, 缓慢加入 5.7 L 水, 有固体析出, 搅拌 20 min 后, 继续缓慢加入 11.4 L 水, 继续搅拌 40 min, 过滤, 将滤饼用水 (2 L x 2) 的淋洗。粗品用石油醚: 甲基叔丁基醚=10:1 的混合溶剂 7.7 L 打浆 12 小时, 过滤, 滤饼用石油醚: 甲基叔丁基醚

=10:1 的混合溶剂 500 mL 淋洗后进行真空浓缩后, 用氮气吹 12 小时, 得到化合物 **1-4**。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 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[M+H]⁺, 474.1[M+H]⁺。

步骤 4: 化合物 1-6 的合成

将化合物 **1-4** (130 g, 275.22 mmol, 1 eq), 碘化亚酮 (104.83g, 550.44 mmol, 2 eq), 化合物 **1-5** (264.37 g, 1.38 mol, 175.08 mL, 5 eq) 溶于 DMF (1.3 L) 中, 氮气保护, 在 100°C 下搅拌 4 小时。降温, 体系过滤, 倒入水 (1.3 L) 中淬灭, 甲基叔丁基醚 (400 mL x 2) 萃取, 饱和食盐水洗涤 (300mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 收集母液浓缩得到粗品。粗品打浆 (石油醚/甲基叔丁基醚 = 8/1, 300 mL) 得到化合物 **1-6**, 收集母液, 母液浓缩柱层析 (石油醚/乙酸乙酯 = 100/1~5/1) 得到粗品, 粗品打浆 (石油醚/甲基叔丁基醚 = 8/1, 100 mL) 得到化合物 **1-6**。两批次固体用石油醚打浆混合, 过滤, 收集固体, 得到化合物 **1-6**。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 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]⁺。

步骤 5: 化合物 1-8 的合成

将钠氢 (70.21 g, 1.76 mol, 60% 纯度, 1.8 eq) 加入到无水四氢呋喃 (4.5 L) 中, 降温至 -5°C, 置换氮气三次, 氮气保护下滴加化合物 **1-7** (203.82 g, 1.76 mol, 188.72 mL, 1.8 eq), -5~0°C 反应 10min 后, 滴加正丁基锂 (2.5 M, 702.14 mL, 1.8 eq), 继续在氮气保护下 -5~0°C 反应 10min, 降温至 -10°C, 滴加化合物 **1-6** (450 g, 975.19 mmol, 1 eq) 的四氢呋喃 (450 mL) 溶液, -10°C 下反应 10min, 将反应液缓慢加入到 5 L 饱和氯化铵中, 分液萃取, 有机相用 4 L 的饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥过滤后浓缩, 向浓缩后的粗品中加入 900 mL x 4 的石油醚, 晃荡洗涤后, 将石油醚上清液倾倒掉, 将粗品进行真空浓缩得到化合物 **1-8**。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 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]⁺。

步骤 6: 化合物 1-9 的合成

将化合物 **1-8** (1.15 kg, 1.77 mol, 89% 纯度, 1 eq) 加入到二氯甲烷 (5.7 L) 中, 加入 N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛 (337.86 g, 2.84 mol, 376.66 mL, 1.6 eq), 25°C 反应 1 小时, 降温至 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), 反应 10min。LCMS 表明原料消失, 出现产物 Ms 信号。将反应液缓慢加入到 10 L 的半饱和碳酸氢钠溶液中, 分液萃取, 有机相用 5 L 的饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥过滤后浓缩将粗品平均分成六份, 每份加入 0.83 L 的甲基叔丁基醚, 搅拌 20min 后析出固体, 继续加入石油醚: 甲基叔丁基醚=1:1 的混合溶剂 0.5 L 后, 打浆过夜 16 小时, 六份一起过滤, 将滤饼用石油醚: 甲基叔丁基醚=1:1 的混合溶剂 800 mL x 2 淋洗后, 旋干, 母液经柱层析石油醚: 乙酸乙酯=100:0-0:1) 得到化合物 **1-9**。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 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]⁺。

步骤 7: 化合物 1-10 的合成

将化合物 **1-9** (775 g, 1.32 mol, 1 eq) 加入到四氢呋喃 (4 L) 中, 降温至 -60°C, 置换氮气三次, 氮气保护下滴加三仲丁基硼氢化锂 (1 M, 1.45 L, 1.1 eq), -60°C 下反应 10min。将反应液缓慢加入到 3.5 L 的 1M

盐酸溶液中,加入 2 L 的水分液萃取,水相继续用 2 L 的乙酸乙酯萃取,合并有机相中并继续加入 1 L 的乙酸乙酯,用 5 L 饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥过滤后浓缩,将粗品分为 4 批,分别加入 200 mL 的甲基叔丁基醚,搅拌 10min,缓慢加入 200 mL 的石油醚,搅拌 0.5-1 小时后析出固体,继续分批次加入 1.6L 的石油醚,打浆搅拌 12 小时,过滤,将滤饼用石油醚:甲基叔丁基醚=10:1 的溶剂 300mL x 3 淋洗,收集固体得到化合物 **1-10** (1.15 kg)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 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]⁺。

步骤 8: 化合物 1-11 的合成

将化合物 **1-10** (310 g, 525.80 mmol, 1 eq) 加入到乙醇 (1.55 L) 中,加入 S-甲基异硫脲硫酸盐 (439.11 g, 1.58 mol, 3 eq) 和碳酸钠 (111.46 g, 1.05 mol, 2 eq), 45~50°C (内温) 氮气保护下反应 16 小时。将大部分乙醇浓缩除去,向粗品中加入 500 毫升水和 400 毫升乙酸乙酯,搅拌,用 500 mL 1M 盐酸调节 pH=3~4 后有灰白色固体析出,再加入 600 mL 石油醚,搅拌,体系中有大量灰白色固体析出。将体系经布氏漏斗过滤,滤饼用乙酸乙酯淋洗 (200 mL x 2),得到的滤饼即为产品。将滤饼用 2 L 二氯甲烷溶解,分液,有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩得到化合物 **1-11**。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 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]⁺。

步骤 9: 化合物 1-12B 的合成

化合物**1-11**进行SFC拆分,色谱柱:DAICEL CHIRALPAK AD(250mm*50mm,10μm);流动相: [0.1%NH₃. H₂O EtOH]; EtOH%: 45%-45%,6.3min。得化合物**1-12B**(出峰时间:1.665 min),化合物**1-12A**(出峰时间:2.446 min)。

步骤 10: 化合物 1-13 的合成

将化合物 **1-12B** (2 g, 3.18 mmol, 1 eq) 溶于二氯甲烷(20 mL) 中,加入 N,N-二异丙基乙胺 (1.23 g, 9.53 mmol, 1.66 mL, 3 eq), 降温至 0~10°C, 将三氟甲磺酸酐 (1.34 g, 4.76 mmol, 786.11 μL, 1.5 eq) 缓慢加入到体系中,在此温度下反应 15min。倒入饱和氯化铵水溶液 (15 mL), 分液,水相用二氯甲烷(15 mL x 2)萃取,合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到粗品。粗品经柱层析 (石油醚/乙酸乙酯=100/1~0/1) 分离得到化合物 **1-13**。LCMS m/z = 762.2[M+H]⁺。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ = 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]⁺。

步骤 11: 化合物 1-15 的合成

将化合物 **1-13**(147 g, 186.74 mmol, 96.76% 纯度, 1 eq) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺(1.5 L) 中,加入 N,N-二异丙基乙胺(72.40 g, 560.23 mmol, 97.58 mL, 3 eq), 再加入化合物 **1-14**(42.54 g, 214.76mmol, 1.15 eq, 2HCl), 升温至 50°C 搅拌 0.5 小时。反应液直接用于下一步,得到化合物 **1-15** 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液。

步骤 12: 化合物 1-16 的合成

将化合物 **1-15** (137.8 g, 187.02 mmol, 1 eq) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液 (1.5 L) 溶液加入到搅拌器中, 加入三乙胺 (18.92 g, 187.02 mmol, 26.03 mL, 1 eq), 将二碳酸二叔丁酯 (48.98 g, 224.42 mmol, 51.56 mL, 1.2 eq) 加到反应液中, 18°C 搅拌 10 小时。倒入水中 (1.5 L), 加入乙酸乙酯 (400 mL x 3), 饱和氯化铵水溶液 (400 mL x 4), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得到化合物 **1-16**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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]⁺。

步骤 13: 化合物 **1-17** 的合成

将化合物 **1-16** (245 g, 278.10 mmol, 95% 纯度, 1 eq) 溶于无水二氯甲烷 (2500 mL), 降温至 0~10°C, 然后将间氯过氧苯甲酸 (56.46 g, 278.10 mmol, 85% 纯度, 1 eq) 分批加入, 10°C 搅拌 0.5 小时。补加间氯过氧苯甲酸 (8.47 g, 41.71 mmol, 85% 纯度, 0.15 eq), 10°C 继续搅拌 0.5 小时。将该反应与 (化合物 **1-16** 10g 批次) 合并处理。反应液用饱和碳酸氢钠洗 (1500 mL), 5% 硫代硫酸钠洗 (1500 mL) (湿润淀粉碘化钾试纸检测合格后), 半饱和食盐水洗 (1500 mL), 无水硫酸钠干燥过滤浓缩。柱层析纯化 (乙酸乙酯: 石油醚 = 10%-15%-20%-30%)。得到化合物 **1-17**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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]⁺。

步骤 14: 化合物 **1-19** 的合成

将化合物 **1-18** (18.24 g, 114.59 mmol, 1.2 eq) 溶于无水四氢呋喃 (900 mL), 降温至 -20°C, 然后加入叔丁醇钠 (11.01 g, 114.59 mmol, 1.2 eq), 搅拌 15 min。然后加入化合物 **1-17** (90.5 g, 95.49 mmol, 90% 纯度, 1 eq) 的无水四氢呋喃 (180 mL), 继续搅拌 0.5 小时。该反应与 (化合物 **1-18** 50g 批次) 合并处理。向反应液中加入 1000 mL 饱和氯化铵淬灭反应, 分液, 水相用乙酸乙酯萃取 (1000 mL) 分液, 无水硫酸钠干燥过滤, 浓缩。柱层析纯化 (乙酸乙酯: 石油醚 = 20%-50%-100%) 得白色固体化合物 **1-19**。LCMS m/z = 948.4[M+H]⁺。

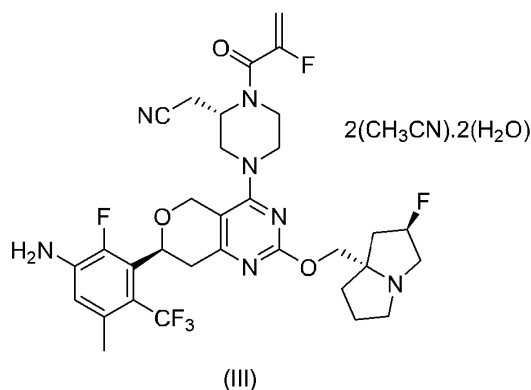
步骤 15: 化合物 **1-20** 的合成

将化合物 **1-19** (97.00 g, 97.20 mmol, 95% 纯度, 1 eq) 溶于 2-甲基四氢呋喃 (500 mL), 降温至 0°C, 然后将盐酸 (8 M, 614.80 mL, 50.6 eq) 滴加到反应液中, 升至 25°C 搅拌 2 小时。加入正庚烷 (200 mL) 分液, 收集水相, 加入 2-甲基四氢呋喃 (300 mL), 用碳酸钠调节 pH=8~9, 搅拌澄清, 分液, 收集有机相, 水相用 2-甲基四氢呋喃 (300 mL x 2), 收集有机相, 饱和食盐水洗 (200 mL), 无水硫酸镁干燥, 过滤, 收集有机相, 浓缩得到粗品, 用二氯甲烷 (1000 mL) 溶解, 将三氟乙酸 (283.73 g, 2.49 mol, 184.24 mL, 25.6 eq) 缓慢加入到二氯甲烷中控制温度在 10°C 以下, 25°C 搅拌 3 小时。将反应液倒入 500 mL 冰水, 搅拌至澄清, 分液。有机相用水 (300 mL x 3) 萃取。合并两个批次水相, 然后用二氯甲烷 (500 mL x 4) 反萃, 弃去有机相。将水相降温至 10°C, 向水相中加入 500 mL 2-甲基四氢呋喃 (会放热), 然后用碳酸钠调 pH=9, 2-甲基四氢呋喃 (400 mL x 2) 萃取, 合并有机相, 水洗 (300 mL x 4), 饱和食盐水洗 (300 mL), 无水硫酸钠干燥过滤浓缩得灰色固体化合物 **1-20**。LCMS m/z = 608.27[M+H]⁺。

步骤 16: 式(I)化合物的合成

将化合物 **1-20** (58 g, 84.00 mmol, 88% 纯度, 1 eq), N,N-二异丙基乙胺 (21.71 g, 168.00 mmol, 29.26 mL, 2 eq)、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(38.33 g, 100.80 mmol, 1.2 eq)溶于 DMF (600 mL), 然后降温至 0°C, 分批加入 2-氟丙烯酸(6.81 g, 75.60 mmol, 0.9 eq), 0°C 搅拌 10min。将反应液倒入 900 mL 水中, 然后乙酸乙酯萃取 (200 mL x 3), 合并有机相, 饱和氯化铵洗 (200 mL x 3), 饱和碳酸钠洗 (200 mL x 3), 饱和食盐水洗 (200 mL), 无水硫酸钠干燥过滤浓缩。然后用乙腈: 水 (100mL: 150 mL) 打浆 16 小时, 过滤得到式 (I) 化合物。SFC 分析方法(柱子: Chiralcel OD-3, 50×4.6mm I.D., 3μm; 流动相: A (CO₂) 和 B (甲醇, 含 0.05% 二异丙胺胺); 梯度: B%=5~50%, 3 min; 流速: 3.4 mL/min; 波长: 220nm; 压力: 1800psi, 光学纯度: 99.21%, 出峰时间: 1.840min。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 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)。

实施例 2: 式 (III) 化合物的单晶 X-射线衍射检测分析



取 0.0133g 式 (II) 化合物 A 晶型在室温条件下溶解于 2mL 乙腈中。将样品溶液置于 4 mL 半密封样品瓶中, 在室温下缓慢挥发。十天后得到无色块状晶体。收集晶体, 用单晶 X 射线衍射仪 (D8-VENTURE) 收集衍射强度数据。式 (III) 化合物的晶体结构数据见表 2, 式 (III) 化合物立体结构椭球图见附图 6。

表 2. 式 (III) 化合物的晶体数据

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

Crystal Density	$D_c = 1.375 \text{ Mg/m}^3$
Crystal $F(000)$	3328
Absorption Coefficient μ	$\mu(\text{Cu K}\alpha) = 0.971 \text{ mm}^{-1}$
Limiting Indices	$-12 \leq h \leq 12$ $-9 \leq k \leq 12$ $-75 \leq l \leq 73$
Cell Measurement Temperature	$T = 173 \text{ (2) K.}$
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 [$R_{\text{int}} = 0.0906$]

实施例 3：式 (II) 化合物 A 晶型的制备

方法一：将式 (I) 化合物 (0.2 g) 加入到乙醇 (2.4 mL) 中，加热至 50℃，溶清后将水 (0.48mL) 缓慢加入到反应液中，在 50℃下搅拌 72 小时，过滤，收集固体得到式 (II) 化合物 A 晶型。

方法二：将式 (I) 化合物(5.0g) 加入到乙醇 (4 V)搅拌至澄清，将水(1 V)缓慢加入到体系中，在 20~30℃下加入晶种 (0.5g)，在此温度下搅拌 15 小时，再缓慢滴加水 (3V)，继续搅拌 1~3 小时。过滤收集滤饼，得到式 (II) 化合物 A 晶型。

实施例 4：式 (II) 化合物 A 晶型的固体稳定性试验

依据《原料药与制剂稳定性试验指导原则》(中国药典 2015 版四部通则 9001)，考察式 (II) 化合物 A 晶型在高温 (60℃，敞口)，高湿 (室温/相对湿度 92.5%，敞口) 及强光照 (5000 lx，敞口) 条件下的稳定性，以及长期实验 (25±2℃/60 ±5% RH)，加速实验 (40±2℃/75 ±5% RH) 条件下的晶型稳定性。

称取式 (II) 化合物 A 晶型约 20mg，置于玻璃样品瓶的底部，摊成薄薄一层。高温及高湿条件下放置的样品用铝箔纸封瓶口，并在铝箔纸上扎些小孔，保证样品能与环境空气充分接触；强光照条件下放置的样品用铝箔纸封瓶口，并在铝箔纸上扎些小孔。不同条件下放置的样品于第 5 天，10 天取样检测 (XRPD)，检测结果与 0 天的初始检测结果进行比较，试验结果见下表 3 所示。

将式 (II) 化合物 A 晶型放入双层药用低密度聚乙烯袋中，每份药用低密度聚乙烯袋分别用扎带扎紧，再放入单层铝箔袋中并热封，最后将样品储存在塑料桶中，储存在稳定性恒温恒湿箱中。稳定性试验所用的包装模拟物料存储包装，在红光下将物料分装为 1.5 g/包的稳定性样品，每份样都以相同的方式包装并贴好稳定性样品标签，在不同条件下放置的样品于第 3 个月，第 6 个月取样检测 (XRPD)，检测结果与 0 天的初始检测结果进行比较，试验结果见下表 3 所示。

表 3 式 (II) 化合物 A 晶型的固体稳定性试验结果

试验条件	时间点	晶型
------	-----	----

-	0 天	A 晶型
高温（60°C，敞口）	5 天	A 晶型
	10 天	A 晶型
高湿（25°C/相对湿度 92.5%，敞口）	5 天	A 晶型
	10 天	A 晶型
光照对照*1	5 天	A 晶型
	10 天	A 晶型
25±2°C/60 ±5%相对湿度	3 个月	A 晶型
	6 个月	A 晶型
40±2°C/75 ±5%相对湿度	3 个月	A 晶型
	6 个月	A 晶型

光照对照*1：需同时放置光照对照样品，光照对照样品采用螺纹瓶盖密封，再用锡箔纸完全包裹。

结论：式（II）化合物 A 晶型在高温、高湿、强光照条件下，以及长期实验和加速实验的条件下具有良好的稳定性。

生物测试数据：

实验例 1：化合物对 KRAS^{G12C} 突变的 MIA-PA-CA-2 细胞增殖抑制作用的测试

1.1 实验目的

测试化合物对KRAS^{G12C}突变的MIA-PA-CA-2细胞增殖抑制的IC₅₀。

1.2 试剂

本研究使用的主要试剂包括 CellTiter-Glo（Promega，货号：G7573）。

1.3 仪器

本研究所使用主要仪器为 PerkinElmer EnVision 多功能酶标仪。

1.4 实验方法

- 1) 贴壁细胞经胰酶消化处理成细胞悬液，并对细胞悬液进行计数备用。
- 2) 取适量细胞至离心管并用细胞培养液补足至需要体积，铺至 96 孔板，终密度为 2000 细胞/孔，100 μL 培养液。
- 3) 培养 24 小时后，将化合物用 DMSO 配置成 10 mM，并用 DPBS（杜比可磷酸缓冲盐）以 3 倍梯度稀释 9 个点，每孔加入 10 μL，两复孔。实验对照孔（Con）每孔加入 10 μL DPBS。
- 4) 同天，取一块未加药处理的细胞培养板，加入 50 μL CellTiter Glo，利用 EnVision 进行荧光读值，标记为 Day0 读值。
- 5) 加药处理后的细胞培养 72 h 后，去除培养板，向细胞板中加入 50 μL CellTiter Glo，利用 EnVision 进行荧光读值。
- 6) 数据分析：按下列公式计算各孔对细胞的抑制率：

$$\text{抑制率}\% = \left(1 - \frac{FCpd}{FCcon - FDay0}\right) * 100\%$$

* F_{Day0} 为未加药处理的原始细胞数目测试孔的读值；
F_{Con} 为培养 72 小时后，Con 组的荧光读值。
F_{Cpd} 为培养 72 小时后，各化合物孔的荧光读值。
7) 使用 GraphPad Prism 软件对化合物的抑制率数据（抑制率%）进行 log(agonist) vs. response -- Variable slope 非线性拟合分析，得到化合物的 IC₅₀ 值，拟合公式为：
$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))})$$

1.5 实验结果

表 4. 本发明化合物对 KRAS^{G12C} 突变的 MIA-PA-CA-2 细胞增殖抑制的测试结果

受试品	IC ₅₀ (nM)
式 (I) 化合物	0.44

实验结果显示式 (I) 化合物对 KRAS^{G12C} 突变的 MIA-PA-CA-2 细胞系具有良好的细胞增殖抑制活性。

实验例 2：化合物对 KRAS^{G12C} 突变的 H358 细胞增殖抑制作用的测试

2.1 实验目的

测试化合物对 KRAS^{G12C} 突变的 H358 细胞增殖抑制的 IC₅₀。

2.2 试剂

本研究使用的主要试剂包括 RPMI-1640 培养基，盘尼西林/链霉素抗生素购自维森特，胎牛血清购自 Biosera。CellTiter-Glo（细胞活率化学发光检测试剂）试剂购自 Promega。NCI-H358 细胞系购自中国科学院细胞库。

2.3 仪器

本研究所使用主要仪器为 Nivo 多标记分析仪(PerkinElmer)。

2.4 实验方法：

- 1) 将 NCI-H358 细胞种于白色 96 孔板中，80μL 细胞悬液每孔，其中包含 4000 个 NCI-H358 细胞。细胞板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。
- 2) 将待测化合物用排枪进行 5 倍稀释至第 9 个浓度，即从 2 mM 稀释至 5.12nM，设置双复孔实验。向中间板中加入 78 μL 培养基，再按照对应位置，转移 2 μL 每孔的梯度稀释化合物至中间板，混匀后转移 20μL 每孔到细胞板中。转移到细胞板中的化合物浓度范围是 10μM 至 0.0256nM。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养 5 天。另准备一块细胞板，在加药当天读取信号值作为最大值（下面方程式中 Max 值）参与数据分析。向此细胞板每孔加入 25 μL 细胞活率化学发光检测试剂，室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。
- 3) 向细胞板中加入每孔 25 μL 的细胞活率化学发光检测试剂，室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用多标记分析仪读数。

数据分析：

利用方程式(Sample-Min)/(Max-Min)*100%将原始数据换算成抑制率，IC₅₀ 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出（GraphPad Prism 中"log(inhibitor) vs. response -- Variable slope" 模式得出）。表 5 提供了本发明的化合物对 NCI-H358 细胞增殖的抑制活性。

表 5. 本发明化合物对 KRASG12C 突变的 H358 细胞增殖抑制的测试结果

受试品	NCI-H358 IC ₅₀ (nM)
式 (I) 化合物	0.6

结论：式 (I) 化合物对 NCI-H358 细胞增殖展现出较好的抑制活性。

实验例 3：肝细胞代谢稳定性

实验目的：评定受试化合物分别在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝细胞中的代谢稳定性

实验操作：准备若干 96 孔样品沉淀板，分别命名为 T0、T15、T30、T60、T90、T120、T0-MC、T120-MC 和空白基质。提前取出复苏培养液和孵育培养液，放置在 37°C 水浴锅中预热。从液氮罐中取出冻存的肝细胞，立即浸没到 37°C 水浴中（约 90 秒）。待冻存部分溶化松动后，分别倒入含有 40 mL 复苏培养液的离心管中，轻柔的颠倒让细胞在复苏培养液中重悬。室温条件下，100 ×g 离心 5 分钟，移除上清液，用适当体积的孵育培养液重悬肝细胞，用台盼蓝染色法计算细胞活率。将 198 μL 的肝细胞混悬液 (0.51×10⁶ cells/mL) 加入到已预热的孵育板中，培养液对照组加入 198 μL 不含肝细胞的孵育培养液至 T0-MC 和 T120-MC 孵育板中，所有孵育板在 37°C 培养箱中预孵育 10 分钟。然后加入 2 μL 供试品和对照化合物工作液，混匀，立即将孵育板放入培养箱内的摇板机中，启动计时器开始反应。每个化合物的每个时间点准备 2 个重复样本。孵育条件为 37°C、饱和湿度、含 5%CO₂。测试体系中，供试品的终浓度为 1 μM，对照品的终浓度为 3 μM，肝细胞的终浓度为 0.5×10⁶ cells /mL，总有机溶剂的终浓度为 0.96%，其中 DMSO 的终浓度为 0.1%。相应时间点孵育结束时，取出孵育板，取出 25 μL 化合物和对照化合物与细胞的混合液加入到含有 125 μL 终止液（含有 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和拉贝诺尔的乙腈溶液）的样品板中。对于 Blank 样品板，直接加入 25 μL 不含肝细胞的孵育培养液。所有样品板封膜后在摇板机上以 600 rpm 摇 10 分钟后，3220×g 离心 20 分钟。供试品和对照品上清液用超纯水以 1:3 的比例稀释。所有样品混匀后用 LC/MS/MS 的方法进行分析。

实验结果：实验结果如表 6 所示。

表 6. 受试化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝细胞中的代谢稳定性

受试品	种属	T _{1/2} (min)	CL _{int} (hep)	CL _{int} (liver)
			(μL/min/10 ⁶)	(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

实验结论：多种属肝细胞代谢实验显示式 (I) 化合物具有良好的代谢稳定性。

实验例 4：体外肝微粒体稳定性研究

实验目的：评定受试化合物分别在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝微粒体中的代谢稳定性

实验操作：准备2块96孔孵育板，分别命名为T60孵育板和NCF60孵育板。 在T60孵育板和NCF60孵育板上

分别加入445μL微粒体工作液（肝微粒体蛋白浓度为0.56 mg/mL），然后将上述孵育板放置于37℃水浴锅中预孵育大约10分钟。

预孵育结束后，在 T60 孵育板和 NCF60 孵育板上分别加入 5μL 供试品或对照化合物工作液，混匀。在 NCF60 孵育板上每孔添加 50 μL 磷酸钾盐缓冲液启动反应；在 T0 终止板中加入 180 μL 的终止液（含 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和 200 ng/mL 拉贝洛尔的乙腈溶液）和 6 uL 的 NADPH 再生体系工作液，从 T60 孵育板中取出 54 μL 样品至 T0 终止板（T0 样品产生）。在 T60 孵育板上每孔添加 44 μLNADPH 再生体系工作液启动反应。在 Blank 板中只添加 54 μL 微粒体工作液、6 uL 的 NADPH 再生体系工作液和 180 μL 的终止液。因此，在供试品或对照化合物的样品中，化合物、睾酮、双氯芬酸和普罗帕酮的反应终浓度为 1 μM，肝微粒体的浓度为 0.5 mg/mL，DMSO 和乙腈在反应体系中的终浓度分别为 0.01%（v/v）和 0.99%（v/v）。孵育适当时间（如 5、15、30、45 和 60 分钟）后，分别在每个终止板的样品孔中加入 180 μL 的终止液（含 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和 200 ng/mL 拉贝洛尔的乙腈溶液），之后从 T60 孵育板中取出 60 μL 样品以终止反应。所有样品板摇匀并在 3220 ×g 离心 20 分钟，然后每孔取 80 μL 上清液稀释到 240 μL 纯水中用于液相色谱串联质谱分析，液相色谱串联质谱分析所有样品进样分析。

实验结果：实验结果如表 7 所示。

表 7. 受试化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人肝微粒体的代谢稳定性

受试品	种属	T _{1/2} (min)	CL _{int} (hep)	CL _{int} (liver)
			(μL/min/10 ⁶)	(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

实验结论：肝微粒体代谢稳定性研究显示式 (I) 化合物具有良好的代谢稳定性

实验例 5: 血浆稳定研究

实验目的：评定受试化合物分别在 CD-1 小鼠、人的血浆稳定性

实验操作：将冻存的血浆解冻 10~20 分钟，待血浆完全解冻后，将其置于离心机中以 3220×g 离心 5 分钟，去除其中存在的悬浮物和沉淀物。准备 96 孔孵育板，分别命名为 T0、T10、T30、T60、T120。将孵育板中对应的加入 98 μL 的小鼠、大鼠、犬、猴和人空白血浆，然后加入 2 μL 化合物或对照化合物的工作液加入到对应的孵育板中，每个样品准备两个平行孔。所有的样品在 37℃ 水浴锅中进行孵育。化合物和对照化合物比沙可啶、马来酸依那普利、普鲁卡因和普鲁本辛的最终孵育浓度为 2 μM，最终有机相含量为 2.0%。每一个孵育时间点结束时，取出相应的孵育板，向每个对应的样品孔中加入 400 μL 含有 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和拉贝诺尔的乙腈溶液沉淀蛋白。所有样品板封膜并摇匀后，3220×g 离心 20 分钟。取 50 μL 上清液加入 100 μL 超纯水稀释，所有样品混匀后用 LC/MS/MS 的方法分析。

实验结果：实验结果如表 8 所示。

表 8. 受试化合物 CD-1 小鼠、人的血浆稳定性

受试品	种属	120min 下受试化合物含量检测
式 (I) 化合物	CD-1 小鼠	94%
	人	93%

实验结论：式 (I) 化合物在人和小鼠血浆中的稳定性良好。

实验例 6：全血稳定研究

实验目的：评定受试化合物分别在评定受试化合物分别在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴的全血稳定性

实验操作：在实验当天或实验的前一天，采用抗凝剂 EDTA-K2 采集新鲜的 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴全血。在实验开始前，将全血与 PBS 进行 1：1 (v：v) 混合，放置于 37℃水浴锅中预热 10~20 分钟。准备 96 孔孵育板，分别命名为 T0、T30、T60、T240。在对应的孵育板中，包括 T0、T30、T60 和 T240 孵育板，将 2 μL 化合物或对照化合物的工作液与 98 μL 的小鼠、大鼠、犬、猴和人空白全血混合，每个样品准备两个平行孔。所有的样品在 37℃ 水浴锅中进行孵育。化合物的最终孵育浓度为 5 μM，对照化合物的最终孵育浓度为 2 μM。每一个时间点孵育结束时，取出相应的孵育板，立即向对应的样品孔中加入 100 μL 超纯水，混匀，然后加入 800 μL 含有 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和拉贝诺尔的乙腈溶液沉淀蛋白。样品板封膜并摇匀后，3220×g 离心 20 分钟。取 150 μL 上清液用 LC/MS/MS 的方法分析。

实验结果：实验结果如表 9 所示。

表 9. 受试化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴的全血稳定性

受试品	种属	240min 下受试化合物含量检测
式 (I) 化合物	CD-1 小鼠	117%
	SD 大鼠	115%
	食蟹猴	77%
	比格犬	102%

实验结论：多种属全血稳定性研究显示式 (I) 化合物在全血中的稳定性良好。

实验例 7：蛋白结合率研究

实验目的：采用平衡透析法测定受试化合物在 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴和人血浆中的蛋白结合率。

实验操作：采用上述五个物种的血浆分别配制化合物浓度为 2μM 的血浆样品，置于 96 孔平衡透析装置中，在 37±1℃ 下用磷酸盐缓冲溶液透析 4 h。本实验采用华法林作为对照化合物。血浆和透析缓冲液中待测物的浓度用 LC-MS/MS 法进行测定。

实验结果：实验结果如表 10 所示。

表 10. 受试化合物 CD-1 小鼠、SD 大鼠、比格犬、食蟹猴、人的蛋白结合率

受试品	种属	蛋白未结合率 (%)
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

实验结论：多种属血浆结合率研究显示式 (I) 化合物在血浆中具有更高的蛋白未结合率。

实验例 8：体内药代动力学研究

1) SD 大鼠口服及静脉注射受试化合物的药代动力学研究

受试化合物与5%二甲基亚砜/95%（10%羟丙基-β-环糊精）溶液混合，涡旋并超声，制备得到1 mg/mL澄清溶液，微孔滤膜过滤后备用。选取7至10周龄的雄性SD大鼠，静脉注射、口服给予候选化合物溶液。收集一定时间的全血，制备得到血浆，以LC-MS/MS方法分析药物浓度，并用Phoenix WinNonlin 软件(美国Pharsight公司)计算药代参数。实验结果如表11所示：

表 11. 受试化合物的药代动力学结果

给药途径	药代动力学参数	式 (I) 化合物
	血浆蛋白未结合率 PPB(Unbond%)	4.8
静脉注射给药	剂量 Dose(mg/kg)	2.0
	半衰期 T _{1/2} (h)	1.9
	清除率 CL (ml/min/kg)	71.5
	表观分布容积 V _{dss} /V _{dss,u} (L/kg)	10.6/221
	血浆浓度-时间曲线下面积 AUC _{0-last} / AUC _u (nM.h)	653/31.3
口服给药	剂量 Dose(mg/kg)	9.8
	达峰时间 T _{max} (h)	1.5
	达峰浓度 C _{max} / C _{max,u} (nM)	220/10.6
	血浆浓度-时间曲线下面积 AUC _{0-last} /AUC _u (nM.h)	995/47.8
	生物利用度 F (%)	30.5%

注：V_{dss,u} 为血浆蛋白未结合下的表观容积分布（V_{dss,u}=V_{dss}/PPB(Unbond%)）；C_{max,u}, AUC_{0-last, u}, 都是血浆蛋白未结合下的相应数值（C_{max,u}= C_{max} x PPB(Unbond%)；AUC_{0-last, u}= AUC_{0-last} x PPB(Unbond%)）

实验结论：PK 研究显示，式 (I) 化合物在大鼠中具有较高的非结合血浆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 晶型的药代动力学研究

精确称量109.72 mg的受试化合物到玻璃瓶中，加入774 uL 0.5% 甲基纤维素(400粘度)水溶液，搅拌5分钟，加入10 mL的0.5% 甲基纤维素(400粘度)水溶液，搅拌5分钟，得均匀的不透明的混悬液。选取7至10周龄的雄性SD大鼠，口服给予候选化合物溶液。收集一定时间的全血，制备得到血浆，以LC-MS/MS方法分析药物浓度，并用Phoenix WinNonlin 软件(美国Pharsight公司)计算药代参数。实验结果如表12所示：

表 12. 受试化合物的药代动力学结果

给药途径	药代动力学参数	式 (II) 化合物的 A 晶型
口服给药	剂量 Dose(mg/kg)	92.3
	达峰时间 T _{max} (h)	5.33
	达峰浓度 C _{max}	1397
	血浆浓度-时间曲线下面积 AUC _{0-last}	11532

实验结论：PK 研究显示，式 (II) 化合物 A 晶型在大鼠中具有高的暴露量

3) CD 小鼠口服及静脉注射受试化合物的药代动力学研究

受试化合物与5%二甲基亚砷/95%（10%羟丙基-β-环糊精）溶液混合，涡旋并超声，制备得到1 mg/mL澄清溶液，微孔滤膜过滤后备用。选取7至10周龄的雄性CD小鼠，静脉注射、口服给予候选化合物溶液。收集一定时间的全血，制备得到血浆，以LC-MS/MS方法分析药物浓度，并用Phoenix WinNonlin 软件(美国Pharsight公司)计算药代参数。实验结果如表13所示：

表 13. 受试化合物的药代动力学结果

给药途径	药代动力学参数	式 (I) 化合物
	血浆蛋白未结合率 PPB(Unbond%)	12.0
静脉注射给药	剂量 Dose(mg/kg)	2.0
	半衰期 T _{1/2} (h)	1.7
	清除率 CL (ml/min/kg)	40.6
	表观分布容积 Vd _{ss} /Vd _{ss,u} (L/kg)	3.9/32.3
	血浆浓度-时间曲线下面积 AUC _{0-last} / AUC _u (nM.h)	1297/155.6
口服给药	剂量 Dose(mg/kg)	10.3
	达峰时间 T _{max} (h)	1.0
	达峰浓度 C _{max} / C _{max,u} (nM)	431/51.7
	血浆浓度-时间曲线下面积 AUC _{0-last} /AUC _u (nM.h)	1422/170.6
	生物利用度 F (%)	21.9%

注：Vd_{ss,u} 为血浆蛋白未结合下的表观容积分布（Vd_{ss,u}=Vd_{ss}/PPB(Unbond%)）；C_{max,u}, AUC_{0-last, u}, 都是血

浆蛋白未结合下的相应数值 ($C_{\max,u}=C_{\max}\times PPB(Unbond\%)$; $AUC_{0-last,u}=AUC_{0-last}\times PPB(Unbond\%)$)

实验结论: PK 研究显示, 式 (I) 化合物在鼠中具有较高的非结合血浆暴露量和良好的口服生物利用度。

4) 比格犬口服受试化合物的药代动力学研究

精确称量680.397mg受试化合物的粉末,加入50 mL 的0.5% 甲基纤维素(400粘度)水溶液,搅拌10min,超声10min。加入50 mL0.5% 甲基纤维素 (400粘度)水溶液,使用匀浆机均质化10min。加入11 mL,超声5min,搅拌10min,加入358 μL 0.5% 甲基纤维素 (400粘度)水溶液,搅拌2min 。选取六个月以上雄性比格犬,口服给予候选化合物溶液。收集一定时间的全血,制备得到血浆,以LC-MS/MS方法分析药物浓度,并用Phoenix WinNonlin 软件(美国Pharsight公司)计算药代参数。实验结果如表14所示: 收集一定时间的全血,制备得到血浆,以LC-MS/MS方法分析药物浓度,并用Phoenix WinNonlin 软件(美国Pharsight公司)计算药代参数。实验结果如表14所示:

表 14. 受试化合物的药代动力学结果

给药途径	药代动力学参数	式 (II) 化合物的 A 晶型
口服给药	剂量 Dose(mg/kg)	24.5
	达峰时间 $T_{\max}$ (h)	2.50
	达峰浓度 $C_{\max}$	2435
	血浆浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-last}	16700

实验结论: PK 研究显示, 式 (II) 化合物的 A 晶型在犬中具有高的暴露量。

实验例 9: 体内药效学研究

人胰腺癌 Mia PaCa-2 细胞裸小鼠皮下移植肿瘤 Balb/c Nude 小鼠模型的体内药效学研究

1. 细胞培养和肿瘤组织准备

细胞培养: 人胰腺癌 Mia PaCa-2 细胞 (ATCC-CRL-1420) 体外单层培养, 培养条件为 DMEM 培养基中加 10%胎牛血清, 2.5%马血清, 37 °C 5%二氧化碳孵箱培养。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%, 数量到达要求时, 收取细胞, 计数, 重悬于适量 PBS 中, 1:1 加入基质胶, 获取细胞密度为 25×10^6 cells/mL 的细胞悬液。

细胞接种: 将 0.2 mL (5×10^6 cells/mouse 个) Mia PaCa-2 细胞 (加基质胶, 体积比为 1:1) 皮下接种于每只小鼠的右后背, 肿瘤平均体积达到 190 mm³ 时, 根据肿瘤体积进行随机分组, 按照表 15 中的方案开始给药。

表 15. 实验动物分组及给药方案

组别	动物数	化合物	剂量 (mg/kg)	给药体积 (μL/g)	给药途径	给药频次
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. 肿瘤测量和实验指标

每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为： $V=0.5a \times b^2$ ， a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。

化合物的抑瘤疗效用 TGI(%)或相对肿瘤增殖率 T/C(%)评价。 相对肿瘤增殖率 $T/C(\%) = TRTV / CRTV \times 100\%$ (TRTV： 治疗组 RTV； CRTV： 阴性对照组 RTV)。根据肿瘤测量的结果计算出相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV)， 计算公式为 $RTV = V_t / V_0$ ， 其中 V0 是分组给药时 (即 D0) 测量所得平均肿瘤体积， Vt 为某一次测量时的平均肿瘤体积， TRTV 与 CRTV 取同一天数据。

TGI (%)， 反映肿瘤生长抑制率。 $TGI(\%)=[1-(\text{某处理组给药结束时平均瘤体积}-\text{该处理组开始给药时平均瘤体积})]/(\text{溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积}-\text{溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积})]\times 100\%$ 。

3. 实验结果

实验结果如图 4、 5 所示。

给药 22 天时结果如表 16 所示

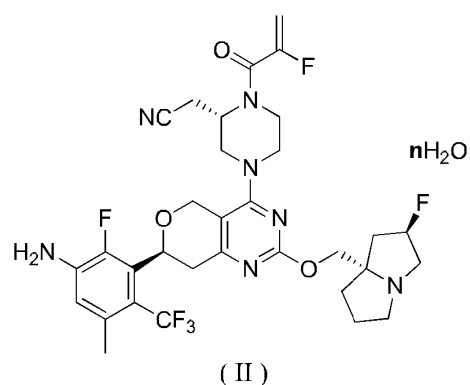
表 16. 给药第 22 天下的 T/C 及 TGI

化合物	给药量	肿瘤体积均值	T/C	TGI
溶媒	N/A	2016.29 mm ³	N/A	N/A
式 (I) 化合物	10 mg/kg	249.87 mm ³	12.39%	93.06%
式 (I) 化合物	30 mg/kg	124.14 mm ³	6.16%	99.64%

实验结论： 式 (I) 化合物具有显著的抑瘤作用， 且小鼠各个剂量组的体重平稳， 无明显不耐受现象。

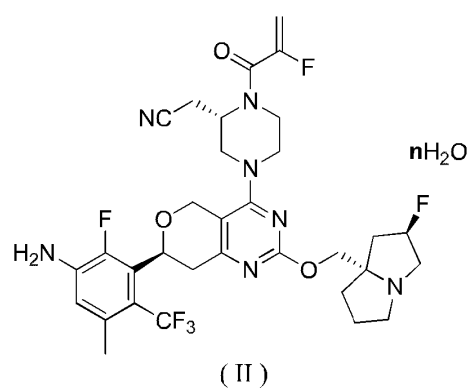
权 利 要 求

1. 式 (II) 化合物,



其中, n 选自 0~3。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 n 选自 0、0.5、1、1.5、2、2.5 和 3。
3. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中 n 选自 2。
4. 根据权利要求 1~3 任意一项所述的式 (II) 化合物的 A 晶型,



其特征在于其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.514 \pm 0.200^\circ$ 、 $14.689 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.122 \pm 0.200^\circ$ 。

5. 根据权利要求 4 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: $6.218 \pm 0.200^\circ$ 、 $8.514 \pm 0.200^\circ$ 、 $12.299 \pm 0.200^\circ$ 、 $14.689 \pm 0.200^\circ$ 、 $16.903 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.122 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.927 \pm 0.200^\circ$ 、 $25.580 \pm 0.200^\circ$ 。
6. 根据权利要求 5 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: $6.218 \pm 0.200^\circ$ 、 $8.514 \pm 0.200^\circ$ 、 $11.663 \pm 0.200^\circ$ 、 $12.299 \pm 0.200^\circ$ 、 $14.689 \pm 0.200^\circ$ 、 $16.903 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.122 \pm 0.200^\circ$ 、 $18.927 \pm 0.200^\circ$ 、 $19.364 \pm 0.200^\circ$ 、 $20.386 \pm 0.200^\circ$ 、 $21.914 \pm 0.200^\circ$ 、 $25.580 \pm 0.200^\circ$ 。
7. 根据权利要求 6 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: 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° 。
8. 根据权利要求 7 所述的 A 晶型, 其 XRPD 图谱如图 1 所示。

9. 根据权利要求 4~8 任意一项所述的 A 晶型，其差示扫描量热曲线在 $115.37^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处具有吸热峰的峰值。
10. 根据权利要求 9 所述的 A 晶型，其 DSC 图谱如图 2 所示。
11. 根据权利要求 4~8 任意一项所述的 A 晶型，其热重分析曲线在 $150.0^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 时失重达 5.379%。
12. 根据权利要求 11 所述的 A 晶型，其 TGA 图谱如图 3 所示。
13. 根据权利要求 1~3 任意一项所述的化合物或 4~12 任意一项所述的 A 晶型在制备治疗实体瘤药物中的应用。
14. 根据权利要求 13 所述的应用，其中，实体瘤为肺癌和直肠癌。