

一种三环四氢异喹啉类衍生物的盐型

本申请要求申请日为 2021 年 7 月 9 日的中国专利申请 2021107799053 的优先权。

本申请引用上述中国专利申请的全文。

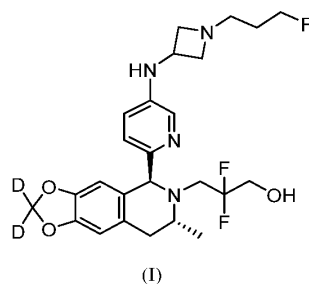
技术领域

本公开涉及一种三环四氢异喹啉类衍生物的盐型及其制备方法、医药用途，属于制药领域。

背景技术

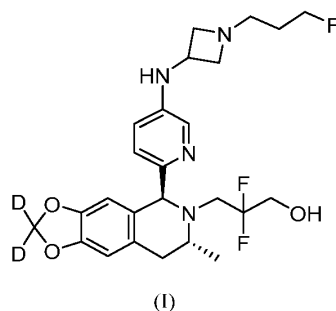
CSCO 乳腺癌诊疗指南（2020 版）中氟维司群针对未经内分泌治疗者的激素受体阳性晚期乳腺癌患者，被调整成为 I 级推荐，新增氟维司群+CDK4/6 抑制剂为 II 级推荐；另外，氟维司群联合 CDK4/6 抑制剂已成为非甾体 AI（NSAI）治疗失败及甾体 AI（SAI）治疗失败患者的 I 级推荐，氟维司群作为目前唯一获批的 SERD，其获批形式为注射剂，为患者用药带来了不便。故寻找新的更有效的 SERD 不仅具有巨大的市场价值也为乳腺癌患者带来了用药上的可选择性及便利性。目前赛诺菲的 SAI439859 作为新一代的可口服的 SERD 抑制剂目前正处于临床 III 期，另外罗氏的 GDC-9545、阿斯利康的 AZD-9833 及 Radius 的 RAD1901 均已进入 III 期。公开的选择性雌激素受体介导的调节剂专利申请包括 WO2014165723、WO2014151899、WO2014141292、WO2014191726、WO2015092634、WO2014135834、WO2014106848 和 EP1113007。

PCT 申请 WO2021139756A 公开了一种式(I)所示的三环四氢异喹啉类衍生物用于雌激素受体下调剂(SERD)，为满足用药需求，对其盐及其晶型进行研究很有必要，



发明内容

本公开提供一种式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐, 所述药学上可接受的盐选自磷酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苹果酸盐或对甲苯磺酸盐,



一些实施方案中, 本公开提供的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐, 其中式 (I) 所示化合物与酸分子的物质的量比选自 1:5-5:1。

一些实施方案中, 本公开提供的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐, 其中式 (I) 所示化合物与酸分子的物质的量比为 1:1。

一些实施方案中, 本公开提供的式 (I) 所示化合物所的药学上可接受的盐, 其中式 (I) 所示化合物与酸分子的物质的量比为 1:3。

一些实施方案中, 本公开提供一种式 (I) 所示化合物的磷酸盐, 其中式 (I) 所示化合物与磷酸分子的物质的量比为 1:3。

本公开提供一种式 (I) 所示化合物的磷酸盐的 I 晶型, 其中式 (I) 所示化合物与磷酸分子的物质的量比为 1:3, 以衍射角 2θ 角度表示的 X-射线粉末衍射图谱, 在 6.1、13.5、19.2、22.3 处有特征峰。

一些实施方案中, 式 (I) 所示化合物的磷酸盐的 I 晶型, 其中式 (I) 所示化合物与磷酸分子的物质的量比为 1:3, 以衍射角 2θ 角度表示的 X-射线粉末衍射图谱, 在 6.1、13.5、13.9、19.2、21.8、22.3、23.4 处有特征峰。

一些实施方案中, 式 (I) 所示化合物的磷酸盐的 I 晶型, 其中式 (I) 所示化合物与磷酸分子的物质的量比为 1:3, 以衍射角 2θ 角度表示的 X-射线粉末衍射图谱, 在 6.1、12.4、13.5、13.9、15.0、16.3、16.9、19.2、20.8、21.8、22.3、23.4、24.1、24.6、26.2、27.5、30.0 处有特征峰。

一些实施方案中, 式 (I) 所示化合物的磷酸盐的 I 晶型, 其中式 (I) 所示化合物与磷酸分子的物质的量比为 1:3, 以衍射角 2θ 角度表示的 X-射线粉末衍射图谱如附图 2 所

示。

一些实施方案中，式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型，其中式(I)所示化合物与磷酸分子的物质的量比为1:3，三斜晶系，轴长 $a = 8.0475(3) \text{ \AA}$ ； $b = 8.0903(3) \text{ \AA}$ ； $c = 84.695(4) \text{ \AA}$ ；轴角 $\alpha = 89.575(2)^\circ$ ； $\beta = 89.859(2)^\circ$ ； $\gamma = 60.745(2)^\circ$ ；晶胞体积 $V = 4810.7(3) \text{ \AA}^3$ 。

本公开提供一种式(I)所示化合物的磷酸盐或式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型的制备方法，包括式(I)所示化合物与磷酸反应的步骤。

本公开提供一种式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型的制备方法，包括以下步骤：

1) 配置式(I)所示化合物的溶剂A溶液，所述溶剂A选自酮类溶剂、酯类溶剂或醚类溶剂；

2) 配置磷酸的溶剂B溶液，所述溶剂B选自水或醇类溶剂；

3) 混合式(I)所示化合物的溶剂A溶液与磷酸的溶剂B溶液后结晶析出。

一些实施方案中，配置式(I)所示化合物的溶剂A溶液，所述溶剂A选自丙酮、乙酸乙酯或甲基叔丁基醚。

一些实施方案中，配置磷酸的溶剂B溶液，所述溶剂B选自甲醇、乙醇或水。

本公开提供一种式(I)所示化合物的硫酸盐，其中式(I)所示化合物与硫酸分子的物质的量比为1:1。

本公开提供一种式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型，中式(I)所示化合物与硫酸分子的物质的量比为1:1，以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱，在6.6、7.9、15.1、20.7、22.1处有特征峰。

一些实施方案中，式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型，中式(I)所示化合物与硫酸分子的物质的量比为1:1，以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱，在6.6、7.9、13.4、14.5、15.1、19.3、19.8、20.7、22.1、24.8、25.4、25.7、27.6处有特征峰。

一些实施方案中，式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型，中式(I)所示化合物与硫酸分子的物质的量比为1:1，以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱，在6.6、7.9、11.6、13.4、14.5、15.1、15.9、18.1、19.3、19.8、20.7、22.1、24.0、24.8、25.4、25.7、27.2、27.6、28.3、29.2处有特征峰。

一些实施方案中，式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型，中式(I)所示化合物与硫酸分子的物质的量比为1:1，以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱如附图8所示。

一些实施方案中，式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型，中式(I)所示化合物与硫酸分子的物质的量比为1:1，单斜晶系，轴长 $a=9.7051(11)\text{Å}$ ； $b=26.208(3)\text{Å}$ ； $c=12.1065(13)\text{Å}$ ；轴角 $\beta=90^\circ$ ；晶体体积 $V=3079.3(6)\text{Å}^3$ 。

本公开提供一种(I)所示化合物的硫酸盐或式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型的制备方法，包括式(I)所示化合物与硫酸反应的步骤。

本公开提供一种式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型的方法，包括以下步骤：

- 1) 配置式(I)所示化合物的溶剂A溶液，所述溶剂A选自酮类溶剂、酯类溶剂、腈类溶剂或醇类溶剂；
- 2) 配置硫酸的溶剂B溶液，所述溶剂B选自水、腈类溶剂或醇类溶剂；
- 3) 混合式(I)所示化合物的溶剂A溶液与硫酸的溶剂B溶液后结晶析出。

一些实施方案中，配置式(I)所示化合物的溶剂A溶液，所述溶剂A选自丙酮、乙酸乙酯、乙腈、甲醇或乙醇。

一些实施方案中，配置硫酸的溶剂B溶液，所述溶剂B选自甲醇、乙腈、乙醇或水。

本公开提供一种式(I)所示化合物的柠檬酸盐的无定型。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的柠檬酸盐的方法，包括式(I)所示化合物与柠檬酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种式(I)所示化合物的L-酒石酸盐的无定型。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的L-酒石酸盐的方法，包括式(I)所示化合物与L-酒石酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的盐酸盐的方法，包括式(I)所示化合物与盐酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的氢溴酸盐的方法，包括式(I)所示化合物与氢溴酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的甲磺酸盐的方法，包括式(I)所示化合物与甲磺酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的甲酸盐的方法，包括式(I)所示化合物与甲酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的乙酸盐的方法，包括式(I)所示化合物与乙酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的琥珀酸盐的方法,包括式(I)所示化合物与琥珀酸反应的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的马来酸盐的方法,包括式(I)所示化合物与马来酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的苹果酸盐的方法,包括式(I)所示化合物与苹果酸反应成盐的步骤。

本公开提供一种制备式(I)所示化合物的对甲苯磺酸盐的方法,包括式(I)所示化合物与对甲苯磺酸反应成盐的步骤。

一些实施方案中,本公开提供的式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型或式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型,以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱中特征峰 2θ 角的误差范围为 ± 0.2 。

另一方面,本公开提供一种药物组合物,包含以下成分:

- 1) 式(I)所示化合物磷酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苹果酸盐或对甲苯磺酸盐、式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型或式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型、式(I)所示化合物的柠檬酸盐的无定型、式(I)所示化合物的L-酒石酸盐的无定型,或其混合物;和
- 2) 任选自药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

另一方面,本公开提供一种药物组合物的制备方法,包括将

- 1) 式(I)所示化合物磷酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苹果酸盐或对甲苯磺酸盐、式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型或式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型、式(I)所示化合物的柠檬酸盐的无定型、式(I)所示化合物的L-酒石酸盐的无定型,或其混合物;和
- 2) 任选自药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合的步骤。

本公开另一方面提供上述式(I)所示化合物磷酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苹果酸盐或对甲苯磺酸盐、式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型或式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型、式(I)所示化合物的柠檬酸盐的无定型、式(I)所示化合物的L-酒石酸盐的无定型,或其混合物、组合物在制备雌激素受体下调剂(SERD)中的用途。

本公开另一方面提供上述式(I)所示化合物磷酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、

盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苹果酸盐或对甲苯磺酸盐、式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型或式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型、式(I)所示化合物的柠檬酸盐的无定型、式(I)所示化合物的L-酒石酸盐的无定型，或其混合物、组合物在制备预防和/或治疗癌症的药物中的用途，其中所述的癌症优选选自乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、宫颈癌、皮肤癌、前列腺癌、卵巢癌、输卵管肿瘤、血友病和白血病。

本公开另一方面提供上述式(I)所示化合物磷酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苹果酸盐或对甲苯磺酸盐、式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型或式(I)所示化合物的硫酸盐的A晶型、式(I)所示化合物的柠檬酸盐的无定型、式(I)所示化合物的L-酒石酸盐的无定型，或其混合物、组合物在制备预防和/或治疗雌激素受体介导的或依赖性的疾病或病症的药物中的用途；优选地，其中所述的雌激素受体介导的或依赖性的疾病或病症选自癌症、中枢神经系统缺陷、心血管系统缺陷、血液系统缺陷、免疫及炎症疾病、易感性感染、代谢缺陷、神经缺陷、精神缺陷和生殖缺陷；优选地，其中所述的癌症选自乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、宫颈癌、皮肤癌、前列腺癌、卵巢癌、输卵管肿瘤、血友病和白血病；更优选，其中所述的癌症选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌和子宫癌。

本公开所述的“ 2θ 或 2θ 角度”是指衍射角， θ 为布拉格角，单位为°或度；每个特征峰 2θ 的误差范围为 ± 0.20 ，具体可以为-0.20、-0.19、-0.18、-0.17、-0.16、-0.15、-0.14、-0.13、-0.12、-0.11、-0.10、-0.09、-0.08、-0.07、-0.06、-0.05、-0.04、-0.03、-0.02、-0.01、0.00、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20。

本公开所述的“结晶析出”包括但不限于搅拌结晶、降温析晶、溶析结晶和挥发结晶。

本公开中所述的“差示扫描量热分析或 DSC”是指在样品升温或恒温过程中，测量样品与参考物之间的温度差、热流差，以表征所有与热效应有关的物理变化和化学变化，得到样品的相变信息。

本公开中所述干燥温度一般为 25°C-100°C，优选 40°C-70°C，可以常压干燥，也可以减压干燥。

本公开中数值为仪器测量值或仪器测量后计算值，存在一定程度的误差，一般而言，正负 10%均属于合理误差范围内。当然需要考虑该数值所用之处的上下文，例如，总杂质的含量，该数值为测量后误差变化不超过正负 10%，可以为正负 9%、正负 8%、正负 7%、正负 6%、正负 5%、正负 4%、正负 3%、正负 2%或正负 1%，优选正负 5%。

本公开晶型制备方法中所用的起始原料可以是任意形式的式 I 所示化合物，具体形

式包括但不限于：无定形、任意晶型、水合物、溶剂合物等。

本公开所述的“析晶”包括但不限于搅拌析晶、降温析晶、打浆析晶和挥发析晶。

附图说明

- 图 1、式 (I) 所示化合物无定型的 XRPD 谱图；
- 图 2、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的 XRPD 谱图；
- 图 3、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的 TGA 谱图；
- 图 4、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的 DSC 谱图；
- 图 5、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的 DVS 后的 XRPD 谱图；
- 图 6、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的 DVS 谱图；
- 图 7、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的单晶谱图；
- 图 8、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的 XRPD 谱图；
- 图 9、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的 TGA 谱图；
- 图 10、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的 DSC 谱图；
- 图 11、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的 DVS 谱图；
- 图 12、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的单晶谱图；
- 图 13、式 (I) 所示化合物酒石酸盐无定型的 XRPD 谱图；
- 图 14、式 (I) 所示化合物柠檬酸盐无定型的 XRPD 谱图。

具体实施方式

通过以下实施例和实验例进一步详细说明本发明。这些实施例和实验例仅用于说明性目的，而并不用于限制本发明的范围。

实验所用仪器的测试条件：

化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或/和质谱(MS)来确定的。NMR 位移(δ)以 10^{-6} (ppm) 的单位给出。NMR 的测定是用 Bruker AVANCE-400 核磁仪或 Bruker AVANCE NEO 500M, 测定溶剂为氘代二甲基亚砷(DMSO- d_6)、氘代氯仿($CDCl_3$)、氘代甲醇(CD_3OD)，内标为四甲基硅烷(TMS)。

MS 的测定用 Agilent 1200 /1290 DAD- 6110/6120 Quadrupole MS 液质联用仪(生产商：Agilent, MS 型号：6110/6120 Quadrupole MS)、waters ACQuity UPLC-QD/SQD(生产商：waters, MS 型号：waters ACQuity Qda Detector/waters SQ Detector)、THERMO Ultimate 3000-Q Exactive (生产商：THERMO, MS 型号：THERMO Q Exactive)。

高效液相色谱法(HPLC)分析使用 Agilent HPLC 1200DAD、Agilent HPLC 1200VWD 和 Waters HPLC e2695-2489 高压液相色谱仪。

手性 HPLC 分析测定使用 Agilent 1260 DAD 高效液相色谱仪。

高效液相制备使用 Waters 2767、Waters 2767-SQ Detecor2、Shimadzu LC-20AP 和 Gilson-281 制备型色谱仪。

手性制备使用 Shimadzu LC-20AP 制备型色谱仪。

CombiFlash 快速制备仪使用 Combiflash Rf200 (TELEDYNE ISCO)。

XRPD 为 X 射线粉末衍射检测：测定使用 BRUKER D8 DISCOVER 型 X 射线衍射仪进行，具体采集信息：Cu 阳极(40kV, 40mA)，Cu-K α 射线($\lambda=1.5418\text{\AA}$)。扫描方式： $\theta/2\theta$ ，扫描范围(2θ 范围)：3~48°。

DSC 为差示扫描量热：测定采用 METTLER TOLEDO DSC 3+差示扫描量热仪，升温速率 10°C/min，温度具体范围参照相应图谱(25-240°C)，氮气吹扫速度 50 mL/min。

TGA 为热重分析：检测采用 METTLER TOLEDO TGA 2 型热重分析仪，升温速率 10°C/min，温度具体范围参照相应图谱(30-350°C)，氮气吹扫速度 20 mL/min。

DVS 为动态水分吸附：检测采用 SMS DVS Advantage，在 25°C，湿度变化为 50%-95%-0%-95%-50%，步进为 10%(最后一步为 5%)(湿度具体范围以相应图谱为准，此处所列为大多使用方法)，判断标准为 $dm/dt \leq 0.002\%$ 。

薄层层析硅胶板使用烟台黄海 HSGF254 或青岛 GF254 硅胶板，薄层色谱法(TLC)使用的硅胶板采用的规格是 0.15 mm~0.2 mm，薄层层析分离纯化产品采用的规格是 0.4 mm~0.5 mm。

硅胶柱色谱法一般使用烟台黄海硅胶 200~300 目硅胶为载体。

激酶平均抑制率及 IC₅₀ 值的测定用 NovoStar 酶标仪(德国 BMG 公司)。

本公开的已知的起始原料可以采用或按照本领域已知的方法来合成，或可购买自 ABCR GmbH & Co. KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, 韶远化学科技(Accela ChemBio Inc)、达瑞化学品等公司。

实施例若无特殊说明，反应均能够在氩气氛或氮气氛下进行。

氩气氛或氮气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氩气或氮气气球。

氢气氛是指反应瓶连接一个约 1L 容积的氢气气球。

加压氢化反应使用 Parr 3916EKX 型氢化仪和清蓝 QL-500 型氢气发生器或 HC2-SS 型氢化仪。

氢化反应通常抽真空，充入氢气，反复操作 3 次。

微波反应使用 CEM Discover-S 908860 型微波反应器。

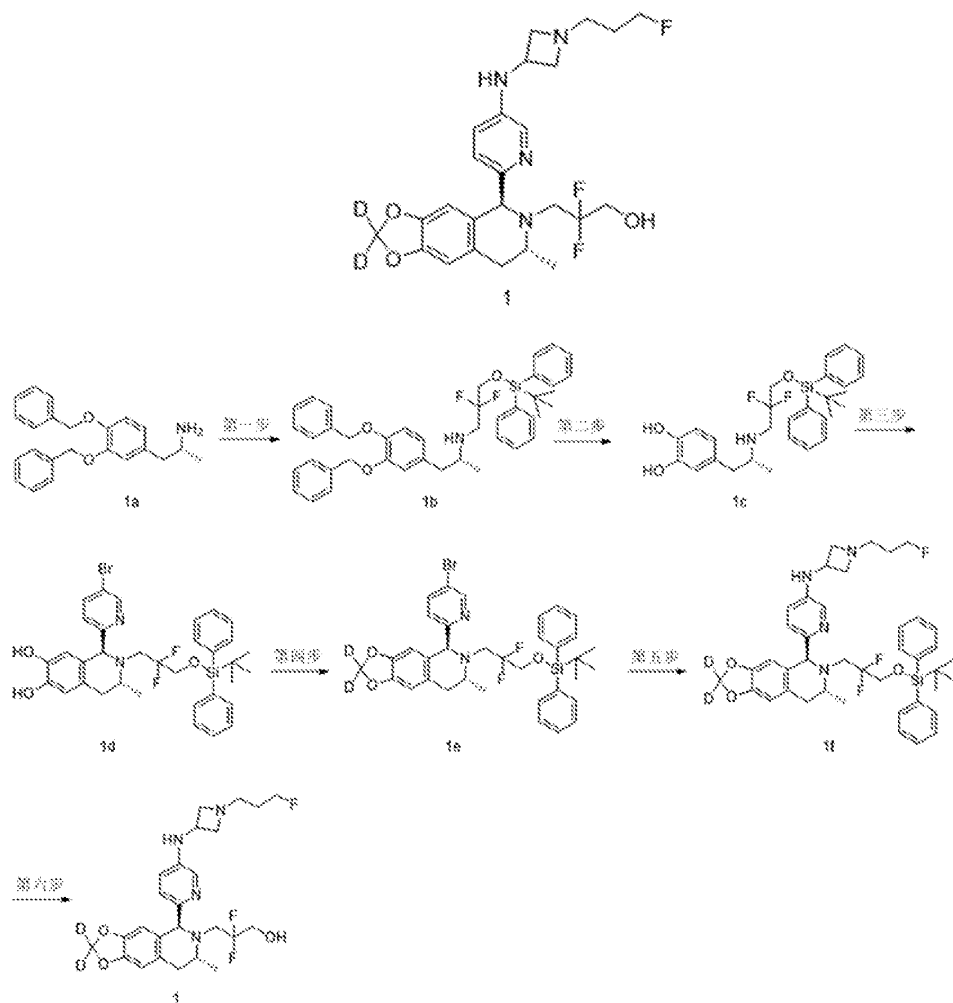
实施例若无特殊说明，溶液是指水溶液。

实施例若无特殊说明，反应的温度为室温，为 20 施~30 例。

实施例中的反应进程的监测采用薄层色谱法(TLC)，反应所使用的展开剂，纯化化合物采用的柱层析的洗脱剂的体系和薄层色谱法的展开剂体系包括：A：二氯甲烷/甲醇体系，B：正己烷/乙酸乙酯体系，C：石油醚/乙酸乙酯体系，溶剂的体积比根据化合物的极性不同而进行调节，也可以加入少量的三乙胺和醋酸等碱性或酸性试剂进行调节。

实施例 1、式 1 所示化合物的制备（优先权为：202010680491.4 的申请中实施例 13 的制备方法）

2,2-二氟-3-((5*S*,7*R*)-5-(5-((1-(3-氟丙基)氮杂环丁-3-基)氨基)吡啶-2-基)-7-甲基-7,8-二氢-[1,3]二氧杂戊环并[4,5-*g*]异喹啉-6(5*H*)-基-2,2-*d*₂)丙-1-醇 1



第一步

(*R*)-*N*-(1-(3,4-二(苄氧基)苯基)丙-2-基)-3-((叔丁基二苯基硅基)氧基)-2,2-二氟丙-1-胺 1b

将化合物 1a (1.0 g, 3.0 mmol)溶于二氧六环(20 mL)，加入二异丙基乙胺(1.2 g, 9.0 mmol)，3-((叔丁基二苯基硅基)氧基)-2,2-二氟丙基三氟甲磺酸酯(1.0 g, 2.0 mmol，采用公知的方法“*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2018, 28(14), 2528-2532”制备而得)，

氩气保护下反应在油浴 80℃搅拌 20 小时。冷却反应液，减压浓缩，加入饱和碳酸氢钠溶液(50 mL)，用乙酸乙酯萃取(100 mL×2)，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，使用柱层析以展开剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题化合物 **1b** (1.7 g)，产率：84%。MS m/z (ESI): 680.2 [M+1]。

第二步

(R)-4-(2-((3-((叔丁基二苯基硅基)氧基)-2,2-二氟丙基)氨基)丙基)苯-1,2-二酚 **1c**

将化合物 **1b** (1.4 g, 2.0 mmol)溶于甲醇(10 mL)，氩气保护，加入氢氧化钾(0.2 g)，氢气球加氢搅拌 3 小时，停止搅拌，过滤，滤液减压浓缩，得到标题化合物 **1c** (0.9 g)，产率：94%。

第三步

(1S,3R)-1-(5-溴吡啶-2-基)-2-(3-((叔丁基二苯基硅基)氧基)-2,2-二氟丙基)-3-甲基-1,2,3,4-四氢异喹啉-6,7-二酚 **1d**

将化合物**1c** (0.8 g, 1.6 mmol)溶于甲苯(10 mL)，加入乙酸(0.2 g, 3.2 mmol)，5-溴吡啶醛(0.6 g, 3.2 mmol)。油浴80℃搅拌反应16小时，停止反应。冷却反应，减压浓缩，加入水(10 mL)，缓慢加入饱和碳酸氢钠溶液(20 mL)调节反应液pH至8左右，用乙酸乙酯萃取(10 mL×2)，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，使用柱层析以展开剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题化合物**1d** (256 mg)，产率75%。

MS m/z(ESI): 667.1 [M+1]。

第四步

(5S,7R)-5-(5-溴吡啶-2-基)-6-(3-((叔丁基二苯基硅基)氧基)-2,2-二氟丙基)-7-甲基-5,6,7,8-四氢-[1,3]二氧杂戊环并[4,5-*g*]异喹啉-2,2-*di* **1e**

将化合物 **1d** (350 mg, 0.5 mmol)溶于 *N,N*-二甲基甲酰胺(10 mL)，加入二溴二氟甲烷(277 mg, 1.6 mmol)，碳酸铯(512 mg, 1.6 mmol)。油浴 70℃搅拌反应 16 小时，停止反应。冷却反应，减压浓缩，加入水(10 mL)，用乙酸乙酯萃取(10 mL×2)，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，使用柱层析以展开剂体系 B 纯化所得残余物，得到标题化合物 **1e** (170 mg)，产率：48%。

MS m/z(ESI): 681.1 [M+1]。

第五步

6-((5*S*,7*R*)-6-(3-((叔丁基二苯基硅基)氧基)-2,2-二氟丙基)-7-甲基-5,6,7,8-四氢-[1,3]二氧杂戊环并[4,5-*g*]异喹啉-5-基-2,2-*d*₂)-*N*-(1-(3-氟丙基)氮杂环丁-3-基)吡啶-3-胺 **1f**

将化合物 **1e** (170 mg, 0.25 mmol)溶于二氧六环(10 mL), 加入化合物 1-(3-氟丙基)氮杂环丁-3-胺(采用专利申请“WO2019228443 中说明书第 50 页实施例 1”公开的方法制备而得)(44 mg, 0.3 mmol), 2,2'-双-(二苯膦基)-1,1'-联萘(12 mg, 0.02 mmol), 三(二亚苄基丙酮)二钯(20 mg, 0.02 mmol), 叔丁醇钠(29 mg, 0.3 mmol), 氩气保护。油浴 80℃搅拌反应 16 小时, 停止反应。冷却反应液, 浓缩, 加入饱和碳酸氢钠溶液(10 mL), 用乙酸乙酯萃取(10 mL×2), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 使用柱层析以展开剂体系 B 纯化所得残余物, 得到标题化合物 **1f** (47 mg), 产率 51%。

第六步

2,2-二氟-3-((5*S*,7*R*)-5-(5-((1-(3-氟丙基)氮杂环丁-3-基)氨基)吡啶-2-基)-7-甲基-7,8-二氢-[1,3]二氧杂戊环并[4,5-*g*]异喹啉-6(5*H*)-基-2,2-*d*₂)丙-1-醇 **1**

将化合物 **1f** (103 mg, 0.14 mmol)溶于二氯甲烷中(5 mL), 冰浴下滴加 1 M 正四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液(1 mL), 滴毕, 室温下搅拌 1.5 小时, 减压浓缩, 加入饱和碳酸氢钠溶液(5 mL), 用乙酸乙酯萃取(5 mL×3), 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤(5 mL), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 使用柱层析以展开剂体系 B 纯化所得残余物, 得到标题化合物 **1** (11 mg), 产率 42%。

MS *m/z* (ESI): 495.2 [*M*+1]。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 7.80 (d, 1H), 7.04 (d, 1H), 6.94 (dd, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.64 (br, 2H), 4.54-4.52 (m, 1H), 4.45-4.42 (m, 1H), 4.15-4.10 (m, 1H), 3.85-3.83 (m, 2H), 3.76-3.68 (m, 1H), 3.64-3.56 (m, 1H), 3.14-2.97 (m, 4H), 2.78-2.68 (m, 3H), 2.59-2.52 (m, 1H), 1.84-1.74 (m, 2H), 1.05 (d, 3H)。

经 X-射线粉末衍射检测, 将该产物为无定形, XRPD 谱图如图 1。

生物学评价

以下结合测试例进一步描述解释本公开, 但这些实施例并非意味着限制本公开的范围。

测试例 1 本公开化合物对 E 与 ER 的结合的抑制作用

本公开化合物对 E (estrogen, 雌激素) 与 ER (estrogen receptor, 雌激素受体) 的结合具有抑制作用, 从而阻断 E 和 ER 的复合物与 ERE (雌激素应答元件) 结合, 继而阻

断了下游的荧光素酶蛋白的表达。本公开化合物对 E 与 ER 结合作用的抑制效果通过以下的方法进行测试。

1、实验目的

本实验的目的是为了测试化合物对 E 与 ER 结合的抑制作用，根据 IC₅₀ 大小评价化合物的体外活性。

2、实验方法

将 ERE 克隆至荧光素酶基因的上游，通过转染 MCF-7 (TCHu74，中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)，挑选出 MCF-7/ERE-荧光素酶(luciferase)单克隆细胞。在 96 孔板中用含 10%活性炭处理 (charcoal stripped) FBS (Moregate, FBSF)，1%丙酮酸钠 (sigma, S8636)，1%非必需氨基酸 (sigma, M7145) 和 500μg/ml G418 的 MEM (hyclone, SH30024.01B) 培养基接种 MCF-7/ERE-荧光素酶细胞，接种密度为 30,000 个细胞/孔，细胞在 37℃，5%CO₂ 条件下培养。将药物配置成 20mM 的储存液，用 100%DMSO 以 10 倍梯度稀释，再用培养基稀释 20 倍。细胞培养 24 小时后去掉培养基，每孔加入 0.1nM 雌二醇 (sigma, E2758) 和 10μL 用培养基稀释好的药物，对照组加入 DMSO，轻轻振荡混匀。放置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养，24 小时后弃去细胞培养液，加入 50μL/孔配制好的荧光素酶底物 (Promega, E6110)，室温避光放置 10-15 分钟，测定化学发光信号值。

3、测试结果

本公开中化合物对 E 与 ER 的结合的抑制作用通过以上的实验进行测定，用 Graphpad Prism 对化学发光信号值与化合物的对数浓度分析，得出化合物的 IC₅₀ 值，结果参见表 1。

表 1. 本公开中化合物对 E 与 ER 的结合的抑制作用

化合物编号	IC ₅₀ (nM)
1	0.69

结论：本公开所要保护的化合物对 E 与 ER 的结合有明显的抑制作用。

测试例 2 本公开化合物对 MCF-7 细胞增殖的抑制效应

1、实验目的

本实验的目的是采用 ATP 法测试本公开化合物对 MCF-7 细胞增殖活性的抑制作用，根据 IC₅₀ 大小评价化合物的体外活性。

2、实验方法

在 96 孔板中接种 MCF-7 (TCHu74，中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)，培养基为含 10%FBS (Gibco, 10099-141)，1%丙酮酸钠 (sigma, S8636)，1%非必需氨基酸 (sigma, M7145) 的 MEM (hyclone, SH30024.01B) 培养基，接种密度为 4,000 个细胞/孔，细胞在 37℃，5%CO₂ 条件下培养。将化合物配置成 20mM 的储存液，用

100%DMSO 梯度稀释成 1000X 终浓度，再用含 2%FBS 的培养基稀释 20 倍。培养 24 小时后去掉培养基，每孔加入 90μL 含 2%FBS 的培养基和 10μL 药物，对照组加入 10μL DMSO，轻轻振荡混匀，空白组只含 100μL 2%FBS 培养基，放置 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养，72 小时后每孔加入 50μL 混合后的 Cell Titer-Glo (Promega, G7571)，振荡混匀，室温放置 10 分钟，测定化学发光信号值。

3、数据分析

用 Graphpad Prism 对化学发光信号值与化合物的对数浓度作图，得出化合物的 IC₅₀ 值，结果参见表 2。

表 2.本公开化合物对 MCF-7 细胞增殖的抑制效应

化合物编号	IC ₅₀ (nM)
1	0.29

测试例 3 本公开化合物对表达 ERα 突变体 MCF7 细胞增殖抑制实验生物学评价

1、实验目的

本实验的目的是测定本公开化合物对表达 ERα 突变体 MCF7 细胞增殖的抑制活性。

2、实验方法

定点突变和细胞系构建

人雌激素受体 α (estrogen receptor α, ERα) 蛋白的突变体 ERα Y537S 使用双引物 PCR 的方式以野生型 ESR1 基因的 cDNA (Accession No. NM000125) 为模板进行定点突变获得。突变所使用的引物序列如下 (下划线标出的核苷酸为突变的位点)：Y537S: F-AAG AAC GTG GTG CCC CTC TCT GAC CTG CTG CTG GAG ATG(SEQ ID NO: 1); R-CAT CTC CAG CAG CAG GTC AGA GAG GGG CAC CAC GTT CTT(SEQ ID NO: 2)。将突变体 ESR1 的 cDNA 克隆至目标慢病毒载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 上。然后将带有突变体 ESR1 基因序列的慢病毒质粒以及慢病毒包装质粒通过 Lipofectamine 3000 Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific, Cat# L3000075) 转染到 HEK-293T 细胞 (ATCC, CRL-3216) 中。转染后 48 小时，将带有病毒的培养基上清过滤、超速离心获得病毒沉淀，用适量的培养基重悬溶解后，加入到 MCF7 细胞 (ATCC, HTB-22) 中，并加入终浓度为 8 μg/ml 的聚凝胺(polybrene)孵育过夜。转染两天后，在细胞培养液中加入 1 μg/ml 的嘌呤霉素进行抗性筛选，约两周后得到能够稳定表达 ERαY537S 突变体的 MCF7 细胞系。

细胞增殖抑制实验

将表达 ERα 突变体的 MCF7 细胞用含有 10% 胎牛血清的 MEM (GE Healthcare, SH30024.01) 完全培养基进行培养。实验第一天，使用完全培养基将细胞以 3,000 个/孔的密度种于 96 孔板，每孔 100 μL 细胞悬液，放置 37℃，5% CO₂ 的细胞培养箱培养过夜。第

二天吸掉培养基，每孔更换为135 μL 含有2% 胎牛血清的MEM不完全培养基，同时每孔加入15 μL 用不完全培养基配制的不同浓度的待测化合物，化合物的终浓度是从100 nM开始进行4倍梯度稀释的9个浓度点，设置含有0.5% DMSO的空白对照，放置37°C，5% CO_2 的细胞培养箱培养144小时。第八天，取出96孔细胞培养板，每孔加入150 μL CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G7573)，室温放置10分钟后，使用多标记微孔板酶标仪 (PerkinElmer, VICTOR 3) 读取发光信号值，用Graphpad Prism软件根据化合物的浓度和发光信号值计算化合物抑制活性的 IC_{50} 值见表3。

3、测试结果

表3. 本公开化合物对表达ER α 突变体MCF7细胞增殖的抑制效应的 IC_{50} 值

化合物编号	IC_{50} (nM)
1	1.36

结论：本公开所要保护的化合物对表达ER α 突变体的MCF7细胞增殖具有明显的抑制作用。

测试例 4 本公开化合物对 ER α 降解作用

1、实验目的

测试本公开化合物引起 ER α 降解作用，该方法用来测定本公开化合物对 ER α 的降解作用。

2、实验方法

ER α 阳性乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞用含有 10% 胎牛血清 (Corning, 35-010-CV) 的 DMEM/F12 培养基 (HyClone, SH30023.01) 进行培养。实验第一天，消化细胞后，用含有 5% 活性炭处理的胎牛血清 (BIOSUN, BS-0004-500) 的无酚红 DMEM/F12 培养基 (ThermoFisher, 11039-021) 将细胞洗一遍后重悬细胞并计数，将细胞密度调整为 1.79×10^5 个/mL。在 48 孔板 (Corning, 3548) 中每孔加入 280 μL 细胞悬液，将细胞放置于 37°C，5% CO_2 培养箱中培养过夜。实验第二天将化合物用 DMSO 进行梯度稀释，并用含有 5% 活性炭处理胎牛血清的无酚红 DMEM/F12 培养基进一步稀释。在 48 孔板细胞中每孔加入 20 μL 稀释后的化合物，终浓度分别是 3000，300，30，3，0.3，0.03 和 0.003 nM。将 48 孔板在培养箱中放置 16 至 18 小时。使用人 ER α /NR3A1 总蛋白检测试剂盒 (R&D, DYC5715-5) 中的俘获抗体包被 96 孔板，将俘获抗体用 PBS 配制成 1 $\mu\text{g/mL}$ ，并在 96 孔板 (Corning, 3590) 中每孔加入 100 μL ，置于 26°C 孵箱中放置过夜。实验第三天，将包被抗体的 96 孔板用 PBS 洗一遍，每孔加入 200 μL 含有 1% BSA 的 PBS，置于 37°C 孵

箱中孵育 1.5 小时进行封闭。弃去细胞培养基上清，用 PBS 将细胞洗一遍，每孔中加入 60 μL 细胞裂解液。细胞裂解液为含有 6M 尿素、1mM EDTA、0.5% TritonX-100、1mM PMSF 以及蛋白酶抑制剂（Roche, 04693159001）的 PBS。将细胞放置在冰上裂解 15 分钟，然后加入 300 μL 每孔的含有 1 mM EDTA 和 0.5% TritonX-100 的 PBS 将尿素稀释至 1 M。将封闭后的 96 孔板中的封闭液弃去，每孔加入 100 μL 稀释后的细胞裂解液，放置于 37°C 孵箱孵育 2 小时，用 PBS 洗板五遍。用含有 1% BSA 的 PBS 将生物素化的检测抗体稀释至 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ，然后每孔加入 100 μL 检测抗体，置于 37°C 孵箱孵育 1 小时。然后再将孔板洗五遍，每孔加入 100 μL 用含有 1% BSA 的 PBS 稀释 200 倍的亲和素-HRP，置于 37°C 孵育 30 分钟。再将孔板洗五遍，每孔加入 100 μL 的 TMB 底物，室温孵育至出现蓝色，每孔加入 100 μL 终止液。使用 PHERAstar 多功能酶标仪读取 OD450 信号值。用 Graphpad Prism 软件计算化合物抑制活性的 IC_{50} 值。化合物最大降解率为 3000 nM 化合物处理后细胞剩余 $\text{ER}\alpha$ 的水平与 3000 nM 氟维司群（Fulvestrant）处理细胞后细胞剩余 $\text{ER}\alpha$ 水平的比值。

3、测试结果

本公开化合物对 $\text{ER}\alpha$ 降解作用所测得的 EC_{50} 值见表 4。

表 4. 本公开化合物对 $\text{ER}\alpha$ 降解作用

实施例编号	EC_{50} (nM)	E_{max} 降解 (%)
氟维司群	0.06	100
1	0.38	107

结论：本公开所要保护的化合物对 $\text{ER}\alpha$ 有明显的降解作用。

测试例 5、本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 咪达唑仑代谢位点的酶活性的抑制作用

本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 咪达唑仑代谢位点的酶活性采用如下实验方法测定：

一、实验材料及仪器

1. 磷酸缓冲液(20×PBS，购买自生工)，
2. NADPH(ACROS, A2646-71-1)，
3. 人肝微粒体(Corning Gentest, Cat No, 452161, Lot No.9050002,Donor,36)，
4. ABI QTrap 4000 液质两用仪(AB Sciex)，
5. ZORBAX Extend-C18, 3×50mm, 3.5 μm (美国安捷伦公司)，

6. CYP 探针底物(咪达唑仑,TRC,M343000/3 μ M)和阳性对照抑制剂(酮康唑,SIGMA, Cat No. K1003-100MG)。

二、实验步骤

配置 100mM 的 PBS 缓冲液,用该缓冲液配制 0.25mg/mL 的微粒体溶液和 7.5mM 的 $MgCl_2$ 和 5mM 的 NADPH 溶液,用 DMSO 将浓度为 30mM 的储备液稀释成浓度为 30mM、10mM、3mM、1mM、0.3mM、0.03mM、0.003mM、0mM 的系列溶液 I,再用磷酸缓冲液(PBS),将上述系列溶液 I 稀释 200 倍得到系列待测溶液 II(150、50、15、5、1.5、0.15、0.015、0 μ M)。用 PBS 稀释至 15 μ M 浓度的咪达唑仑工作液。

分别取配制在 7.5mM $MgCl_2$ 中的 0.25mg/mL 的微粒体溶液 40 μ L,再分别取 15 μ M 的咪达唑仑工作液和化合物工作液(150、50、15、5、1.5、0.15、0.015、0 μ M)各 20 μ L,混合均匀。阳性对照组用相同浓度的酮康唑代替化合物。同时将 5mM 的 NADPH 溶液一起在 37°C 预孵育 5 分钟。5 分钟之后每个孔中加入 20 μ L NADPH,启动反应,孵育 30 分钟。所有孵育样品设双样本。30 分钟后向所有样本中加入 250 μ L 含内标的乙腈,混匀,800rpm 摇 10 分钟,然后 3700 rpm 离心 10 分钟。取 100 μ L 的上清液与 80 μ L 的超纯水混匀,转移至 LC-MS/MS 分析。

数值经 Graphpad Prism 计算得到药物对 CYP3A4 咪达唑仑代谢位点的 IC_{50} 值见表 5。

表 5. 本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的咪达唑仑代谢位点的 IC_{50} 值

化合物编号	$IC_{50}(\mu M)$
1	15.38

结论:本公开所要保护的化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的咪达唑仑代谢位点抑制作用弱,表现出更好的安全性,提示不会发生基于 CYP3A4 代谢咪达唑仑代谢位点的代谢性药物相互作用。

测试例 6、本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 酮代谢位点的酶活性的抑制作用
本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 酮代谢位点的酶活性采用如下实验方法测定:

一、实验材料及仪器

1. 磷酸缓冲液(20 $\times$ PBS, 购买自生工),
2. NADPH(ACROS, A2646-71-1),
3. 人肝微粒体(Corning Gentest, Cat No, 452161, Lot No.905002, Donor36),
4. ABI QTrap 4000 液质两用仪(AB Sciex),
5. ZORBAX Extend-C18, 3 $\times$ 50mm, 3.5 μ m(美国安捷伦公司),
6. CYP 探针底物(酮,沃凯, CAS No.[58-22-0]/75 μ M),和阳性对照抑制剂(酮康唑,SIGMA, Cat No. K1003-100MG)。

二、实验步骤

配置 100mM 的 PBS 缓冲液,配置 100mM 的 PBS 缓冲液,用该缓冲液配制 0.25mg/ml

的微粒体溶液和 7.5mM 的 $MgCl_2$ 和 5mM 的 NADPH 溶液, 用 DMSO 将浓度为 30mM 的储备液稀释成浓度为 30 mM、10mM、3mM、1mM、0.3mM、0.03mM、0.003mM、0mM 的系列溶液 I, 再用磷酸缓冲液(PBS), 将上述系列溶液 I 稀释 200 倍得到系列待测溶液 II(150、50、15、5、1.5、0.15、0.015、0 μ M)。用 PBS 稀释至 375 μ M 浓度的睾酮工作液。

取配制在 7.5mM $MgCl_2$ 中的 0.25mg/mL 的微粒体溶液 40 μ L, 再分别取 375 μ M 的睾酮工作液和化合物工作液(150、50、15、5、1.5、0.15、0.015、0 μ M)各 20 μ L, 混合均匀。阳性对照组用相同浓度的酮康唑代替化合物。同时将 5mM 的 NADPH 溶液一起在 37 $^{\circ}$ C 预孵育 5 分钟。5 分钟之后每个孔中加入 20 μ L NADPH, 启动反应, 孵育 30 分钟。30 分钟后向所有样本中加入 250 μ L 含内标的乙腈, 混匀, 800rpm 摇 10 分钟, 然后 3700 rpm 离心 10 分钟。取 100 μ L 的上清液与 80 μ L 的超纯水混匀, 转移至 LC-MS/MS 分析。

数值经 Graphpad Prism 计算得到药物对 CYP3A4 睾酮代谢位点的 IC_{50} 值见表 6。

表 6. 本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的睾酮代谢位点的 IC_{50} 值

化合物编号	$IC_{50}(\mu M)$
1	>30

结论: 本公开所要保护的化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的睾酮代谢位点的抑制较弱, 表现出更好的安全性。

测试例 7、本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 咪达唑仑代谢位点的酶活性的时间依赖性抑制作用 (Time-dependent inhibition)。

本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 咪达唑仑代谢位点的时间依赖性 CYP 酶活性抑制作用采用如下实验方法测定:

一、实验材料及仪器

1. 磷酸缓冲液(20 $\times$ PBS, 购买自生工),
2. NADPH(ACROS, A2646-71-1),
3. 人肝微粒体(Corning Gentest, Cat No, 452161, Lot No.9050002,Donor,36),
4. ABI QTrap 4000 液质两用仪(AB Sciex),
5. ZORBAX Extend-C18, 3 $\times$ 50mm, 3.5 μ m(美国安捷伦公司),
6. CYP 探针底物(咪达唑仑,TRC,M343000/3 μ M)和阳性对照抑制剂(维拉帕米, Adamas Reagent Co,Ltd, Cat No. 25904A)。

二、实验步骤

配置 100mM 的 PBS 缓冲液, 用该缓冲液配制 0.25mg/ml 的微粒体溶液和 7.5mM 的 $MgCl_2$ 和 5mM 的 NADPH 溶液, 用 DMSO 将浓度为 30mM 的储备液稀释成浓度为 30 mM、10mM、3mM、1mM、0.3mM、0.1mM、0.03mM、0mM 的系列溶液 I, 再用磷酸缓冲液(PBS), 将上述系列溶液 I 稀释 200 倍得到系列待测溶液 II(150、50、15、5、1.5、0.5、0.15、0 μ M)。用 PBS 稀释至 15 μ M 浓度的咪达唑仑工作液。

将上述制备好的待测系列溶液摇匀, 分装 20 μ L 到对应的反应板 (设+NADPH、T0、

-NADPH 组) 中, 设 3 个平行, 再往每块 96 孔板中加入 40 μ L 肝微粒体工作液, T0 板中加入 20 μ L 对应的底物溶液, T0 板和+NADPH 组分别加入 20 μ L NADPH, 计时开始, 放入水浴锅 37 $^{\circ}$ C 孵育, 孵育 30min 后取出 T0 板, 用含内标的 ACN 的溶液 250 μ L 终止反应; +NADPH 组补上 20 μ L 对应的底物溶液, -NADPH 组补上 20 μ L 对应的底物溶液和 20 μ L NADPH, 计时开始, 放入水浴锅 37 $^{\circ}$ C 孵育, 孵育 30min 后取出, 用含内标的 ACN 的溶液 250 μ L 终止反应。然后摇床 800rpm 摇 10min, 离心机 4000rpm 离心 15min。取上清 100 μ L 与 80 μ L 超纯水混匀后转移至 LC-MS/MS 分析。

数值经 Graphpad Prism 计算得到药物对 CYP3A4 咪达唑仑代谢位点的 IC₅₀ 值见表 7。

表 7. 本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的咪达唑仑代谢位点的 IC₅₀ 值和 IC₅₀ Shift 倍数

化合物编号	(+)NADPH IC ₅₀ (μ M)	(-)NADPH IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ Shift
1	13.11	19.59	0.7

结论: 本公开所要保护的化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的咪达唑仑代谢位点抑制作用弱, 表现出更好的安全性, 提示不会发生基于 CYP3A4 代谢咪达唑仑代谢位点的代谢性药物相互作用。

测试例 8、本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 睾酮代谢位点的酶活性的时间依赖性抑制作用

本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 睾酮代谢位点的酶活性的时间依赖性抑制作用采用如下实验方法测定:

一、实验材料及仪器

1. 磷酸缓冲液(20 $\times$ PBS, 购买自生工),
2. NADPH(ACROS, A2646-71-1),
3. 人肝微粒体(Corning Gentest, Cat No, 452161, Lot No.905002, Donor36),
4. ABI QTrap 4000 液质两用仪(AB Sciex),
5. ZORBAX Extend-C18, 3 $\times$ 50mm, 3.5 μ m(美国安捷伦公司),
6. CYP 探针底物(睾酮,沃凯, CAS No.[58-22-0]/75 μ M),和阳性对照抑制剂(维拉帕米, Adamas Reagent Co Ltd, Cat No. 25904A)。

二、实验步骤

配置 100mM 的 PBS 缓冲液, 用该缓冲液配制 0.25mg/mL 的微粒体溶液和 7.5mM 的 MgCl₂ 和 5mM 的 NADPH 溶液, 用 DMSO 将浓度为 30mM 的储备液稀释成浓度为 30mM、10mM、3mM、1mM、0.3mM、0.1mM、0.03mM、0mM 的系列溶液 I, 再用磷酸缓冲液(PBS), 将上述系列溶液 I 稀释 200 倍得到系列待测溶液 II(150、50、15、5、1.5、0.5、0.15、0 μ M)。用 PBS 稀释至 15 μ M 浓度的咪达唑仑工作液。

将上述制备好的待测系列溶液摇匀, 分装 20 μ L 到对应的反应板 (设+NADPH、T0、

-NADPH 组) 中, 设 3 个平行, 再往每块 96 孔板中加入 40 μ L 肝微粒体工作液, T0 板中加入 20 μ L 对应的底物溶液, T0 板和+NADPH 组分别加入 20 μ L NADPH, 计时开始, 放入水浴锅 37 $^{\circ}$ C 孵育, 孵育 30min 后取出 T0 板, 用含内标的 ACN 的溶液 250 μ L 终止反应; +NADPH 组补上 20 μ L 对应的底物溶液, -NADPH 组补上 20 μ L 对应的底物溶液和 20 μ L NADPH, 计时开始, 放入水浴锅 37 $^{\circ}$ C 孵育, 孵育 30min 后取出, 用含内标的 ACN 的溶液 250 μ L 终止反应。然后摇床 800rpm 摇 10min, 离心机 4000rpm 离心 15min。取上清 100 μ L 与 80 μ L 超纯水混匀后转移至 LC-MS/MS 分析。

数值经 Graphpad Prism 计算得到药物对 CYP3A4 甾酮代谢位点的 IC₅₀ 值见表 8。

表 8. 本公开化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的甾酮代谢位点的 IC₅₀ 值和 IC₅₀ shift 倍数

化合物编号	(+)NADPH IC ₅₀ (μ M)	(-)NADPH IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ Shift
1	>30	>30	No TDI

结论: 本公开所要保护的化合物对人肝微粒体 CYP3A4 的甾酮代谢位点的抑制较弱, 表现出更好的安全性, 提示不会发生基于 CYP3A4 发生代谢性药物相互作用。

测试例 9

1、实验目的

应用全自动膜片钳在转染 hERG 钾通道的稳定细胞株上测试本公开化合物对 hERG 钾电流的阻断作用。

2、实验方法

2.1 实验材料与仪器

2.1.1 实验材料:

试剂名称	供货公司	货号
FBS	GIBCO	10099
丙酮酸钠溶液	sigma	S8636-100ML
MEM 非必需氨基酸溶液 (100 $\times$)	sigma	M7145-100ML
G418 硫酸盐	Enzo	ALX-380-013-G005
MEM	Hyclone	SH30024.01B
hERG cDNA	金唯智生物科技有限公司合成	基因序列 NM_000238.4-

2.1.2 实验仪器:

仪器名称	供货公司	型号
Patchliner 4 通道	nanion	2-03-03100-002
Patchliner 清洗站	nanion	2-02-03201-005
Patchliner 细胞库	nanion	2-02-03105-000

Elektrodenchloridierer Patchliner	nanion	3-02-03533-000
HEAK EPC10 膜片钳放大器	nanion	1-01-10012-000
渗透压摩尔浓度测定仪	Gonoter	Gonoter 030
pH 计	Mettler Toledo	FE20

2.2 全自动膜片钳实验步骤

HEK293-hERG 稳定细胞株按照 1:4 的密度在 MEM/EBSS 培养基(10%FBS, 400μg/ml G418, 1% MEM 非必需氨基酸溶液 (100×), 1% 丙酮酸钠溶液)中进行传代培养, 培养 48-72 小时之内进行全自动膜片钳实验。实验当天将细胞用 0.25%胰酶消化后, 离心收集细胞, 用细胞外液(140mM NaCl, 4mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 5mM D-葡萄糖, 10mM Hepes, pH7.4, 298 mOsm)重悬细胞制成细胞悬液。将细胞悬液放置在 Patchliner 仪器的细胞库上, Patchliner 仪器利用负压控制器将细胞加到芯片 (NPC-16) 上, 负压将单个细胞吸引在芯片的小孔上。当形成全细胞模式后, 仪器将按照设定的 hERG 电流电压程序得到 hERG 电流, 然后仪器自动的由低浓度到高浓度, 进行化合物灌流。通过 HEAK Patchmaster, HEAK EPC10 膜片钳放大器 (Nanion) 和 Pathlinersoftware 以及 Pathcontrol HTsoftware 进行数据收集和分析, 对化合物各浓度下的电流以及空白对照电流进行分析。

2.3 测试结果

本公开化合物对 hERG 钾电流的阻断作用通过以上的试验进行测定, 测得的 IC₅₀ 值见表 9。

表 9. 本公开化合物对 hERG 钾电流的阻断作用的 IC₅₀

化合物编号	IC ₅₀ (μM)
1	>30

注: IC₅₀ ≥ 30μM 为无抑制活性; 30 > IC₅₀ ≥ 10μM 为有微弱抑制活性; 10 > IC₅₀ ≥ 1μM 为有中等的抑制活性; IC₅₀ < 1μM 为有强的抑制活性。

结论: 本公开所要保护的化合物对 hERG 没有抑制活性, 表现为更好的安全性。

实施例 2、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的制备

称取约 450mg 式 (I) 所示化合物溶于 10mL 丙酮, 加入 1.25mL 1.46M 磷酸乙醇溶液, 升降温 24h 后样品离心, 40℃ 真空干燥得固体, 经 X-射线粉末衍射检测, 将该固体定义为 I 晶型, XRPD 谱图如图 2 所示, 其特征峰位置如表 10 所示, TGA 谱图 (附图 3) 显示: I 晶型在 30-115℃ 之间失重 0.38%; DSC 谱图 (附图 4) 显示 I 晶型具有一个吸热峰, 峰值为 188.98℃; DVS 后的 XRPD 谱图 (附图 5) 显示晶型未发生变化; DVS 谱图见附图 6; 单晶谱图见附图 7, 其中游离碱与磷酸根的摩尔比值为 1: 3; 轴长 a = 8.0475 (3) Å; b = 8.0903 (3) Å; c = 84.695 (4) Å; 轴角 α = 89.575 (2)°; β = 89.859 (2)°; γ = 60.745

(2)^o；晶体体积 $V = 4810.7(3) \text{ \AA}^3$ 。

表 10. I 晶型特征峰

峰编号	2- θ (deg)	d($\text{\AA}$)	I(%)
1	6.146	14.36866	100.0
2	12.444	7.10720	8.4
3	13.466	6.57007	24.1
4	13.922	6.35584	13.7
5	14.976	5.91087	8.5
6	16.262	5.44621	7.0
7	16.915	5.23745	15.0
8	19.222	4.61381	67.5
9	20.844	4.25832	7.9
10	21.848	4.06471	68.4
11	22.290	3.98509	68.2
12	23.436	3.79276	64.9
13	24.119	3.68697	9.8
14	24.563	3.62135	12.9
15	26.164	3.40321	21.6
16	27.475	3.24377	8.3
17	29.998	2.97638	16.9

实施例 3、式 (I) 所示化合物磷酸盐 I 晶型的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙酸乙酯，加入 41 μ L 1.46M 的磷酸乙醇溶液，升降温 24h 后离心干燥得固体，经 X-射线粉末衍射检测为 I 晶型。

实施例 4、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙醇，加入 16.3 μ L 1.84M 硫酸乙醇溶液，升降温 24h 后离心干燥，得固体，经 X-射线粉末衍射检测，将该产物定义为晶型 A，XRPD 谱图如图 8；其特征峰位置如表 11 所示，TGA 谱图（附图 9）显示：A 晶型在 30-90 $^{\circ}\text{C}$ 之间失重 6.84%；DSC 谱图（附图 10）显示 A 晶型具有两个吸热峰，峰值为 68.13 $^{\circ}\text{C}$ 和 146.66 $^{\circ}\text{C}$ ；DVS 后的样品潮解；DVS 谱图见图 11；单晶谱图见附图 12，其中游离碱与硫酸根的摩尔比值为 1：1；轴长 $a = 9.7051(11) \text{ \AA}$ ； $b = 26.208(3) \text{ \AA}$ ； $c = 12.1065(13) \text{ \AA}$ ；轴角 $\beta = 90^{\circ}$ ；晶体体积 $V = 3079.3(6) \text{ \AA}^3$ 。

表 11. A 晶型特征峰

峰编号	2- θ (deg)	d($\text{\AA}$)	I(%)
-----	-------------------	-------------------	------

1	6.582	13.41759	64.7
2	7.898	11.18575	100.0
3	11.573	7.64035	14.1
4	13.357	6.62340	23.2
5	14.469	6.11707	21.9
6	15.142	5.84641	49.3
7	15.920	5.56251	14.3
8	18.121	4.89150	4.6
9	19.335	4.58693	34.3
10	19.820	4.47579	28.2
11	20.677	4.29225	45.0
12	22.125	4.01448	50.5
13	23.980	3.70799	18.9
14	24.763	3.59249	23.1
15	25.397	3.50424	26.9
16	25.663	3.46850	27.8
17	27.200	3.27590	4.7
18	27.588	3.23072	21.9
19	28.307	3.15024	3.0
20	29.161	3.05988	12.0

实施例 5、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙酸乙酯，加入 16.3 μ L 1.84M 硫酸乙醇溶液，升降温 24h 后离心干燥的固体，经 X-射线粉末衍射检测为 A 晶型。

实施例 6、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的制备

称取约 148mg 式 (I) 所示化合物溶于 1mL 丙酮，加入 0.163mL 1.84M 硫酸乙醇溶液，升降温 40h 后离心干燥后的固体，经 X-射线粉末衍射检测为 A 晶型。

实施例 7、式 (I) 所示化合物硫酸盐的 A 晶型的制备

称取约 296mg 式 (I) 所示化合物溶于 1mL 甲醇，加入 0.33mL 1.84M 硫酸甲醇溶液，升降温 24h 后离心干燥后的固体，经 X-射线粉末衍射检测为 A 晶型。

实施例 8、式 (I) 所示化合物 L-酒石酸盐无定型的制备

将式 (I) 所示化合物 25 mg 加入到 0.5 mL 异丙醇中，搅拌溶清，L-酒石酸 8 mg 用异丙醇 0.5 mL 稀释，滴加入以上反应液中，室温下氮气保护搅拌形成白色浑浊液，继续搅拌 16 小时后过滤，收集滤饼，真空干燥，得到白色固体，经 X-射线粉末衍射检测，该产物为无定型，XRPD 谱图如图 13。

实施例 9、柠檬酸盐无定型的制备

将式 (I) 所示化合物 25 mg 加入到 0.5 mL 异丙醇中，搅拌溶清，柠檬酸 10 mg 用异丙醇 0.5 mL 稀释，滴加入以上反应液中，室温下氮气保护搅拌形成白色浑浊液，继续搅拌 16 小时后过滤，收集滤饼，真空干燥，得到白色固体，经 X-射线粉末衍射检测，该产物为无定型，XRPD 谱图如图 14。

实施例 10、盐酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙醇，加入 50 μ L 1.2M 的盐酸乙醇溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 11、氢溴酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙酸乙酯，加入 80 μ L 0.75M 的氢溴酸乙醇溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 12、甲磺酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙酸乙酯，加入 39 μ L 1.53M 的甲磺酸水溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 13、甲酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 丙酮，加入 22.6 μ L 2.65M 的甲酸水溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 14、乙酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙醇，加入 34.2 μ L 1.75M 的乙酸水溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 15、琥珀酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 丙酮，加入 36μL 0.83M 的琥珀酸乙醇溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 16、马来酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙酸乙酯，加入 30μL 1M 的马来酸水溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 17、苹果酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙酸乙酯，加入 30μL 1M 的苹果酸水溶液，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 18、对甲苯磺酸盐的制备

称取约 15mg 式 (I) 所示化合物溶于 0.2mL 乙醇，加入 10.28mg 的对甲苯磺酸，加入 60μL 纯化水，升降温 24h 并搅拌，室温挥发得油胶状固体。

实施例 19、引湿性研究

采用 Surface Measurement Systems intrinsic，在 25℃，湿度从 50%起，考察湿度范围为 0%-95%，步进为 10%，判断标准为每个梯度质量变化 $dM/dT \leq 0.002\%$ ，TMAX 360min，循环两圈。

表 12.引湿性研究数据

供试品	0.0%RH-95.0%RH	0%RH-80.0%RH	晶型
游离态无定形	6.7%	4.6%（有引湿性）	未转变
磷酸盐 I 晶型	7.1%	1.2%（略有引湿性）	未转变
硫酸盐 A 晶型	44.1%	13.3%（有引湿性）	潮解

实施例 20、影响因素稳定性研究

将游离态无定形、磷酸盐 I 晶型、硫酸盐 A 晶型敞口平摊放置，分别考察在光照 (4500Lux)、高温(40℃、60℃)、高湿(RH 75%、RH 92.5%)条件下样品的稳定性，取样考察期为 30 天。

表 13. 影响因素 30 天试验 1 个月结果

条件	时间	游离态无定形	
		纯度%	晶型
起始	0 天	97.1	无定形
	5 天	96.7	无定形
	10 天	96.5	无定形
	1 月	95.4	无定形
40℃	5 天	95.7	无定形
	10 天	94.2	无定形
	1 月	87.6	无定形
	1 月	87.6	无定形
60℃	5 天	94.0	无定形
	10 天	89.9	无定形
	1 月	71.7	无定形
	1 月	71.7	无定形
4500 Lux	5 天	97.0	无定形
	10 天	97.0	无定形
	1 月	96.9	潮解
	1 月	96.9	潮解
75% RH	5 天	96.9	无定形
	10 天	97.0	无定形
	1 月	97.0	潮解
	1 月	97.0	潮解
92.5% RH	5 天	96.9	无定形
	10 天	97.0	无定形
	1 月	97.0	潮解
	1 月	97.0	潮解
条件	时间(天)	磷酸盐 I 晶型	
		纯度%	晶型
起始	0	99.4	I 晶型
	5 天	99.3	I 晶型
	10 天	99.1	I 晶型
	1 月	99.1	I 晶型
40℃	5 天	99.1	I 晶型
	10 天	99.1	I 晶型
	1 月	98.8	I 晶型
	1 月	98.8	I 晶型
60℃	5 天	98.9	I 晶型
	10 天	98.8	I 晶型
	1 月	98.4	I 晶型
	1 月	98.4	I 晶型
4500 Lux	5 天	99.3	I 晶型
	10 天	99.4	I 晶型
	1 月	99.4	I 晶型
	1 月	99.4	I 晶型
75% RH	5 天	99.3	I 晶型
	10 天	99.4	I 晶型
	1 月	99.4	I 晶型
	1 月	99.4	I 晶型

	1 月	99.4	I 晶型
	5 天	99.3	I 晶型
92.5% RH	10 天	99.3	I 晶型
	1 月	99.3	I 晶型
硫酸盐 A 晶型			
条件	时间(天)	纯度%	晶型
起始	0	98.9	A 晶型
	5 天	98.8	A 晶型
40℃	10 天	98.7	A 晶型
	1 月	98.0	A 晶型
	5 天	98.7	A 晶型
60℃	10 天	98.6	A 晶型
	1 月	97.3	A 晶型
	5 天	97.4	A 晶型
4500 Lux	10 天	96.0	A 晶型
	1 月	92.9	A 晶型
	5 天	97.8	潮解
75% RH	10 天	96.6	潮解
	1 月	94.8	潮解
	5 天	98.1	潮解
92.5% RH	10 天	97.3	潮解
	1 月	95.1	潮解

结论：影响因素实验表明： 磷酸盐 I 晶型在影响因素条件下放置 30 天物理和化学稳定性良好。硫酸盐的 A 晶型除光照条件下，其他条件下物理和化学稳定性良好，高湿条件下潮解。无定形高湿条件下潮解，其他条件下物理稳定，化学稳定性高温和光照条件下略差。

实验例 21、长期/加速稳定性

将游离态无定形、磷酸盐 I 晶型、硫酸盐 A 晶型分别放置 25℃/60%RH 和 40℃/75%RH 条件考察其稳定性：

表 14. 游离碱无定形长期/加速稳定性

放置条件	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	晶型
	起始	7 天	14 天	1 个月	2 个月	3 个月	

25℃/60%RH	97.1	97.1	97.0	97.1	96.7	96.7	不变
40℃/75%RH	97.1	96.8	96.6	96.5	95.5	94.9	不变

表 15. 磷酸盐 I 晶型长期/加速稳定性

放置条件	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	晶型
	起始	7 天	14 天	1 个月	2 个月	3 个月	
25℃/60%RH	99.4	99.4	99.5	99.3	99.3	99.2	不变
40℃/75%RH	99.4	99.5	99.5	99.3	99.2	99.0	不变

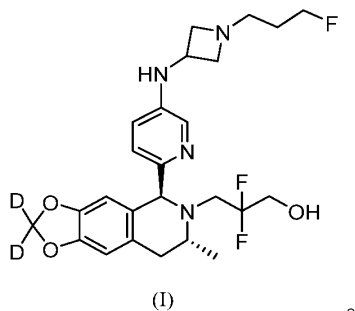
表 16. 硫酸盐 A 晶型长期/加速稳定性

放置条件	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	纯度%	晶型
	起始	7 天	14 天	1 个月	2 个月	3 个月	
25℃/60%RH	98.9	99.0	98.9	98.9	98.7	98.8	不变
40℃/75%RH	98.9	99.2	98.9	98.7	98.2	98.1	不变

结论：长期加速 3 个月的稳定性结果显示，磷酸盐 I 晶型、硫酸盐 A 晶型物理化学稳定性良好，略优于游离态无定形。

权利要求

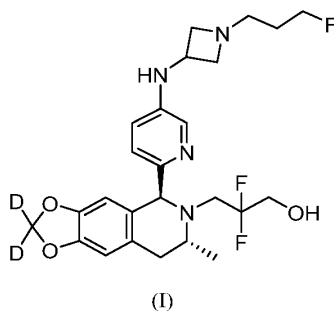
1. 一种式(I)所示化合物的药学上可接受的盐,所述药学上可接受的盐选自磷酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、甲酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、苹果酸盐和对甲苯磺酸盐,



2. 根据权利要求1所述的式(I)所示化合物的药学上可接受的盐,其中式(I)所示化合物与酸分子的物质的量比选自5:1-1:5;优选1:1或1:3。

3. 根据权利要求1-2任一项所述的式(I)所示化合物的药学上可接受的盐,其为磷酸盐,其中式(I)所示化合物与磷酸分子的物质的量比为1:3。

4. 一种式(I)所示化合物的磷酸盐的I晶型,其中式(I)所示化合物与磷酸分子的物质的量比为1:3,以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱,在6.1、13.5、19.2、22.3处有特征峰,

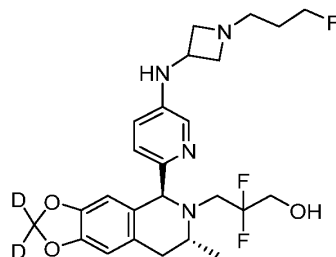


优选地,以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱,在6.1、13.5、13.9、19.2、21.8、22.3、23.4处有特征峰;

最优选地,以衍射角 2θ 角度表示的X-射线粉末衍射图谱,在6.1、12.4、13.5、13.9、15.0、16.3、16.9、19.2、20.8、21.8、22.3、23.4、24.1、24.6、26.2、27.5、30.0处有特征峰。

5. 根据权利要求 1-2 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐，其为硫酸盐，其中式 (I) 所示化合物与硫酸分子的物质的量比为 1:1。

6. 一种式 (I) 所示化合物的硫酸盐的 A 晶型，其中式 (I) 所示化合物与硫酸分子的物质的量比为 1:1，以衍射角 2θ 角度表示的 X-射线粉末衍射图谱，在 6.6、7.9、15.1、20.7、22.1 处有特征峰，



(I)

优选地，以衍射角 2θ 角度表示的 X-射线粉末衍射图谱，在 6.6、7.9、13.4、14.5、15.1、19.3、19.8、20.7、22.1、24.8、25.4、25.7、27.6 处有特征峰；

最优选地，以衍射角 2θ 角度表示的 X-射线粉末衍射图谱，在 6.6、7.9、11.6、13.4、14.5、15.1、15.9、18.1、19.3、19.8、20.7、22.1、24.0、24.8、25.4、25.7、27.2、27.6、28.3、29.2 处有特征峰。

7. 根据权利要求 4 或 6 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐的晶型，所述 2θ 角的误差范围为 ± 0.2 。

8. 一种权利要求 1-3 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐，所述药学上可接受的盐为磷酸盐，或权利要求 4 所述的式 (I) 所示化合物的磷酸盐的 I 晶型的制备方法，包括式 (I) 所示化合物与磷酸反应的步骤。

9. 一种权利要求 4 所述的式 (I) 所示化合物的磷酸盐的 I 晶型的制备方法，包括以下步骤：

1) 配置式 (I) 所示化合物的溶剂 A 溶液，所述溶剂 A 选自酮类溶剂、酯类溶剂或醚类溶剂；优选丙酮、乙酸乙酯或甲基叔丁基醚；

2) 配置磷酸的溶剂 B 溶液，所述溶剂 B 选自水或醇类溶剂；优选甲醇、乙醇或水；

3) 混合式 (I) 所示化合物的溶剂 A 溶液与磷酸的溶剂 B 溶液后结晶析出。

10. 一种权利要求 1-2 或 5 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐，所述药学上可接受的盐为硫酸盐，或根据权利要求 6 所述的式 (I) 所示化合物的硫酸盐

的 A 晶型的制备方法，包括式 (I) 所示化合物与硫酸反应的步骤。

11. 一种权利要求 6 所述的式 (I) 所示化合物的硫酸酸盐的 A 晶型的制备方法，包括以下步骤：

1) 配置式 (I) 所示化合物的溶剂 A 溶液，所述溶剂 A 选自酮类溶剂、酯类溶剂、腈类溶剂或醇类溶剂；所述溶剂 A 优选丙酮、乙酸乙酯、乙腈、甲醇或乙醇；

2) 配置硫酸的溶剂 B 溶液，所述溶剂 B 选自水、腈类溶剂或醇类溶剂；所述溶剂 B 优选甲醇、乙醇、水、乙腈；

3) 混合式 (I) 所示化合物的溶剂 A 溶液与硫酸的溶剂 B 溶液后结晶析出。

12. 一种权利要求 1 所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐的制备方法，包括式 (I) 所示化合物与酒石酸、柠檬酸、盐酸、氢溴酸、甲磺酸、甲酸、乙酸、琥珀酸、马来酸、苹果酸或对甲苯磺酸反应成盐的步骤。

13. 一种药物组合物，包含以下成分：

1) 根据权利要求 1-3、5 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐或根据权利要求 4、6-7 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐的晶型，或其混合物；和

2) 任选自药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

14. 一种药物组合物的制备方法，包括将

1) 根据权利要求 1-3、5 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐或根据权利要求 4、6-7 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐的晶型，或其混合物；和

2) 任选自药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合的步骤。

15. 权利要求 1-3、5 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐或根据权利要求 4、6-7 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐的晶型，或其混合物，或权利要求 13 所述的药物组合物在制备雌激素受体调节剂中的用途；优选为在制备雌激素受体下调剂中的用途。

16. 权利要求 1-3、5 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐或根据权利要求 4、6-7 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐的晶型，或其混合物，或权利要求 13 所述的药物组合物在制备预防和/或治疗癌症的药物中的用途，其中所述的癌症优选选自乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、宫颈癌、皮肤癌、前列腺癌、卵巢癌、输

卵管肿瘤、血友病和白血病。

17. 权利要求 1-3、5 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐或根据权利要求 4、6-7 任一项所述的式 (I) 所示化合物的药学上可接受的盐的晶型，或其混合物，或权利要求 13 所述的药物组合物在制备预防和/或治疗雌激素受体介导的或依赖性的疾病或病症的药物中的用途；优选地，其中所述的雌激素受体介导的或依赖性的疾病或病症选自癌症、中枢神经系统缺陷、心血管系统缺陷、血液系统缺陷、免疫及炎症疾病、易感性感染、代谢缺陷、神经缺陷、精神缺陷和生殖缺陷；优选地，其中所述的癌症选自乳腺癌、子宫内膜癌、子宫癌、宫颈癌、皮肤癌、前列腺癌、卵巢癌、输卵管肿瘤、血友病和白血病；更优选，其中所述的癌症选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌和子宫癌。