



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110950847 B

(45) 授权公告日 2022.11.01

(21) 申请号 201811127660.0

(22) 申请日 2018.09.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110950847 A

(43) 申请公布日 2020.04.03

(73) 专利权人 浙江同源康医药股份有限公司
地址 313100 浙江省湖州市长兴经济开发区明珠路1278号长兴世贸大厦A座14层1403-2室

(72) 发明人 吴豫生 耿阳 孟庆国 梁阿朋
牛成山

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 徐迅 高一平

(51) Int. Cl.

C07D 403/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104140418 A, 2014.11.12

CN 108558835 A, 2018.09.21

CN 108467385 A, 2018.08.31

CN 105153122 A, 2015.12.16

CN 105237515 A, 2016.01.13

WO 2016023422 A1, 2016.02.18

审查员 刘芳

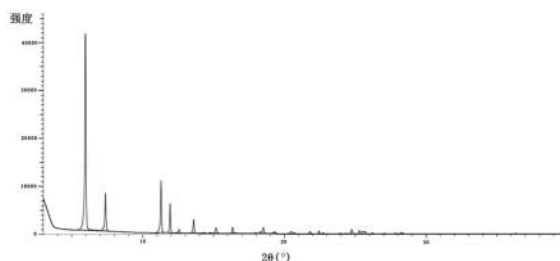
权利要求书2页 说明书20页 附图5页

(54) 发明名称

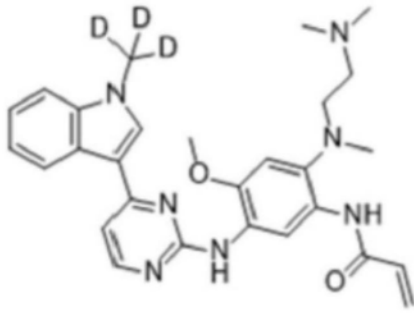
氘代AZD9291化合物的新晶型及其用途

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,具体公开了两种氘代AZD9291的新晶型,以及晶型的制备方法。本发明还公开了所述的氘代AZD9291的晶型在制备用于治疗癌症的药物中的用途。通过常温与加速稳定性研究,结合混悬实验与DVS数据,本发明提供的氘代AZD9291晶型A与晶型C相比其他晶型均为稳定的晶型,晶型稳定性好。



1. 一种氘代AZD9291化合物的晶型A,其特征在于,氘代AZD9291化合物的结构式如式(I)所示:



式(I),

晶型A使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射在 2θ 角度(单位为 $^\circ$)为: 5.9 ± 0.2 、 7.4 ± 0.2 、 11.3 ± 0.2 、 11.9 ± 0.2 、 12.5 ± 0.2 、 13.5 ± 0.2 、 15.1 ± 0.2 、 16.3 ± 0.2 、 18.5 ± 0.2 、 20.5 ± 0.2 、 21.8 ± 0.2 、 22.4 ± 0.2 、 24.7 ± 0.2 、 25.2 ± 0.2 处具有衍射峰。

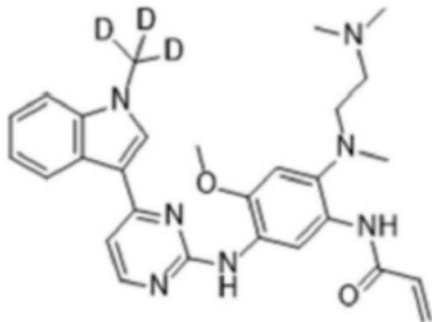
2. 根据权利要求1所述的氘代AZD9291化合物的晶型A,其特征在于,晶型A使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图案基本如图1所示。

3. 根据权利要求1或2所述的氘代AZD9291化合物的晶型A,其特征在于,所述晶型A差示扫描量热分析图谱显示在 $92\sim 119^\circ\text{C}$ 处有吸热峰。

4. 权利要求1或2所述的氘代AZD9291化合物的晶型A在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

5. 根据权利要求4所述的氘代AZD9291化合物的晶型A的用途,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

6. 一种氘代AZD9291化合物的晶型C,其特征在于,氘代AZD9291化合物的结构式如式(I)所示:



式(I),

晶型C使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射在 2θ 角度(单位为 $^\circ$)为: 8.8 ± 0.2 、 9.2 ± 0.2 、 9.6 ± 0.2 、 10.4 ± 0.2 、 16.0 ± 0.2 、 16.7 ± 0.2 、 17.6 ± 0.2 、 18.5 ± 0.2 、 20.5 ± 0.2 、 20.9 ± 0.2 、 23.2 ± 0.2 、 26.0 ± 0.2 、 26.6 ± 0.2 处具有衍射峰。

7. 根据权利要求6所述的氘代AZD9291化合物的晶型C,其特征在于,晶型C使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图案基本如图3所示。

8. 根据权利要求6或7所述的氘代AZD9291化合物的晶型C,其特征在于,所述晶型C差示扫描量热分析图谱显示在 $81\sim 106^\circ\text{C}$ 处有吸热峰。

9. 权利要求6或7所述的氘代AZD9291化合物的晶型C在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

10. 根据权利要求9所述的氘代AZD9291化合物的晶型C的用途,其中所述癌症是非小细胞肺癌。

氘代AZD9291化合物的新晶型及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体涉及氘代AZD9291的新晶型,同时还公开了晶型物的制备方法及其用途。

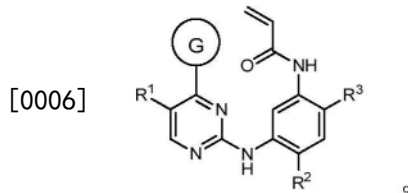
背景技术

[0002] 表皮生长因子受体EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 是erbB受体家族的跨膜蛋白酪氨酸激酶的一种。当与生长因子配体(例如表皮生长因子(EGF))结合时,受体可以与附加的EGFR分子发生同源二聚,或者与另一家族成员(例如erbB2 (HER2)、erbB3 (HER3)、或者erbB4 (HER4))发生异源二聚。erbB受体的同源二聚和/或异源二聚导致胞内域中关键酪氨酸残基的磷酸化,并且导致对参与细胞增殖和生存的许多细胞内信号传导通路的刺激。erbB家族信号传导的失调促进增殖、侵入、转移、血管生成和肿瘤细胞生存,并且已在许多的人类癌症中(包括肺癌、头颈部癌和乳腺癌等)得到描述。

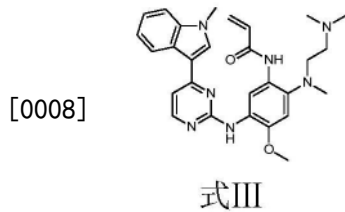
[0003] 因此,以erbB家族为代表的作为抗癌药物开发的合理靶点,如靶向EGFR或erbB2的许多药物现在已经在临床上广泛的应用,包括吉非替尼(IRESSA™)、厄洛替尼(TARCEVA™)和拉帕替尼(TYKERB™)等。New England Journal of Medicine (2008) (第358期,1160-1174)和Biochemical and Biophysical Research Communications (2004) (第319期,1-11)中都提供了对erbB受体信号传导及其在肿瘤发生中的参与的详细论述。

[0004] 肺癌是全球发病率最高的癌症,在中国肺癌发病率位居所有癌症中第一位,也是中国发病率和死亡率最高的癌症。在中国的肺癌病人中,大约30%的病人具有EGFR突变,其中L858R和外显子19缺失突变占大约90%以上,这类病人对EGFR抑制剂更为敏感。现有已上市第一代EGFR抑制剂如厄洛替尼、吉非替尼等对这类病人有较好的疗效,能够使其中60%以上的病人肿瘤缩小,明显延长病人的无进展生存期。但绝大多数病人在6-12个月会获得耐药,这种耐药模式是EGFR的进一步突变,这就降低了其对第一代EGFR抑制剂的敏感性。这些突变中最常见的是所谓的“gatekeeper”突变T790M (Science, 2004, Vol. 304, 1497-1500; New England Journal of Medicine 2004, 350, 2129-2139)。由原来在该位点的L-苏氨酸(T)为L-甲硫氨酸(M)所替代,变异后的EGF酪氨酸激酶R不再与吉非替尼、厄洛替尼结合,从而使第一代EGFR抑制剂将不再起效,导致这类病人目前处于无药可用的状态。临床发现对第一代EGFR抑制剂产生耐药的病人中有50%检测都有EGFR T790M突变。在T790M突变细胞系H1975中第一代EGFR抑制剂,如吉非替尼和厄洛替尼,均大于3 μ M,基本没有活性。

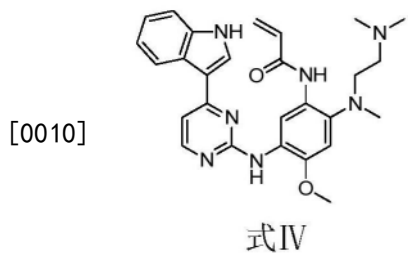
[0005] 为了提高对耐药EGFR T790M等突变的抑制活性,WO2013014448公开了可作为EGFR抑制剂的嘧啶衍生物及其治疗癌症的用途,其中,G选自4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]吡啶-3-基、1H-吡唑-3-基、1-甲基-1H-吡唑-3-基或吡唑并[1,5-a]吡啶-3-基,R²为甲基或甲氧基,结构如下:



[0007] 在该专利公开文献中,如式III所示的化合物(AZD9291)已于2015年11月13日获美国FDA加速批准(商品名:Tagrisso,AZD9291)上市,用于治疗表皮生长因子受体EGFR T790M突变阳性的晚期非小细胞肺癌患者。



[0009] 目前,CN104140418B和CN105237515A等均报道了一些氘代AZD9291化合物,但是还没有见到关于氘代AZD9291的可药用晶型专利的报道。晶型是药物存在的固体物质状态,药物晶型研究就是对药物基础状态的研究,只有对化学药物晶型状态有了比较充分和全面的认识,才有可能寻找更合适于治疗疾病的药物晶型固体物质。药物晶型可以影响药物的理化性质,直接影响药物临床发挥治疗疾病作用的基础。同时,由于一些药物本身的溶解性等问题,将其做成可以药用接受的盐,能够大大改善其溶解性,提高药物的吸收利用。本公司一直从事肺癌药物的研究,很早就已经开始了EGFR靶点的药物研究,取得了一系列的研究成果,如专利CN102659692、US08916572、CN107382879、W02017219500和W02018050052等等。在我们的研究过程中发现,式III所示化合物可以通过血脑屏障进入大脑,并且文献Clin.Cancer Res.2016,22(20),5130-5140中也报道了此结果。但是,当式III所示的化合物在体内代谢脱掉吡啶氮上的甲基后生成的式IV所示的化合物(AZ5104),就不能透过血脑屏障,因此对脑部转移的肿瘤失去作用。如果将式III所示的化合物吡啶氮上的甲基进行氘代,这样就增加了此甲基的代谢稳定性,其在体内的血药浓度和脑部的浓度得到更好的提高,从而达到更好的疗效。因此,研究氘代AZD9291的稳定晶型具有重要意义。

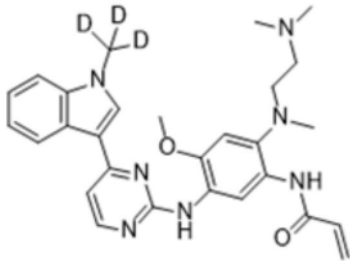


发明内容

[0011] 本发明提供了两种氘代AZD9291化合物的新晶型,并提供了其制备方法和药物用途。

[0012] 本发明提供的一种氘代AZD9291化合物的晶型A,其中氘代AZD9291化合物的结构式如式(I)所示:

[0013]



式(1) ,

[0014] 晶型A使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射在 2θ 角度(单位为 $^\circ$)为: 5.9 ± 0.2 、 7.4 ± 0.2 、 11.3 ± 0.2 、 11.9 ± 0.2 处具有衍射峰。

[0015] 进一步地,晶型A使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射在 2θ 角度(单位为 $^\circ$)为: 12.5 ± 0.2 、 13.5 ± 0.2 、 15.1 ± 0.2 、 16.3 ± 0.2 、 18.5 ± 0.2 、 20.5 ± 0.2 、 21.8 ± 0.2 、 22.4 ± 0.2 、 24.7 ± 0.2 、 25.2 ± 0.2 处也具有衍射峰。

[0016] 进一步地,晶型A使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图案基本如图1所示。

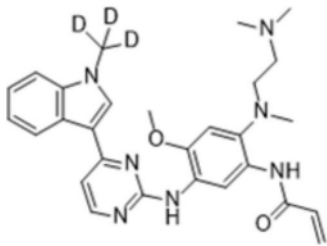
[0017] 进一步地,所述的晶型A的差示扫描量热分析图谱显示其在 $92 \sim 119^\circ\text{C}$ 处有吸热峰。

[0018] 本发明提供的氘代AZD9291化合物的晶型A可用于制备治疗癌症的药物。

[0019] 其中,所述癌症优选是非小细胞肺癌。

[0020] 本发明提供的一种氘代AZD9291化合物的晶型C,其中氘代AZD9291化合物的结构式如式(I)所示:

[0021]



式(1) ,

[0022] 晶型C使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射在 2θ 角度(单位为 $^\circ$)为: 8.8 ± 0.2 、 9.2 ± 0.2 、 10.4 ± 0.2 、 16.0 ± 0.2 、 16.7 ± 0.2 、 17.6 ± 0.2 、 20.5 ± 0.2 、 20.9 ± 0.2 、 23.2 ± 0.2 处具有衍射峰。

[0023] 进一步地,晶型C使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射在 2θ 角度(单位为 $^\circ$)为: 9.6 ± 0.2 、 18.5 ± 0.2 、 26.0 ± 0.2 、 26.6 ± 0.2 处也具有衍射峰。

[0024] 进一步地,晶型C使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图案基本如图3所示。

[0025] 进一步地,所述晶型C的差示扫描量热分析图谱显示其在 $81 \sim 106^\circ\text{C}$ 处有吸热峰。

[0026] 本发明提供的氘代AZD9291化合物的晶型C可用于制备治疗癌症的药物。

[0027] 其中,所述癌症优选是非小细胞肺癌。

[0028] 同一药物的活性成分一般存在两种或以上的晶体形态,称为药物多晶型。不同晶型具有各自不同的溶解度与溶解速率,通过引起体内生物利用度的变化,来影响药物在临床上的治疗作用。药物晶型不同,可能会影响其在体内的溶出和吸收,进而影响药物的生

物利用度、临床疗效和安全性。同时,药物晶型的稳定性也十分重要。为了提高药物的生物利用度,减少毒性,增进治疗效果就要更加重视药物晶型稳定性。稳定性好的晶型可以保证在制备和贮存过程中药物剂型的物理化学稳定性,保持药物剂型好的溶解度和生物利用度,保证每批药物间的等效性。同一种药物往往具有多种晶型,目前将具有更好的治疗效果,临床上最为适用的晶型称作优势药物晶型。

[0029] 本发明对式(1)所示的氘代AZD9291化合物的晶型进行了筛选,尽可能多的找出了原料药的不同晶型。筛选出的固体通过粉末X射线衍射分析(XRPD)、差示扫描量热法(DSC)、热重分析(TGA)等手段进行了鉴别,并进一步通过常温与加速稳定性考察,引湿性考察并结合混悬转晶实验,确定出了优势药物晶型,为后续药物代谢动力学实验与动物学实验的晶型选择提供了参考依据。

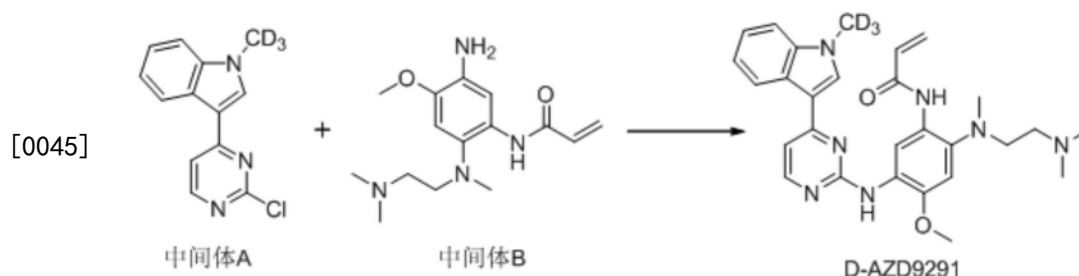
[0030] 通过常温与加速稳定性研究,结合混悬实验与DVS数据,本发明提供的晶型A与晶型C相比其他晶型均为稳定的晶型,晶型稳定性好。

附图说明

- [0031] 图1是本发明提供的晶型A使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图;
 [0032] 图2是本发明提供的晶型A的DSC-TGA图谱;
 [0033] 图3是本发明提供的晶型C使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图;
 [0034] 图4是本发明提供的晶型C的DSC-TGA图谱;
 [0035] 图5是本发明提供的晶型A加热前与加热后的XRPD对比图谱;
 [0036] 图6是本发明提供的晶型A加热后的DSC-TGA图谱;
 [0037] 图7是本发明提供的晶型A的DVS图谱;
 [0038] 图8是本发明提供的晶型C的DVS图谱;
 [0039] 图9是本发明提供的晶型I的DVS图谱;
 [0040] 图10是本发明提供的晶型A、晶型C、晶型I常温混悬转晶的XRPD对比图。

具体实施方式

- [0041] 下面对本发明的技术方案进行详细说明。
 [0042] 式(I)所示化合物的制备
 [0043] 合成氘代AZD9291(D-AZD9291),具体如下。
 [0044] 合成路线为:

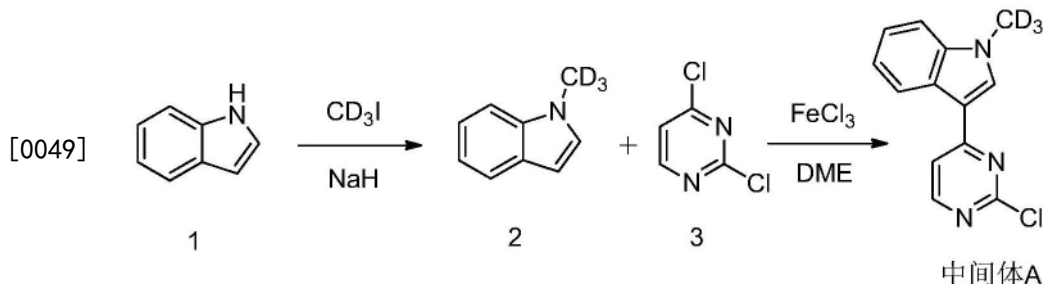


[0046] 操作步骤:将50毫克中间体B,130毫克中间体A与35毫克一水对甲苯磺酸溶解在5毫升2-戊醇中,然后升温至50℃,氮气保护下搅拌过夜,TLC显示原料基本消失,反应液旋干,然后加入20毫升二氯甲烷和20毫升饱和碳酸钠水溶液,分层后,再用20毫升二氯甲烷洗

涤水层两次,合并有机层,干燥、旋干,过柱分离得到50毫克D-AZD9291产品。

[0047] D-AZD9291的核磁分析数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, d_6 -DMSO) δ 10.22 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.33 (d, $J=5.2\text{Hz}$, 1H), 8.24 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.53 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.26-7.22 (m, 2H), 7.17-7.13 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.46-6.40 (m, 1H), 6.30-6.25 (m, 1H), 5.79-5.76 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.90-2.37 (m, 2H), 2.72 (s, 3H), 2.30-2.27 (m, 2H), 2.20 (s, 6H); m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 503.3。

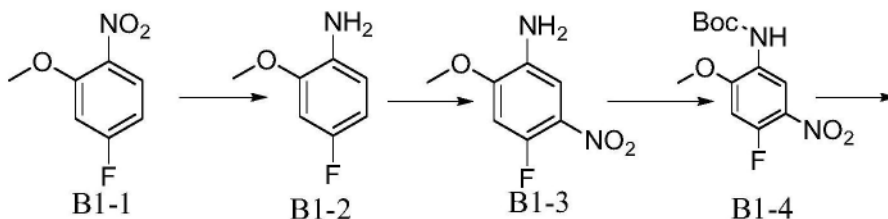
[0048] 其中,中间体A的合成,路线如下:



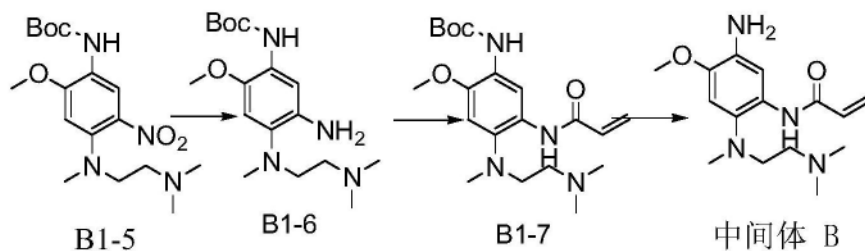
[0050] 化合物2的合成:氮气保护下,向500mL的三口瓶中加入化合物1 (15g, 128.2mmol) 和260mL的四氢呋喃,然后降温到0℃,分批加入氢化钠 (7.7g, 192.0mmol),加完后,0℃反应1小时,然后将氙代碘甲烷 (27.8g, 192.0mmol) 滴加到反应液中,保持反应液的温度在0℃。加完氙代碘甲烷后,缓慢升温到室温,继续反应10小时,将冰水 (200mL) 滴加到反应混合物中,保持反应体系0℃,此混合物用乙酸乙酯萃取 (100mL \times 3),将有机相混合,干燥,过柱得15g混合物2。 m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 135.1。

[0051] 中间体A的合成:氮气保护下,向250mL的三口瓶中加入化合物2 (15g, 111.9mmol)、化合物3 (20.0g, 134.3mmol)、三氯化铁 (21.7g, 134.3mmol) 和150mL的DME,然后回流过夜,反应结束后,将反应体系降温到室温,过滤,滤饼用50mL的甲醇洗涤3次,然后将有机相旋干,过柱得到13.1g的中间体A。核磁分析数据如下: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, d_6 -DMSO) δ 7.35 (2H, m), 7.64 (1H, dd), 7.88 (1H, d), 8.45-8.52 (1H, m), 8.56 (1H, s), 8.62 (1H, d); m/z (ES⁺) (M+H)⁺ = 247.1。

[0052] 中间体B的合成,路线如下:



[0053]



[0054] B1-2的合成:原料B1-1称取50g,加入500ml甲醇全溶解,加入Pd/C 10g,35℃下氢

化反应两天。点板监控,原料反应完毕,处理。直接滤除Pd/C,旋干甲醇相得到粗品39g,直接投下一步。

[0055] B1-3的合成:原料B1-2取39g,加入到500ml的浓硫酸中,冰盐浴下加入。控制温度在10℃以下搅拌全溶。保持温度10℃以下加入1eq硝酸钾,室温下搅拌过夜。次日,倒入冰水中,用氨水调节PH>7,乙酸乙酯萃取,干燥,过柱,得到44g产品。核磁分析数据如下:¹H-NMR (CDCl₃) δ7.39 (d, J=7.2Hz, 1H), 6.63 (d, J=12.4Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.90 (broad, 2H)。

[0056] B1-4的合成:原料B1-3取20g,加入到500ml的二氯甲烷中,冰盐浴冷却到-5℃。滴加1.1eq的二碳酸二叔丁酯的二氯甲烷溶液,滴毕,加入0.2eq的DMAP。自然升温到室温,搅拌过夜。次日,点板,反应完毕,过柱,得到24g黄色固体。核磁分析数据如下:¹H-NMR (CDCl₃) δ8.89 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.71 (d, J=12.4Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 1.53 (s, 9H); m/z (ES+) (M+H)⁺=285.0。

[0057] B1-5的合成:原料B1-4取13.5g,加入到200ml的DMA中,搅拌下全溶。再加入2eq的N,N,N'-三甲基乙二胺和3eq的DIEA,升温到110℃搅拌过夜。次日,反应完毕。处理,得到22g油状物粗品,直接投下一步。核磁分析数据如下:¹H-NMR (CDCl₃) δ8.54 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.22 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.81 (s, 3H), 2.55 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.26 (s, 6H), 1.49 (s, 9H); m/z (ES+) (M+H)⁺=369.3。

[0058] B1-6的合成:原料B1-5取22g,加入到400ml的乙酸乙酯中,搅拌下全溶,再加入4.07g的Pd/C,20℃下氢化反应过夜。次日,原料反应完毕,直接滤除Pd/C,浓缩,得到粗品17g黑色油状物,直接投下一步。核磁分析数据如下:¹H-NMR (CDCl₃) δ7.517 (s, 1H), 6.941 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 2.92 (m, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.40 (m, 2H), 2.27 (s, 6H), 1.49 (s, 9H); m/z (ES+) (M+H)⁺=339.4。

[0059] B1-7的合成:原料B1-6有17.3g,加入500ml的二氯甲烷和1.2eq的DIEA,冰盐浴冷却到-5℃,氩气保护。滴加1.1eq的丙烯酰氯,滴毕,自然升温到室温。3小时后,反应完毕。直接低温下旋蒸浓缩除去溶剂。得到23g左右粗品。直接投下一步。

[0060] 中间体B的合成:原料B1-7有23g,加入到50ml的THF中,冰盐浴冷却到-5℃。浓盐酸100ml,控制温度低于10℃,搅拌2小时后,点板反应完毕。处理,过柱。得到5.2g产品。核磁分析数据如下:¹H-NMR (CDCl₃) δ10.10 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.41-6.21 (m, 2H), 5.65 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.20 (s, 6H); m/z (ES+) (M+H)⁺=293.3。

[0061] 式(I)所示化合物晶型的制备

[0062] 取氘代AZD9291化合物即式(I)所示化合物,游离碱,外观为黄色固体,纯度99.73%,含水量3.9%,溶剂残留<0.5%,熔点测定为105-107℃。

[0063] 首先进行了溶解度实验:在室温条件下测量了氘代AZD9291化合物在多种溶剂中的近似溶解度,该实验是在溶剂结晶法筛选的基础上进行的。当观察到固体完全溶解后,即可根据加入样品的质量,计算出样品在该溶剂中的近似溶解度。值得注意的是,由于样品在某些溶剂中溶解速度较慢,样品在该溶剂中真实的溶解度可能会比计算值高。在本发明中,如果在实验过程中溶解度大于50mg/ml,则认为属于良溶剂;如果在实验过程中溶解度在10mg/ml~50mg/ml之间,则认为属于一般溶剂;如果在实验过程中溶解度小于10mg/ml或没有发生溶解现象,则认为属于不良溶剂。溶解度实验筛选出的良溶剂、一般溶剂、不良溶剂

见表1。

[0064] 表1

[0065]

良溶剂	一般溶剂	不良溶剂
无水甲醇	叔丁醇	仲丁醇
无水乙醇	异丙苯	异戊醇
正丙醇	硝基甲烷	仲戊醇
异丙醇	异丁醇	甲基叔丁基醚
正丁醇	乙酸乙酯	乙酸正丙酯
2,2,2-三氟乙醇		乙酸异丙酯
丙酮		乙酸丁酯
2-丁酮		乙酸异丁酯
4-甲基-2-戊酮		二甲苯
3-甲基-2-丁酮		正己烷
1-甲基-2-吡咯烷酮		环己烷
乙二醇甲醚		正庚烷
丙二醇甲醚		甲基环己烷
苯甲醚		水
四氢呋喃		
1,4-二氧六环		
乙腈		
DMSO		
硝基苯		
三氯甲烷		

[0066] 在此基础上进行了晶型筛选实验。

[0067] 一、晶型筛选方法

[0068] 对氘代AZD9291化合物的固体晶型筛选,是从选定的单一溶剂及其混合溶剂结晶或沉淀,来获得亚稳态和稳定态晶型。采用的方法包括混悬结晶、挥发结晶、降温结晶。

[0069] 1.混悬结晶

[0070] 在室温(22℃~26℃),相对湿度40%~60%环境下,分别称取约100mg的氘代AZD9291化合物,置玻璃样品瓶中,加入1ml溶剂。在60℃条件下摇床震荡悬浮72h,过滤溶液,固体部分在40℃条件下干燥30min,通过粉末X射线衍射(XRPD)、差示扫描量热法(DSC)和热重(TGA)等手段进行分析和鉴定。

[0071] 2.挥发结晶

[0072] 在室温(22℃~26℃),相对湿度40%~60%环境下,根据溶解度分类,分别称取20mg-100mg氘代AZD9291化合物,加入200μl良溶剂,加热至60℃,10min后所有溶液/悬浊液均使用带有0.22μm尼龙过滤器的一次性注射器过滤至EP管中。

[0073] 将单一良溶剂滤液置于通风橱内,使其在室温大气环境下自然挥发,并观察是否有沉淀析出。

[0074] 在良溶剂滤液中再加入200μl不良溶剂,混匀后置于通风橱内,使其在室温大气环

境下自然挥发,并观察是否有沉淀析出。

[0075] 从单一良溶剂滤液中析出的固体沉淀、加有不良溶剂的良溶剂滤液中析出的固体沉淀通过粉末X射线衍射 (XRPD)、差示扫描量热法 (DSC) 和热重 (TGA) 等手段进行分析和鉴定。

[0076] 3. 降温结晶

[0077] 在室温 (22℃~26℃), 相对湿度40%~60%环境下, 根据溶解度分类, 分别称取20mg-100mg氘代AZD9291化合物, 加入200μl良溶剂, 加热至60℃, 10min后所有溶液/悬浊液均使用带有0.22μm尼龙过滤器的一次性注射器过滤至EP管中。

[0078] 将单一良溶剂滤液置于4℃冰箱内, 降温冷却并观察是否有沉淀析出。

[0079] 在良溶剂滤液中再加入200μl不良溶剂, 混匀后置于4℃冰箱内, 降温冷却并观察是否有沉淀析出。

[0080] 从单一良溶剂滤液中析出的固体沉淀、加有不良溶剂的良溶剂滤液中析出的固体沉淀通过粉末X射线衍射 (XRPD)、差示扫描量热法 (DSC) 和热重 (TGA) 等手段进行分析和鉴定。

[0081] 二、晶型筛选过程

[0082] 1. 采用挥发结晶方法

[0083] 1.1 单一溶剂

[0084] 选择了37种溶剂, 在室温 (22℃~26℃), 相对湿度40%~60%环境下, 分别称取20mg-100mg的氘代AZD9291化合物, 根据溶解度数据, 加入200μl溶剂, 加热至60℃, 10min后所有溶液/悬浊液均使用带有0.22μm尼龙过滤器的一次性注射器过滤至EP管中。将EP管敞口置于通风橱内, 使其在室温大气环境下自然挥发, 并观察是否有沉淀析出。结果如表2。

[0085] 表2

[0086]

溶剂	晶型
无水甲醇	A+B
无水乙醇	A+B
正丙醇	A
异丙醇	A+B
正丁醇	A+B
异丁醇	A+B
仲丁醇	A+B
异戊醇	A+B
仲戊醇	A+B
2,2,2-三氟乙醇	-
苯甲醇	-
叔丁醇	B
丙酮	A
2-丁酮	B
4-甲基-2-戊酮	A+B
1-甲基-2-吡咯烷酮	-

3-甲基-2-丁酮	-
乙酸乙酯	A+B
乙酸正丙酯	A+B
乙酸异丙酯	A+B
乙酸正丁酯	A
乙酸异丁酯	A
甲基叔丁基醚	B
乙二醇甲醚	-
丙二醇甲醚	-
苯甲醚	-
二甲苯	B
异丙苯	-
硝基苯	-
三氯甲烷	-
硝基甲烷	A
四氢呋喃	B
1,4-二氧六环	B
乙腈	-
甲基环己烷	A
水	A

[0087] 表中“-”表示未得到固体。

[0088] 1.2混合溶剂

[0089] 在室温(22℃~26℃),相对湿度40%~60%环境下,根据溶解度分类,分别称取20mg-100mg氘代AZD9291化合物,加入200μl良溶剂,加热至60℃,10min后所有溶液/悬浊液均使用带有0.22μm尼龙过滤器的一次性注射器过滤至EP管中。在良溶剂滤液中再加入200μl不良溶剂,混匀后置于通风橱内,使其在室温大气环境下自然挥发,并观察是否有沉淀析出。结果如表3。

[0090] 表3

[0091]

良溶剂 \ 不良溶剂		1	2	3	4	5	6	7	8
		乙醇	正丙醇	异丙醇	正丁醇	苯甲醚	丙酮	2-丁酮	4-甲基-2-戊酮
A	叔丁醇	D	B	C	B	B	C	B	C
B	异丙苯	-	-	-	B	B	-	B	-
C	硝基甲烷	A+B	A+B	-	A+B	B	C	B	A+B
D	仲戊醇	A+B	A	-	B	B	C	B	A
E	乙酸正丙酯	A+B	A+B	B	B	B	B+C	B	A
F	乙酸异丙酯	A+B	A+B	C	A+B	B	B+C	B	A
G	乙酸丁酯	A+B	A+B	B	A+B	B	B+C	B	A
H	乙酸异丁酯	B	B	C	B	B	B	B	B
I	二甲苯	B	B	-	B	B	-	B	B
J	甲基叔丁基醚	B	B	B	B	B	B	A	B
良溶剂 \ 不良溶剂		9	10	11	12	13	14		
		三氟乙醇	1,3-二甲基-吡咯烷酮	乙二醇甲醚	四氢呋喃	1,4-二氧六环	乙腈		
A	叔丁醇	-	B	J	B	B	B		
B	异丙苯	-	B	J	B	-	-		
C	硝基甲烷	-	B	J	C	A+B	A		
D	仲戊醇	B	B+C	J	B	B	C		
E	乙酸正丙酯	B	B	J	B	A+B	A+B		
F	乙酸异丙酯	B	B	J	B	B	A+B		
G	乙酸丁酯	B	B	J	B	B	A		
H	乙酸异丁酯	B	B	J	B	B	K		
I	二甲苯	-	B	J	B	B	A+B		
J	甲基叔丁基醚	B	B	J	B	B	A+B		

[0092] 表中“-”表示未得到固体。

[0093] 2. 采用降温结晶方法

[0094] 2.1 单一溶剂

[0095] 选择了21种良溶剂,在室温(22℃~26℃),相对湿度40%~60%环境下,分别称取20mg-50mg的氘代AZD9291化合物,根据溶解度数据,加入200μl溶剂,加热至60℃,10min后所有溶液/悬浊液均使用带有0.22μm尼龙过滤器的一次性注射器过滤至EP管中。将EP管置于4℃冰箱内,降温冷却并观察是否有沉淀析出。结果如表4。

[0096] 表4

[0097]

溶剂	晶型
无水乙醇	-
正丙醇	-
异丙醇	-
正丁醇	-
异丁醇	-
2,2,2-三氟乙醇	-
丙酮	-

2-丁酮	A
4-甲基-2-戊酮	-
3-甲基-2-丁酮	B
1-甲基-2-吡咯烷酮	-
乙酸乙酯	-
乙二醇甲醚	-
丙二醇甲醚	-
苯甲醚	-
四氢呋喃	-
1,4-二氧六环	-
乙腈	B
DMSO	-
硝基苯	-
三氯甲烷	-

[0098] 表中“-”表示未得到固体。

[0099] 2.2混合溶剂

[0100] 在室温(22℃~26℃),相对湿度40%~60%环境下,根据溶解度分类,分别称取20mg-50mg氘代AZD9291化合物,加入200μl良溶剂,加热至60℃,10min后所有溶液/悬浊液均使用带有0.22μm尼龙过滤器的一次性注射器过滤至EP管中。在良溶剂滤液中再加入200μl不良溶剂,混匀后置于4℃冰箱内,降温冷却并观察是否有沉淀析出。结果如表5。

[0101] 表5

不良溶剂 \ 良溶剂		1	2	3	4	5	6	7	8
		正丁醇	苯甲醚	丙酮	2-丁酮	4-甲基-2-戊酮	四氢呋喃	1,4-二氧六环	乙腈
[0102]	A 叔丁醇	B	B	C	B	-	B	B	C
	B 异丙苯	B	B	-	B	-	-	-	-
	C 硝基甲烷	A+B	B	C	B	-	A+B	A	A+B
	D 仲戊醇	B	B	C	B	B	B	C	A
	E 乙酸正丙酯	B	B	B+C	B	B	A+B	A+B	A
	F 乙酸异丙酯	A+B	B	B+C	B	B	B	A+B	A
	G 乙酸丁酯	A+B	B	B+C	B	B	B	A	A
[0103]	H 乙酸异丁酯	B	B	B	B	B	B	K	B
	I 二甲苯	B	B	-	B	-	B	A+B	B
	J 甲基叔丁基醚	B	B	B	A	B	B	A+B	B

[0104] 表中“-”表示未得到固体。

[0105] 3. 采用混悬结晶方法

[0106] 选择有一定溶解度的一般溶剂与有代表性的不良溶剂进行混悬结晶实验。

[0107] 在室温(22℃~26℃),相对湿度40%~60%环境下,分别称取约100mg的氘代AZD9291化合物,置玻璃样品瓶中,加入1ml溶剂。在60℃条件下摇床震荡悬浮72h,过滤溶

液,固体部分在40℃条件下干燥30min。结果如表6。

[0108] 表6

[0109] 溶剂	结果
叔丁醇	D
异丙苯	-
硝基甲烷	A
仲丁醇	A
异戊醇	A
仲戊醇	A
二甲苯	A
乙酸异丙酯	A
乙酸丁酯	A

[0110] 表中“-”表示未得到固体。

[0111] 三、晶型分析

[0112] 运用多种检测分析方法对得到的固体样品进行了分析,例如粉末X射线衍射(XRPD)、差示扫描量热法(DSC)、热重分析(TGA)和动态水分吸附实验(DVS)。

[0113] 1. 粉末X射线衍射(XRPD)

[0114] 使用粉末X射线衍射分析仪(Bruker D8advance)对固体样品进行分析,该仪器配备了LynxEye检测器。样品的2 θ 扫描角度是从3°到40°,扫描步长是0.02°,光管电压和电流分别为40kV和40mA。样品使用零背景样品架进行检测。波长1.5406。入射光为CuK α 谱线。

[0115] 2. 热重分析(TGA)

[0116] 使用METTLER TGA/DSC 2对固体样品进行热重分析。取大约2.0mg的样品放置在已平衡的铂或铝制样品盘中,样品质量在TGA加热炉内自动称量。样品以10℃/min的速率加热到300℃。测试过程中,氮气对天平室和样品室的氮气流量分别是40mL/min和60mL/min。

[0117] 3. 差示扫描量热法(DSC)

[0118] 使用NETZSCH DSC200F3对固体样品进行分析,其校正使用的标准样品是铟。取约2.0mg的样品精确称重后放置于铝样品盘中,并记录下样品的准确质量。样品在氮气环境下(流速为50mL/min)以10℃/min的速率加热到250℃。

[0119] 4. 动态水吸附分析(DVS)

[0120] 使用SMS DVS Intrinsic对固体样品进行分析。取约10mg样品精确称重后放置在样品盘中,在25℃的温度下,相对湿度由0%升至95%,考察样品对水分的吸附与解吸附情况。

[0121] 四、晶型分析结果

[0122] 1. 晶型A

[0123] 为氘代AZD9291化合物的初始晶型。该晶型为一个水合物,TGA数据显示有3.9%左右的失重。DSC显示其熔点在100℃至107℃之间。晶型A在甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇、异戊醇、仲戊醇、丙酮、乙酸乙酯、乙酸正丙酯、乙酸异丙酯、乙酸正丁酯、乙酸异丁酯、4-甲基-2-戊酮、硝基甲烷等多种单一溶剂与混合溶剂体系中均可得到。稳定性实验表明,晶型A是一个较为稳定的晶型。

[0124] 晶型A使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图(XRPD)、DSC-TGA图谱分别见图1和图2。

[0125] 从图1可知,晶型A的X-射线粉末衍射峰数据如表7所示。

[0126] 表7

2 θ (°)	相对强度 (%)
5.95	100.0
7.36	19.6
11.30	27.0
11.93	14.9
12.57	1.8
13.59	7.0
15.19	2.8
16.35	3.1
18.50	3.1
20.51	1.1
21.80	1.2
22.44	1.4
24.75	1.9
25.29	1.7

[0128] 2. 晶型B

[0129] 该晶型熔融前失重3.5%,DSC显示其熔点在100°C至105°C之间。晶型B在甲醇、乙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇、异戊醇、仲戊醇、叔丁醇、2-丁酮、乙酸乙酯、乙酸正丙酯、乙酸异丙酯、4-甲基-2-戊酮、甲基叔丁基醚、二甲苯、四氢呋喃、1,4-二氧六环等多种单一溶剂与混合溶剂体系中均可得到。晶型B是一个亚稳态晶型,加速稳定性实验表明,晶型B在40°C,75%湿度条件下放置10d会转变为晶型A。

[0130] 晶型B的X-射线粉末衍射峰数据如表8所示。

[0131] 表8

2 θ (°)	相对强度 (%)
5.99	100.0
7.46	46.7
11.24	64.5
11.97	12.8
13.00	30.2
14.42	24.5
16.50	9.5
17.79	6.4
18.31	17.3
19.12	11.6
22.32	6.3

24.84	36.3
25.79	14.7

[0133] 3. 晶型C

[0134] 该晶型熔融前失重3.7%，DSC显示其熔点在85℃至95℃之间。晶型C可以在异丙醇、丙酮、乙腈与叔丁醇、硝基甲烷、仲戊醇、乙酸异丙酯等的混合溶剂中得到。加速稳定性实验表明，晶型C在固体状态下是一个较为稳定的晶型。在有醇类溶剂介导的条件下，晶型C会转变为晶型B。

[0135] 晶型C使用Cu-K α 射线测量得到的X射线粉末衍射图(XRPD)、DSC-TGA图谱分别见图3和图4。

[0136] 从图3可知，晶型C的X-射线粉末衍射峰数据如表9所示。

[0137] 表9

	2 θ (°)	相对强度 (%)
[0138]	8.80	35.1
	9.25	100.0
	9.61	3.3
	10.42	40.1
	16.01	54.1
	16.73	19.7
	17.65	61.3
[0139]	18.57	9.5
	20.58	17.5
	20.95	17.9
	23.28	16.4
	26.08	10.1
	26.63	11.2

[0140] 4. 晶型D

[0141] 该晶型TGA数据显示加热失重为6.4%，DSC显示其熔点在60℃至80℃之间。晶型D可以通过叔丁醇悬浮转晶的方法得到。晶型D是一个亚稳态晶型，失去部分水或溶剂后转变为晶型C。

[0142] 晶型D的X-射线粉末衍射峰数据如表10所示。

[0143] 表10

2 θ (°)	相对强度 (%)
6.36	100.0
8.84	4.5
9.24	6.2
10.05	3.1
10.77	12.6
11.65	2.4

14.27	4.1
16.62	8.9
16.80	18.6
20.17	3.2
21.64	13.2
25.21	7.3
26.60	1.2

[0145] 5. 晶型E

[0146] 该晶型TGA数据显示加热失重为6.8%，DSC显示其熔点在80℃至100℃之间。晶型E可以通过饱和甲醇降温析晶的方法得到。晶型E是一个亚稳态晶型，失去部分水或溶剂后转变为晶型F。

[0147] 晶型E的X-射线粉末衍射峰数据如表11所示。

[0148] 表11

[0149]

2 θ (°)	相对强度 (%)
8.61	100.0
10.16	0.7
12.34	1.7
12.90	3.0
15.46	1.7
16.72	0.5
18.43	0.8
19.32	0.3
20.78	1.1
21.78	2.0
22.08	1.6
24.86	0.7
26.00	0.7

[0150] 6. 晶型F

[0151] 该晶型TGA数据显示在40℃以下失去少量水/溶剂，失重为1.3%左右，表明其应该为一非水/溶剂合物。DSC显示其熔点在80℃至90℃之间。晶型F可以通过晶型E失水/溶剂后得到。将晶型E置真空干燥箱中，加热至60℃，12h后转变为晶型F。晶型F是一个亚稳态晶型，加速稳定性实验表明，晶型F在40℃，75%湿度条件下放置10d会部分转变为晶型A。

[0152] 晶型F的X-射线粉末衍射峰数据如表12所示。

[0153] 表12

[0154]

2 θ (°)	相对强度 (%)
8.86	100.0
10.14	1.6
12.38	0.5
12.90	3.7

14.08	0.5
15.61	2.3
16.66	1.1
17.81	0.6
19.21	0.5
21.13	2.3
25.97	0.6
26.86	0.4
28.94	0.3

[0155] 7. 晶型G

[0156] 该晶型TGA数据显示在熔融前失重4.3%，DSC显示其熔点在130℃至140℃之间。晶型G可以通过含甲醇的混合溶剂得到。晶型G是一个亚稳态晶型，室温条件下放置2m后转变为晶型C。

[0157] 晶型G的X-射线粉末衍射峰数据如表13所示。

[0158] 表13

[0159]

2 θ (°)	相对强度 (%)
8.24	50.3
9.19	37.9
12.73	5.2
13.96	7.9
16.52	100.0
17.91	2.0
18.39	2.0
20.98	0.7
22.89	3.2
24.89	46
26.93	1.2
27.72	1.3
28.98	0.9

[0160] 8. 晶型H

[0161] 该晶型TGA数据显示有10.5%左右的失重，DSC显示其熔点在150℃至160℃之间。晶型H可以通过饱和3-甲基-2-丁酮转晶的方式得到。晶型H是一个亚稳态晶型，失去部分水或溶剂后转变为晶型I。

[0162] 晶型H的X-射线粉末衍射峰数据如表14所示。

[0163] 表14

	2 θ (°)	相对强度 (%)
[0164]	7.18	2.5
	7.77	18.0
	8.06	32.5
	8.29	100.0
	8.74	25.5
	13.51	6.2
	14.05	16.3
	15.54	16.6
	18.38	14.4
	19.26	19.4
[0165]	21.01	7.9
	23.49	9.6
	27.70	3.6

[0166] 9. 晶型I

[0167] 该晶型TGA数据显示有8.3%左右的失重,DSC在140°C至170°C之间有多重吸热峰。晶型I可以通过饱和丙二醇甲醚转晶的方式得到。晶型I是一个亚稳态晶型,在水中与晶型A,晶型C混悬1w完全转变。

[0168] 晶型I的X-射线粉末衍射峰数据如表15所示。

[0169] 表15

2 θ (°)	相对强度 (%)
7.20	100.0
8.72	0.2
10.03	0.5
11.89	1.3
14.43	8.3
15.45	0.4
17.34	0.3
18.46	0.1
19.69	0.3
23.97	0.3
24.30	0.2
25.94	0.2
29.12	0.7

[0171] 五、晶型稳定性研究

[0172] 1. 晶型A加热脱结晶水

[0173] 通过晶型A的DSC-TGA图谱发现,起始原料为水合物。通过加热脱去水,检测XRPD,观察无水物的晶型变化。结果表明除结晶度下降外,无变化。

[0174] 晶型A加热前与加热后的XRPD对比图谱见图5所示。晶型A加热后的DSC-TGA图谱见图6所示。

[0175] 2. 常温稳定性研究

[0176] 排除易失去结晶溶剂,发生晶型转变的晶型D、晶型E、晶型H,将初步判断较为稳定的晶型A、晶型B、晶型C、晶型F、晶型G、晶型I在室温条件下放置2月,观察晶型稳定性。稳定性数据见表16。

[0177] 表16

晶型	稳定性结果
A	稳定
B	稳定
C	稳定
F	稳定
G	转变为晶型 C
I	稳定

[0180] 3. 加速稳定性研究

[0181] 排除常温稳定性研究中发生转晶的晶型G,将常温放置下稳定的晶型A、晶型B、晶型C、晶型F、晶型I放置于40℃,75%湿度条件下10d,观察晶型稳定性。稳定性数据见表17。

[0182] 表17

晶型	稳定性结果
A	稳定
B	转变为晶型A
C	稳定
F	晶型F与晶型A混晶
I	稳定

[0184] 4. 引湿性研究

[0185] 选择加速稳定的晶型A、晶型C、晶型I进行DVS检测(动态水吸附分析),考察不同晶型的引湿性。晶型A、晶型C、晶型I的DVS图谱分别见图7-图9。由DVS图谱可知,晶型A与晶型C的引湿性基本相同(吸附水约3.5%),晶型I的引湿性较小(吸附水约0.7%)。

[0186] 5. 混悬转晶研究

[0187] 在稳定性与引湿性的基础上,对晶型A、晶型C、晶型I在水中悬浮条件下的晶型转化关系与稳定性进行进一步考察。混悬转晶研究数据见表18。选取常温与加速试验均稳定的晶型A,晶型C与晶型I,混合后常温下在水中搅拌,按1w,2w,3w取样,过滤得到固体,XRPD检测分析,晶型A、晶型C、晶型I常温混悬转晶的XRPD对比图见图10。

[0188] 结果表明,固体的XRPD谱图在混悬1w后,晶型I的特征峰(7.0°、14.2°等)即已完全消失。混悬2w与3w后,晶型A的特征峰(图中圈1)与晶型C的特征峰(图中圈2)位置与强度基本未发生改变。这说明在水溶液中,由于溶解度极低,两种晶型均较为稳定。

[0189] 表18

	样品	质量/mg	体积/mL	温度 (°C)	XRPD
[0190]	晶型 A	5.0	2	20	晶型 A 与晶型 C 的混合
	晶型 C	5.1			
	晶型 I	4.9			

[0191] 本发明完成了对式 (1) 所示化合物的多晶型研究, 全面筛选了原料药在不同条件下可能存在的晶型。运用多种途径对原料药进行多晶型筛选, 其中包括溶剂结晶法筛选、加热转晶、混悬转晶、挥发结晶以及降温结晶等。在研究中发现原料药一共存在9种以上的晶型, 晶型A至晶型I成功放大制备成功, 晶型J与晶型K未能重复放大制备, 判断是较不稳定的亚稳晶型。

[0192] 对晶型A至晶型I进一步进行了常温与加速稳定性研究, 并进行了混悬实验与DVS引湿性研究, 晶型A至晶型I的晶型性质列表见表19。发现晶型A与晶型C在固体状态下均是较为稳定的晶型, 相比其他晶型, 晶型A与晶型C的稳定性好。

[0193] 但考虑到在醇类溶剂介导的条件下, 晶型C会发生转晶, 晶型A为最佳的优势药物晶型。本发明为进行后续药物代谢动力学实验与动物学实验提供了参考依据。

[0194] 表19

	晶型	初期稳定性	长期稳定性 (室温, 2月)	加速稳定性 (40°C/75%RH, 10d)	引湿性
[0195]	A	稳定	稳定	稳定	3.5%
	B	稳定	稳定	转变为 A	-
	C	稳定	稳定	稳定	3.5%
	D	转变为 C	-	-	-
	E	转变为 F	-	-	-
	F	稳定	稳定	部分转变为 A	-
	G	稳定	转变为 C	-	-
	H	转变为 I	-	-	-
	I	稳定	稳定	稳定	0.7%

[0196] “-”: 未检测。

[0197] 在本发明中, X-射线粉末衍射峰的2θ角度值, 其误差范围为±0.2°。应该理解, X射线粉末衍射图的2θ值可在机器之间和样品之间稍有变化, 其数值范围可能相差在±0.2个单位内, 因此所引用的数值不能解释为绝对值。

[0198] 考虑到2θ角度的表示的峰的强度有高有低, 尤其是一些峰的强度低于最强峰的20%, 其表征的数据准确度受仪器条件的影响较大, 可能出现较大的误差, 因此可以选取峰强高于20%的峰值作为本发明晶型的特征峰。

[0199] 本发明提供的晶型A和晶型C理化性质稳定, 非常适合在接下来制剂等药物研发方面的应用。

[0200] 本发明提供的氘代AZD9291晶型A和晶型C, 其可作为表皮生长因子受体EGFR抑制剂, 特别是EGFR突变体抑制剂。

[0201] 本发明提供的氘代AZD9291晶型A和晶型C,可用于制备调节EGFR酪氨酸激酶活性或治疗EGFR相关疾病药物,其抑制一种或多种EGFR的激活或抗性突变,例如L858R激活突变体、Exon19缺失EGFR激活突变体、T790M抗性突变体,尤其适用于癌症治疗,如非小细胞肺癌。

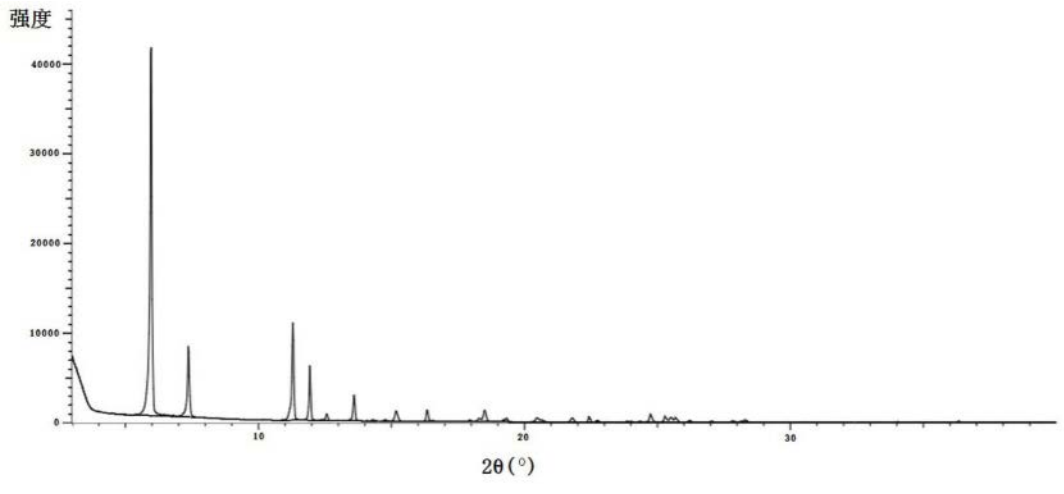


图1

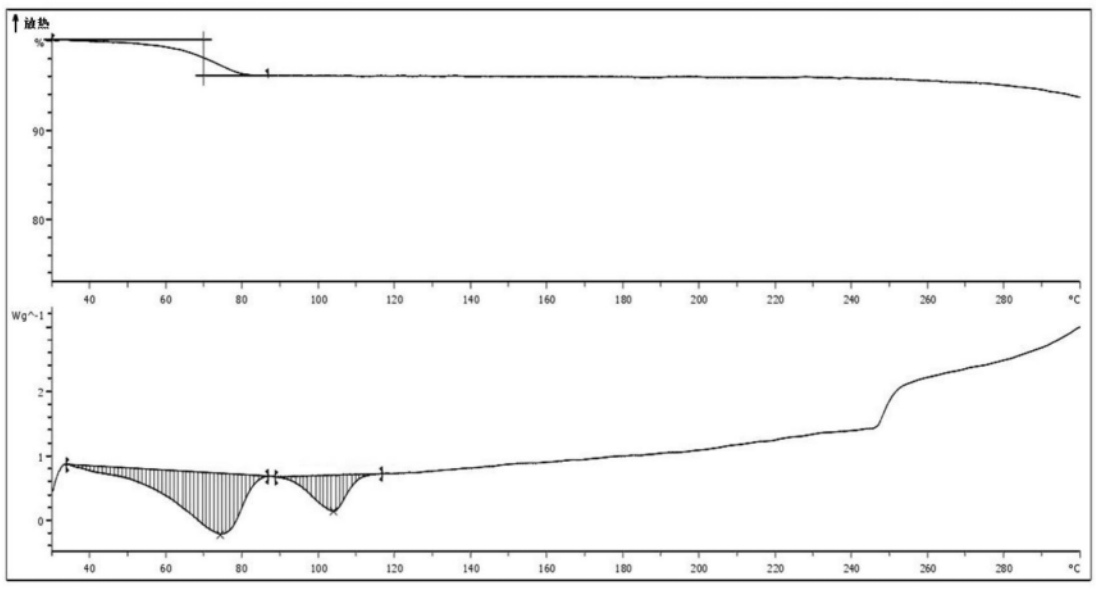


图2

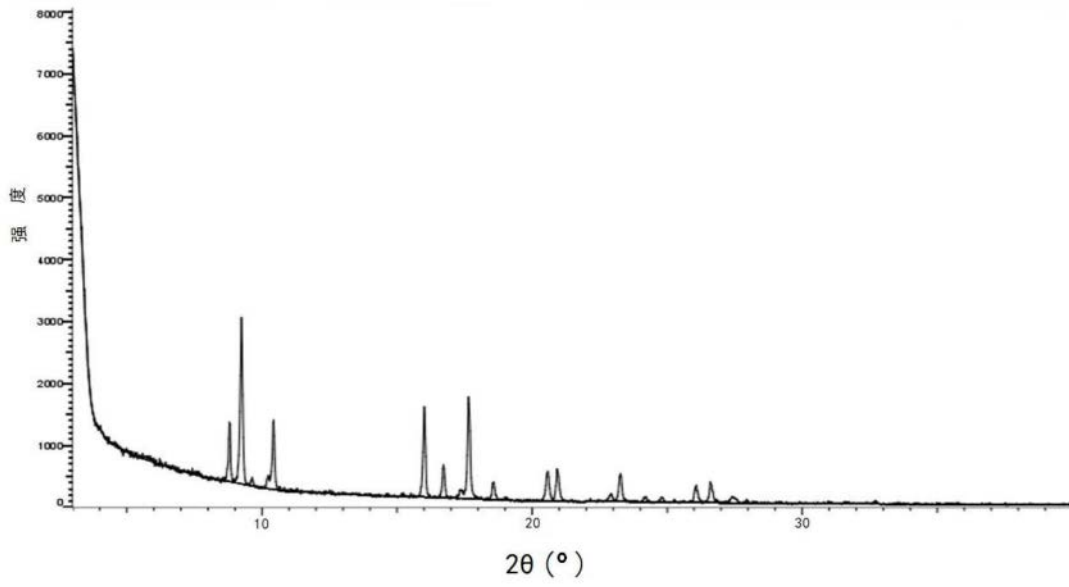


图3

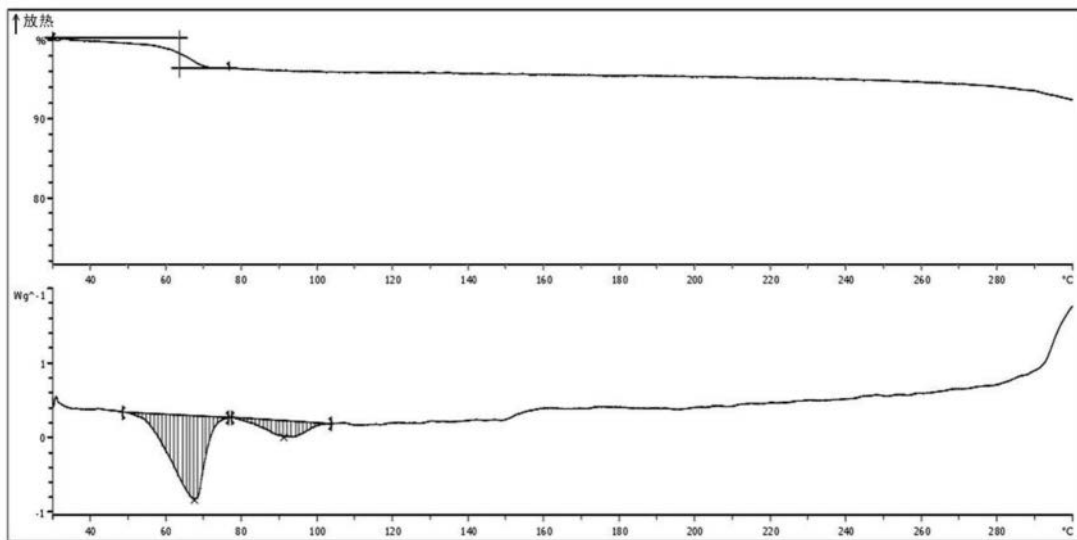


图4

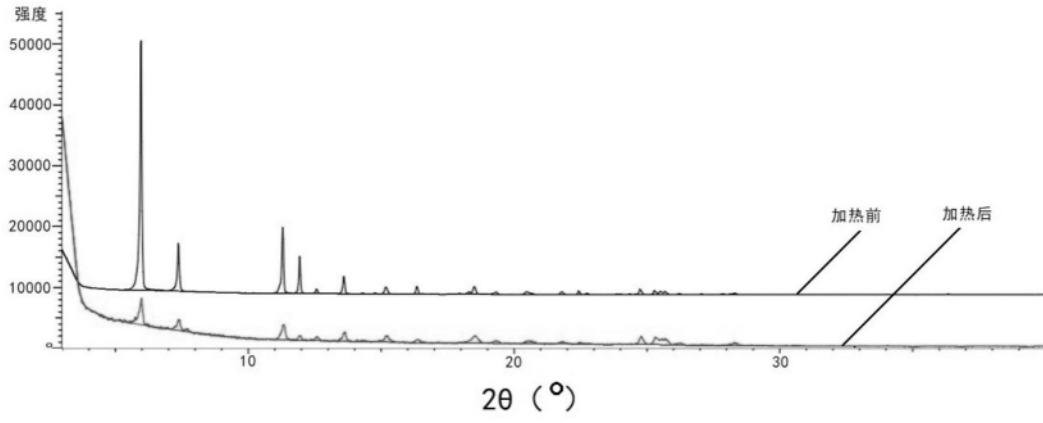


图5

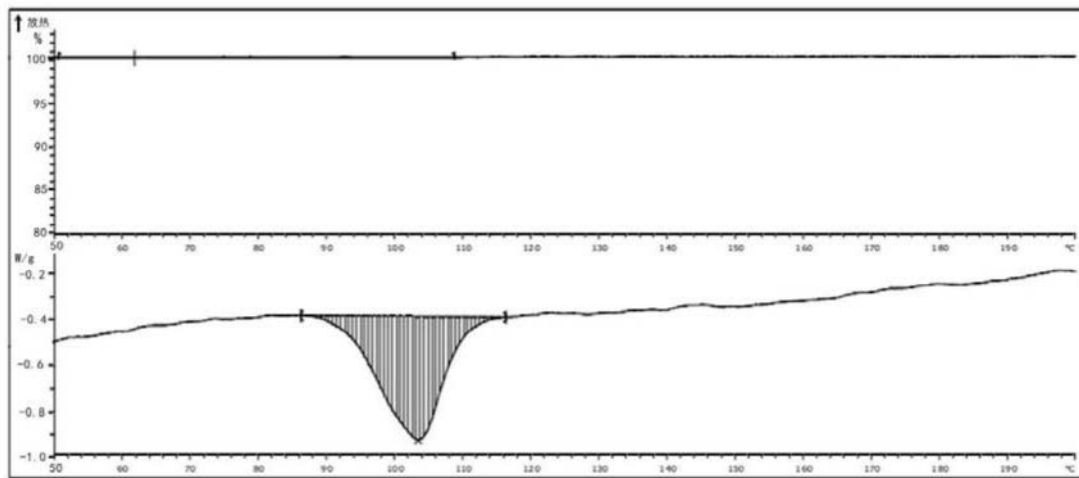


图6

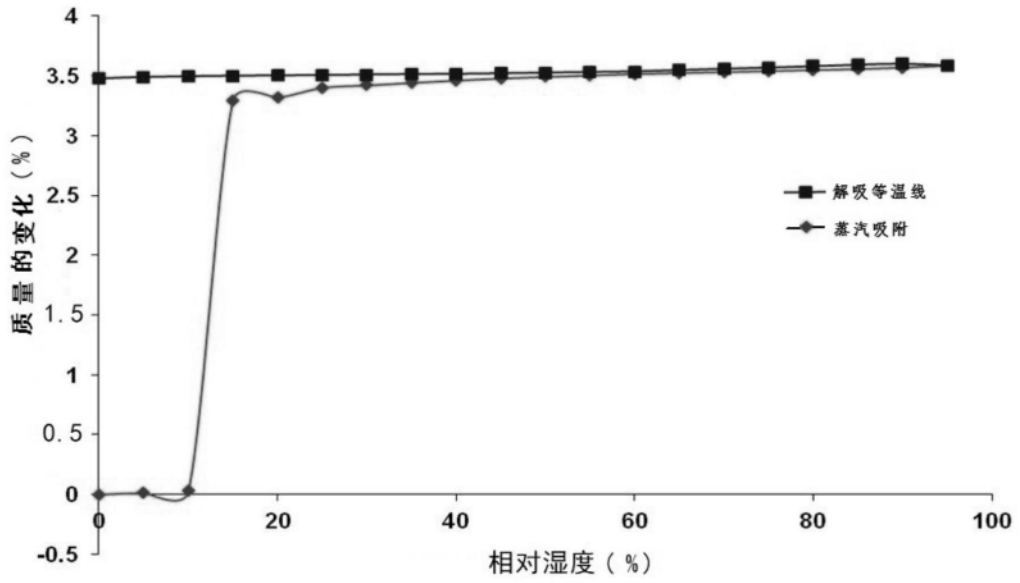


图7

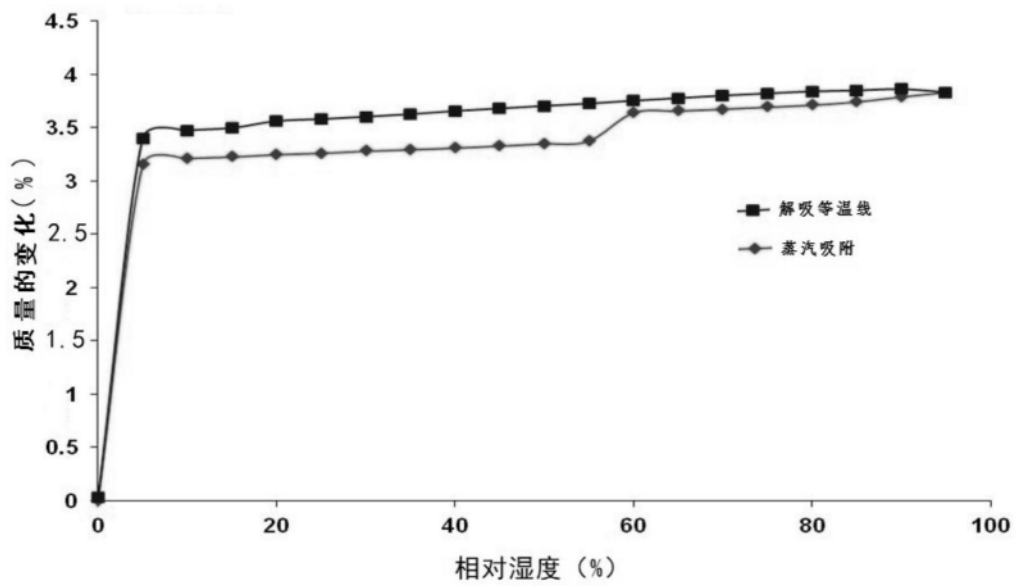


图8

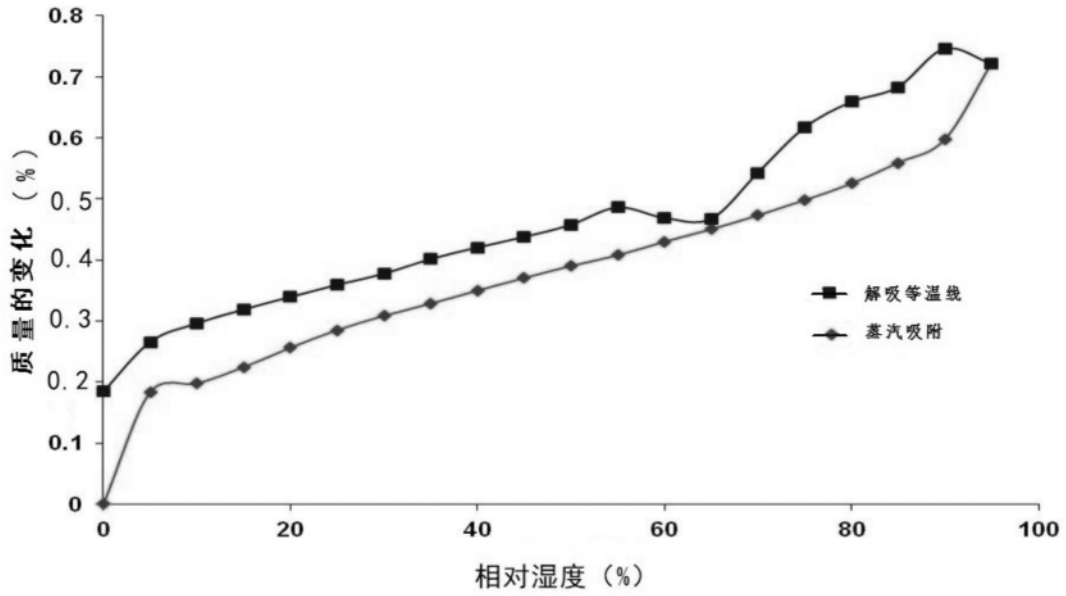


图9

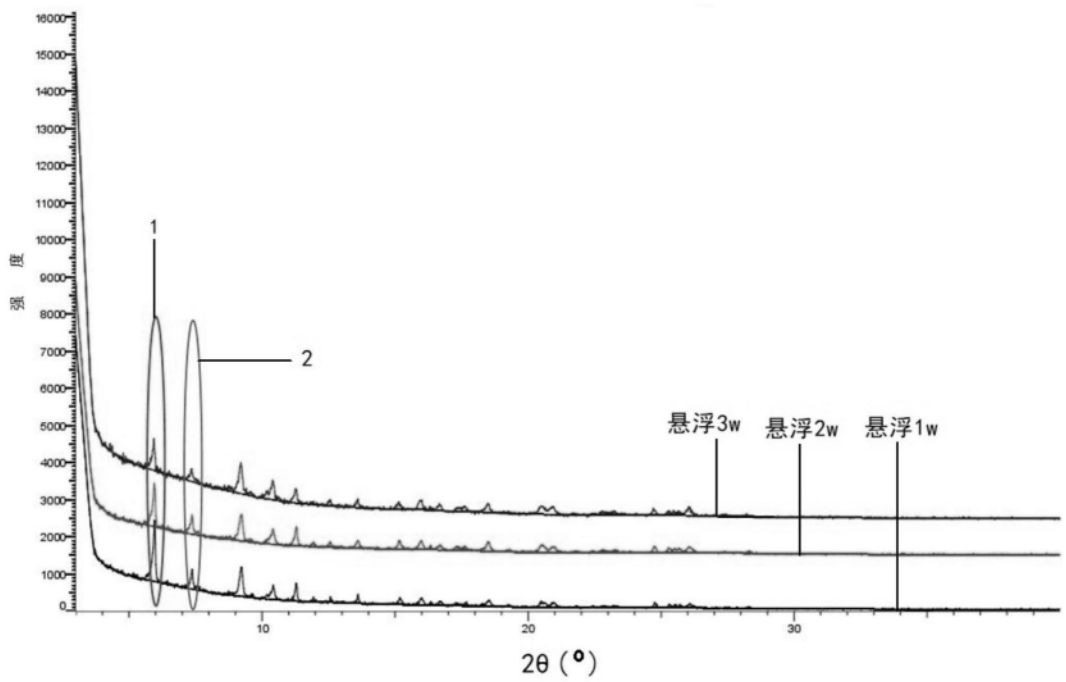


图10