

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 3 月 15 日 (15.03.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/045993 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 401/14 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/101067

(22) 国际申请日: 2017 年 9 月 8 日 (08.09.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610814752.0 2016 年 9 月 9 日 (09.09.2016) CN

(71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市海州区郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。南京明德新药研发股份有限公司 (MEDSHINE DISCOVERY INC.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市高新开发区高新路 9 号商务办公楼 218 室, Jiangsu 210032 (CN)。

(72) 发明人: 丁照中 (DING, Charles Z.); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。陈曙辉 (CHEN, Shuhui); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。胡利红 (HU, Lihong); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。徐招兵 (XU, Zhaobing); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。刘迎春 (LIU, Yingchun); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。任兵杰 (REN, Bingjie); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。李卫东 (LI, Weidong); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。李宗斌 (LI, Zongbin); 中国上海市浦东新区富特中路 288 号, Shanghai 200131 (CN)。赵锐 (ZHAO, Rui); 中国江苏省连云港市海州区郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。张喜全 (ZHANG,

Xiquan); 中国江苏省连云港市海州区郁州南路 369 号, Jiangsu 222062 (CN)。

(74) 代理人: 北京林达刘知识产权代理事务所 (普通合伙) (LINDA LIU & PARTNERS); 中国北京市东城区北三环东路 36 号北京环球贸易中心 C 座 16 层, Beijing 100013 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

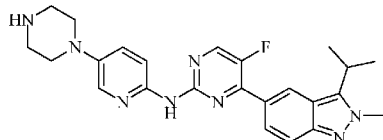
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。

(54) Title: CRYSTAL FORM, SALT TYPE OF SUBSTITUTED 2-HYDRO-PYRAZOLE DERIVATIVE AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种取代的 2-氢-吡唑衍生物的晶型、盐型及其制备方法



(1)

(57) Abstract: A crystal form, a salt type of a substituted 2-hydro-pyrazole derivative, preparation method therefor, and use of the crystal form and the salt type in preparation of a medicament for treating cancers such as breast cancer, lung cancer and the like.

(57) 摘要: 一种取代的 2-氢-吡唑衍生物晶型、盐型及其制备方法, 以及所述晶型和盐型在制备治疗乳腺癌、肺癌等癌症的药物中的应用。

WO 2018/045993 A1

一种取代的2-氢-吡唑衍生物的晶型、盐型及其制备方法

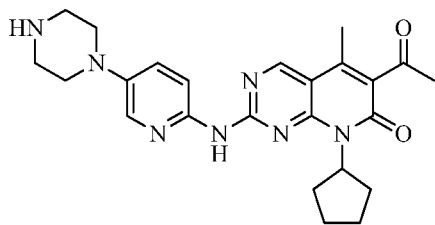
技术领域

本发明涉及一种取代的2-氢-吡唑衍生物的晶型、盐型及其制备方法，还包括所述晶型和盐型在制备治疗乳腺癌与其他癌症药物中的应用。

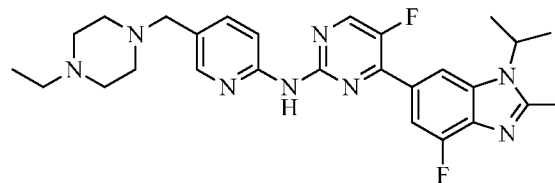
背景技术

细胞周期的调控主要受一系列丝氨酸/苏氨酸激酶的影响，这类丝氨酸/苏氨酸激酶又被称作细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK），他们通过与其相对应的调节亚基周期素（cyclins）相结合，推动细胞周期的进行、遗传信息的转录和细胞的正常分裂增殖。CDK4/6 是细胞周期的关键调节因子，能够触发细胞周期从生长期（G1 期）向 DNA 复制期（S1 期）转变。在细胞增殖过程中，细胞周期素 D（Cyclin D）与 CDK4/6 形成的复合物能够磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白（Rb）。肿瘤抑制蛋白 Rb 一旦发生磷酸化，可释放其在未被磷酸化的状态下紧密结合的转录因子 E2F，E2F 激活进一步转录推动细胞周期通过限制点（R 点）并从 G1 期进展到 S 期，进入了细胞增殖的周期。因此，抑制 CDK4/6 使之无法形成 Cyclin D-CDK4/6 复合物，就能够阻滞细胞周期自 G1 期向 S 期的进程，从而达到抑制肿瘤增殖的目的。在雌激素受体阳性（ER+）乳腺癌（BC）中，CDK4/6 的过度活跃非常频繁，而 CDK4/6 是 ER 信号的关键下游靶标。临床前数据表明，CDK4/6 和雌激素受体（ER）信号双重抑制具有协同作用，并能够抑制 G1 期雌激素受体阳性（ER+）乳腺癌（BC）细胞的生长。

CDK4/6 靶点是一个竞争很激烈的研发领域。Pietzsch 在 2010 年总结了这一领域的进展情况（Mini-Rev. Med. Chem. 2010, 10, 527-539）。Malorni 还在 2014 年总结了最新的 CDK4/6 抑制剂在乳腺癌临床前和临床上的研究成果（Curr. Opin. Oncol. 2014, 26, 568-575）。针对 CDK4/6 靶点的大量研究工作促进了一系列不同选择性的 CDK 抑制剂的开发，同时也导致少数几个有效和高选择性的 CDK4/6 抑制剂的发现。Palbociclib（PD0332991）是这几个有效和高选择性的 CDK4/6 抑制剂之一，它已经进入人体临床试验，用于妇女晚期或转移性雌激素受体（ER+），人表皮生长因子受体 2 阴性（HER2-）乳腺癌的治疗。基于 PALOMA-1 实验的中期数据，2014 年 8 月辉瑞公司已经向 FDA 提交了 palbociclib 的新药申请（NDA），FDA 于 2015 年 2 月批准了 palbociclib 的上市请求。其他两个 CDK4/6 抑制剂 Abemaciclib（LY2835219）和 LEE-011 也已经开始为 3 期临床试验招募患者癌症。除了可用于乳腺癌的治疗，这些小分子的杂环化合物在临床上还可以用于其它多种癌症的治疗。这些专利包括 WO2012018540，WO2012129344，WO2011101409，WO2011130232，WO2010075074，WO2009126584，WO2008032157，WO2003062236。



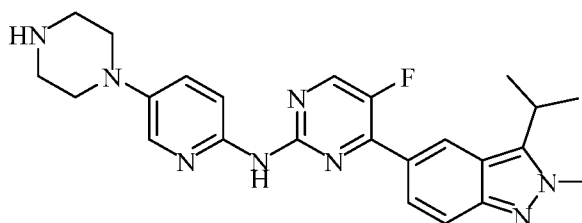
Palbociclib



LY-2835219

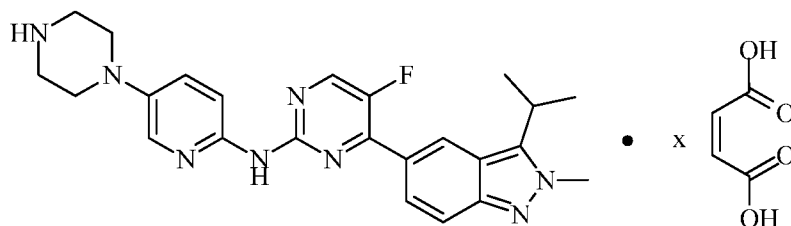
发明内容

本发明提供式 (I) 化合物的马来酸盐。



(I)

本发明的一些方案中，上述式 (I) 化合物的马来酸盐，如式 (II) 所示，其中，x 选自 0.5~2。



(II)

本发明的一些方案中，上述 x 为 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 或 2.0。

本发明的一些方案中，上述式 (II) 化合物为化合物 WX₁，其中 x 为 0.8、0.9、1 或 1.1。

本发明的一些方案中，所述化合物 WX₁ 中，x 为 1。

本发明还提供了化合物 WX₁ 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：
4.69±0.2°，14.04±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：4.69±0.2°，
9.35±0.2°，13.28±0.2°，14.04±0.2°，16.03±0.2°，18.74±0.2°，20.08±0.2°，28.25±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 A 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：4.69±0.2°，
9.35±0.2°，10.01±0.2°，13.28±0.2°，14.04±0.2°，16.03±0.2°，18.74±0.2°，20.08±0.2°，23.53±0.2°，25.11±0.2°，
27.80±0.2°，28.25±0.2°。

本发明的一些方案中,上述 A 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $4.69\pm 0.2^\circ$, $9.35\pm 0.2^\circ$, $10.01\pm 0.2^\circ$, $13.28\pm 0.2^\circ$, $14.04\pm 0.2^\circ$, $16.03\pm 0.2^\circ$, $16.83\pm 0.2^\circ$, $17.73\pm 0.2^\circ$, $18.58\pm 0.2^\circ$, $18.74\pm 0.2^\circ$, $20.08\pm 0.2^\circ$, $21.58\pm 0.2^\circ$, $23.53\pm 0.2^\circ$, $25.11\pm 0.2^\circ$, $25.27\pm 0.2^\circ$, $27.80\pm 0.2^\circ$, $28.25\pm 0.2^\circ$, $33.00\pm 0.2^\circ$ 。

本发明一些方案中,上述 A 晶型的 X 射线粉末衍射图谱中,特征峰的峰位置及强度如表 1 所示:

表 1 : A 晶型的 X 射线粉末衍射图谱的特征峰的峰位置及强度

编号	2θ 角 ($^\circ$)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 ($^\circ$)	相对强度 (%)
1	4.690	100	10	18.737	5.3
2	9.353	6.4	11	20.078	6.8
3	10.008	3.6	12	21.580	3.7
4	13.276	6.9	13	23.532	5.3
5	14.035	77.7	14	25.114	3.9
6	16.025	7.8	15	25.269	6.3
7	16.831	2.4	16	27.801	3.6
8	17.726	2.3	17	28.251	7.5
9	18.581	1.9	18	32.999	2.1

本发明的一些方案中,上述 A 晶型的 XRPD 图谱如图 1 所示,即具有如图 1 所示的 XRPD 图谱所代表的特征。

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

表 2: A 晶型的 XRPD 解析数据

编号	2θ 角 ($^\circ$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 ($^\circ$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度 (%)
1	4.690	18.8251	100	10	18.737	4.7320	5.3
2	9.353	9.4476	6.4	11	20.078	4.4189	6.8
3	10.008	8.8308	3.6	12	21.580	4.1145	3.7
4	13.276	6.6635	6.9	13	23.532	3.7775	5.3
5	14.035	6.3049	77.7	14	25.114	3.5430	3.9
6	16.025	5.5260	7.8	15	25.269	3.5216	6.3
7	16.831	5.2634	2.4	16	27.801	3.2064	3.6
8	17.726	4.9995	2.3	17	28.251	3.1562	7.5
9	18.581	4.7712	1.9	18	32.999	2.7122	2.1

本发明的一些方案中,上述 A 晶型,其 DSC 图谱如图 2 所示,即具有如图 2 所示的 DSC 图谱所代表的特征。

本发明的一些方案中,上述 A 晶型的差示扫描量热曲线在 $208.18^\circ\text{C}\pm 3^\circ\text{C}$ 处具有吸热峰。

本发明的一些方案中，上述 A 晶型，其 TGA 图谱如图 3 所示，即具有如图 3 所示的 TGA 图谱所代表的特征。

本发明的一些方案中，上述 A 晶型的热重分析曲线在 $188.49 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重达 $0.3110 \pm 0.2\%$ 。

本发明的一些方案中，上述化合物 WX₁ 的 A 晶型中，x 为 1。

本发明还提供式 (I) 化合物的马来酸盐的制备方法，包括式 (I) 化合物与马来酸接触。

本发明的一些方案中，上述化合物 WX₁ 的 A 晶型的制备方法包括如下步骤：

- (1) 将马来酸和溶剂混合；
- (2) 向步骤 (1) 的混合物中加入式 (I) 化合物；
- (3) 过滤，干燥；

其中，所述溶剂选自甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、乙酸乙酯的一种或一种以上，以及甲醇/水的混合溶剂或者异丙醇/水的混合溶剂，优选为甲醇/水的混合溶剂。

本发明的一些方案中，马来酸与式 (I) 化合物的摩尔比约为 1-1.1: 1。

本发明的一些方案中，甲醇/水的体积比约为 1-50: 1，优选为 1-20: 1；在本发明的一些具体实施方案中，甲醇/水的体积比约为 3: 1；在本发明的一些具体实施方案中，甲醇/水的体积比约为 17-18: 1。

本发明的一些方案中，异丙醇/水的体积比约为 0.5-5: 1，优选为 1: 1。

本发明的一些方案中，步骤 (1) 在加热的条件下进行。

本发明的一些方案中，步骤 (1) 的加热温度约为 $60 \sim 70^\circ\text{C}$ ，优选为约 65°C 。

本发明的一些方案中，步骤 (2) 中加入式 (I) 化合物后进行搅拌。

本发明的一些方案中，步骤 (2) 中加入式 (I) 化合物后，在温度约为 $60 \sim 70^\circ\text{C}$ 下搅拌，优选约为 65°C 。

本发明的一些方案中，步骤 (3) 在过滤前进行冷却，所述冷却可以是冷却至 20°C 。

本发明的一些方案中，步骤 (3) 可以根据需要在冷却后进行搅拌，所述搅拌的时间可以是 15~22 小时，优选 18 小时。

本发明的一些方案中，步骤 (3) 干燥之前任选地用溶剂洗涤，所述洗涤溶剂选自甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮或者乙酸乙酯，以及甲醇/水的混合溶剂或者异丙醇/水的混合溶剂，优选为甲醇。

本发明还提供上述化合物 WX₁ 的 A 晶型的精制方法，包括：

- (a) 先将溶剂升温至 $45 \sim 55^\circ\text{C}$ ，然后将化合物 WX₁ A 晶型加入溶剂中；
- (b) 在 $45 \sim 55^\circ\text{C}$ 下搅拌 1~3 小时；
- (c) 冷却，过滤，滤饼用溶剂洗涤；
- (d) 干燥 48~72 小时；

其中，步骤 (a) 和步骤 (c) 所述的溶剂分别独立地选自甲醇、乙醇和异丙醇一种或一种以上，优选为甲醇、乙醇或异丙醇的一种，进一步优选步骤 (a) 和步骤 (c) 中的溶剂均为甲醇。

本发明的一些方案中，步骤（a）为将溶剂升温至 50℃，然后将化合物 WX₁A 晶型加入溶剂中。

本发明的一些方案中，步骤（b）为在 50℃下搅拌 1~3 小时。

本发明的一些具体方案中，步骤（b）为在 50℃下搅拌 2 小时。

本发明的一些方案中，步骤（c）的冷却温度为冷却至 30℃。

本发明的一些具体方案中，步骤（c）干燥 64 小时。

本发明还提供式（I）化合物的 B 晶型，其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：

12.88±0.2°，14.18±0.2°，16.72±0.2°，17.49±0.2°，19.21±0.2°，21.06±0.2°，21.65±0.2°，24.14±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：9.86±0.2°，12.88±0.2°，14.18±0.2°，16.72±0.2°，17.49±0.2°，19.21±0.2°，21.06±0.2°，21.65±0.2°，24.14±0.2°，26.29±0.2°，27.69±0.2°。

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：9.56±0.2°，9.86±0.2°，11.53±0.2°，12.01±0.2°，12.88±0.2°，14.18±0.2°，15.21±0.2°，15.66±0.2°，16.72±0.2°，17.49±0.2°，18.79±0.2°，19.21±0.2°，19.76±0.2°，21.06±0.2°，21.65±0.2°，22.52±0.2°，22.93±0.2°，24.14±0.2°，24.47±0.2°，26.29±0.2°，27.69±0.2°，28.48±0.2°，28.79±0.2°，30.25±0.2°，30.74±0.2°，31.67±0.2°，34.79±0.2°，35.18±0.2°。

本发明一些方案中，上述 B 晶型的 X 射线粉末衍射图谱中，特征峰的峰位置及强度如表 3 所示：

表 3：B 晶型的 X 射线粉末衍射图谱的特征峰的峰位置及强度

编号	2θ 角 (°)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 (°)	相对强度 (%)
1	9.560	13.3	16	22.516	5.2
2	9.857	18.8	17	22.933	33.1
3	11.533	2.1	18	24.135	100.0
4	12.007	10.7	19	24.471	9.6
5	12.876	47.8	20	25.912	6.7
6	14.177	30.6	21	26.286	41.6
7	15.207	3.3	22	27.685	37.6
8	15.659	6.2	23	28.475	4.1
9	16.719	18.0	24	28.791	2.6
10	17.488	34.3	25	30.250	15.9
11	18.792	12.9	26	30.738	2.9
12	19.206	55.0	27	31.669	15.3
13	19.757	2.3	28	34.786	4.1
14	21.060	79.9	29	35.176	5.1
15	21.651	67.8	-	-	-

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的 XRPD 图谱如图 4 所示，即具有如图 4 所示的 XRPD 图谱所代表的特征。

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

表 4： B 晶型的 XRPD 解析数据

编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 (°)	面间距 (Å)	相对强度 (%)
1	9.560	9.2436	13.3	16	22.516	3.9455	5.2
2	9.857	8.9655	18.8	17	22.933	3.8747	33.1
3	11.533	7.6665	2.1	18	24.135	3.6845	100.0
4	12.007	7.3651	10.7	19	24.471	3.6346	9.6
5	12.876	6.8696	47.8	20	25.912	3.4356	6.7
6	14.177	6.2420	30.6	21	26.286	3.3876	41.6
7	15.207	5.8216	3.3	22	27.685	3.2195	37.6
8	15.659	5.6546	6.2	23	28.475	3.1319	4.1
9	16.719	5.2982	18.0	24	28.791	3.0983	2.6
10	17.488	5.0668	34.3	25	30.250	2.9522	15.9
11	18.792	4.7181	12.9	26	30.738	2.9063	2.9
12	19.206	4.6175	55.0	27	31.669	2.8230	15.3
13	19.757	4.4898	2.3	28	34.786	2.5769	4.1
14	21.060	4.2149	79.9	29	35.176	2.5492	5.1
15	21.651	4.1012	67.8	-	-		-

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的 DSC 图谱如图 5 所示，即具有如图 5 所示的 DSC 图谱所代表的特征。

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的差示扫描量热曲线在 225.76℃ 附近有一个吸热峰。

在本发明的一些方案中，上述 B 晶型的差示扫描量热曲线在 225.76℃±3℃ 处具有吸热峰。

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的 TGA 图谱如图 6 所示，即具有如图 6 所示的 TGA 图谱所代表的特征。

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的热重分析曲线在 52.81℃±3℃、184.82℃±3℃ 和 230.03℃±3℃ 处失重。

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的热重分析曲线在 52.81℃±3℃ 时，重量减少了 0.1384%；在 184.82℃±3℃，重量又减少了 0.3565%；和 230.03℃±3℃ 时，重量又减少了 0.4086%。

本发明的一些方案中，上述 B 晶型的热重分析曲线在 52.81℃ 时，重量减少了 0.1384%；在 184.82℃ 时，重量又减少了 0.3565%；在 230.03℃ 时，重量又减少了 0.4086%。

本发明还提供了上述 B 晶型的制备方法，包括以下步骤：

(i) 将式 (I) 化合物加入溶剂中，加热；

(ii) 缓慢降温，静置；

(iii) 离心，干燥。

在一些实施方案中，步骤(i)所述溶剂为乙醇、水的一种或两种，优选为乙醇和水的混合溶剂。

在一些实施方案中，步骤(i)加热温度为70~100°C，优选为80°C。

在一些实施方案中，上述B晶型的制备方法，包括以下步骤：

(i) 将式(I)化合物加入溶剂中，在70~100°C下搅拌0.5~2小时；

(ii) 缓慢降温，静置8~16小时；

(iii) 离心，干燥8~16小时；

其中，所述溶剂为乙醇和水的混合溶剂，乙醇和水的体积比为3:1。

本发明的一些方案中，步骤(i)为将式(I)化合物加入溶剂中，在80°C下搅拌0.5~2小时。

本发明的一些具体方案中，步骤(i)为将式(I)化合物加入溶剂中，在80°C下搅拌1小时。

另一方面，本发明提供包含所述化合物WX₁的A晶型的结晶组合物，其中，所述化合物WX₁的A晶型占结晶组合物重量的50%以上，较好为80%以上，更好是90%以上，最好是95%以上。

另一方面，本发明提供包含所述式(I)化合物的B晶型的结晶组合物，其中，所述式(I)化合物的B晶型占结晶组合物重量的50%以上，较好为80%以上，更好是90%以上，最好是95%以上。

另一方面，本发明提供了包含所述式(I)化合物的马来酸盐、式(II)化合物、化合物WX₁、化合物WX₁的A晶型、包含化合物WX₁的A晶型的结晶组合物、式(I)化合物的B晶型、或包含式(I)化合物的B晶型的结晶组合物的药物组合物，该药物组合物中包含治疗有效量的本发明所述式(I)化合物的马来酸盐、式(II)化合物、化合物WX₁、化合物WX₁的A晶型、包含化合物WX₁的A晶型的结晶组合物、式(I)化合物的B晶型、或包含式(I)化合物的B晶型的结晶组合物。本发明的药物组合物中可含有或不含有药学上可接受的辅料。

另一方面，本发明还提供上述化合物、A晶型和B晶型在制备治疗乳腺癌与其他癌症药物中的应用。

另一方面，本发明还提供了式(I)化合物的马来酸盐、式(II)化合物、化合物WX₁、化合物WX₁的A晶型、包含化合物WX₁的A晶型的结晶组合物、式(I)化合物的B晶型、或包含式(I)化合物的B晶型的结晶组合物，或其药物组合物在制备用于治疗CDK4/6介导的疾病的药物中的用途，其中所述疾病包括癌症，优选为乳腺癌或肺癌。

另一方面，本发明还提供一种治疗哺乳动物(例如人)疾病的方法，其中所述疾病是CDK4/6介导的疾病，该方法包括向哺乳动物(例如人)给予治疗有效量的式(I)化合物的马来酸盐、式(II)化合物、化合物WX₁、化合物WX₁的A晶型、包含化合物WX₁的A晶型的结晶组合物、式(I)化合物的B晶型、或包含式(I)化合物的B晶型的结晶组合物，或其药物组合物，其中所述疾病包括癌症，优选为乳腺癌或肺癌。

还一方面，本发明还提供了用于治疗 CDK4/6 介导的哺乳动物（例如人）的疾病的式（I）化合物的马来酸盐、式（II）化合物、化合物 WX_1、化合物 WX_1 的 A 晶型、包含化合物 WX_1 的 A 晶型的结晶组合物、式（I）化合物的 B 晶型、或包含式（I）化合物的 B 晶型的结晶组合物，或其药物组合物，其中所述疾病包括癌症，优选为乳腺癌或肺癌。

技术效果

式（I）化合物的马来酸盐在生物活性、安全性、生物利用度等至少一方面具有优异的效果，化合物 WX_1 的 A 晶型和式（I）化合物的 B 晶型非常稳定，吸湿性小，水溶性好，成药前景良好。

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。

术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以预防、改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：

- (i) 预防疾病或疾病状态在哺乳动物中出现，特别是当这类哺乳动物易患有该疾病状态，但尚未被诊断为已患有该疾病状态时；
- (ii) 抑制疾病或疾病状态，即遏制其发展；
- (iii) 缓解疾病或疾病状态，即使该疾病或疾病状态消退。

术语“治疗有效量”意指(i) 治疗或预防特定疾病、病况或障碍，(ii) 减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状，或(iii) 预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本申请化合物的用量。构成“治疗有效量”的本申请化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被治疗的哺乳动物的年龄而改变，但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的知识及本公开内容而确定。

术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

作为药学上可接受的盐，例如，可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。

术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

术语“药学上可接受的辅料”是指对有机体无明显刺激作用，而且不会损害该活性化合物的生物活性

及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的，例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水等。

词语“包括 (comprise)”或“包含 (comprise)”及其英文变体例如 comprises 或 comprising 应理解为开放的、非排他性的意义，即“包括但不限于”。

术语“PO”是指口服给药。

术语“QD×3W”是指一天一次，持续给药3周。

本申请的药物组合物可通过将本申请的化合物与适宜的药学上可接受的辅料组合而制备，例如可配制成固态、半固态、液态或气态制剂，如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球及气溶胶等。

给予本申请化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、局部、吸入、肠胃外、舌下、阴道内、鼻内、眼内、腹膜内、肌内、皮下、静脉内给药。

本申请的药物组合物可以采用本领域众所周知的方法制造，如常规的混合法、溶解法、制粒法、制糖衣药丸法、磨细法、乳化法、冷冻干燥法等。

在一些实施方案中，药物组合物是口服形式。对于口服给药，可以通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的辅料混合，来配制该药物组合物。这些辅料能使本申请的化合物被配制成片剂、丸剂、锭剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、浆剂、悬浮剂等，用于对患者的口服给药。

可以通过常规的混合、填充或压片方法来制备固体口服组合物。例如，可通过下述方法获得：将所述的活性化合物与固体辅料混合，任选地碾磨所得的混合物，如果需要则加入其它合适的辅料，然后将该混合物加工成颗粒，得到了片剂或糖衣剂的核心。适合的辅料包括但不限于：粘合剂、稀释剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、甜味剂或矫味剂等。

药物组合物还可适用于肠胃外给药，如合适的单位剂型的无菌溶液剂、混悬剂或冻干产品。

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。

本发明采用下述缩略词：MW 代表微波；rt.代表室温；aq 代表水溶液；DCM 代表二氯甲烷；THF 代表四氢呋喃；DMSO 代表二甲基亚砜；NMP 代表 N-甲基吡咯烷酮；EtOAc 代表乙酸乙酯；EtOH 代表乙

醇; MeOH 代表甲醇; dioxane 代表二氧六环; HOAc 代表乙酸; Boc 代表叔丁氧羰基, Cbz 代表苄氧羰基, 两者都是胺保护基团; Boc₂O 代表二-叔丁基二碳酸酯; DIPEA 代表二异丙基乙胺; TEA 或 Et₃N 代表三乙胺; BnNH₂ 代表苄胺; PMBNH₂ 代表对甲氧基苄胺; KOAc 代表醋酸钾; NaOAc 代表醋酸钠; Cs₂CO₃ 代表碳酸铯; K₂CO₃ 代表碳酸钾; NaHCO₃ 代表碳酸氢钠; Na₂SO₄ 代表硫酸钠; pyridine 代表吡啶; NaOH 代表氢氧化钠; TEA 或 Et₃N 代表三乙胺; NaH 代表钠氢; LiHMDS 代表双(三甲基硅基)胺基锂; i-PrMgBr 代表异丙基溴化镁; *t*-BuOK 代表叔丁醇钾; *t*-BuONa 代表叔丁醇钠; Pd₂(dba)₃ 代表三(二亚苄基丙酮)二钯; Pd(PPh₃)₄ 代表三苯基膦钯; Pd(dppf)Cl₂ CH₂Cl₂ 代表[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯.二氯甲烷; Pd(OAc)₂ 代表醋酸钯; Pd(PPh₃)₂Cl₂ 代表二(三苯基膦)二氯化钯; Rh(PPh₃)₃Cl 代表三(三苯基膦)氯化铑; Pd(OH)₂ 代表氢氧化钯; Xantphos 代表 4,5-双(二苯基膦)-9,9-二甲基氧杂蒽; Xphos 代表 2-二环己基膦-2',4',6'-三异丙基联苯; BINAP 代表(±)-2,2'-双-(二苯基膦)-1,1'-联萘; Xantphos 代表 4,5-双-(二苯基膦)-9,9-二甲基氧杂蒽; Xphos-Pd-G1 代表氯(2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基-1,1'-联苯基)[2-(2'-氨基乙基苯基)]钯(II); Xphos-PD-G₂ 代表氯(2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基-1,1'-联苯基)[2-(2'-氨基-1,1'-联苯)]钯(II); Xphos-Pd-G₃ 代表甲磺酸(2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基-1,1'-联苯基)[2-(2'-氨基-1,1'-联苯)]钯(II); I₂ 代表碘单质; LiCl 代表氯化锂; HCl 代表盐酸; maleic acid 代表马来酸。

化合物经手工或者 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 (又称 “X-射线粉末衍射”, X-ray powder diffractometer, XRPD) 方法

仪器型号: 布鲁克 D8 advance X-射线衍射仪

测试方法: 大约 10 ~ 20 mg 样品用于 XRPD 检测。

详细的 XRPD 参数如下:

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

光管电压: 40 kV, 光管电流: 40 mA

发散狭缝: 0.60 mm

探测器狭缝: 10.50 mm

防散射狭缝: 7.10 mm

扫描范围: 4-40 deg

步径: 0.02 deg

步长: 0.12 秒

样品盘转速: 15 rpm

需要说明的是, 在 X-射线粉末衍射光谱 (XRPD) 中, 由结晶化合物得到的衍射谱图对于特定的结晶往往是特征性的, 其中谱带 (尤其是在低角度) 的相对强度可能会因为结晶条件、粒径和其它测定条件的差

异而产生的优势取向效果而变化。因此，衍射峰的相对强度对所针对的结晶并非其特征性的，判断是否与已知的结晶相同时，更应该注意的是峰的相对位置而不是它们的相对强度。此外，对任何给定的结晶而言，峰的位置可能存在轻微误差，这在结晶学领域中也是公知的。例如，由于分析样品时温度的变化、样品移动、或仪器的标定等，峰的位置可以移动， 2θ 值的测定误差有时约为 $\pm 0.2^\circ$ 。因此，在确定每种结晶结构时，应该将此误差考虑在内。在 XRPD 图谱中通常用 2θ 角或晶面距 d 表示峰位置，两者之间具有简单的换算关系： $d = \lambda / 2\sin\theta$ ，其中 d 代表晶面距（又称“面间距”）， λ 代表入射 X 射线的波长， θ 为衍射角。对于同种化合物的同种结晶，其 XRPD 谱的峰位置在整体上具有相似性，相对强度误差可能较大。还应指出的是，在混合物的鉴定中，由于含量下降等因素会造成部分衍射线的缺失，此时，无需依赖高纯试样中观察到的全部谱带，甚至一条谱带也可能对给定的结晶是特征性的。

本发明差热分析（又称“差示扫描量热法”，Differential Scanning Calorimeter, DSC）方法

仪器型号：TA Q2000 差示扫描量热仪

测试方法：取样品（ $\sim 1\text{ mg}$ ）置于 DSC 铝锅内进行测试，在 50 mL/min N_2 条件下，以 10°C/min 的升温速率，加热样品从 25°C 到 300°C 。

DSC 测定当结晶由于其结晶结构发生变化或结晶熔融而吸收或释放热时的转变温度。对于同种化合物的同种结晶，在连续的分析中，热转变温度和熔点误差典型的在约 5°C 之内，通常在约 3°C 之内，当我们说一个化合物具有一给定的 DSC 峰或熔点时，这是指该 DSC 峰或熔点 $\pm 5^\circ\text{C}$ 。DSC 提供了一种辨别不同结晶的辅助方法。不同的结晶形态可根据其不同的转变温度特征而加以识别。需要指出的是对于混合物而言，其 DSC 峰或熔点可能会在更大的范围内变动。此外，由于在物质熔化的过程中伴有分解，因此熔化温度与升温速率相关。

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

仪器型号：TA Q5000IR 热重分析仪

测试方法：取样品（ $2\sim 5\text{ mg}$ ）置于 TGA 铂金锅内进行测试，在 25 mL/min N_2 条件下，以 10°C/min 的升温速率，加热样品从室温到 350°C 。

附图说明

图 1 为化合物 WX_1 A 晶型的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。

图 2 为化合物 WX_1 A 晶型的 DSC 谱图。

图 3 为化合物 WX_1 A 晶型的 TGA 谱图。

图 4 为式 (I) 化合物 B 晶型的 Cu-K α 辐射的 XRPD 谱图。

图 5 为式 (I) 化合物 B 晶型的 DSC 谱图。

图 6 为式 (I) 化合物 B 晶型的 TGA 谱图。

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。

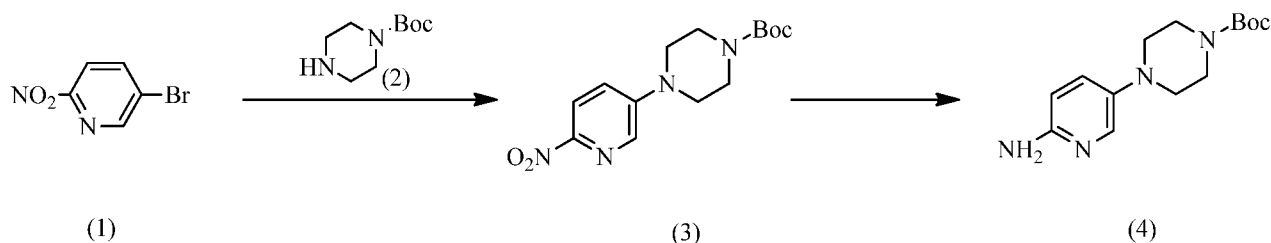
WX_1 A 晶型的制备

在 20℃ 下，将马来酸（439.30 克，99.6% 纯度），甲醇（11.90 升）和水（666.00 毫升）加入到 50 升反应釜中，得到的混合物加热至 65℃，然后向反应釜中加入式 (I) 化合物（1.66 千克）。将反应混合物在 65℃ 下搅拌 1 小时后，冷却至 20℃，搅拌 18 小时。得到的混合物过滤，滤饼用甲醇（2 升×2）洗涤后，在 45℃ 条件下真空干燥 70 小时，得到化合物 WX_1 A 晶型的粗品（1.55 千克，98.88% 纯度）。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.88 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.61 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 9.1, 3.1 Hz, 1H), 6.05 (s, 2H), 4.15 (s, 3H), 3.60 (td, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 3.33 (br d, *J* = 6.0 Hz, 4H), 3.29 (br d, *J* = 5.9 Hz, 4H), 1.51 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H)。

在 30℃ 下，向 10 升三口瓶中加入甲醇（8.65 升），将此溶液加热至 50℃，然后将 WX_1 A 晶型的粗品（865.00 克，1.52 摩尔，1.00 当量）加入到反应瓶中。将反应混合物在 50℃ 下搅拌 2 小时。然后将反应混合物冷却至 30℃，过滤，滤饼用甲醇（1 升×2）洗涤后，在 45℃ 条件下真空干燥 64 小时，得到 WX_1 A 晶型（780.00 克，98.98% 纯度）。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.83 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 9.2, 3.0 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 4.15 (s, 3H), 3.60 (td, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 3.34 (br d, *J* = 3.5 Hz, 4H), 3.29 (br d, *J* = 5.8 Hz, 4H), 1.51 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H)。

式 (I) 化合物的制备

制备流程 1:



第 1 步:

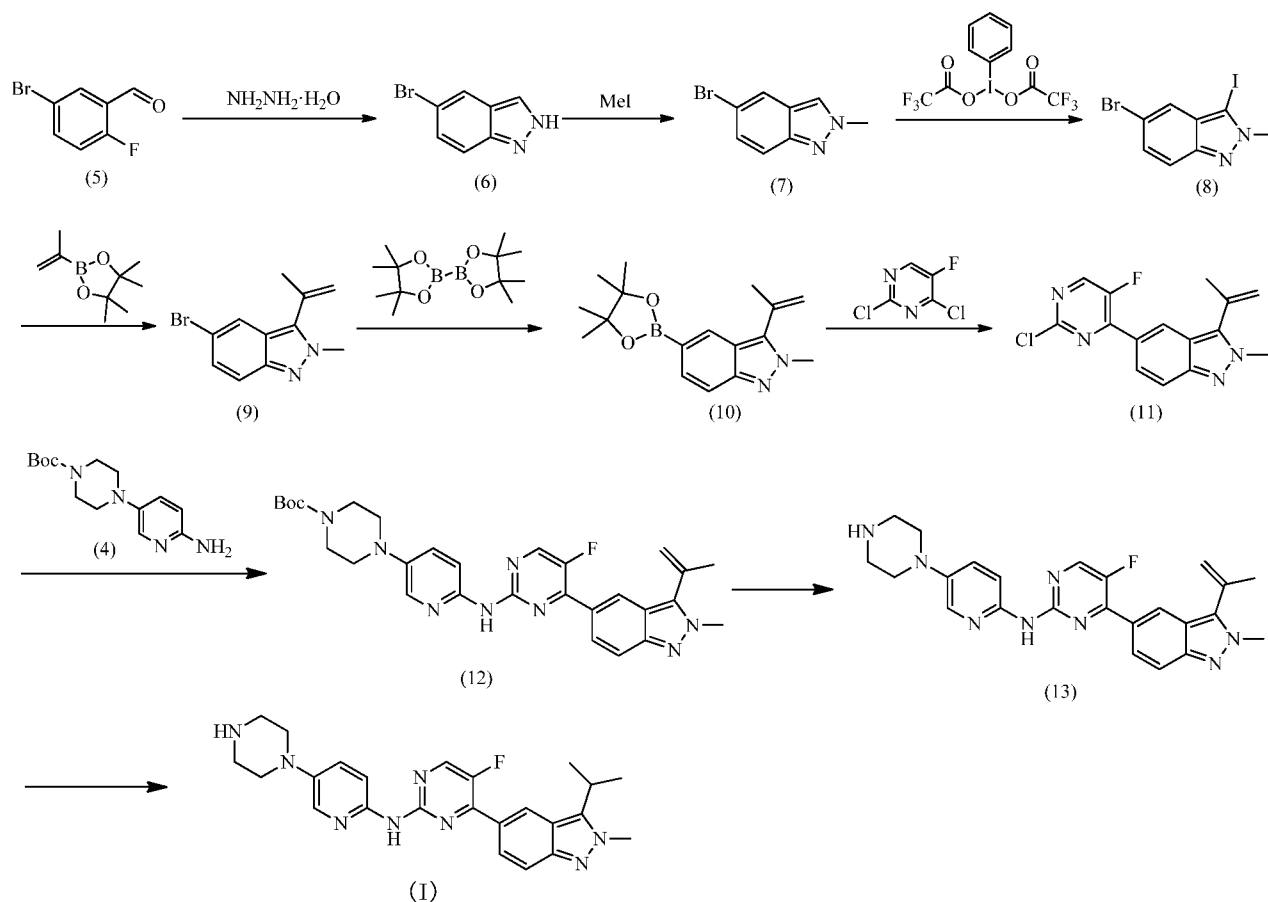
向化合物 (1)（20.00 克，98.53 毫摩尔，1.00 当量）的二甲亚砜（52 毫升）溶液中，加入化合物 (2)

(24.00 克, 128.86 毫摩尔, 1.31 当量) 和三乙胺 (20.00 克, 197.65 毫摩尔, 2.01 当量)。将溶液加热到 60℃ 并搅拌 18 小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=3:1) 显示反应完全。溶液用水 (200 毫升) 稀释并搅拌 30 分钟, 然后过滤。滤饼用水洗, 用真空干燥得到粗产物。粗产物用硅胶柱 (石油醚: 乙酸乙酯=50: 1 至 20: 1) 纯化, 得到化合物 (3) (27.00 克, 87.57 毫摩尔, 产率: 88.87%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 9.03 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 2.89 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 9.10, 2.95 Hz, 1H), 3.69-3.59 (m, 4H), 3.51-3.40 (m, 4H), 1.49 (s, 9H)。

第 2 步:

在氮气保护下, 向化合物 (3) (28.00 克, 90.81 毫摩尔, 1.00 当量) 的甲醇 (600 毫升) 溶液中, 加入钯碳 (6%, 1.7 克)。悬浊液抽气并充入氢气几次。溶液在 50℃, 氢气 (50 psi) 氛围下搅拌 18 小时。TLC (二氯甲烷: 甲醇=10: 1) 显示原料反应完全。将悬浊液过滤, 滤液旋干, 得到化合物 (4) (24.13 克, 86.69 毫摩尔, 产率: 95.46%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (d, *J* = 2.64 Hz, 1H) 7.18 (dd, *J* = 8.78, 2.89 Hz, 1H) 6.50 (d, *J* = 8.78 Hz, 1H) 4.21 (br s, 2H) 3.60-3.54 (m, 4H) 3.00-2.92 (m, 4H) 1.48 (s, 9H)。

制备流程 2:



第 1 步:

向 85% 的水合肼 (103.00 克, 2.06 摩尔, 23.20 当量) 水溶液中, 缓慢加入化合物 (5) (18.00 克,

88.67 毫摩尔, 1.00 当量), 在滴加过程中有白色固体慢慢析出。将混合物在 110℃ 下搅拌 16 小时。LCMS 显示大部分为目标化合物, 将混合物冷却到 16℃ 并过滤, 滤饼用水 (100 毫升) 洗涤得到粗产品, 粗产品通过柱层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=3: 2), 得到化合物 (6) (6.50 克, 32.99 毫摩尔, 产率 37.21%)。LCMS (ESI) m/z: 197.1 (M+1).

第 2 步:

在 30℃, 氮气保护下, 向化合物 (6) (20.00 克, 101.51 毫摩尔, 1.00 当量) 和甲醇钠 (5.48 克, 5.48 毫摩尔, 5.48 当量) 的甲醇 (150.00 毫升) 溶液中, 滴加碘甲烷 (57.00 克, 401.58 毫摩尔, 3.96 当量), 控制滴加时间为 1 小时。然后将混合物加热到 85℃ 并搅拌 5 小时, LCMS 显示原料几乎消耗完全并且检测到所需化合物的 MS, 将混合物冷却至 16℃ 并浓缩得到粗产品, 用 3% 的 NaHCO₃ 水溶液 (30 毫升) 稀释, 用乙酸乙酯 (80 毫升×2) 萃取, 有机相减压浓缩。残余物通过柱层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=30: 1 至 1: 1), 得到化合物 (7) (8.40 克, 39.80 毫摩尔, 收率 39.21%)。 ¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 1.8 Hz, 8 Hz, 1H), 4.18 (s, 1H). LCMS (ESI) m/z: 210.8 (M+1).

第 3 步:

在 30℃ 下, 向化合物 (7) (8.40 克, 39.80 毫摩尔, 1.00 当量) 的二氯甲烷 (90 毫升) 溶液中, 加入吡啶 (4.72 克, 59.70 毫摩尔, 1.5 当量) 和双(三氟乙酰氧)碘代苯 (20.54 克, 47.76 毫摩尔, 1.20 当量) 将混合物搅拌 0.5 小时, 然后加入碘 (12.12 克, 47.76 毫摩尔, 1.20 当量) 继续搅拌 23.5 小时。LCMS 显示反应完全, 将混合物过滤, 得到化合物 (8) (8.20 克, 粗品)。LCMS (ESI) m/z: 336.9 (M+1).

第 4 步:

在氮气保护下, 向化合物 (8) (7.68 克, 22.79 毫摩尔, 1.00 当量) 和异丙基硼酸酯 (4.21 克 25.07 毫摩尔, 1.11 当量) 的二氧六环 (90.00 毫升) 溶液中, 加入 K₂CO₃ (9.45 克, 68.38 毫摩尔, 3.00 当量) 的饱和水溶液 (30 毫升), Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (1.86 克, 2.28 毫摩尔, 0.10 当量), 将混合物在 100℃ 下搅拌 3 小时。TLC 显示原料几乎反应完全, 将混合物冷却到 30℃, 过滤, 滤液用乙酸乙酯 (100 毫升×3) 萃取, 用水 (50 毫升×3) 洗涤, 饱和食盐水 (20 毫升×3) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤、浓缩, 残余物通过柱层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=1: 1), 得到化合物 (9) (5.36 克, 21.34 毫摩尔, 收率 93.66%)。

第 5 步:

在氮气保护下, 向化合物 (9) (2.80 克, 11.15 毫摩尔, 1.00 当量) 和双联频哪醇硼酸酯 (3.40 克, 13.38 毫摩尔, 1.20 当量) 的二氧六环 (56.00 毫升) 溶液中加入 KOAc (3.28 克, 33.45 毫摩尔, 3.00 当量) 和 Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (1.82 克, 2.23 毫摩尔, 0.20 当量), 将混合物在 100℃ 下搅拌 5 小时。LCMS 显示反应完全, 并检测到目标化合物的 MS, 将混合物冷却到 16℃, 混合物用乙酸乙酯 (20 毫升) 稀释, 过滤

得到滤液。滤液通过柱层析（石油醚：乙酸乙酯=1：1）纯化，得到化合物（10）（3.30 克，9.96 毫摩尔，收率 89.33%，纯度 90%）。LCMS (ESI) m/z: 299.1 (M+1).

第 6 步:

在氮气保护下，向 2, 4-二氯-5-氟-嘧啶（147.83 毫克，885.34 微摩尔，1.20 当量）和化合物（10）（220.00 毫克，737.78 微摩尔，1.00 当量）的二氧六环（4 毫升）溶液中加入 K_2CO_3 （305.91 毫克，2.21 毫摩尔，3.00 当量）和 $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ （120.50 毫克，147.56 微摩尔，0.20 当量），将混合物在 100℃ 下搅拌 3.5 小时。TLC 显示大多数原料反应完全，LCMS 显示主要为目标产物的 MS，将混合物冷却到 30℃ 并过滤，滤饼用乙酸乙酯（5 毫升）洗涤，滤液浓缩，残余物通过柱层析纯化（石油醚：乙酸乙酯=1：0 至 6：1），得到化合物（11）（210.0 毫克，693.69 微摩尔，收率 94.02%）。LCMS (ESI) m/z: 303.0 (M+1).

第 7 步:

向化合物（11）（200.00 毫克，660.65 微摩尔，1.00 当量）的二氧六环（10.00 毫升）溶液中，加入化合物（4）（220.67 毫克，792.79 微摩尔，1.20 当量）， $Pd_2(dba)_3$ （60.50 毫克，66.07 微摩尔，0.10 当量）和 Xantphos（76.45 毫克，132.13 微摩尔，0.20 当量）和碳酸铯（430.51 毫克，1.32 毫摩尔，2.00 当量）。溶液在氮气保护下升温到 110℃ 搅拌 16 小时。LCMS 显示反应完全。溶液冷却至 25℃，过滤，浓缩得到粗产物。粗产物用制备 TLC（乙酸乙酯：石油醚=1：2）纯化，得到化合物（12）（320.00 毫克，587.57 微摩尔，产率：88.94%）。LCMS (ESI) m/z: 545.3 (M+1).

第 8 步:

在氮气保护下，向化合物（12）（320.00 毫克，587.57 微摩尔，1.00 当量）的甲醇（20.00 毫升）溶液中加入钨碳（200.00 毫克）和乙酸（2.10 克，34.97 毫摩尔，59.52 当量）。悬浊液抽气并充入氢气几次。溶液在 50℃，氢气（32 psi）氛围下搅拌 96 小时。LCMS 显示反应完全。悬浊液冷却到 25℃，过滤，浓缩得到化合物（13）（500.00 毫克，粗产品）。LCMS (ESI) m/z: 547.1 (M+1).

第 9 步:

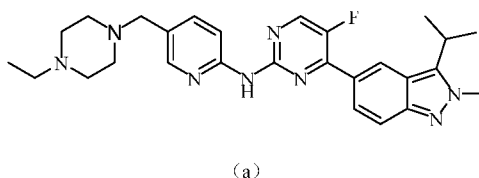
在 20℃ 下，向化合物（13）（10.00 克，18.29 毫摩尔，1.00 当量）的二氯甲烷（80.00 毫升）溶液中，加入 HCl/EtOAc（4 摩尔/升，80.00 毫升，17.50 当量），搅拌 2 小时。LCMS 显示反应完成。将反应混合物过滤，滤饼用乙酸乙酯（50 毫升×3）洗涤。将滤饼溶解在去离子水（100 毫升）中，用饱和碳酸氢钠水溶液调节 pH 至 7-8，将该体系用二氯甲烷（200 毫升×3）萃取。合并的有机相用饱和食盐水（100 毫升）洗涤，经无水硫酸钠干燥后，浓缩。得到的粗产品用叔丁醇（50 毫升）在 80℃ 下搅拌 1 小时，将该体系冷却至 20℃，过滤，滤饼用甲醇（30 毫升×2）洗涤，干燥后，得到式（I）化合物（7.50 克，16.63 毫摩尔，收率：90.92%，纯度：99%）。 ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.72 (s, 1H), 8.42 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 9.2, 3.0 Hz, 1H), 4.18 (s, 3H), 3.63 (quin, J = 7.0 Hz, 1H), 3.12 (dd, J = 6.1, 3.8 Hz, 4H), 3.02-2.97 (m, 4H), 1.59 (d, J = 7.0 Hz, 6H).

LCMS (ESI) m/z: 447.1 (M+1).

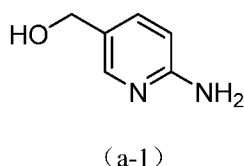
式 (I) 化合物 B 晶型的制备

将大约90 mg式 (I) 化合物置于1.5 mL玻璃瓶中, 加入大约1.2 mL的混合溶剂 (EtOH:H₂O=3:1), 形成的混悬液在80℃下搅拌1小时, 关闭加热, 缓慢降温, 静置过夜, 将该悬浮液快速离心 (14000 rpm, 5 min), 得到的固体进一步在40℃真空干燥箱中干燥过夜, 得式 (I) 化合物B晶型。

式 (a) 化合物的制备

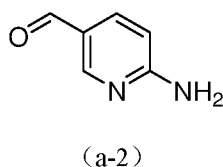


第1步



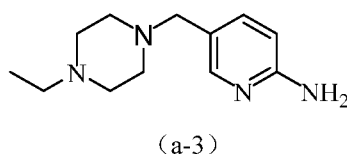
在氮气保护下, 向LiAlH₄(1.5 克)的四氢呋喃(100 毫升)溶液中加入6-氨基吡啶-3-甲酸甲酯(5.00 克)的四氢呋喃(50 毫升)溶液, 将混合物在70℃下搅拌16小时。TLC显示反应完全, 将混合物冷却到20℃, 依次加入水(1.5 毫升), 氢氧化钠(15%, 1.5 毫升)水溶液, 水(4.5 毫升)并搅拌0.5小时。将混合物过滤, 滤液浓缩得到黄色固体, 用(石油醚: 乙酸乙酯=1:10)洗涤, 残余的黄色固体为式 (a-1) 化合物(2.6 克)。

第2步



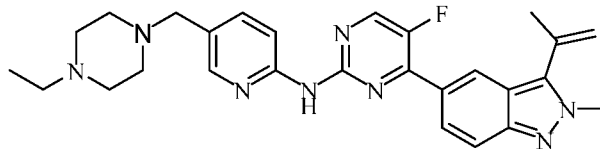
向式 (a-1) 化合物的二氯甲烷(30毫升)溶液中加入二氧化锰(17.51 克), 将混合物在50℃下搅拌16小时。TLC(石油醚: 乙酸乙酯=1:1)显示反应完全。将混合物冷却至20℃并过滤, 滤液浓缩得到式 (a-2) 化合物(2.10 克)为黄色固体, 式 (a-2) 化合物不经过纯化直接用于下一步反应。

第3步



向式 (a-2) 化合物 (2.00 克) 的甲醇 (20毫升) 溶液中加入1-乙基哌嗪(1.87 克), 将混合物在20℃下搅拌1小时, 然后加入NaBH₃CN (氰基硼氢化钠, 2.57克), 将混合物在20℃下搅拌15小时。LCMS显示反应完全, 减压浓缩除去溶剂, 残余物通过制备HPLC (碱性)纯化, 得到式 (a-3) 化合物 (800 毫克) 为黄色固体。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.38 (br. s, 2H), 3.38 (s, 2H), 2.61-2.31 (m, 10H), 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

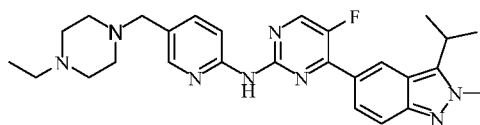
第4步



(a-4)

在氮气保护下, 向化合物 (11) (250.00 毫克) 和式 (a-3) 化合物 (200.13 毫克) 的二氧六环 (8 毫升) 溶液中加入Pd₂(dba)₃(151.24毫克), Xantphos (191.13 毫克) 和Cs₂CO₃ (538.14 毫克), 将混合物在100℃下搅拌16小时, 混合物眼色变成棕色。TLC和LCMS显示原料反应完全, 将混合物冷却到20℃并用乙酸乙酯 (20 毫升) 稀释, 过滤, 滤饼用乙酸乙酯 (4 毫升) 洗涤, 滤液浓缩得到粗产物, 向粗产物中加入甲醇 (8 毫升) 在30℃下静置2小时, 有黄色沉淀析出, 过滤, 滤饼用甲醇 (2 毫升) 洗涤, 干燥得到式 (a-4) 化合物 (143.00 毫克)。¹H NMR(400 MHz, Methanol-d₄) δ 9.99(s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.21 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.17(s, 3H), 3.43 (s, 2H), 2.38-2.27 (m, 13H), 0.97 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H). LCMS (ESI) *m/z*: 487.2 (M+1).

第5步



(a)

向Pd/C (20 毫克) 的甲醇(5 毫升) 中加入式 (a-4) 化合物(120.00 毫克), 向体系中通入氢气并保持压力为15Psi, 将混合物在50℃下搅拌16 小时。LCMS 显示反应完全, 过滤, 滤液浓缩, 残余物通过制备HPLC (HCl) 纯化(HCl)纯化, 得到式 (a) 化合物 (68.00 毫克)。¹H NMR(400 MHz, Methanol-d₄) δ 9.99 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.16 (s, 3H), 3.62 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.44 (s, 2H), 2.55-2.31 (m, 10H), 1.51 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H), 0.98 (s, 3H). LCMS (ESI) *m/z*: 489.3 (M+1).

化合物WX_1 A晶型的吸湿性研究

实验条件:

仪器型号: SMSDVS Advantage动态蒸汽吸附仪

测试条件：取样品（10 ~ 15 mg）置于DVS样品盘内进行测试。

DVS参数：

温度：25° C

平衡：dm/dt=0.01 %/min（最短：10 min，最长：180 min）

干燥：0% RH下干燥120min

RH（%）测试梯级：10%

RH（%）测试梯级范围：0% - 90% - 0%

吸湿性评价标准：

吸湿性分类	吸湿增重*（ $\Delta W\%$ ）
潮解	吸收足量水分形成液体
极具吸湿性	$\Delta W\% \geq 15\%$
有吸湿性	$15\% > \Delta W\% \geq 2\%$
略有吸湿性	$2\% > \Delta W\% \geq 0.2\%$
无或几乎无吸湿性	$\Delta W\% < 0.2\%$

* 在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $80 \pm 2\%$ RH下的吸湿增重

实验结果：化合物WX_1 A晶型在25℃、80% RH下的吸湿增重为1.48%。

实验结论：化合物WX_1 A晶型略有吸湿性。

化合物WX_1的多晶型研究

将化合物WX_1 A晶型在相应溶剂中加热后溶解，在40℃下避光搅拌2天，将溶液离心取沉淀干燥后经XRPD检测，结果如下：

编号	溶剂	晶型
1	甲醇	A 晶型
2	乙醇	A 晶型
3	异丙醇	A 晶型
4	丙酮	A 晶型
5	乙酸乙酯	A 晶型
6	甲醇-水(3:1)	A 晶型
7	乙醇-水(3:1)	无定形（挥发）
8	丙酮-水(1:2)	无定形（挥发）
9	异丙醇-水(1:1)	A 晶型（挥发）

备注：挥发是指将化合物WX_1 A晶型在相应溶剂中加热后溶解，离心，取上清液挥发，析出的晶体做XRPD检测。

式 (I) 化合物与化合物 WX_1 A 晶型的溶解度试验

分别称取大约 2 毫克的样品（若是盐，则按照式 (I) 化合物 2 毫克的标准，根据盐因子计算得到所需要的盐的量）加入到 1.5 毫升的玻璃瓶中，然后分别加入 1 毫升不同的溶媒。将上述混悬液中置于磁力搅拌器上进行搅拌（室温 25-27℃）。待搅拌 24 小时后取样，先将所取样品离心，取上层清液，根据溶解情况适当稀释后，用 HPLC 测定其浓度，结果如下：

溶解度 样品	H ₂ O (mg/ml)	SGF (mg/ml)	FaSSIF (mg/ml)	FeSSIF (mg/ml)
式 (I) 化合物	0.01	>2.0	0.013	1.60
化合物 WX_1 A 晶型	1.14	>2.0	0.023	1.60

备注：

FaSSIF: 模拟人类餐前饥饿状态下小肠内的肠液；

FeSSIF: 模拟人类餐后饱食状态下小肠内的肠液；

SGF: 模拟人类饥饿状态下空胃时的胃液

由上表可以看出，化合物 WX_1 A 晶型在水中的溶解度比式 (I) 化合物提高了约 110 倍，溶解性能提升显著。

化合物 WX_1 A 晶型在不同 pH 中的溶解度研究

实验方法：

大约 10 毫克的化合物 WX_1 A 晶型加入到 8 毫升的玻璃瓶中，称取 9 份，然后分别加入 4 毫升不同的媒介(0.1N HCl, 0.01N HCl, 水, pH3.8、pH4.5、pH5.5、pH6.0、pH7.5、pH6.8 缓冲液)。将磁子加入到上述混悬液中，置于磁力搅拌器上进行搅拌（温度为 37℃，避光）。分别待搅拌 4、24 小时后取样离心，下层残留固体测定 XRPD，上层样品用滤膜过滤，滤液用 HPLC 测定其浓度，并测定其 pH 值，HPLC 系统用流动相平衡后在开始分析样品，结果如下表：

溶媒	pH		状态		溶解度		溶解度描述
	4hrs	24hrs	4 hrs	24 hrs	4 hrs (mg/mL)	(24 hrs) (mg/mL)	
0.1 N HCl(pH 1.00)	1.05	1.05	澄清的	澄清的	>2.5	>2.5	微溶
0.01 N HCl (pH 1.99)	2.29	2.32	澄清的	澄清的	>2.5	>2.5	微溶
pH 3.8缓冲液(pH 3.80)	3.98	3.97	澄清的	澄清的	>2.5	>2.5	微溶
pH 4.5缓冲液(pH 4.48)	4.47	4.47	澄清的	澄清的	>2.5	>2.5	微溶
pH 5.5缓冲液(pH 5.52)	5.32	5.31	浑浊的	浑浊的	0.110	0.138	极微溶
pH 6.0缓冲液(pH6.04)	5.62	5.64	浑浊的	浑浊的	0.002	0.002	几乎不溶
pH 6.8缓冲液(pH 6.80)	6.56	6.56	浑浊的	浑浊的	< LOQ*	< LOQ	几乎不溶
pH 7.4缓冲液(pH 7.39)	7.12	7.11	浑浊的	浑浊的	< LOQ	< LOQ	几乎不溶
纯化水(pH 6.05)	4.42	4.52	浑浊的	浑浊的	1.113	1.215	微溶

标准曲线	$y=14412x+6.8209$, $R^2=1$
------	-----------------------------

*: LOQ=0.0003 mg/mL S/N=21.7

化合物 WX_1 A 晶型的 CDK2/4/6 酶学活性测试

实验材料:

CDK2/cyclin A, CDK4/cyclin D1, CDK6/cyclin D1 (Life technology)。ULight 标记的多肽底物 ULight-4E-BP1 和 ULight-MBP (PerkinElmer)。铕标记的抗髓磷脂碱蛋白抗体和铕标记的兔源抗体 (PerkinElmer), Envision 多标记分析仪进行信号的检测 (PerkinElmer)。

实验方法:

将待检测的化合物进行三倍稀释, 包括 10 个浓度梯度, 最终的浓度范围是 5 μ M 到 0.25 nM。

● CDK2/cyclin A 的酶反应体系

标准的 Lance Ultra 方法通过 10 μ L 的酶反应体系进行, 包含 0.5 nM CDK2/cyclin A 蛋白, 100 nM ULight-MBP 多肽, 和 25 μ M ATP。分别将其溶解在酶缓冲液中, 缓冲液的成分包括: pH7.5 的羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液 50 mM, 乙二醇四乙酸 1 mM, 氯化镁 10 mM, 0.01% Brij-35, 二硫苏糖醇 2 mM。开始反应后, 用顶部热封膜 TopSeal-A 将 OptiPlate384 孔板封好, 室温孵育 60 分钟。

● CDK4/cyclin D1 的酶反应体系

标准的 Lance Ultra 方法通过 10 μ L 的酶反应体系进行, 包含 0.3 nM CDK4/cyclin D1 蛋白, 50 nM ULight-4E-BP1 多肽, 和 350 μ M ATP。分别将其溶解在酶缓冲液中, 缓冲液的成分包括: pH7.5 的羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液 50 mM, 乙二醇四乙酸 1 mM, 氯化镁 10 mM, 0.01% Brij-35, 二硫苏糖醇 2 mM。开始反应后, 用顶部热封膜 TopSeal-A 将 OptiPlate384 孔板封好, 室温孵育 180 分钟。

● CDK6/cyclin D1 的酶反应体系

标准的 Lance Ultra 方法通过 10 μ L 的酶反应体系进行, 包含 0.8 nM CDK6/cyclin D1 蛋白, 50 nM ULight-4E-BP1 多肽, 和 250 μ M ATP。分别将其溶解在酶缓冲液中, 缓冲液的成分包括 pH7.5 的羟乙基哌嗪乙硫磺酸溶液 50 mM, 乙二醇四乙酸 1 mM, 氯化镁 10 mM, 0.01% Brij-35, 二硫苏糖醇 2 mM。开始反应后, 用顶部热封膜 TopSeal-A 将 OptiPlate384 孔板封好, 室温孵育 180 分钟。

准备酶反应终止缓冲液, 用 1 倍稀释的检测缓冲液溶解 EDTA, 终止反应在室温进行 5 分钟。分别在 CDK2/cyclin A、CDK4/cyclin D1 和 CDK6/cyclin D1 反应中加入 5 μ L 检测混合液 (分别用铕标记的抗髓磷脂碱蛋白抗体和铕标记的兔源抗体配置)。室温孵育 60 分钟, 根据时间分辨荧光共振能量转移原理利用 Envision 仪器检测反应信号。

实验结果:

利用方程式 $(\text{Max-Ratio})/(\text{Max-Min}) \times 100\%$ 将原始数据换算成抑制率, IC_{50} 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出 (XLFIT5 中 205 模式得出, iDBS), 结果如下:

受试化合物	CDK4 IC_{50} (nM)	CDK6 IC_{50} (nM)	CDK2 IC_{50} (nM)
Palbociclib	5.23	0.98	1314.03
LY2835219	1.02	1.22	14.73
化合物WX_1 A晶型	0.35	<0.80	2.43

注: IC_{50} 是指使用某种试剂产生 50%最大抑制时对应试剂的浓度。

化合物 WX_1 A 晶型对 MCF-7 乳腺癌细胞增殖抑制实验

实验材料:

RPMI 1640 培养基, 胎牛血清, 盘尼西林/链霉素抗生素购自 Promega (Madison, WI)。MCF-7 细胞系购自欧洲细胞培养物保藏所 (ECACC)。Envision 多标记分析仪(PerkinElmer)。

实验方法:

将 MCF-7 细胞种于黑色 384 孔板中, 每孔 45 μL 细胞悬液, 其中包含 200 个 MCF-7 细胞。细胞板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。

将待测化合物用 Bravo 进行 3 倍稀释至第 10 个浓度, 即从 10 μM 稀释至 0.508 nM, 设置双复孔实验。向中间板中加入 49 μL 培养基, 再按照对应位置, 转移 1 μL 每孔的梯度稀释化合物至中间板, 混匀后转移 5 μL 每孔到细胞板中。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养 6 天。

向细胞板中加入每孔 25 μL 的 Promega CellTiter-Glo 试剂, 室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用 PerkinElmer Envision 多标记分析仪读数。

实验结果:

利用方程式 $(\text{Max-Ratio})/(\text{Max-Min}) \times 100\%$ 将原始数据换算成抑制率, IC_{50} 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出 (XLFIT5 中 205 模式得出, iDBS), 实验结果如下:

受试化合物	MCF-7 IC_{50} (nM)
Palbociclib	88.23
LY2835219	184.83
WX_1 A晶型	70.03

实验结论:

本发明的化合物 WX_1 A 晶型对雌激素受体阳性的 MCF-7 乳腺癌细胞具有明显的增殖抑制活性。化合物 WX_1 A 晶型较参照化合物 Palbociclib 和 LY2835219 具有更高的对 MCF-7 细胞增殖的抑制活性。

式 (I) 化合物对 MCF-7 细胞和 MDA-MB-436 细胞增殖抑制实验

实验材料:

RPMI 1640 培养基, 胎牛血清, 盘尼西林/链霉素抗生素购自 Promega (Madison, WI)。MCF-7 细胞系和 MDA-MB-436 细胞系购自欧洲细胞培养物保藏所 (ECACC)。Envision 多标记分析仪(PerkinElmer)。

实验方法:

将 MCF-7 细胞种于黑色 384 孔板中, 每孔 45 μ L 细胞悬液, 其中包含 200 个 MCF-7 细胞。细胞板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。

将 MDA-MB-436 细胞种于黑色 384 孔板中, 每孔 45 μ L 细胞悬液, 其中包含 585 个 MCF-7 细胞。细胞板置于二氧化碳培养箱中过夜培养。

分别将待测化合物用 Bravo 进行 3 倍稀释至第 10 个浓度, 即从 10 μ M 稀释至 0.508 nM, 设置双复孔实验。向中间板中加入 49 μ L 培养基, 再按照对应位置, 转移 1 μ L 每孔的梯度稀释化合物至中间板, 混匀后转移 5 μ L 每孔到细胞板中。细胞板置于二氧化碳培养箱中培养 6 天。

向细胞板中加入每孔 25 μ L 的 Promega CellTiter-Glo 试剂, 室温孵育 10 分钟使发光信号稳定。采用 PerkinElmer Envision 多标记分析仪读数。

实验结果:

利用方程式 $(\text{Max-Ratio})/(\text{Max-Min}) \times 100\%$ 将原始数据换算成抑制率, IC_{50} 的值即可通过四参数进行曲线拟合得出 (XLFIT5 中 205 模式得出, iDBS), 实验结果如下:

受试化合物	MCF-7 IC_{50} (nM)	MDA-MB-436 IC_{50} (nM)
式 (a) 化合物	240	2098
式 (I) 化合物	32.1	328

化合物 WX_1 A 晶型的体内药效研究 (一)**实验材料:**

皮下植入 MCF-7 乳腺癌患者来源的基于人源肿瘤细胞系的异种移植 (CDX) BALB/c 裸鼠, 雌性, 6-8 周, 体重 20 克。共需 150 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

实验目的:

评价受试药 Palbociclib、LY2835219 和化合物 WX_1 A 晶型在人乳腺癌 MCF-7 细胞皮下异种移植肿瘤模型上的体内药效。

实验方法:**(1) 配制药物详细方案:**

化合物	配制方法	浓度 (mg/ml)	储存 条件
溶媒 (0.5%甲基纤维素)	称取5 g甲基纤维素置于1000 ml玻璃瓶，加入1000ml去离子水，涡旋至溶液澄清。	--	4℃
50 mmol/L 乳酸钠缓冲液	将2.069 ml乳酸溶于200 ml去离子水，用5N NaOH调节PH至4.0。将溶液转移至500 ml容量瓶，加去离子水定容至500 ml，然后用0.2 um滤头过滤溶液。	--	4℃
Palbociclib	称取60.91 mg Palbociclib置于棕色药瓶内，加入21ml 50 mmol/L乳酸钠缓冲液（pH=4）	2.5	4℃
Palbociclib	称取121.81 mg Palbociclib置于棕色药瓶内，加入21 ml 50 mmol/L乳酸钠缓冲液（pH=4）	5	4℃
LY2835219	称取64.87 mg LY2835219置于棕色药瓶内，加入21 ml 0.5%MC，涡旋至均匀溶液	2.5	4℃
化合物WX_1 A晶型	称取49.77 mg 化合物WX_1 A晶型置于棕色药瓶内，加入21ml 0.5%MC，涡旋至均匀溶液	1.875	4℃

注：动物给药前需要轻轻将药物充分混匀。

(2) 动物实验分组和给药方案：

组别	N1	化合物治疗	剂量 (mg/kg)	给药体积参数 (μl/g) ²	给药途径	给药频次
1	10	溶剂对照	--	10	PO	QD× 3W
2	10	Palbociclib	25	10	PO	QD× 3W
3	10	Palbociclib	50	10	PO	QD× 3W
4	10	LY2835219	25	10	PO	QD× 3W
5	10	化合物WX_1 A晶型	18.75	10	PO	QD× 3W

(3) 实验操作：

BALB/c 裸鼠，雌性，6-8 周，体重约 20 克，将小鼠保持在一个特殊的无病原体的环境中，且在单个通风笼中（10 只小鼠每笼）。所有的笼子，铺垫和水在使用前进行消毒。所有的动物都可以自由获取标准认证的商业实验室饮食。共有 150 只，购自北京维通利华实验动物技术有限公司的小鼠用于研究。每只小鼠在左后背皮下植入雌激素片（0.18 mg/片，60 天缓释），3 天之后，每只小鼠在右后背皮下植入肿瘤细胞（ 10×10^6 在 0.2 毫升磷酸盐缓冲液中），用于肿瘤的生长。当平均肿瘤体积达到约 150-200 立方毫米时开始给药。将试验化合物每日口服给药，给药剂量如上表所示。肿瘤体积每周两次用二维卡尺测量，体积以立方毫米计量，通过以下公式计算： $V = 0.5 a \times b^2$ ，其中 a 和 b 分别是肿瘤的长径和短径。抗肿瘤药效是通过用化合物处理过的动物的平均肿瘤增加体积除以未用化合物处理过动物的平均肿瘤增加体积来确定。

实验结果：

待测化合物的抗肿瘤疗效如下：

受试化合物	给药剂量 (mg/kg)	肿瘤体积 (mm ³)			
		0 天	7 天	14 天	20天
Vehicle	0	153	231	356	537
Palbociclib	25.0	153	203	252	222
Palbociclib	50.0	153	180	197	137
LY2835219	25.0	153	155	147	102
化合物WX_1 A晶型	18.75	153	156	136	98

实验结论：

本发明化合物 WX_1 A 晶型在 MCF-7 乳腺癌基于人源肿瘤细胞系的异种移植 (CDX) 模型上展示了显著的抗肿瘤活性。如上表所示，实验开始 20 天后，未给药动物组的肿瘤体积从最开始的 153 立方毫米快速增长至 537 立方毫米，而同期化合物 WX_1 A 晶型所在动物组的肿瘤体积只是从最开始的 153 立方毫米减小至 98 立方毫米，明显小于参照化合物 Palbociclib 和 LY2835219 所在组的肿瘤体积，考虑到化合物 WX_1 A 晶型的给药剂量 (18.75 mg/kg) 少于参照化合物 LY2835219 (25 mg/kg) 或者参照化合物 Palbociclib (25 mg/kg, 50 mg/kg) (实验证明 Palbociclib 高剂量不能耐受)，化合物 WX_1 A 晶型的抗肿瘤活性明显优于参考化合物。

化合物 WX_1 A 晶型的体内药效研究 (二)

实验材料：

皮下植入 LU-01-0393 肺癌患者来源的基于人源肿瘤细胞系的异种移植 (CDX) BALB/c 裸鼠，雌性，6-8 周，体重 17-20 克，共需 72 只，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。人源性肺癌 LU-01-0393 肿瘤 (即非小细胞肺癌) 最初来源于外科切除手术的临床样品，接种到裸鼠上后被定义为 P0 代，P0 代肿瘤再接种到裸鼠上后被定义为 P1 代，以此类推，在裸鼠上进行传代。LU-01-0393-FP5 是从 P4 复苏后移植所得。本研究实验将会用到 FP6 代肿瘤组织。

实验目的：

评价受试药 Palbociclib、LY2835219 和化合物 WX_1 A 晶型在人肺癌 LU-01-0393 细胞皮下异种移植肿瘤模型上的体内药效。

实验方法：

(1) 配制药物详细方案：

化合物	配制方法	浓度 (mg/ml)	储存 条件
溶媒 (0.5%甲基纤维素)	称取5 g 甲基纤维素置于1000 mL玻璃瓶，加入1000 mL去离子水，涡旋至溶液澄清。	--	4℃
50 mmol/L 乳酸钠缓冲液	将2.069 mL乳酸溶于200 mL去离子水，用5N NaOH调节pH至4.0。将溶液转移至500 mL容量瓶，加去离子水定容至500 mL，然后用0.2 um滤头过滤溶液。	--	4℃
Palbociclib	称取267.27 mg Palbociclib置于棕色药瓶内，加入19 mL 50 mmol/L乳酸钠缓冲液（pH=4），超声，涡旋振荡得到均匀透明的溶液。	12	4℃
LY2835219	称取283.37 mg LY2835219置于棕色药瓶内，加入19 mL 0.5% 甲基纤维素，超声，涡旋振荡得到均匀透明的溶液。	12	4℃
化合物WX_1 A晶型	称取108.94 mg 化合物WX_1 A晶型置于棕色药瓶内，加入19 mL 0.5%甲基纤维素，超声，涡旋振荡得到均匀透明的溶液。	4.5	4℃

注：动物给药前需要轻轻将药物充分混匀。

(2) 动物实验分组和给药方案：

组别	N1	化合物治疗	剂量 (mg/kg)	给药体积参数 (μl/g) ²	给药途径	给药频次
1	10	溶剂对照	--	10	PO	QD× 3W
2	10	Palbociclib	120	10	PO	QD× 3W
3	10	LY2835219	120	10	PO	QD× 3W
4	10	化合物WX_1 A晶型	45	10	PO	QD× 3W

(3) 实验操作：

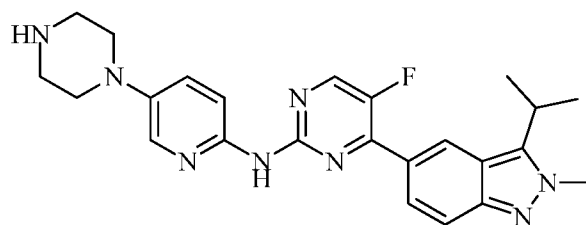
BALB/c 裸鼠，雌性，6-8 周，体重约 17-20 克，将小鼠保持在一个特殊的无病原体的环境中，且在单个通风笼中。所有的笼子，铺垫和水在使用前进行消毒。所有的动物都可以自由获取标准认证的商业实验室饮食。共有 72 只，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司的小鼠用于研究。将 LU-01-0393 FP6 肿瘤组织切成 20~30 mm³ 接种于每只小鼠的右背等待肿瘤生长，肿瘤平均体积达到约 171mm³ 时进行随机分组给药。将试验化合物每日口服给药，给药剂量如上表所示。每周两次用二维卡尺测量肿瘤直径通过以下公式计算： $V = 0.5 a \times b^2$ ，其中 a 和 b 分别是肿瘤的长径和短径。抗肿瘤药效是通过用化合物处理过的动物的平均肿瘤增加体积除以未用化合物处理过动物的平均肿瘤增加体积来确定。

实验结果：

待测化合物的抗肿瘤疗效如下：

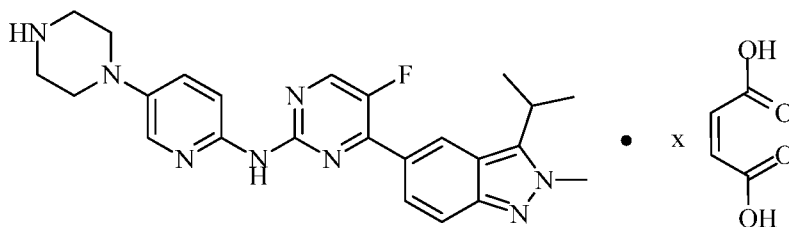
受试化合物	给药剂量 (mg/kg)	肿瘤体积 (mm ³)			
		0 天	7 天	14 天	21天
Vehicle	0	172±26	337±45	486±63	731±80
Palbociclib	120.0	170±24	261±38	266±41	251±34
LY2835219	120.0	172±23	228±26	255±30	272±36
化合物WX_1 A晶型	45	171±26	172±33	150±29	175±42

1. 式 (I) 化合物的马来酸盐



(I)

2. 根据权利要求 1 所述的式 (I) 化合物的马来酸盐, 如式 (II) 所示, 其中, x 选自 0.5~2,



(II)

3. 根据权利要求 2 所述的马来酸盐, 其中, x 选自 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 或 2.0。
4. 根据权利要求 3 所述的马来酸盐, 其中 x 为 0.8、0.9、1 或 1.1。
5. 根据权利要求 4 所述的马来酸盐, 其中 x 为 1。
6. 根据权利要求 4 或者 5 的马来酸盐的晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰:
 $4.69 \pm 0.2^\circ$, $14.04 \pm 0.2^\circ$ 。
7. 根据权利要求 6 所述的晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $4.69 \pm 0.2^\circ$,
 $9.35 \pm 0.2^\circ$, $13.28 \pm 0.2^\circ$, $14.04 \pm 0.2^\circ$, $16.03 \pm 0.2^\circ$, $18.74 \pm 0.2^\circ$, $20.08 \pm 0.2^\circ$, $28.25 \pm 0.2^\circ$ 。
8. 根据权利要求 7 所述的晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $4.69 \pm 0.2^\circ$,
 $9.35 \pm 0.2^\circ$, $10.01 \pm 0.2^\circ$, $13.28 \pm 0.2^\circ$, $14.04 \pm 0.2^\circ$, $16.03 \pm 0.2^\circ$, $18.74 \pm 0.2^\circ$, $20.08 \pm 0.2^\circ$, $23.53 \pm 0.2^\circ$, $25.11 \pm 0.2^\circ$,
 $27.80 \pm 0.2^\circ$, $28.25 \pm 0.2^\circ$ 。
9. 根据权利要求 8 所述的晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $4.69 \pm 0.2^\circ$,
 $9.35 \pm 0.2^\circ$, $10.01 \pm 0.2^\circ$, $13.28 \pm 0.2^\circ$, $14.04 \pm 0.2^\circ$, $16.03 \pm 0.2^\circ$, $16.83 \pm 0.2^\circ$, $17.73 \pm 0.2^\circ$, $18.58 \pm 0.2^\circ$, $18.74 \pm 0.2^\circ$,
 $20.08 \pm 0.2^\circ$, $21.58 \pm 0.2^\circ$, $23.53 \pm 0.2^\circ$, $25.11 \pm 0.2^\circ$, $25.27 \pm 0.2^\circ$, $27.80 \pm 0.2^\circ$, $28.25 \pm 0.2^\circ$, $33.00 \pm 0.2^\circ$ 。
10. 根据权利要求 9 所述的晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱中, 特征峰的峰位置及强度由下表表示:

编号	2θ 角 ($^\circ$)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 ($^\circ$)	相对强度 (%)
1	4.690	100	10	18.737	5.3

2	9.353	6.4	11	20.078	6.8
3	10.008	3.6	12	21.580	3.7
4	13.276	6.9	13	23.532	5.3
5	14.035	77.7	14	25.114	3.9
6	16.025	7.8	15	25.269	6.3
7	16.831	2.4	16	27.801	3.6
8	17.726	2.3	17	28.251	7.5
9	18.581	1.9	18	32.999	2.1

11. 根据权利要求 10 所述的晶型，其具有如图 1 所示的 XRPD 图谱所代表的特征。
12. 根据权利要求 6~11 中任一项所述的晶型，其差示扫描量热曲线在 $208.18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 处具有吸热峰。
13. 根据权利要求 12 所述的晶型，其具有如图 2 所示的 DSC 图谱所代表的特征。
14. 根据权利要求 6~11 中任一项所述的晶型，其热重分析曲线在 $188.49 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 处失重达 $0.3110 \pm 0.2\%$ 。
15. 根据权利要求 14 所述的晶型，其具有如图 3 所示的 TGA 图谱如所代表的特征。
16. 权利要求 6~15 中任一项所述的晶型的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 将马来酸和溶剂混合；
- (2) 向步骤 (1) 的混合物中加入式 (I) 化合物；
- (3) 过滤，干燥；

其中，所述溶剂选自甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、乙酸乙酯的一种或一种以上，以及甲醇/水的混合溶剂或者异丙醇/水的混合溶剂。

17. 权利要求 16 的制备方法，还包括：

- (a) 先将溶剂升温至 $45 \sim 55^{\circ}\text{C}$ ，然后将权利要求 16 得到的晶型加入溶剂中；
- (b) 在 $45 \sim 55^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 1~3 小时；
- (c) 冷却，过滤，滤饼用溶剂洗涤；
- (d) 干燥 48~72 小时；

其中，步骤 (a) 和步骤 (c) 所述的溶剂分别独立地选自甲醇、乙醇和异丙醇一种或一种以上。

18. 式 (I) 化合物的晶型，其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $12.88 \pm 0.2^{\circ}$ ， $14.18 \pm 0.2^{\circ}$ ， $16.72 \pm 0.2^{\circ}$ ， $17.49 \pm 0.2^{\circ}$ ， $19.21 \pm 0.2^{\circ}$ ， $21.06 \pm 0.2^{\circ}$ ， $21.65 \pm 0.2^{\circ}$ ， $24.14 \pm 0.2^{\circ}$ 。

19. 根据权利要求 18 所述的晶型，其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $9.86 \pm 0.2^{\circ}$ ， $12.88 \pm 0.2^{\circ}$ ， $14.18 \pm 0.2^{\circ}$ ， $16.72 \pm 0.2^{\circ}$ ， $17.49 \pm 0.2^{\circ}$ ， $19.21 \pm 0.2^{\circ}$ ， $21.06 \pm 0.2^{\circ}$ ， $21.65 \pm 0.2^{\circ}$ ， $24.14 \pm 0.2^{\circ}$ ， $26.29 \pm 0.2^{\circ}$ ， $27.69 \pm 0.2^{\circ}$ 。

20. 权利要求 19 所述的晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $9.56\pm 0.2^\circ$, $9.86\pm 0.2^\circ$, $11.53\pm 0.2^\circ$, $12.01\pm 0.2^\circ$, $12.88\pm 0.2^\circ$, $14.18\pm 0.2^\circ$, $15.21\pm 0.2^\circ$, $15.66\pm 0.2^\circ$, $16.72\pm 0.2^\circ$, $17.49\pm 0.2^\circ$, $18.79\pm 0.2^\circ$, $19.21\pm 0.2^\circ$, $19.76\pm 0.2^\circ$, $21.06\pm 0.2^\circ$, $21.65\pm 0.2^\circ$, $22.52\pm 0.2^\circ$, $22.93\pm 0.2^\circ$, $24.14\pm 0.2^\circ$, $24.47\pm 0.2^\circ$, $26.29\pm 0.2^\circ$, $27.69\pm 0.2^\circ$, $28.48\pm 0.2^\circ$, $28.79\pm 0.2^\circ$, $30.25\pm 0.2^\circ$, $30.74\pm 0.2^\circ$, $31.67\pm 0.2^\circ$, $34.79\pm 0.2^\circ$, $35.18\pm 0.2^\circ$ 。
21. 权利要求 20 所述的晶型, 其 X 射线粉末衍射图谱中, 特征峰的峰位置及强度由下表表示:

编号	2θ 角 ($^\circ$)	相对强度 (%)	编号	2θ 角 ($^\circ$)	相对强度 (%)
1	9.560	13.3	16	22.516	5.2
2	9.857	18.8	17	22.933	33.1
3	11.533	2.1	18	24.135	100.0
4	12.007	10.7	19	24.471	9.6
5	12.876	47.8	20	25.912	6.7
6	14.177	30.6	21	26.286	41.6
7	15.207	3.3	22	27.685	37.6
8	15.659	6.2	23	28.475	4.1
9	16.719	18.0	24	28.791	2.6
10	17.488	34.3	25	30.250	15.9
11	18.792	12.9	26	30.738	2.9
12	19.206	55.0	27	31.669	15.3
13	19.757	2.3	28	34.786	4.1
14	21.060	79.9	29	35.176	5.1
15	21.651	67.8	-	-	-

22. 根据权利要求 21 所述的晶型, 其具有如图 4 所示的 XRPD 图谱所代表的特征。
23. 根据权利要求 18~22 中任一项所述的晶型, 其差示扫描量热曲线在 225.76°C 处具有吸热峰。
24. 根据权利要求 23 所述的晶型, 其具有如图 5 所示的 DSC 图谱所代表的特征。
25. 根据权利要求 18~22 中任一项所述的晶型, 其热重分析曲线在 52.81°C 时, 重量减少了 0.1384%。
26. 根据权利要求 18~22 中任一项所述的晶型, 其热重分析曲线在 184.82°C 时, 重量减少了 0.3565%。
27. 根据权利要求 18~22 中任一项所述的晶型, 其热重分析曲线在 230.03°C 时, 重量减少了 0.4086%。
28. 根据权利要求 25~27 中任一项所述的晶型, 其具有如图 6 所示的 TGA 图谱所代表的特征。
29. 式 (I) 化合物晶型的制备方法, 包括以下步骤:
- (i) 将式 (I) 化合物加入溶剂中, 在 $70\sim 100^\circ\text{C}$ 下搅拌 0.5~2 小时;
 - (ii) 缓慢降温, 静置 8~16 小时;
 - (iii) 离心, 干燥 8~16 小时;
- 其中, 所述溶剂为乙醇和水的混合溶剂, 乙醇和水的体积比为 3:1。

30. 结晶组合物，其包含权利要求 6~15 中任一项所述的晶型或者权利要求 18~22 中任一项所述的晶型，其中所述权利要求 6~15 中任一项所述的晶型或者权利要求 18~22 中任一项所述的晶型占结晶组合物重量的 50%以上，较好为 80%以上，更好是 90%以上，最好是 95%以上。
31. 药物组合物，其包含权利要求 1~5 中任一项所述的马来酸盐、权利要求 6~15 中任一项所述的晶型、权利要求 18~28 中任一项所述晶型或权利要求 30 所述的结晶组合物，该药物组合物中包含治疗有效量的权利要求 1~5 中任一项所述的马来酸盐、权利要求 6~15 中任一项所述的晶型、权利要求 18~28 中任一项所述的晶型或权利要求 30 所述的结晶组合物。
32. 权利要求 1~5 中任一项所述的马来酸盐、权利要求 6~15 中任一项所述的晶型、权利要求 18~28 中任一项所述的晶型或权利要求 30 所述的结晶组合物在制备用于治疗 CDK4/6 介导的疾病的药物中的用途。
33. 一种治疗哺乳动物 CDK4/6 介导的疾病的方法，其中所述疾病是 CDK4/6 介导的疾病，该方法包括向哺乳动物、给予治疗有效量的权利要求 1~5 中任一项所述的马来酸盐、权利要求 6~15 中任一项所述的晶型、权利要求 18~28 中任一项所述的晶型或权利要求 30 所述的结晶组合物。
34. 权利要求 32 的用途或者权利要求 33 的方法，其中所述疾病为癌症，优选为乳腺癌或肺癌。

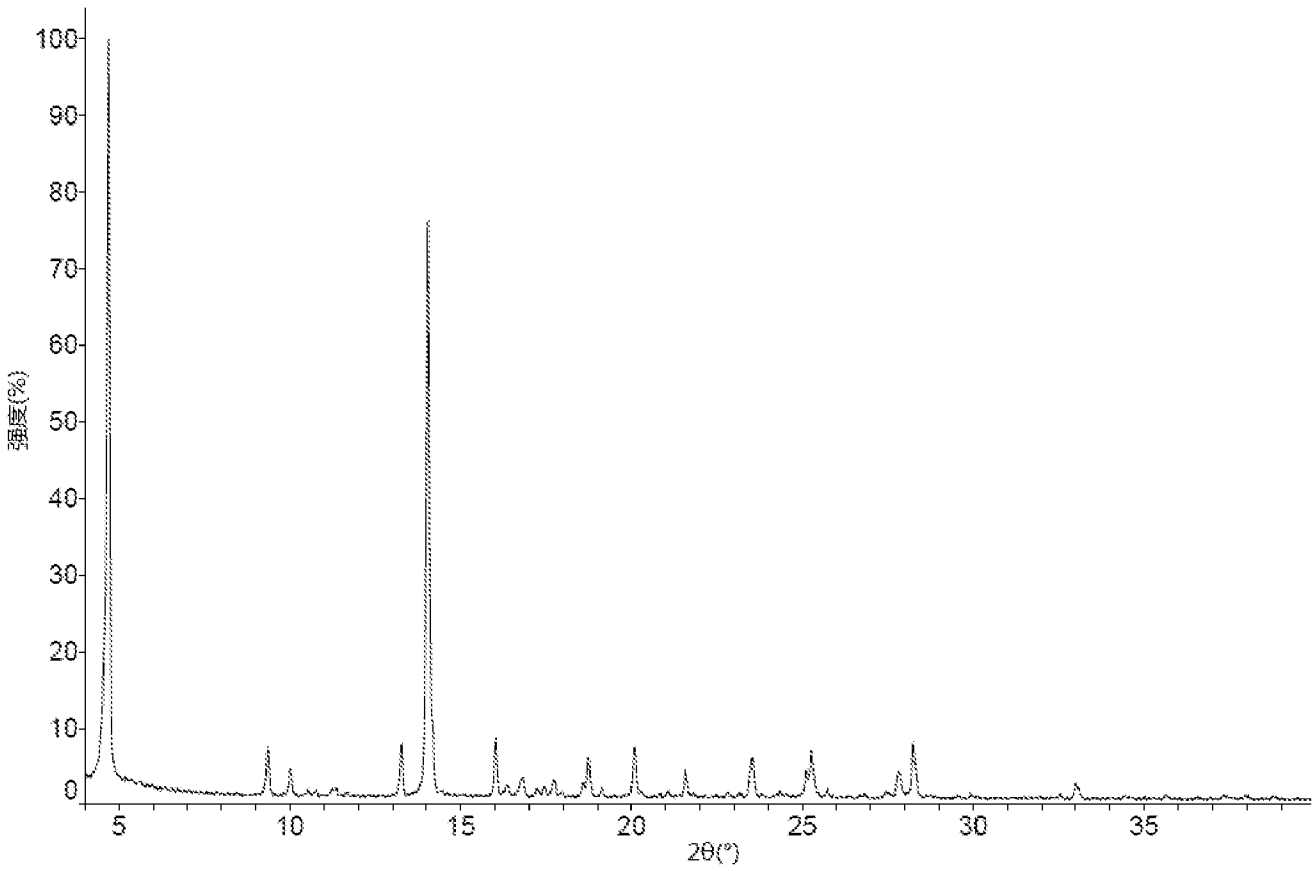


图 1

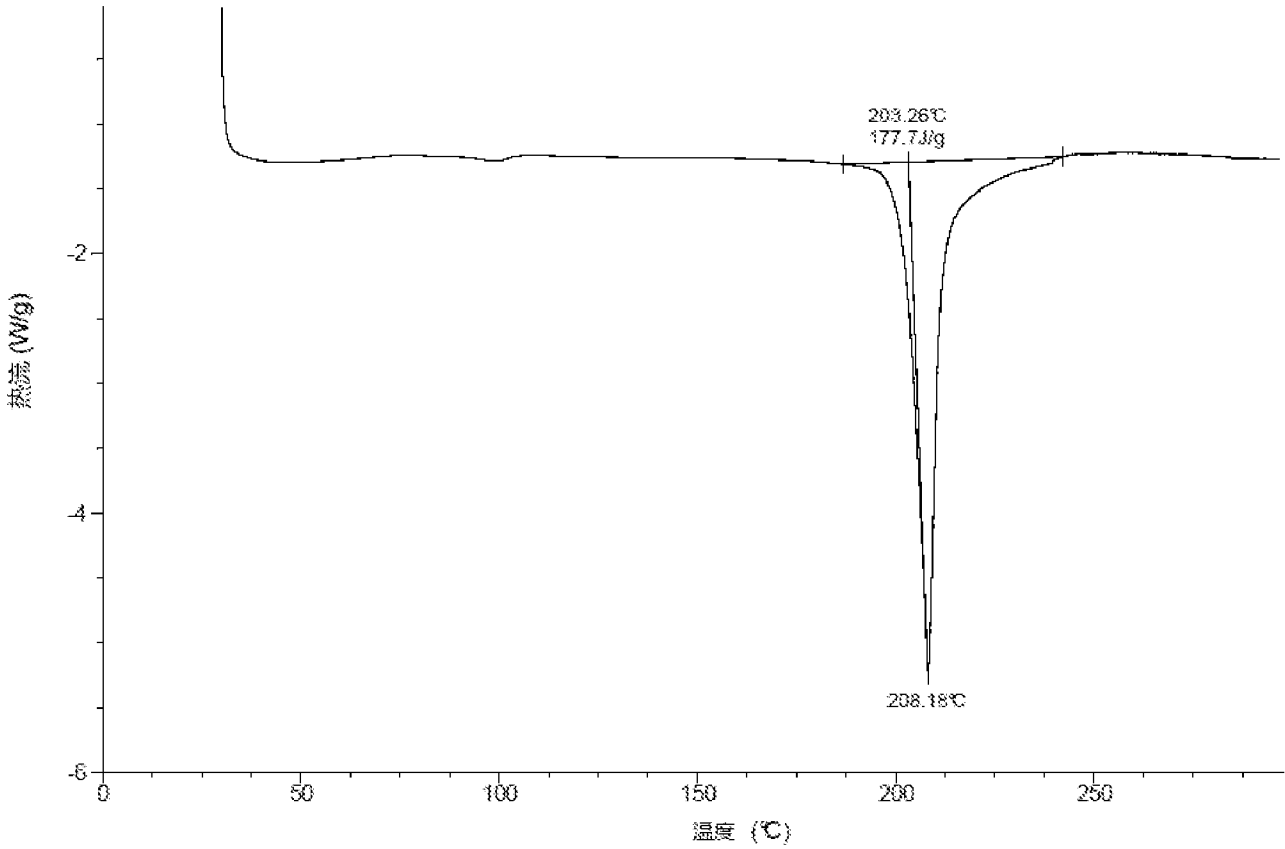


图 2

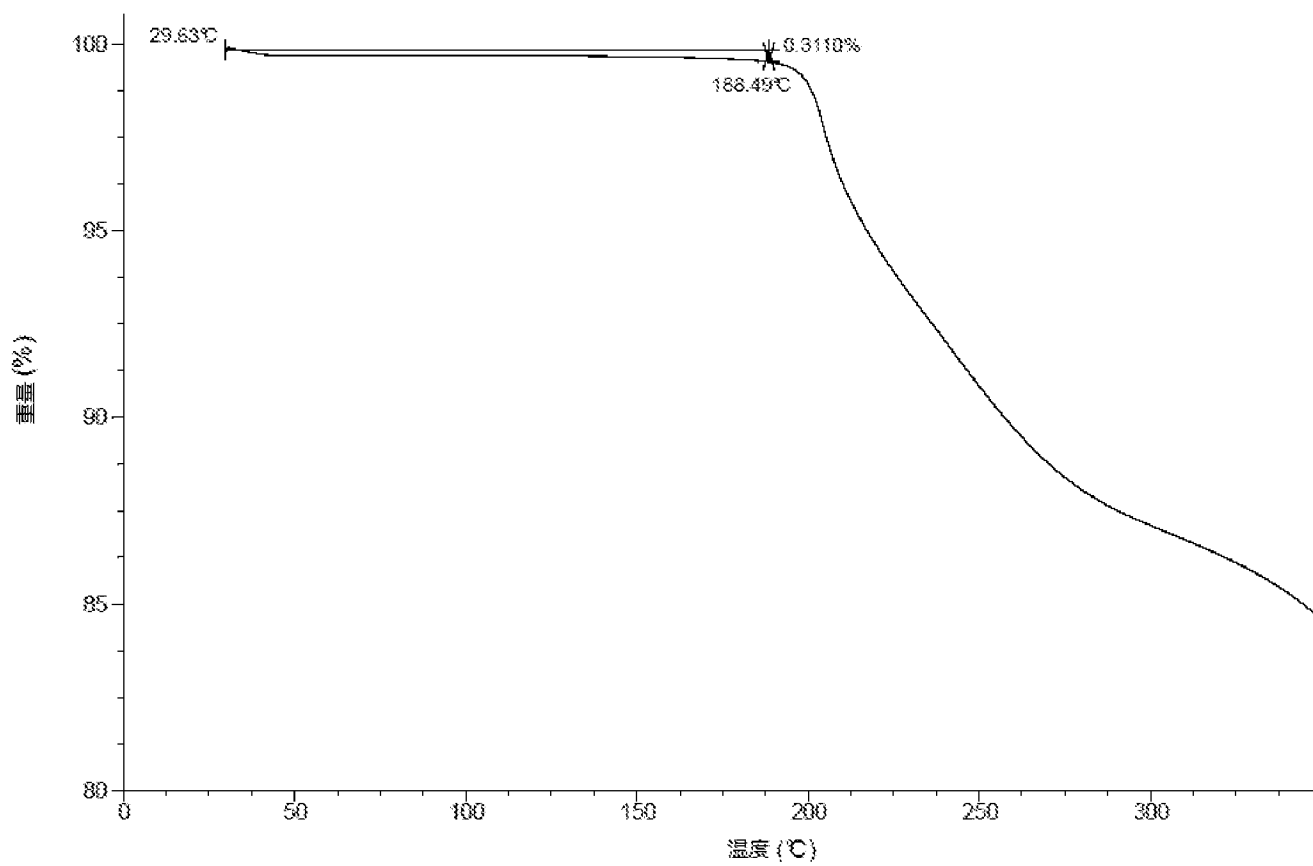


图 3

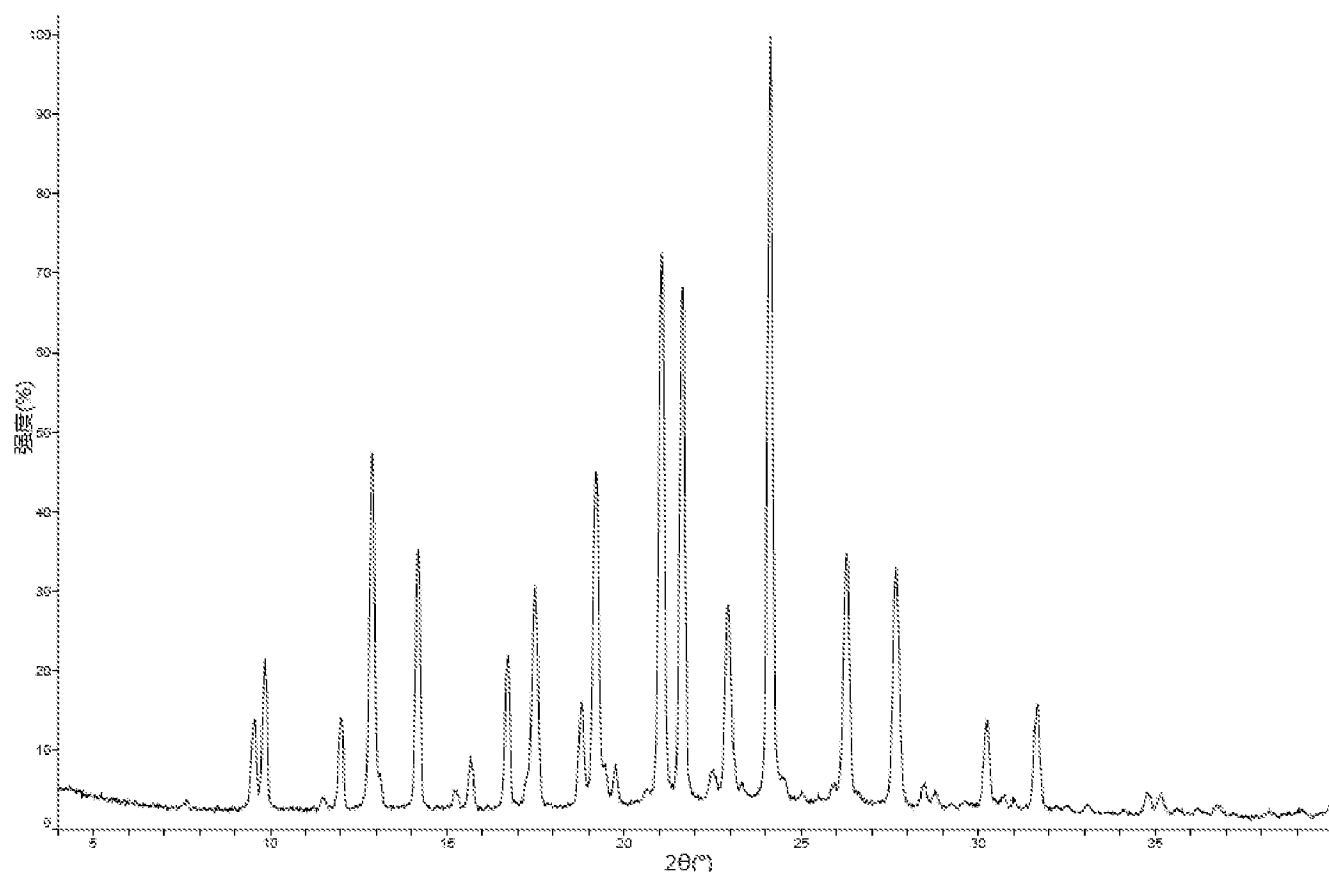


图 4

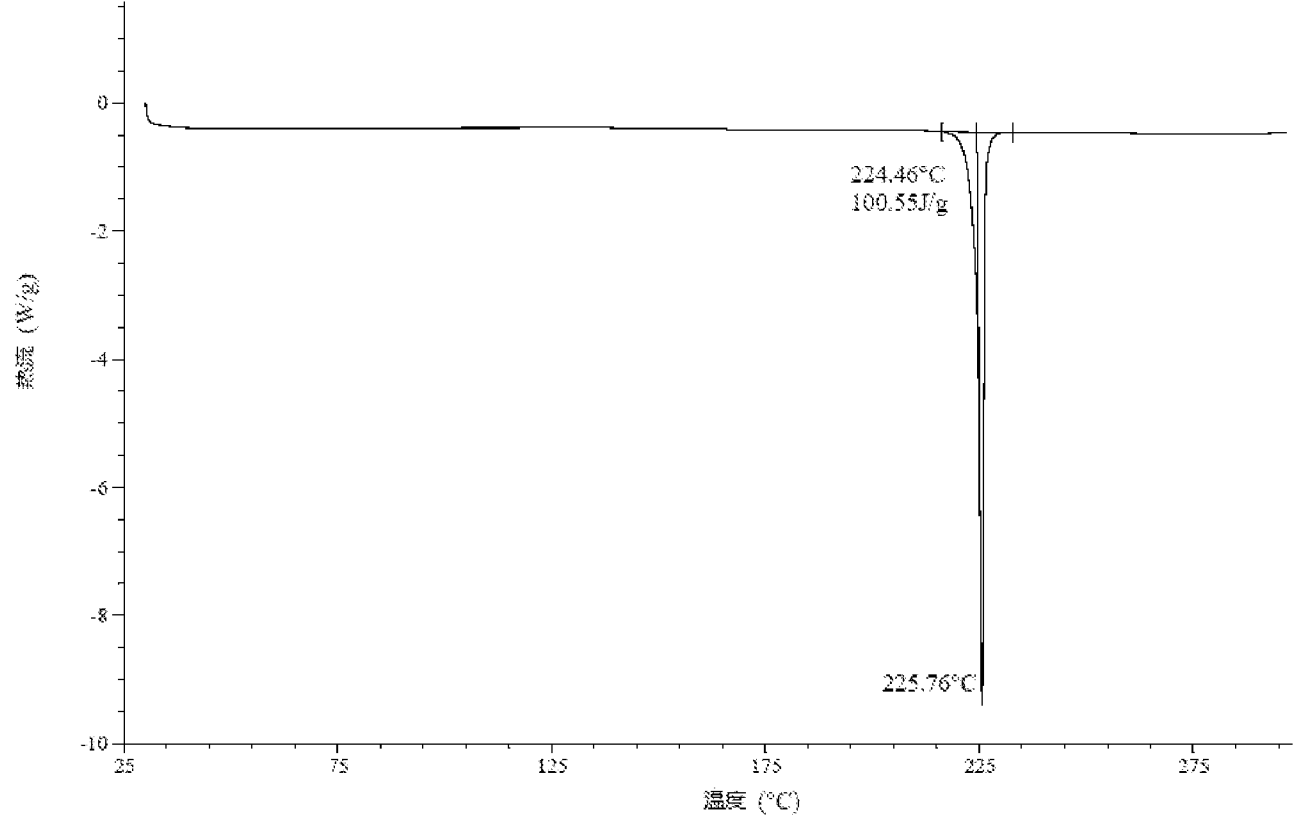


图 5

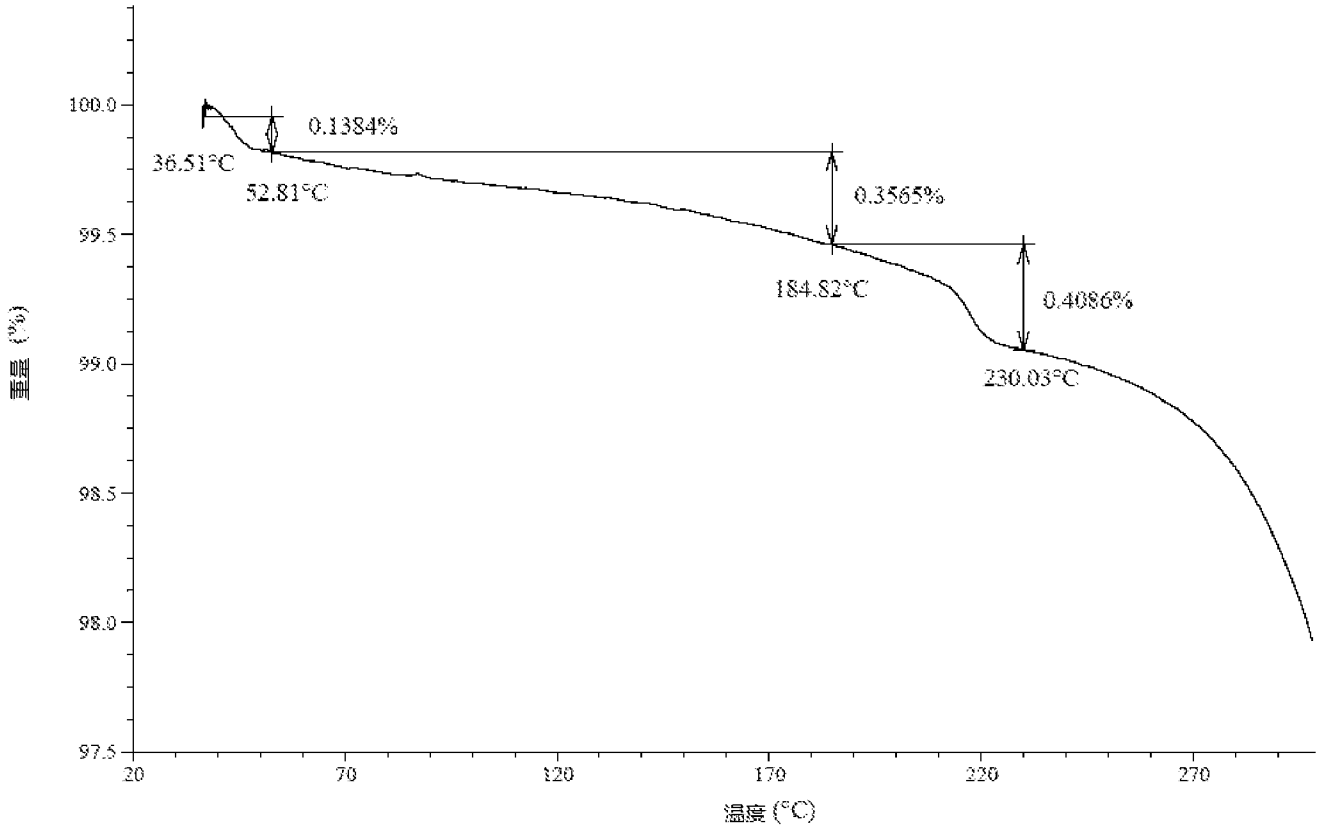


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/101067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 401/14 (2006.01) i; A61K 31/506 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CHINA MEDICINE PATENT LITERATURE DATABASE; CNABS; CPRSABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNTXT; EPTXT; USTXT; JPTXT; WOTXT; CNKI; WANFANG DATA Knowledge Service Platform; ISI Web of Science; STN: 2004705-28-4, 吡唑, 吡啶, 苯并吡唑, 二氮杂茛, 吡啶, 氮苯, 氮杂苯, 哌嗪, 嘧啶, 间二嗪, 二氮苯, 二氮杂苯, 间氮苯, 细胞周期蛋白依赖性激酶, 癌, 瘤, indazol+, benzodiazol+, benzopyrazol+, pyridin+, piperazin+, pyrimidin+, CDK, cancer, tumor, MCF-7, MDA-MB-436, LU-01-0393

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2016141881 A1 (MEDSHINE DISCOVERY INC.) 15 September 2016 (15.09.2016), claim 12, description, embodiment 3, and tables 1 and 4	1-34
Y	CN 102264725 A (LILLY CO. ELI) 30 November 2011 (30.11.2011), description, paragraphs [0006], [0012]-[0028] and [0230]-[0234]	1-34
Y	WO 2016014904 A1 (BETA PHARMA, INC.) 28 January 2016 (28.01.2016), claims 12 and 15-18, and description, page 12, paragraph 1	1-34

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 November 2017	Date of mailing of the international search report 14 December 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer JIANG, Wei Telephone No. (86-10) 62088437

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/101067

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 33 and 34
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claim 33 sets forth a method of treatment of mammalian CDK4/6-mediated diseases; the method comprises administering to the mammal a therapeutically effective amount of a maleate salt as claimed in any one of claims 1 to 5, the crystalline form according to any one of claims 6 to 15, the crystalline form according to any one of claims 18 to 28, or the crystalline composition according to claim 30; the dependent claim 34 further defines the disease as cancer, preferably breast or lung cancer. Claims 33 and 34 both relate to methods of treatment and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39 (iv). It is expected that the applicant may modify the subject matter as: the maleate salt according to any one of claims 1 to 5, the crystal form according to any one of claims 6 to 15, the crystal form according to any one of claims 18 to 28 or the crystalline form or the crystalline composition according to claim 30 for the manufacture of a medicament for the treatment of a disease mediated by CDK4 / 6 in a mammal. This international search report is based on the subject of a reasonably anticipated amendment.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/101067

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2016141881 A1	15 September 2016	TW 201639831 A	16 November 2016
		CA 2978363 A1	15 September 2016
		AU 2016228660 A1	19 October 2017
CN 102264725 A	30 November 2011	SI EP2379528 T1	29 November 2013
		EA 018808 B1	30 October 2013
		TN 2011000293 A1	17 December 2012
		PE 01072012 A1	20 February 2012
		IL 213350 A	31 August 2014
		WO 2010075074 A1	01 July 2010
		CN 102264725 B	16 April 2014
		MA 32903 B1	01 December 2011
		DO P2011000204 A	30 September 2011
		PA 8852901 A1	27 July 2010
		PT 2379528 E	25 November 2013
		US 7855211 B2	21 December 2010
		IL 213350 D0	31 July 2011
		JO 2885 B	15 March 2015
		CO 6382125 A2	15 February 2012
		SG 172331 A1	28 July 2011
		EP 2379528 A1	26 October 2011
		TW I429635 B	11 March 2014
		ES 2435798 T3	23 December 2013
		CA 2747055 C	14 January 2014
		JP 2012513396 A	14 June 2012
		KR 101297497 B1	20 August 2013
		NZ 593114 A	30 November 2012
		UA 104603 C2	25 February 2014
		TW 201031653 A	01 September 2010
		AU 2009330365 B2	12 July 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/101067

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2016014904 A1	28 January 2016	RS 53061 B	30 April 2014
		CA 2747055 A1	01 July 2010
		SI 2379528 T1	29 November 2013
		EA 201170872 A1	30 December 2011
		HK 1159630 A1	14 March 2014
		EP 2379528 B1	18 September 2013
		DK 2379528 T3	14 October 2013
		ZA 201104505 B	28 November 2012
		MY 150547 A	30 January 2014
		US 2010160340 A1	24 June 2010
		JP 5417453 B2	12 February 2014
		AU 2009330365 A1	01 July 2010
		AR 074575 A1	26 January 2011
		HR P20131051 T1	06 December 2013
		GT 201100181 A	08 April 2014
		HN 2011001701 A	22 July 2013
		CR 20110343 A	14 September 2011
		KR 20110091551 A	11 August 2011
		BR PI0924183 A2	05 July 2016
		MX 2011006757 A	20 July 2011
		EC SP11011157 A	29 July 2011
		MX 2017000806 A	01 May 2017
		TW 201609705 A	16 March 2016
		EA 201790122 A1	31 August 2017
		KR 20170031241 A	20 March 2017
		CN 106687454 A	17 May 2017
		AP 201709728 A0	31 January 2017
		CA 2954298 A1	28 January 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/101067

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		JP 2017522390 A	10 August 2017
		EP 3191469 A1	19 July 2017
		AP 201709728 D0	31 January 2017
		PH 12017500146 A1	29 May 2017
		US 2017210726 A1	27 July 2017
		AU 2015292425 A1	16 February 2017
		SG 11201700037 A1	27 February 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/101067

A. 主题的分类

C07D 401/14(2006.01)i; A61K 31/506(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07D, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

中国药物专利数据库;CNABS;CPRSABS;DWPI;SIPOABS;VEN;CNTXT;EPTXT;USTXT;JPTXT;WOTXT;CNKI;万方数据知识服务平台;ISI Web of Science;STN: 2004705-28-4, 吡唑, 吡啶唑, 苯并吡唑, 二氮杂茚, 吡啶, 氮苯, 氮杂苯, 哌嗪, 噻唑, 间二噻, 二氮苯, 二氮杂苯, 间氮苯, 细胞周期蛋白依赖性激酶, 癌, 瘤, indazol+, benzodiazol+, benzopyrazol+, pyridin+, piperazin+, pyrimidin+, CDK, cancer, tumor, MCF-7, MDA-MB-436, LU-01-0393

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	WO 2016141881 A1 (MEDSHINE DISCOVERY INC.) 2016年 9月 15日 (2016 - 09 - 15) 权利要求12, 说明书实施例3, 表1、表4	1-34
Y	CN 102264725 A (伊莱利利公司) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30) 说明书第[0006]、[0012]-[0028]、[0230]-[0234]段	1-34
Y	WO 2016014904 A1 (BETA PHARMA, INC.) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28) 权利要求12、15-18, 说明书第12页第1段	1-34

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 11月 27日

国际检索报告邮寄日期

2017年 12月 14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

江炜

电话号码 (86-10)62088437

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 33-34
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求33要求保护一种治疗哺乳动物CDK4/6介导的疾病的方法，该方法包括向哺乳动物给予治疗有效量的权利要求1~5中任一项所述的马来酸盐、权利要求6~15中任一项所述的晶型、权利要求18~28中任一项所述的晶型或权利要求30所述的结晶组合物；从属权利要求34进一步限定所述疾病为癌症，优选为乳腺癌或肺癌。权利要求33-34均涉及治疗方法，属于PCT细则第39条第(iv)项规定的无需检索的主题。预期申请人可能修改的主题为：权利要求1~5中任一项所述的马来酸盐、权利要求6~15中任一项所述的晶型、权利要求18~28中任一项所述的晶型或权利要求30所述的结晶组合物在制备用于治疗哺乳动物CDK4/6介导的疾病的药物中的用途。本国际检索报告是基于该合理预期修改的主题做出的。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求， 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/101067

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016141881	A1	2016年 9月 15日	TW	201639831	A	2016年 11月 16日
				CA	2978363	A1	2016年 9月 15日
				AU	2016228660	A1	2017年 10月 19日
CN	102264725	A	2011年 11月 30日	SI	EP2379528	T1	2013年 11月 29日
				EA	018808	B1	2013年 10月 30日
				TN	2011000293	A1	2012年 12月 17日
				PE	01072012	A1	2012年 2月 20日
				IL	213350	A	2014年 8月 31日
				WO	2010075074	A1	2010年 7月 1日
				CN	102264725	B	2014年 4月 16日
				MA	32903	B1	2011年 12月 1日
				DO	P2011000204	A	2011年 9月 30日
				PA	8852901	A1	2010年 7月 27日
				PT	2379528	E	2013年 11月 25日
				US	7855211	B2	2010年 12月 21日
				IL	213350	D0	2011年 7月 31日
				JO	2885	B	2015年 3月 15日
				CO	6382125	A2	2012年 2月 15日
				SG	172331	A1	2011年 7月 28日
				EP	2379528	A1	2011年 10月 26日
				TW	I429635	B	2014年 3月 11日
				ES	2435798	T3	2013年 12月 23日
				CA	2747055	C	2014年 1月 14日
				JP	2012513396	A	2012年 6月 14日
				KR	101297497	B1	2013年 8月 20日
				NZ	593114	A	2012年 11月 30日
				UA	104603	C2	2014年 2月 25日
				TW	201031653	A	2010年 9月 1日
				AU	2009330365	B2	2012年 7月 12日
				RS	53061	B	2014年 4月 30日
				CA	2747055	A1	2010年 7月 1日
				SI	2379528	T1	2013年 11月 29日
				EA	201170872	A1	2011年 12月 30日
				HK	1159630	A1	2014年 3月 14日
				EP	2379528	B1	2013年 9月 18日
				DK	2379528	T3	2013年 10月 14日
				ZA	201104505	B	2012年 11月 28日
				MY	150547	A	2014年 1月 30日
				US	2010160340	A1	2010年 6月 24日
				JP	5417453	B2	2014年 2月 12日
				AU	2009330365	A1	2010年 7月 1日
				AR	074575	A1	2011年 1月 26日
				HR	P20131051	T1	2013年 12月 6日
				GT	201100181	A	2014年 4月 8日
				HN	2011001701	A	2013年 7月 22日
				CR	20110343	A	2011年 9月 14日
				KR	20110091551	A	2011年 8月 11日
				BR	PI0924183	A2	2016年 7月 5日
				MX	2011006757	A	2011年 7月 20日
				EC	SP11011157	A	2011年 7月 29日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/101067

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2016014904	A1	2016年 1月 28日	MX	2017000806	A	2017年 5月 1日
				TW	201609705	A	2016年 3月 16日
				EA	201790122	A1	2017年 8月 31日
				KR	20170031241	A	2017年 3月 20日
				CN	106687454	A	2017年 5月 17日
				AP	201709728	A0	2017年 1月 31日
				CA	2954298	A1	2016年 1月 28日
				JP	2017522390	A	2017年 8月 10日
				EP	3191469	A1	2017年 7月 19日
				AP	201709728	D0	2017年 1月 31日
				PH	12017500146	A1	2017年 5月 29日
				US	2017210726	A1	2017年 7月 27日
				AU	2015292425	A1	2017年 2月 16日
				SG	11201700037	A1	2017年 2月 27日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)