



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109563099 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780049930.8

(22)申请日 2017.08.15

(66)本国优先权数据

PCT/CN2016/095510 2016.08.16 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2017/054955 2017.08.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/033853 EN 2018.02.22

(71)申请人 百济神州有限公司

地址 开曼群岛大开曼

(72)发明人 王志伟 郭运行 史公银

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 陈桢

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书45页 附图9页

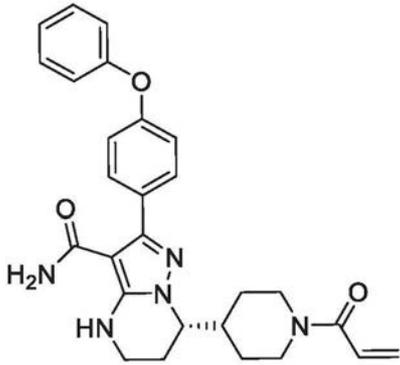
(54)发明名称

(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-A]嘧啶-3-甲酰胺的晶型、其制备和用途

(57)摘要

本发明涉及用于抑制Btk的(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺的晶型、其制备方法和药物组合物,以及上述晶型在治疗疾病中的用途或在制备用于治疗疾病的药物中的用途。

1. 化合物1的晶型,



化合物 1。

2. 权利要求1的晶型,其中所述晶型为无水物。

3. 权利要求1或2中任一项的晶型,其特征为X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $14.8\pm 0.2^\circ$ 、 $16.4\pm 0.2^\circ$ 和 $21.4\pm 0.2^\circ$ 。

4. 权利要求1或2中任一项的晶型,其特征为X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $14.8\pm 0.2^\circ$ 、 $15.6\pm 0.2^\circ$ 、 $16.4\pm 0.2^\circ$ 和 $21.4\pm 0.2^\circ$ 。

5. 权利要求1或2中任一项的晶型,其特征为X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $12.2\pm 0.2^\circ$ 、 $12.9\pm 0.2^\circ$ 、 $14.8\pm 0.2^\circ$ 、 $15.6\pm 0.2^\circ$ 、 $16.4\pm 0.2^\circ$ 和 $21.4\pm 0.2^\circ$ 。

6. 权利要求1或2中任一项的晶型,其特征为X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $12.2\pm 0.2^\circ$ 、 $12.9\pm 0.2^\circ$ 、 $14.8\pm 0.2^\circ$ 、 $15.6\pm 0.2^\circ$ 、 $16.4\pm 0.2^\circ$ 、 $17.7\pm 0.2^\circ$ 、 $18.5\pm 0.2^\circ$ 、 $20.7\pm 0.2^\circ$ 和 $21.4\pm 0.2^\circ$ 。

7. 权利要求1或2中任一项的晶型,其中所述晶型具有基本上与图1一致的X射线粉末衍射图。

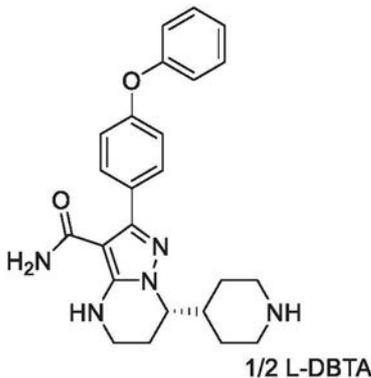
8. 权利要求2-7中任一项的晶型,其中所述晶型的特征为熔点是 $139\pm 2^\circ\text{C}$ (起始温度)。

9. 权利要求2-7中任一项的晶型,其中所述晶型的特征为具有基本上与图2一致的DSC。

10. 权利要求2-7中任一项的晶型,其中所述晶型的特征为具有基本上与图3一致的TGA。

11. 权利要求1-7中任一项的晶型,其中所述晶型的特征为纯度 $>85\%$ 或纯度 $>95\%$ 或纯度 $>99\%$ 。

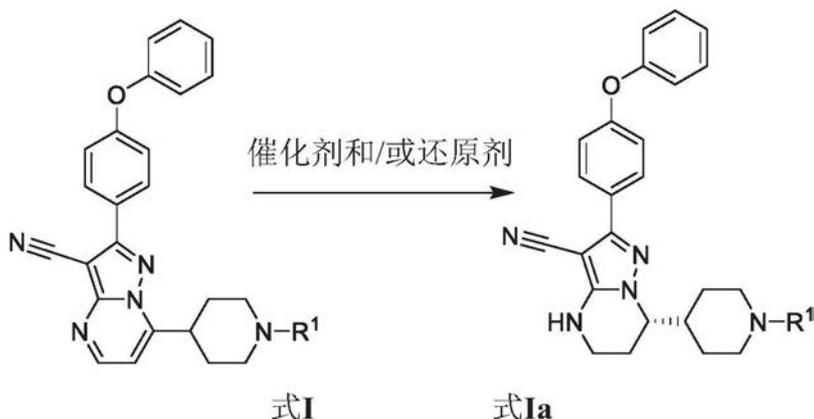
12. 具有以下结构的化合物的晶型,



其中所述晶型具有基本上与图11一致的X射线粉末衍射图。

13. 权利要求12的晶型, 其中所述晶型的特征为具有包括 $a=16.7939(4)\text{\AA}$, $b=7.9871(2)\text{\AA}$, $c=23.5438(5)\text{\AA}$, $\alpha=90.00^\circ$, $\beta=108.0460(10)^\circ$, $\gamma=90.00^\circ$ 的晶胞尺寸。

14. 式Ia化合物的制备方法, 包括在催化剂和/或还原剂的存在下不对称还原式I化合物制备式Ia化合物,

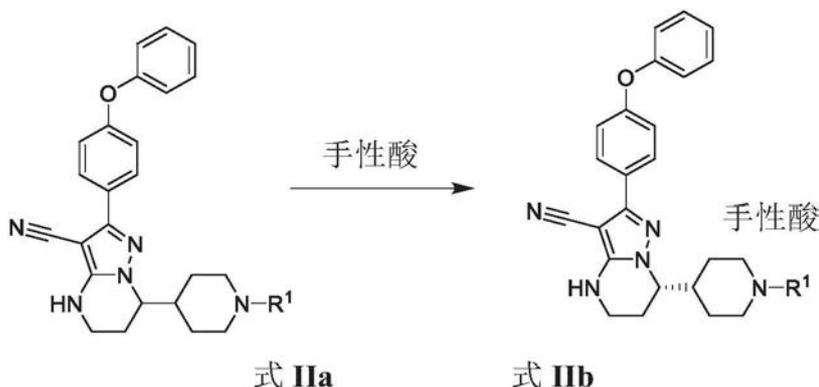


其中R¹为氢或氨基保护基团。

15. 权利要求14的方法, 其中所述氨基保护基团选自乙酰基、丙酰基、丁酰基、苄基乙酰基、苄甲酰基、甲苯酰基、苄氧基乙酰基、甲氧基羰基、乙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、叔丁基氧基羰基、2-碘乙氧基羰基、苄氧羰基、4-甲氧基苄基氧基羰基、(苎-9-基甲氧基)羰基、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基、苄基、甲基或4-甲氧基苄基。

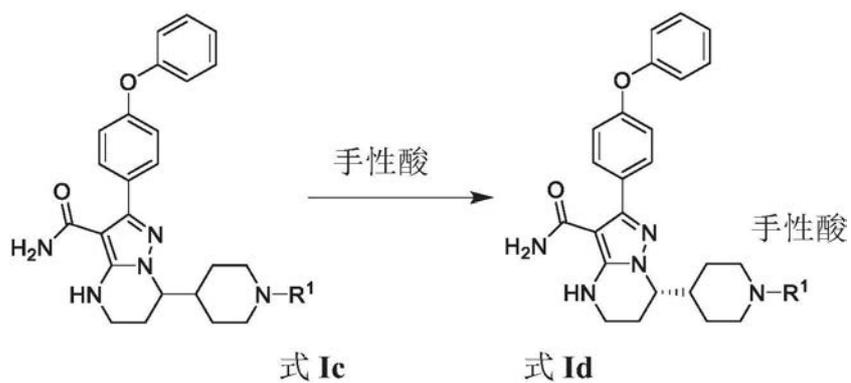
16. 权利要求14的方法, 其中所述催化剂为中性催化剂体系或阳离子型催化剂体系。

17. 拆分式IIa化合物制备式IIb化合物或改善式IIb化合物的手性纯度的方法, 包括以手性酸处理外消旋的式IIa化合物,



其中R¹为氢、甲基、苄基、4-甲氧基苄基或其他常规氨基保护基团。

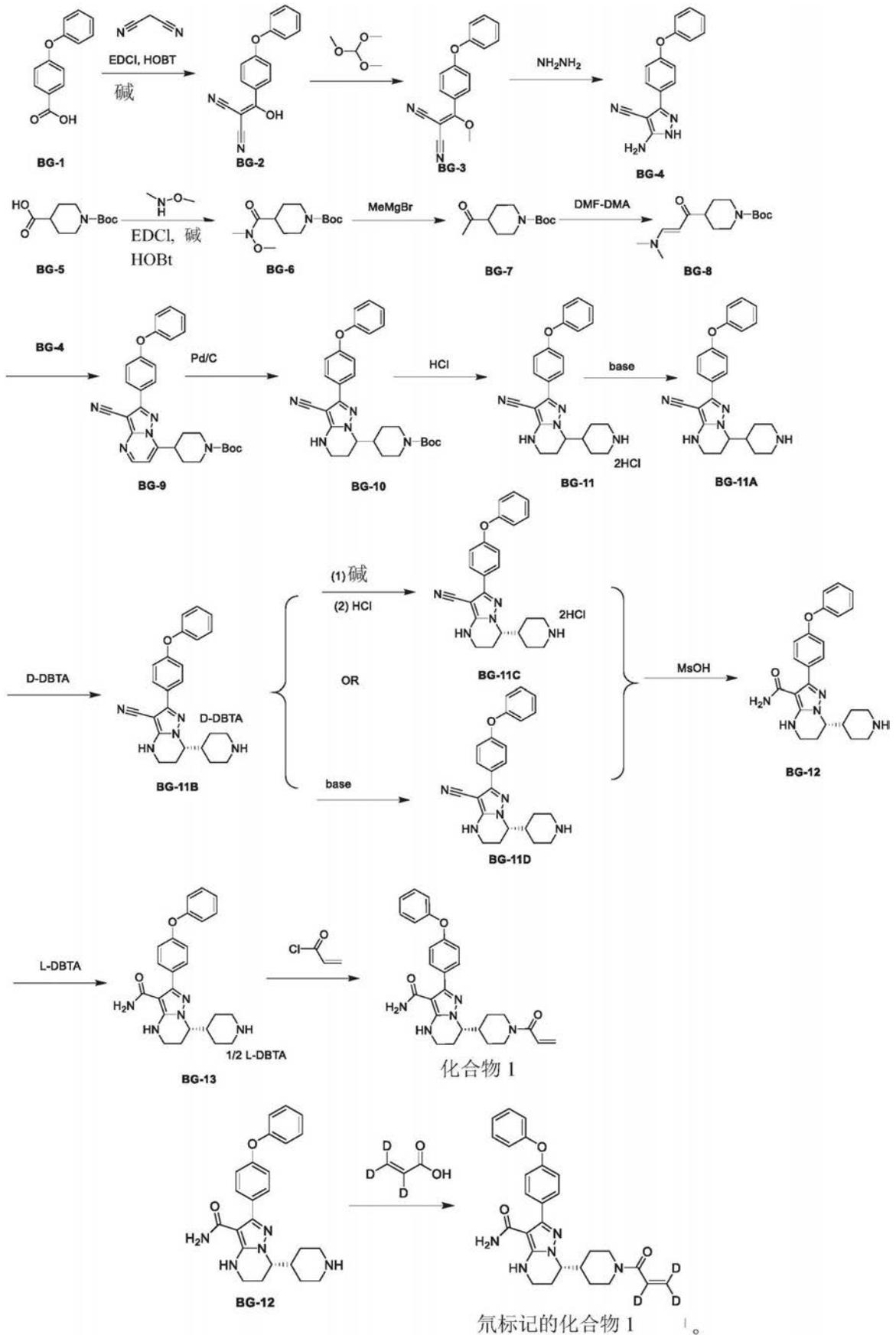
18. 拆分式Ic化合物制备式Id化合物或改善式Id化合物的手性纯度的方法, 包括以手性酸处理外消旋的式Ic化合物,



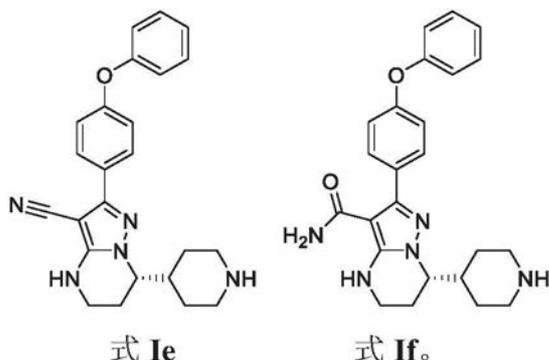
其中R¹为氢、甲基、苄基、4-甲氧基苄基或其他常规氨基保护基团。

19. 权利要求17或18的方法, 其中手性酸选自L-苹果酸、D-苹果酸、L-扁桃酸、D-扁桃酸、L-樟脑磺酸、D-樟脑磺酸、L-酒石酸、D-酒石酸、L-DBTA、D-DBTA、L-DTTA或D-DTTA。

20. 化合物1和氘标记的化合物1的制备方法, 包括以下:



21. 用来制备化合物1的式Ie化合物或其盐、式If化合物或其盐，



22. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将化合物1溶解在DCM中,交换为溶剂EA,从EA/MTBE中重结晶,获得目标晶型。

23. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将化合物1溶解在EA中,添加己烷,获得目标晶型。

24. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将化合物1溶解在有机溶剂中,添加H₂O,获得目标晶型,其中所述有机溶剂选自丙酮或DMAc。

25. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将权利要求1-7的结晶溶解在有机溶剂中,添加H₂O,获得目标晶型,其中所述有机溶剂选自丙酮或DMAc。

26. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将化合物1溶解在有机溶剂中,添加正庚烷,或目标晶型,其中所述有机溶剂选自EtOAc、DCM、甲苯或2-MeTHF。

27. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将权利要求1-7的结晶溶解在有机溶剂中,添加正庚烷,获得目标晶型,其中所述有机溶剂选自EtOAc、DCM、甲苯或2-MeTHF。

28. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将化合物1溶解在丙酮或EtOAc获得溶液,将溶液置于正庚烷中,于室温蒸发,获得目标晶型。

29. 制备权利要求2-7中任一项的晶型的方法,包括以下步骤:将权利要求1-7的结晶溶解在丙酮或EtOAc中得到溶液,将溶液置于正庚烷中,于室温蒸发,获得目标晶型。

30. 权利要求22-29的方法,其中化合物1或权利要求1-7的结晶的ee值大于90%、优选大于97%。

31. 药物组合物,其包含治疗有效量的权利要求1-7中任一项的晶型和药学上可接受的赋形剂。

32. 权利要求31的药物组合物,其中所述药物组合物以口服给予使用。

33. 权利要求31或32中任一项的药物组合物,其中所述组合物含有1wt%-99wt%的权利要求1-7中任一项的晶型。

34. 权利要求31的药物组合物,其中所述组合物含有1wt%-70wt%的权利要求1-7中任一项的晶型。

35. 权利要求31的药物组合物,其中所述组合物含有10wt%-30wt%的权利要求1-7中任一项的晶型。

36. 通过向受试者给予权利要求1-7中任一项的晶型在受试者中治疗与不期望Btk活性相关的疾病的方法。

37. 通过向受试者给予权利要求1-7中任一项的晶型在受试者中治疗选自以下的疾病

的方法:变应性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其两种或更多种的组合。

38. 通过向受试者给予权利要求1-7中任一项的晶型在受试者中治疗选自B-细胞恶性肿瘤的B-细胞增殖性疾病的方法。

39. 权利要求38的方法,其中所述B-细胞增殖性疾病为B-细胞恶性肿瘤,选自淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)、边缘区淋巴瘤(MZL)、毛细胞白血病(HCL)、伯基特样白血病(BL),或其两种或更多种的组合。

40. 权利要求38的方法,其中所述B-细胞增殖性疾病为复发性/难治性B-细胞恶性肿瘤,选自复发性/难治性套细胞淋巴瘤(R/R MCL)、复发性/难治性慢性淋巴细胞性白血病(R/R CLL)、复发性/难治性小淋巴细胞性淋巴瘤(R/R SLL)、复发性/难治性瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(R/R WM),或其两种或更多种的组合。

41. 权利要求38的方法,其中以40mg-320mg/天的剂量给予权利要求1-7中任一项的晶型。

42. 权利要求38的方法,其中以160mg每天两次(BID)或320mg每天一次(QD)的剂量给予权利要求1-7中任一项的晶型。

(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-A]嘧啶-3-甲酰胺的晶型、其制备和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺的晶型。本发明还涉及制备该晶型的方法以及使用该晶型作为Btk抑制剂的方法。

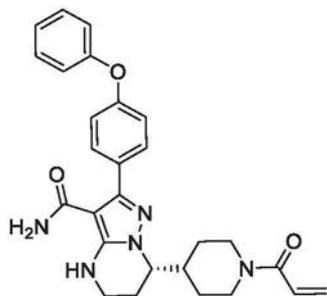
发明背景

[0002] 布鲁顿氏酪氨酸激酶(Bruton's酪氨酸激酶,Btk)属于Tec酪氨酸激酶家族(Vetrie et al.,Nature 361:226-233,1993;Bradshaw,Cell Signal.22:1175-84,2010)。Btk主要表达在大部分造血细胞诸如B细胞、肥大细胞和巨噬细胞中(Smith et al.,J.Immunol.152:557-565,1994)并位于骨髓、脾和淋巴结组织中。Btk在B-细胞受体(BCR)和FcR信号传导途径中发挥重要作用,涉及B-细胞发育、分化(Khan,Immunol.Res.23:147,2001)。Btk由上游Src-家族激酶来激活。一旦激活,Btk转而将PLC γ 磷酸化,导致对B-细胞功能和存活的作用(Humphries et al.,J.Biol.Chem.279:37651,2004)。

[0003] 这些信号传导途径受到精确的调节。编码Btk的基因中的突变造成人中的遗传性B-细胞特异性免疫缺陷疾病,称为X连锁无 γ 球蛋白血症(XLA)(Conley et al.,Annu.Rev.Immunol.27:199-227,2009)。异常的BCR-介导的信号传导会导致失调的B-细胞活化,导致大量的自体免疫和炎症性疾病。临床前研究显示Btk缺失的小鼠对发展胶原诱导的关节炎具有抗性。此外,Rituxan,一种消除成熟B-细胞的CD20抗体,其临床研究揭示了B-细胞在大量炎症性疾病诸如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和多发性硬化中的关键作用(Gurcan et al.,Iht.Immunopharmacol.9:10-25,2009)。因此,Btk抑制剂可以用来治疗自体免疫和和/或炎症性疾病。

[0004] 此外,Btk的异常活化在B-细胞淋巴瘤的病因学中发挥重要作用,表明抑制Btk可用于治疗恶性血液肿瘤(Davis et al.,Nature 463:88-92,2010)。初步的临床试验结果显示Btk抑制剂PCI-32765有效治疗若干种类型的B-细胞淋巴瘤(例如,54th American Society of Hematology (ASH) annual meeting abstract,Dec.2012:686The Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) Inhibitor,Ibrutinib (PCI-32765),Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell lymphoma (DLBCL):Interim results of a Multicenter,Open-Label,Phase I Study)。由于Btk在多个信号转导途径中作为调节子发挥中心作用,Btk的抑制剂作为抗炎药和/或抗癌药受到巨大关注(Mohamed et al.,Immunol.Rev.228:58-73,2009;Pan,Drug News perspect 21:357-362,2008;Rokosz et al.,Expert Opin.Ther.Targets 12:883-903,2008;Uckun et al.,Anti-cancer Agents Med.Chem.7:624-632,2007;Lou et al.,J.Med.Chem.55(10):4539-4550,2012)。

[0005] 国际申请W02014173289A披露了一系列的作为Btk抑制剂的稠合杂环化合物。具体而言,W02014173289A披露了(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(在下文称为化合物1)

**化合物 1**

[0006] 化合物1是有效的、特异性的和不可逆的BTK激酶抑制剂。在临床前研究中使用生物化学研究、基于细胞的研究和动物研究生成的数据表明化合物1可能在抑制B-细胞恶性肿瘤中的肿瘤生长中提供显著的益处。由于对于抑制BTK对EGFR、FGFR、FRK、HER2、HER4、ITK、JAK3、LCK和TEC,化合物1显示比依鲁替尼 (ibrutinib) 选择性更大,预期在临床上比依鲁替尼产生更少的副作用。此外,化合物1由于其较弱的ITK抑制显示出对利妥昔单抗诱导的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 显著小于依鲁替尼,并且因此可在与利妥昔单抗或其他ADCC依赖性抗体组合用于治疗B-细胞恶性肿瘤时提供更好的功效。

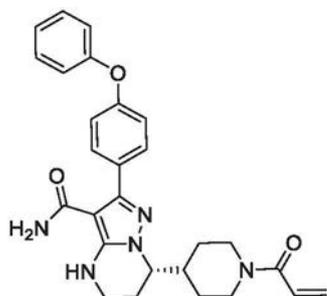
[0007] 临床前安全评价证实,在大鼠和犬这两者高达28天的单剂量和重复剂量毒性研究中,化合物1在整体耐受性和严重毒性方面比依鲁替尼更安全。此外,与依鲁替尼所观察到的相比,化合物1具有更好的生物利用度,没有积累问题。这些独特的特性保障了在临床研究中进一步评价化合物1。

[0008] 然而,根据W0 2014173289A中化合物27的制备方法,发现化合物1为无定形,这进一步得到了图7A的X射线粉末衍射图的证实。无定形形式显示具有低的玻璃转化为温度,如图7B所示,表明在以无定形形式进行药物配制中存在一些困难,诸如低稳定性和难以纯化。因此,有必要开发新形式的化合物1,其具有诸如高熔点和更好稳定性的特性,适于药物配制。

发明概述

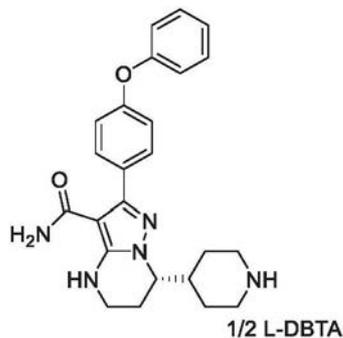
[0009] 本发明出人意料地发现化合物1的晶型,其具有高熔点并显示极其稳定的曲线,即使储存在25°C/60%RH高达24个月或者储存在40°C/75%RH条件高达6个月也如此。

[0010] 在第一方面,本申请公开了化合物1的晶型,

**化合物 1。**

[0011] 在一些实施方案中,化合物1的晶型为结晶无水物(下文称为“晶型A”)。

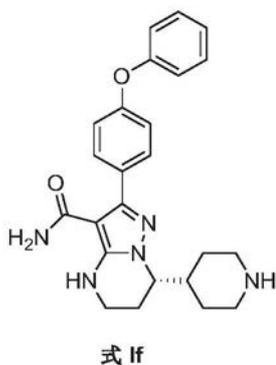
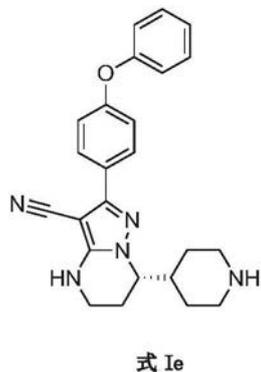
[0012] 在第二方面,本申请公开了化合物BG-13的晶型,其X射线粉末衍射图与图11基本上一致。



化合物 BG-13

[0013] 在第三方面,本申请公开了化合物1的制备方法。

[0014] 本申请还公开了用于制备化合物1的式Ie或其盐、或式If或其盐的中间体化合物,



[0015] 在第四方面,本申请公开了本申请公开的晶型A的制备方法。

[0016] 在第五方面,本申请公开了药物组合物,其包含治疗有效量的本申请公开的晶型A。

[0017] 在第六方面,本申请公开了通过向受试者给予本申请公开的晶型A在受试者中治疗与不期望Btk活性相关的疾病的方法。

[0018] 在第七方面,本申请公开了通过向受试者给予本申请公开的晶型A在受试者中治疗选自以下的疾病的方法:变应性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其两种或更多种的组合。

[0019] 在第八方面,本申请公开了通过向受试者给予本申请公开的晶型A在受试者中治疗选自B-细胞恶性肿瘤或复发性/难治性B-细胞恶性肿瘤的B-细胞增殖性疾病的方法。在该方面的一些实施方案中,本申请公开了通过向受试者给予本申请公开的晶型A在受试者中治疗选自以下的B-细胞增殖性疾病的方法:慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、伯基特样白血病,或其两种或更多种的组合。

[0020] 在第九方面,本申请公开了本申请公开的晶型A在制备治疗受试者中与不期望Btk活性相关的至少一种疾病的药物中的用途。

[0021] 在第十方面,本申请公开了本申请公开的晶型A在制备治疗受试者中选自以下的疾病的药物中的用途:变应性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其两种或更多种的组合。

[0022] 在第十一方面,本申请公开了本申请公开的晶型A在制备治疗受试者中选自以下的B-细胞增殖性疾病的药物中的用途:B-细胞恶性肿瘤或复发性/难治性B-细胞恶性肿瘤。在该方面的一些实施方案中,本申请公开了本申请公开的晶型A在制备治疗受试者中选自以下的B-细胞增殖性疾病的药物中的用途:慢性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、伯基特样白血病,或其两种或更多种的组合。

[0023] 在第十二方面,本申请公开了化合物1的晶型A的制备方法,包括将化合物1的无定形形式与以下溶剂体系混合,以形成澄清溶液;将该溶液保持在室温,或者伴随或不伴随搅拌加热一段时间,以使晶型A析出,其中所述溶剂体系为:

乙酸乙酯:己烷=1:0.6-0.7体积比;

乙酸乙酯:庚烷=1:0.6-0.7体积比;

乙酸乙酯:环己烷=1:0.6-1.2体积比;

乙酸甲酯:己烷=1:0.6-1.2体积比;

甲苯:己烷=1.0:0.2-0.4体积比;

甲苯:环己烷=1.0:0.1-0.2体积比;

乙酸甲酯:环己烷=0.6-0.8:1.0体积比;

IPAC:环己烷=1.0:0.2-1.0体积比;或

乙酸异丁酯:环己烷=1.0:0.2-1.0体积比。

[0024] 在一个实施方案中,化合物1的无定形形式的ee值大于90%。在另一实施方案中,化合物1的无定形形式的ee值为97%。

附图简述

[0025] 图1示出晶型A的XRPD图。

[0026] 图2示出晶型A的DSC曲线。

[0027] 图3示出晶型A的TGA曲线。

[0028] 图4示出晶型A的¹H-NMR。

[0029] 图5示出晶型A的¹³C-NMR。

[0030] 图6示出结晶A的DVS图。

[0031] 图7A示出化合物1的无定形形式的XRPD的图。

[0032] 图7B示出化合物1的无定形形式的mDSC曲线,示出无定形形式的玻璃转化温度为79.7°C(中间点温度)。

[0033] 图8示出BG-13的单晶的绝对结构。

[0034] 图9图示说明BG-13的单晶的氢键。

[0035] 图10示出BG-13的单晶的晶体堆积。

[0036] 图11示出BG-13的单晶的XRPD图。

发明详述

[0037] 本发明人出人意料地发现晶体形式的化合物1,即晶型A,仅能在特定的条件下获得,取决于起始物质的ee值和共溶剂的比例,等等。还通过以下方法实施多晶型物研究:缓慢蒸发、反溶剂添加、缓慢冷却、蒸发扩散和聚合物诱导的结晶。大部分实验不能得到晶型,

这表明晶型A的获得不是简单直接的。

[0038] 进一步表征结果揭示晶型A为熔点 $139.4 \pm 2^\circ\text{C}$ (起始温度)的无水物。为了评价稳定性,晶型A的样品于 80°C 储存2天, $25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$ 储存多达24个月或 $40^\circ\text{C}/75\%\text{RH}$ 条件多达6个月,并且以稳定性测试之前、期间和之后通过XRPD表征。结果显示对于上述所有时段没有观察到晶型变化,表明晶型A于 80°C 或储存于 $25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$ 多达24个月并于 $40^\circ\text{C}/75\%\text{RH}$ 条件多达6个月的物理稳定性好。

[0039] 在一些实施方案中,晶型A的X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $14.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.4 \pm 0.2^\circ$ 和 $21.4 \pm 0.2^\circ$ 。

[0040] 在一些实施方案中,晶型A的X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $14.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.4 \pm 0.2^\circ$ 和 $21.4 \pm 0.2^\circ$ 。

[0041] 在一些实施方案中,晶型A的X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $12.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.4 \pm 0.2^\circ$ 和 $21.4 \pm 0.2^\circ$ 。

[0042] 在一些实施方案中,晶型A的X射线粉末衍射图包含具有独立选自以下 2θ 角度值的衍射峰:约 $12.2 \pm 0.2^\circ$ 、 $12.9 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.8 \pm 0.2^\circ$ 、 $15.6 \pm 0.2^\circ$ 、 $16.4 \pm 0.2^\circ$ 、 $17.7 \pm 0.2^\circ$ 、 $18.5 \pm 0.2^\circ$ 、 $20.7 \pm 0.2^\circ$ 和 $21.4 \pm 0.2^\circ$ 。

[0043] 在一些实施方案中,晶型A的X射线粉末衍射图基本上与图1一致。

[0044] 在一些实施方案中,晶型A的X射线粉末衍射图总结在表1中。

[0045] 表1晶型A的X射线衍射图

峰#	衍射角(2- θ)	间距	相对强度
1	5.432	16.26908	7.37
2	10.799	8.19295	2.40
3	12.188	7.26191	13.19
4	12.942	6.84040	13.51
5	14.820	5.97780	28.09
6	15.587	5.68534	19.63
7	16.350	5.42177	29.30
8	17.662	5.02158	13.62
9	18.452	4.80853	11.39
10	18.689	4.74791	8.26
11	20.729	4.28515	11.07
12	21.420	4.14847	100.00

13	22.035	4.03409	7.59
14	22.864	3.88958	6.70
15	23.684	3.75673	5.24
16	25.111	3.54646	2.43
17	26.525	3.36044	5.13
18	26.906	3.31381	6.41
19	27.126	3.28741	6.92
20	29.641	3.01393	4.61
21	30.755	2.90724	2.58
22	36.421	2.46692	1.29

[0046] 在一些优选的实施方案中,晶型A的熔点为 $139 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (起始温度)。

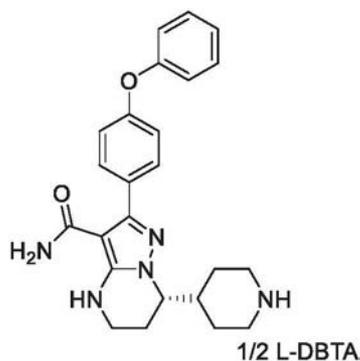
[0047] 在一些优选的实施方案中,晶型A的DSC基本上与图2一致。

[0048] 在一些优选的实施方案中,晶型A的TGA基本上与图3一致。

[0049] 在一些实施方案中,晶型A是难吸湿的 (slightly hygroscopic)。在一些实施方案中,晶型A是未溶剂化的。

[0050] 在一些实施方案中,晶型A在于 40°C 和75%RH储存多达6个月后具有基本上相同的X射线粉末衍射 (XRPD) 图。在一些实施方案中,晶型A在于 25°C 和60%RH储存多达24个月后具有基本上相同的X射线粉末衍射 (XRPD) 图。

[0051] 本申请还公开了化合物BG-13的晶型,其X射线粉末衍射图基本上与图11一致,



化合物 BG-13。

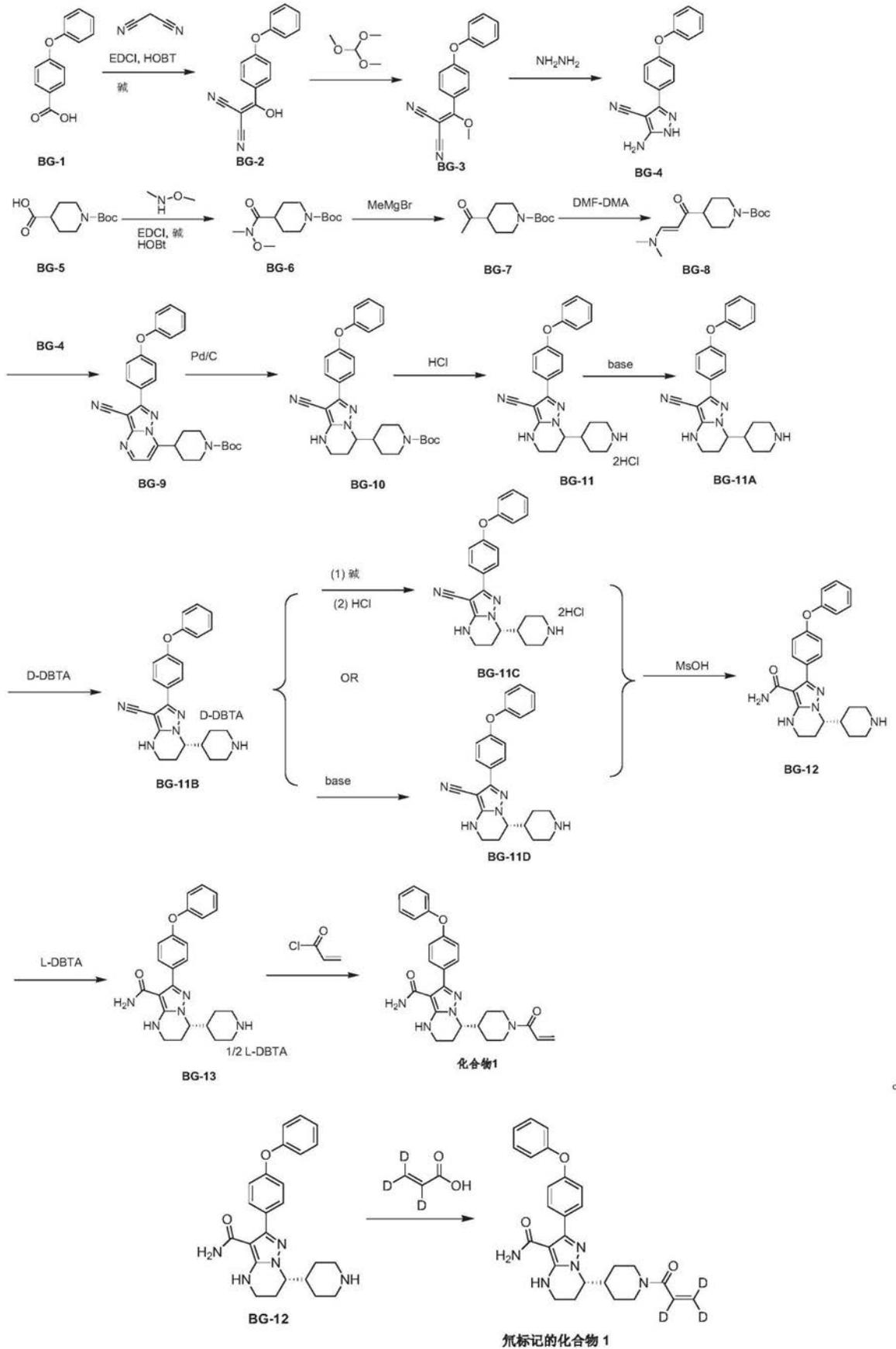
[0052] 在一些实施方案中,BG-13的晶型为单晶,其晶胞尺寸 (unit cell dimension) 包括 $a = 16.7939(4)\text{\AA}$, $b = 7.9871(2)\text{\AA}$, $c = 23.5438(5)\text{\AA}$, $\alpha = 90.00^{\circ}$, $\beta = 108.0460(10)^{\circ}$, $\gamma = 90.00^{\circ}$ 。

[0053] 本发明人从中间体BG-13的单晶X射线结构分析推断化合物1的绝对构型为S。

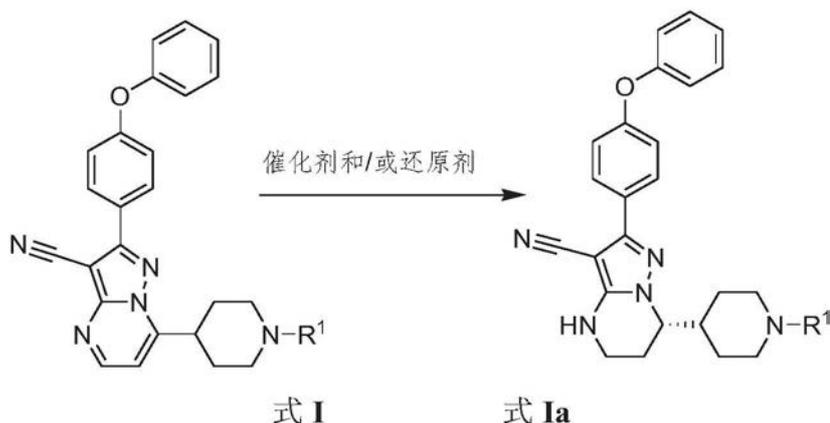
[0054] 本申请还公开了化合物1和氘标记的化合物1的制备方法,诸如在方案1中描述的操作。化合物1经由本申请公开的晶型A的新合成方法和结晶/重结晶操作克服了许多与前述报道的方法相关的许多问题,诸如制备光学纯度 $>98\%$ 的关键手性中间体,改善化合物1的纯度以达到说明书中的验收标准,控制化合物1中的杂质并提供相对于现有方法的许多

优势。值得注意的是,本申请公开的方法尤其适于以高品质和高收率可重复地以商业规模制备化合物1。在备选方法中,方案1中的BG-9或其类似物能够被以低至出色的对映选择性不对称地还原(5%ee.至95%ee)。其他步骤的方法类似于方案1中所列的那些。

[0055] 方案1:制备化合物1和氘标记的化合物1



[0056] 本申请还公开了制备式Ia化合物的方法,包括在催化剂和/或还原剂的存在下不对称还原式I化合物以制备式Ia化合物,



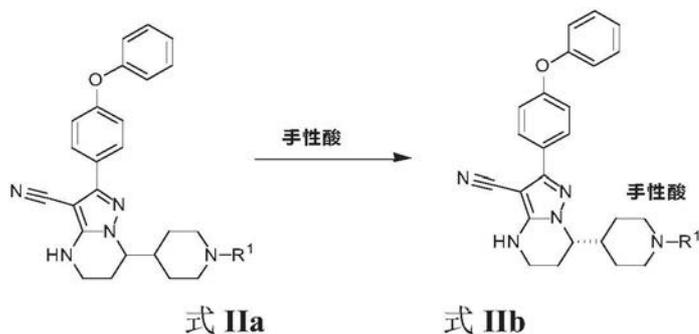
其中R¹为氢或者氨基保护基团。

[0057] 在一些实施方案中,氨基保护基团包括但不限于乙酰基、丙酰基、丁酰基、苯基乙酰基、苯甲酰基、甲苯酰基、苯氧基乙酰基(POA)、甲氧基羰基、乙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、叔丁基氧基羰基(BOC)、2-碘乙氧基羰基、苄氧羰基(CBZ)、4-甲氧基苄基氧基羰基、(苄-9-基甲氧基)羰基(Fmoc)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基(Mtr)、苄基、甲基或4-甲氧基苄基。

[0058] 在一些实施方案中,所述催化剂为中性催化剂体系或阳离子型催化剂体系。在一些优选的实施方案中,所述催化剂为铱催化剂体系,包括但不限于[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-MeO-Biphep、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Binap、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Tol-Binap、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-xyl-Binap、[Ir(COD)Cl]₂/(S,S或R,R)-Diop、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-P-Phos、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Tol-P-Phos、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Xyl-P-Phos、[Ir(COD)Cl]₂/(R, R或S,S)-Me-DuPhos、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-SegPhos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Ship、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Siphos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Siphos-PE、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-MonoPhos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-tol-SDP、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(S,S或R,R)-Diop、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(S,R或R,S)-Josiphos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Binap、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-MeO-Biphep、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Synphos或[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Difluorophosor[Ir(cod)₂]^{+X⁻}(X:例如BF₄、NO₃、OTf、PF₆、SbF₆和BarF)加如上所述的相关配体(Wen-Bo et al., J. AM. CHEM. SOC. 125, 10536-10537 2003. Damien et al., J. Org. Chem. 77, 4544-4556, 2012. Milos et al., Org. Process Res. Dev. 16, 1293-1300, 2012.); 铑催化剂体系,包括但不限于[Rh(COD)₂]BF₄加如上所述的配体(Xiang-Ping et al., Top Organomet Chem 36, 313-354, 2017); 或钌催化剂体系包括但不限于RuCl₂(R或S)-BINAP/(R或S)-DAIPEN、RuCl₂(R或S)-BINAP/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(S或R)-BINAP(S,S或R,R)-DACH、RuCl₂[(R或S)-Tol-BINAP][(S,S或R,R)-DPEN]、RuCl₂(R,R或S,S)-Me-DuPHOS/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R,R或S,S)-Et-DuPHOS/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R,R或S,S)-Et-DuPHOS/(R,R或S,S)-DACH、RuCl₂(S,S或R,R)-i-Pr-DuPHOS/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R或S)-HexaPHEMP/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R或S)-MeO-BIPHEP/(R,R或S,S)-DPEN(Christopher et al., Adv. Synth. Catal. 345, 195-201, 2003. Julian et al., Adv. Synth. Catal. 345, 300-307, 2003.)。

[0059] 发现上述方法通过使用上述催化剂、尤其是中性或阳离子型铱催化剂体系产生了出色的高达95% ee的对映选择性。

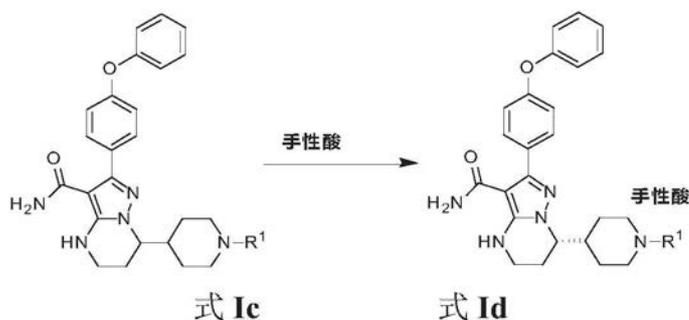
[0060] 本申请还公开了拆分式IIa化合物以制备式IIb化合物或改善式IIb化合物的手性纯度的方法,包括以手性酸处理外消旋的式IIa化合物,



其中R¹为氢、甲基、苄基、4-甲氧基苄基或其他如上所述的常规氨基保护基团。

[0061] 在一些实施方案中,手性酸包括但不限于L-苹果酸、D-苹果酸、L-扁桃酸、D-扁桃酸、L-樟脑磺酸、D-樟脑磺酸、L-酒石酸、D-酒石酸、L-DBTA、D-DBTA、L-DTTA或D-DTTA。

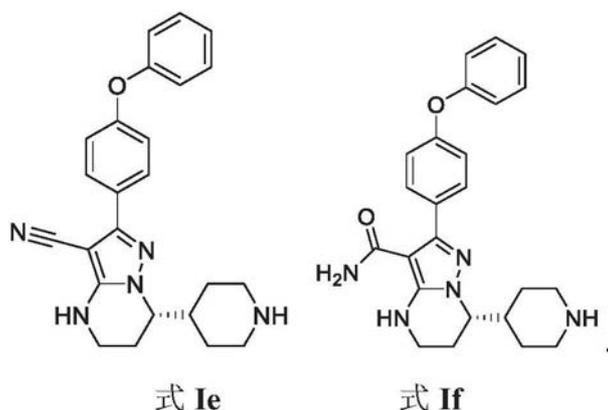
[0062] 本申请还公开了拆分式Ic化合物以制备式Id化合物或改善式Id化合物的手性纯度的方法,包括以手性酸处理外消旋的式Ic化合物,



其中R¹为氢、甲基、苄基、4-甲氧基苄基或其他如上所述的常规氨基保护基团。

[0063] 在一些实施方案中,手性酸包括但不限于L-苹果酸、D-苹果酸、L-扁桃酸、D-扁桃酸、L-樟脑磺酸、D-樟脑磺酸、L-酒石酸、D-酒石酸、L-DBTA、D-DBTA、L-DTTA或D-DTTA。

[0064] 本申请还公开了用于制备化合物1的式Ie化合物或其盐或者式If化合物或其盐,



[0065] 此外,本申请还提供了晶型A的制备方法。本申请公开的晶型可通过从包含至少一种溶剂的合适溶剂体系中结晶本申请公开的化合物来制备,这可通过自发性析出(蒸发)、冷却和/或添加反溶剂(其中本申请公开的化合物具有相对较低的溶解度)以实现溶剂体系中的过饱和来实现。结晶还可通过使用或不使用适于结晶本申请公开的晶型的晶种来实现。

[0066] 在一些实施方案中,晶型A的制备方法包括以下步骤:将(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(化合物1)溶解在DCM中,交换为溶剂EA,从EA/MTBE中重结晶,得到目标晶型。

[0067] 在一些实施方案中,晶型A的制备方法包括以下步骤:将化合物1溶解在EA中,添加己烷,得到目标晶型。

[0068] 在一些实施方案中,晶型A的制备方法通过将反溶剂添加至固体化合物1或粗制晶型A在用于溶解该固体的溶剂中的溶液来实现,其中所述反溶剂包括但不限于H₂O和正庚烷,并且用于溶解固体的溶剂包括但不限于丙酮、DMAc、EtOAc、DCM、甲苯和2-MeTHF。

[0069] 在一些实施方案中,晶型A的制备方法通过将化合物1或粗制晶型A在溶剂中的溶液添加至反溶剂,并允许足够的时间使得有机物蒸发从而与密封反应器中的溶液相互作用来实现,其中所述溶剂包括但不限于丙酮和EtOAc,并且所述反溶剂包括但不限于正庚烷。

[0070] 本申请还公开了一种药物组合物,其包含治疗有效量的晶型A和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物用于口服给予。在一些优选的实施方案中,药物组合物包含1wt%至99wt%的晶型A。在一些更优选的实施方案中,药物组合物包含1wt%至70wt%的晶型A。在一些最优选的实施方案中,药物组合物包含10wt%至30wt%的晶型A。

[0071] 本发明还提供了通过向受试者给予晶型A在受试者中治疗或预防与不期望Btk活性相关的疾病的方法。

[0072] 本发明还提供了通过向受试者给予晶型A在受试者中治疗或预防选自以下疾病的方法:变应性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其两种或更多种的组合。

[0073] 本发明还提供了通过向受试者给予晶型A在受试者中治疗或预防B-细胞增殖性疾病的方法。

[0074] 在一些实施方案中,所述B-细胞增殖性疾病为B-细胞恶性肿瘤,包括但不限于淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡型淋巴瘤(FL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)、边缘区淋巴瘤(MZL)、毛细胞白血病(HCL)、伯基特样白血病(BL)。

[0075] 在一些实施方案中,所述B-细胞增殖性疾病为复发性/难治性(R/R)B-细胞恶性肿瘤,包括但不限于R/R MCL、R/R CLL、R/R SLL、R/R WM。

[0076] 本申请公开的晶型A可用于制备在受试者中治疗至少一种与不期望Btk活性相关的疾病的药物。

[0077] 本申请公开的晶型A可用于制备在受试者中治疗选自以下的疾病的药物:变应性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其两种或更多种的组合。

[0078] 本申请公开的晶型A可用于制备在受试者中治疗选自以下的B-细胞增殖性疾病的药物:B-细胞恶性肿瘤或复发性/难治性B-细胞恶性肿瘤。

[0079] 最新的临床试验持续证实化合物1在未经治疗(TN)和复发性/难治性(R/R)B-细胞恶性肿瘤中(例如在WM中)耐受性良好,在可评价的42名患者群体中具有超过40%的非常好的部分响应(VGPR)率并且以12.3个月的平均随访时间在42名功效可评价患者中具有90%的总响应率(ORR),并且在CLL/SLL中,在功效评价的10.5个月的平均随访时,总响应率高(94%)且治疗中断率非常低(3%)。

定义

[0080] 除非在本文件中另外具体指定,否则本申请所使用的所有其他技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。

[0081] 本申请包括权利要求使用的,单数形式的词语诸如“一”、“一种”和“所述”,包括它们对应的复数指代,除非上下文清楚地表明相反情况。因此,例如,提及“晶型”包括一个或多个这样不同的晶型并且提及“所述方法”包括提及本领域普通技术人员已知的等同步骤和方法,其可经改良或代替本申请所述的方法。

[0082] 本申请公开的晶型为大致纯的结晶。本申请使用的术语“大致纯的”是指至少85wt%、优选至少95wt%、更优选至少99wt%的本申请公开的晶型A。

[0083] 对于本申请公开的晶型,仅总结了主峰(即,最具有特征性的、显著的、独特的和/或可重复的峰);其他峰可通过常规方法从衍射图谱获得。上述主峰可在误差界限的范围内重复(在最后给出的小数位 ± 2 ,或者在所给值 ± 0.2)。

[0084] 本申请公开的“X射线粉末衍射图与图1基本上一致”是指示出如图1中主峰的X射线粉末衍射图,其中主峰是指那些相对强度大于10%、优选大于20%的峰,相对于图1中的最高峰(其相对强度标记为100%)而言。

[0085] 在以下整个说明书和权利要求书中,除非上下文有其他要求,否则术语“包含”及变体诸如“含有”和“包括”,将会被理解为隐含包括所述整数或步骤或者整数或步骤的集合,但是不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤的集合。当本申请使用时,术语“包含”可替换为术语“含有”,或有时在使用时可替换为术语“具有”。

[0086] 本申请使用的术语“治疗有效量”是指在给予受试者治疗疾病或者疾病或病症的至少一种临床症状时,足以影响该疾病、病状或症状的治疗的化合物的量。“治疗有效量”可随化合物,疾病,病症,和/或疾病或病症的症状,疾病或病症的严重程度,和/或疾病或病症的症状,待治疗受试者的年龄,和/或待治疗受试者的重量而变化。在任何给定情况中的适当量对于本领域技术人员是显而易见的或者可通过常规实验确定。在联合疗法的情况中,“治疗有效量”是指有效治疗疾病、病症或病况的组合对象的总量。

[0087] 包含本申请公开的化合物的药物组合物可经口服、吸入、直肠、肠胃外或局部给予有此需要的受试者。对于口服给予,药物组合物可为规则固体制剂诸如片剂、粉剂、颗粒剂、胶囊等,液体制剂诸如水或油悬浮液或其他液体制剂诸如糖浆、溶液、悬浮液等;对于肠胃外给予,药物组合物可为溶液、水溶液、油悬浮液浓缩物、冻干粉末等。优选地,药物组合物的制剂选自片剂、包衣片剂、胶囊、栓剂、鼻喷雾或注射剂,更优选片剂或胶囊。药物组合物可为具有精确剂量的单个单元给予。此外,药物组合物可进一步包含额外的活性成分。

[0088] 本申请公开的药物组合物的所有制剂都可通过制药领域的常规方法制备。例如,活性成份可与一种或多种赋形剂混合然后制备所需的制剂。“药学上可接受的赋形剂”是指适于所需药物制剂的常规药物载体,例如:稀释剂,媒介物诸如水、各种有机溶剂等,填充剂诸如淀粉、蔗糖等,粘合剂诸如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶和聚乙烯吡咯烷酮(PVP);润湿剂诸如甘油;崩解剂诸如琼脂、碳酸钙和碳酸氢钠;吸收增强剂诸如季铵化合物;表面活性剂诸如十六醇;吸收载体诸如高岭土和皂粘土;润滑剂诸如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、聚乙二醇等。此外,药物组合物进一步包含其他药学上可接受的赋形剂诸如分散剂(decentralized agent)、稳定剂、增稠剂、络合剂、缓冲剂、渗透促进剂、聚合物、芳香化合物、增甜剂和染料。

[0089] 术语“疾病”是指任何病、不适、恙、症状或适应症，并且可与术语“病症”或“病况”互换使用。

[0090] 缩写：

AcOH	乙酸
AEs	不利事件
BID	一天两次
CLL	慢性淋巴细胞性白血病
Con.	浓的
D-DBTA	(2S, 3S)-二苯甲酰基酒石酸
DDQ	2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌
DCM	二氯甲烷
DIEA	<i>N,N</i> -二异丙基乙胺
DLBCL	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
DMAc	<i>N,N</i> -二甲基乙酰胺
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DMF-DMA	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺二甲基乙缩醛
DMSO	二甲基亚砜
DSC	差示扫描量热法
DVS	动态蒸气吸附
EA	乙酸乙酯, EtOAc
EDCI	1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺
EtOH	乙醇
FL	滤泡性淋巴瘤
GC	气相色谱
GCMS	气相色谱-质谱
HOAc	乙酸
HOBt	羟基苯并三唑
HPLC	高效液相色谱
IPA	异丙醇
IPAc	乙酸异丙酯
IPC	过程控制
KF	Karl-Fischer
L-DBTA	(2R, 3R)-二苯甲酰基酒石酸
LOQ	检测限
MCL	套细胞淋巴瘤
MeCN 或 ACN	乙腈
MeMgBr	甲基溴化镁
MeOH	甲醇
2-MeTHF	2-甲基四氢呋喃

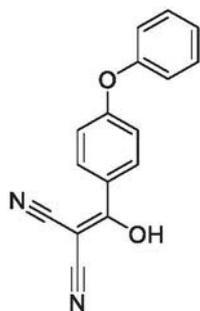
MIBE	4-甲基-2-戊酮
MsOH	甲磺酸
MTBE	甲基叔丁基醚
NHL	非霍奇金淋巴瘤
NLT	不少于
NMP	1-甲基-2-吡咯烷酮
NMR	核磁共振
NMT	不超过
ORR	总响应率
Pd	钯
pH	氢离子浓度
POA	苯氧基乙酰基
QD	一天一次
RH	相对湿度
SLL	小淋巴细胞性淋巴瘤
RT	室温
TEA	三乙胺
TGA	热重分析
THF	四氢呋喃
TN	未经治疗
VGPR	非常好的部分响应
XRPD	X 射线粉末衍射
WM	瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症

实施例

[0091] 本发明进一步由说明本发明的以下实施例进行示例性说明,但是并不受其限制。

实施例1制备(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(化合物1)及其晶型A

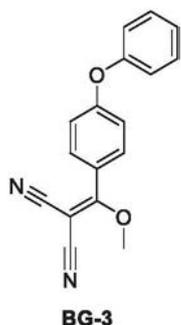
步骤1:合成BG-2



BG-2

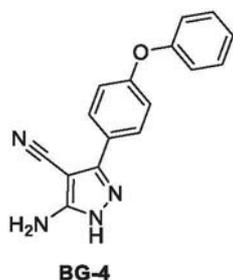
[0092] 在氮气气氛下,于10^{°C}向EA (5v)、HOBT (1.2当量)、EDCI (1.2当量)、4-苯氧基苯甲酸(BG-1,80Kg,1.0当量)和丙二腈(1.2当量)的溶液添加TEA(2.4当量)。然后混合物于室温搅拌直到反应完成。混合物然后离心且滤饼以EA洗涤。滤液以NaHCO₃水溶液洗涤两次并以NH₄Cl洗涤。有机相以1.5N H₂SO₄洗涤两次并搅拌。从甲醇和纯化水浓缩,析出。固体通过离心收集并经真空干燥。如此得到79.9Kg的BG-2。¹H NMR (DMSO-d₆) δ7.62 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.46-7.38 (m, 2H), 7.18 (t, J=7.4Hz, 1H), 7.06 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.94 (d, J=8.6Hz, 2H)。

步骤2:合成BG-3



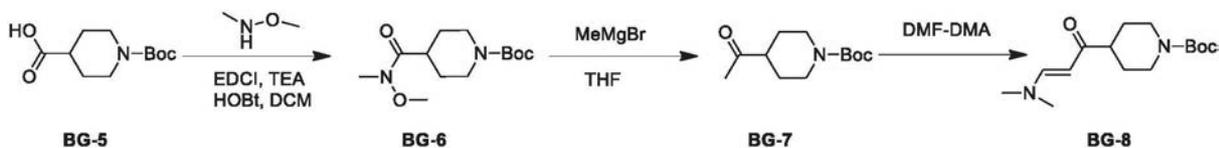
[0093] 在氮气气氛下,于85[°]C将BG-2 (79.9kg,1.0当量) 在MeCN (5.0v) 中的溶液添加至三甲氧基甲烷 (12.0v)。搅拌所得混合物直到反应完成。取样用于HPLC分析。真空浓缩。残余物从i-PrOH和己烷中析出。混合物经离心,且滤饼以己烷洗涤并经真空干燥。如此得到71.7Kg的产物。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ7.70 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.52-7.45 (m, 2H), 7.28 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.22-7.06 (m, 4H), 3.93 (s, 3H)。

步骤3:合成BG-4



[0094] 在氮气气氛下,于低于15[°]C向反应器中,向BG-3 (71.6kg,1.0当量) 在乙醇 (2.5v) 中的溶液滴加氢氧化胍 (1.0当量) 在乙醇 (0.6v) 中的溶液。将溶液加热至室温并搅拌直到反应完成。将水 (4.0v) 添加至反应器。溶液然后冷却至5[°]C,离心且滤饼以水 (1.0v) 洗涤。滤饼真空干燥。如此得到66.9Kg的产物。¹H NMR (DMSO-d₆) δ12.11 (br s, 1H), 7.80 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.46-7.39 (m, 2H), 7.18 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.12-7.04 (m, 4H), 6.43 (br s, 2H)。

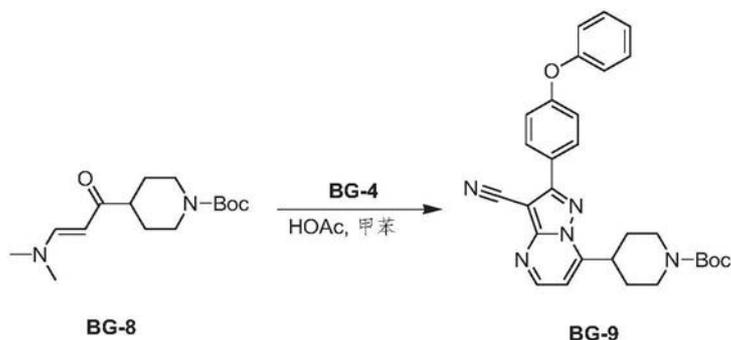
步骤4至6:合成BG-8



[0095] 于低于15[°]C,向DCM (8.0v)、BG-5 (80.0Kg,1.0当量)、N,O-二甲基羟基胺盐酸盐 (1.2当量)、HOBt (1.2当量) 和EDCI (1.2当量) 的混合物中滴加TEA (2.6当量)。混合物于室温搅拌直到反应完成,离心且滤饼以DCM (1.0v) 洗涤两次。滤液以20%NH₄Cl水溶液 (3×4.0v) 洗涤。滤液经真空浓缩得到粗产物BG-6,其不经进一步纯化用于后续步骤。残余物溶解在甲苯 (5.0v) 和THF (1.0v) 中,冷却至10[°]C,于10[°]C滴加MeMgBr (1.4当量) 且然后于室温搅拌直到反应完成。溶液冷却至低于10[°]C。于低于10[°]C滴加饱和NH₄Cl水溶液。混合物经离心、分离、过滤,且有机相以NaCl水溶液洗涤两次。有机相经浓缩得到粗产物,其不经进一步纯化用于后续步骤。在DMF (2.5v) 和DMF-DMA (2.5v) 中的残余物于110[°]C搅拌直到反应完成。反应混合物经冷却,浓缩且然后添加DCM。最终混合物以饱和NH₄Cl水溶液洗涤。有机层经浓缩并通过添加己烷而析出。混合物经离心且收集滤饼。滤饼经真空干燥。如此得到82.2Kg的期望产物。¹H NMR (DMSO-d₆) δ7.49 (d, J=12.6Hz, 1H), 5.01 (d, J=12.6Hz, 1H), 3.99-3.82 (m, 2H), 3.14-

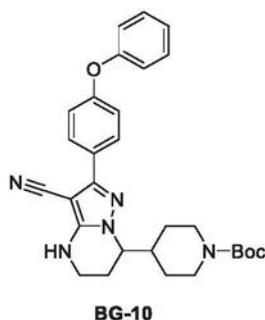
2.94 (m, 2H), 2.89-2.61 (m, 6H), 2.49-2.37 (m, 1H), 1.66-1.56 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.39-1.20 (m, 2H)。

步骤7: 合成BG-9



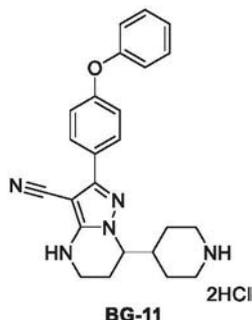
[0096] 在氮气气氛下, 将甲苯 (8.0v)、AcOH (0.5v)、BG-8 (1.2当量) 和BG-4 (66.9Kg 1.0当量) 的混合物加热至95^{°C}并搅拌直到反应完成。混合物经冷却, 浓缩并从甲醇中析出。混合物经离心且滤饼以甲醇洗涤。滤饼经真空干燥。如此得到107.8Kg的产物。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8.78 (d, J=4.6Hz, 1H), 8.15-8.07 (m, 2H), 7.51-7.41 (m, 2H), 7.34 (d, J=4.6Hz, 1H), 7.27-7.19 (m, 3H), 7.17-7.10 (m, 2H), 4.24-4.02 (m, 2H), 3.81-3.69 (m, 1H), 3.12-3.82 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.76-1.60 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)。

步骤8: 合成BG-10



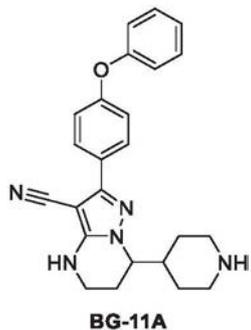
[0097] 在N₂下, 向THF (10.0v)、BG-9 (13.0Kg, 1.0当量) 和D-DBTA (1.0当量) 的混合物添加Pd/C (10% w/w), 将氢气引入反应器且将氢气压力保持至1.8MPa。反应器缓慢地加热至40^{°C}并搅拌直到反应完成。混合物然后经冷却, 过滤, 且滤饼以THF洗涤。滤液经收集并真空浓缩。添加DCM。残余物经NaHCO₃水溶液洗涤, 浓缩并从MTBE和己烷中析出, 然后离心。收集滤饼并真空干燥, 得到期望化合物 (收率: 94.8% 和纯度: 98.5%)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.82-7.76 (m, 2H), 7.56-7.51 (m, 1H), 7.45-7.37 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 4.09-3.91 (m, 3H), 3.30-3.22 (m, 2H), 2.82-2.55 (m, 2H), 2.18-1.99 (m, 2H), 1.98-1.86 (m, 1H), 1.69-1.58 (m, 1H), 1.56-1.45 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.32-1.13 (m, 2H)。

步骤9: 合成BG-11



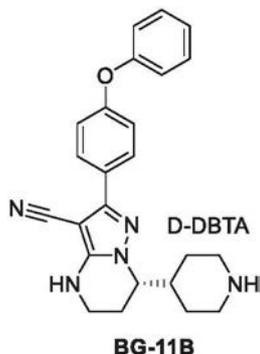
[0098] 在氮气气氛下,向BG-10 (100.0Kg 1.0当量) 在DCM (6.0v) 中的溶液中滴加HCl/EtOH (20.9% w/w, 2.0v)。搅拌混合物直到反应完成。将MTBE (4.0v) 添加至溶液,冷却。各滤饼通过离心收集并以己烷 (2.0v) 洗涤,然后滤饼在己烷 (5v) 中浆料化,并再次离心。滤饼以己烷 (2.0v) 洗涤并经真空干燥。如此得到85.2Kg的产物。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 9.25-8.85 (m, 2H), 7.84-7.70 (m, 2H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.18 (t, J=7.4Hz, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 5.73 (br s, 2H), 4.12-4.03 (m, 1H), 3.25-3.19 (m, 4H), 2.90-2.73 (m, 2H), 2.28-2.12 (m, 1H), 2.10-2.00 (m, 1H), 1.99-1.86 (m, 1H), 1.84-1.52 (m, 4H)。

步骤10: 合成BG-11A



[0099] BG-11 (85.0Kg, 1.0当量) 在水 (6.0v) 和NaOH (3.0当量) 中的混合物在室温搅拌直到反应完成。收集滤饼并在MTBE (6.0v) 浆料化。混合物然后离心以收集滤饼。滤饼经真空干燥。如此得到71.3Kg产物。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.82-7.74 (m, 2H), 7.54-7.49 (m, 1H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.12-7.04 (m, 4H), 4.03-3.95 (m, 1H), 3.29-3.21 (m, 2H), 3.00-2.87 (m, 2H), 2.46-2.31 (m, 2H), 2.11-1.83 (m, 3H), 1.58-1.12 (m, 4H)。

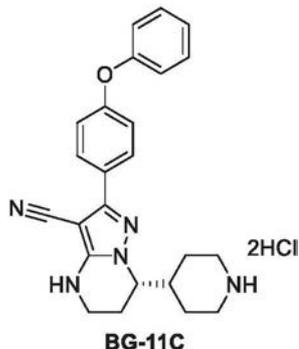
步骤11: 合成BG-11B



[0100] 在氮气气氛下,将乙醇/水/乙酸 (7:3:1, 46v) 和BG-11A (30kg, 1.0当量) 在反应器中的混合物加热至70±5°C,然后伴随不小于65°C的温度滴加D-DBTA (1.20当量) 在乙醇/水/乙酸 (7:3:1, 4v) 中的溶液。所得溶液于60-65°C搅拌16小时,然后冷却至室温。通过离心收集

固体并且以乙醇 (2.0v) 洗涤。滤饼在乙醇/水/AcOH (7:3:1, 20v) 的混合溶剂中于 55[°]C 浆料化 16 小时并冷却至室温。固体通过离心收集, 并以乙醇 (2.0v) 洗涤。滤饼经真空干燥 (收率: 37.9%)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.76 (br s, 2H), 7.99-7.89 (m, 4H), 7.83-7.75 (m, 2H), 7.66-7.57 (m, 3H), 7.52-7.45 (m, 4H), 7.45-7.39 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.13-7.03 (m, 4H), 5.64 (s, 2H), 4.08-4.00 (m, 1H), 3.29-3.19 (m, 4H), 2.85-2.72 (m, 2H), 2.21-1.40 (m, 7H)。

步骤12: 合成BG-11C

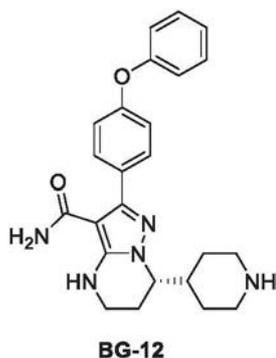


[0101] 在氮气气氛下, 于室温向二氯甲烷 (15.0v) 和 20.0% KOH 水溶液 (3.0v) 的混合物分批添加 BG-11B (48.0kg, 1.0 当量)。反应完成后, 有机层经收集并且水层以二氯甲烷 (5.0v) 萃取。合并各有机层。于室温将浓 HCl (0.36v) 添加至上述有机层。搅拌所得混合物直到反应完成。固体通过离心收集并以二氯甲烷 (1.0v) 洗涤。收集的固体以 MTBE (6.0v) 浆料化。固体通过离心收集并以 MTBE (1.0v) 洗涤, 然后真空干燥。如此得到 31.5Kg 的产物 (收率: 100%)。

步骤12: 合成BG-11D (备选中间体)

[0102] 将 ACN (5.0v)、软水 (10.0v)、KOH (5.0 当量) 添加至反应器并搅拌至少 15min。将 BG-11B (1.0 当量) 分份添加至反应器。搅拌混合物直到反应完成。滤饼通过离心收集, 在 ACN (1.0v) 和软水 (5.0v) 中浆料化, 并真空干燥得到产物。

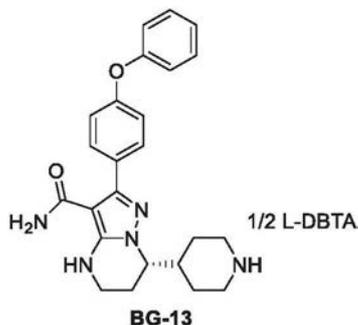
步骤13: 合成BG-12



[0103] 在氮气气氛下, BG-11C (15.0Kg 1.0 当量) 在 MsOH (2.5v) 中的溶液于 85[°]C 搅拌直到反应完成。冷却至 5[°]C 后, 将纯化水 (4.0v) 滴加至体系中并保持温度不超过 35[°]C (温度增加明显)。所得溶液于 30[°]C 搅拌 16 小时, 且然后以 DCM (2 × 3.0v) 洗涤。水相经收集。将 DCM (6.0v) 添加至水相, 混合物冷却至 5[°]C。以 20% NaOH 水溶液将 pH 值调节至 11~12 (温度增加明显), 伴随搅拌, 温度不超过 30[°]C。分开并收集有机相。水相以 DCM (3.0v) 萃取。合并各有机层并浓缩。MTBE (4.0v) 添加至该残余物。混合物然后经浓缩并从正庚烷中析出。固体通过离心收集并且在真空烘箱中干燥。由此得到 12.55Kg 产物 (收率: 94.9%)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.52-7.46 (m, 2H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.21-7.13 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 3.99-3.90

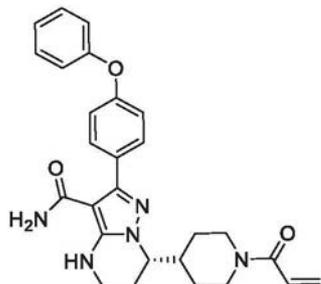
(m, 1H), 3.29–3.22 (m, 2H), 3.03–2.90 (m, 2H), 2.48–2.36 (m, 2H), 2.03 (dd, J=13.9, 5.6Hz, 2H), 2.14–1.99 (m, 1H), 1.97–1.85 (m, 1H), 1.65–1.15 (m, 3H)。

步骤14: 合成BG-13



[0104] 在N₂气氛下,将MeOH(13.5v)、纯化水(4.5v)和BG-12(8.5Kg,1.0当量)在反应器中的混合物加热至50℃。向混合物中滴加L-DBTA(0.7当量)在MeOH/纯化水(1.5v/0.5v)中的溶液,同时将温度保持在50℃。添加后,混合物于50℃搅拌至少2小时,且然后冷却至室温并于室温搅拌至少16小时。滤饼通过离心收集并以MeOH(2.0v)洗涤。滤饼在真空烘箱中干燥。如此得到9.08Kg的产物(收率:74.8%,ee值>98%)。

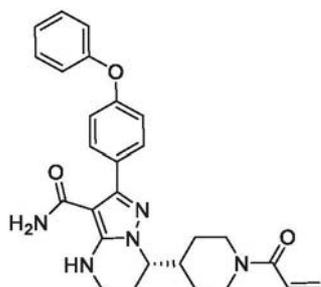
步骤15: 合成(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[15-a]嘧啶-3-甲酰胺(化合物1)



[0105] 在N₂气氛下,将ACN(12.0v)、水(12.5v)、BG-13(8.0Kg,1.0当量)和NaHCO₃(2.5当量)添加至反应器。然后将混合物冷却至-5~0℃。向混合物中滴加丙烯酰氯(1.1当量)在MeCN(0.5v)中的溶液并搅拌直到反应完成。然后将EA(6.0v)添加至反应器中并搅拌。收集有机相。水层以EA(3.0v)进一步萃取。合并有机相并以盐水洗涤。收集有机层并浓缩。

[0106] 残余物通过以3%w/w甲醇/DCM(21.0v)洗脱的硅胶(2wt)柱纯化。收集化合物1溶液并真空浓缩。残余物从EA/MTBE(2.0v)中析出。滤饼通过离心收集为产物。

步骤15: 合成(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(化合物1,备选方法)



[0107] CH₃CN(10.0v)、纯化水(5.0v)、NaOH(1.5当量)和BG-13(1.0当量)的混合物经搅拌

得到澄清溶液。EtOAc (6.0v) 然后添加至反应中并分离。有机相经收集并以15%盐水 (3.0v) 洗涤。上述制备的有机相经浓缩并且将溶剂交换为CH₃CN (剩余体积:NMT 5.0v)。添加CH₃CN (7.5v) 和纯化水 (12.5v) 并冷却至15-20^oC。将L-(+)-酒石酸 (0.5当量) 和NaHCO₃ (2.5当量) 添加至反应混合物。丙烯酰氯 (1.1当量) 在CH₃CN (0.5v) 中的溶液滴加至反应混合物中。反应完成后, 将EtOAc (6.0v) 添加至反应混合物并收集有机层。水相进一步以EA (3.0v) 萃取。合并各有机层, 以15%盐水 (5.0v) 洗涤并浓缩。溶剂交换为DCM (剩余体积:1.5-2.0v) 并通过硅胶柱纯化 (硅胶:100-200目, 2.0w/w; 洗脱剂:3%w/w MeOH/DCM (约50v)。收集的溶液经浓缩并交换为EtOAc (4.0v)。于50^oC将MTBE (6.4v) 滴加至残余物。然后冷却混合物至5^oC且离心收集滤饼。

步骤16: 制备化合物1的晶型A

[0108] 化合物1的上述滤饼溶解在7.0体积的DCM中, 且然后交换为溶剂EA。从EA/MTBE中重结晶后, 离心收集滤饼, 并真空干燥。如此得到4.44Kg产物 (收率:70.2%)。

[0109] 产物然后由在PANalytical Empyrean X射线粉末衍射仪上产生的X射线粉末衍射 (XRPD) 图法表征, 其中XRPD参数如下: X射线波长 (Cu, α , $\text{K}\alpha 1$ (Å) : 1.540598, $\text{K}\alpha 2$ (Å) : 1.544426; $\text{K}\alpha 2/\text{K}\alpha 1$ 强度比: 0.50); X射线管设置 (45Kv, 40mA); 发散狭缝 (自动); 扫描模式 (连续); 扫描范围 ($^{\circ} 2\text{TH}$) (3^o-40); 步长 ($^{\circ} 2\text{TH}$) (0.0131); 扫描速度 ($^{\circ}/\text{min}$) (约10)。XRPD结果发现所得到的产物为如图1所示的结晶。

[0110] 如图2所示的差示扫描量热 (DSC) 曲线在来自TA Instruments的TA Q2000 DSC上产生。所用DSC参数包括: 温度 (25^oC-期望温度); 加热速率 (10^oC/min); 方法 (ramp); 样品盘 (铝, 起褶); 冲洗气体 (N₂)。DSC结果显示139.4^oC的明确熔点 (起始温度)。

[0111] 如图3所示的热重分析 (TGA) 曲线在来自TA Instruments的TA Q5000TGA上产生。所用TGA参数包括: 温度 (室温-期望温度); 加热速率 (10^oC/min); 方法 (ramp); 样品盘 (铂, 开放); 冲洗气体 (N₂)。TGA结果显示为无水的, 即使高达110^oC也没有重量损失。

[0112] 如图4所示的质子核磁共振 (¹H-NMR) 在Bruker 400M NMR光谱仪上在DMSO-d₆中收集。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.50 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.46-7.38 (m, 2H), 7.17 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.08 (d, J=7.6Hz, 2H), 7.05 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.85-6.72 (m, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.07 (dd, J=16.8, 2.2Hz, 1H), 5.64 (dd, J=10.4Hz, 2.2Hz, 1H), 4.55-4.38 (m, 1H), 4.17-3.94 (m, 2H), 3.33-3.22 (m, 2H), 3.08-2.88 (m, 1H), 2.67-2.51 (m, 1H), 2.36-2.15 (m, 1H), 2.12-1.82 (m, 2H), 1.79-1.65 (m, 1H), 1.63-1.49 (m, 1H), 1.38-1.08 (m, 2H)。

[0113] 如图5所示的碳核磁共振 (¹³C-NMR) 在Bruker 400M NMR光谱仪上在DMSO-d₆中收集。化合物1的晶型A的¹³C-NMR光谱。

实施例2制备化合物1的晶型A

[0114] (S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡啶并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺 (化合物1) 通过在W02014173289A中公开的方法制备, 且进一步冻干得到化合物1的无定形形式。将化合物1 (200mg, ee值 > 97%) 在EA (8mL) 中的溶液加热至50^oC, 于50^oC向上述溶液中滴加己烷 (8mL)。混合物冷却至室温且搅拌16小时, 然后过滤得到110mg, 为白色固体。所得到的固体由XRPD表征为晶型A。

实施例3制备化合物1的晶型A (反溶剂添加)

[0115] 称重约15mg的样品 (晶型A) 至20-mL玻璃小瓶, 接着添加0.4-1.2mL相应的溶剂 (参

见表2)以溶解所有的固体。混合物然后在800rpm的速度磁力搅拌从而在室温得到澄清溶液。接着,将相关的反溶剂(参见表2)添加至该溶液中诱导析出或直到反溶剂总量达到15.0mL。如果没有析出发生,然后转移溶液以减缓室温蒸发。所得固体由XRPD表征为晶型A。

[0116] 表2反溶剂添加实验

实验ID	溶剂	反溶剂
1	丙酮	H ₂ O
2	DMAc	H ₂ O
3	EtOAc	正庚烷
4	DCM	正庚烷
5	甲苯	正庚烷
6	2-MeTHF	正庚烷

实施例4制备化合物1的晶型A(溶液蒸发扩散)

[0117] 将约15mg的样品(晶型A)溶解在0.5-1.5mL的相应溶剂(丙酮或EtOAc)中以得到在3-mL小瓶中的澄清溶液。接着,将溶液置于含3mL的相关反溶剂(正庚烷)的20-mL小瓶中。20-mL小瓶以盖密封并保持在室温,允许足够的时间使得有机蒸气与溶液相互作用。在11天结束时,转移澄清溶液在室温蒸发。所得固体由XRPD表征为晶型A。

实施例5化合物1的晶型A的稳定性测试和化合物1的纯度

(1) 物理稳定性测试

[0118] 化合物1的晶型A储存于80°C两天进行热稳定性测试,并且测试前后的XRPD图显示没有晶型变化。

[0119] 化合物1的晶型A的长期稳定性研究显示在于25°C/60%RH储存长达24个月(%面积:T₀=99.2%和T₁₂=99.2%)和于40°C/75%RH条件储存长达6个月(%面积:T₀=99.1%和T₆=99.4%)时没有显著的化学纯度变化。此外,在于25°C/60%RH储存长达24个月且于40°C/75%RH条件储存长达6个月时没有观察到晶型和光学纯度变化。

(2) 吸湿测试

[0120] 在图1中示出的动态蒸气吸附(DVS)曲线在SMS(Surface Measurement Systems) DVS Intrinsic上收集。所用DVS参数包括:温度(25°C);dm/dt(0.002%/min);最小dm/dt稳定性持续时间(10min);最大平衡时间(180min);RH范围(0%RH至95%RH);RH步长(10%RH,从0%RH至90%RH,5%RH,从90%RH至95%RH)。如图6所示,在80%RH有非常轻微的质量增长,其为约0.8%的化合物1的晶型A。

(3) 经由晶型A的结晶/重结晶以改善化合物1的纯度

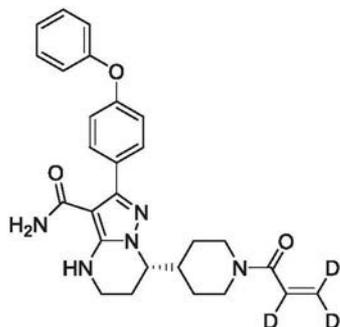
[0121] 经由晶型A的结晶/重结晶是改善化合物1纯度并控制化合物1中杂质的有效方式,从而达到说明书中的验收标准。参见表3中所示的实施例。

[0122] 表3在经由晶型A结晶/重结晶后的纯度变化

条件	化合物1的纯度
硅胶色谱纯化后	98.5%面积
第一次重结晶后	99.3%面积
第二次重结晶后	99.5%面积

实施例6制备氘标记的(S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-

四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(氘标记的化合物1)



[0123] 于0~5℃,向丙烯-2,3,3-d₃酸(50mg,0.67mmol)和DMF(一滴)在DCM(20mL)中的溶液中滴加草酰氯(1.6N,40.9mL,65.5mmol),然后于室温搅拌2小时。混合物减压浓缩得到粗制的丙烯酰-d₃氯。

[0124] 于0~5℃,向(S)-2-(4-苯氧基苯基)-7-(哌啶-4-基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(从BG-13解离,参见步骤15,化合物1,备选方法;278mg,0.67mmol)在DCM(20mL)和NaHCO₃水溶液(10mL)中的溶液中滴加上述丙烯酰-d₃氯在DCM(5mL)中的溶液并于室温搅拌2小时。合并的有机层经无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩并通过制备型TLC纯化,得到55mg(17.5%)的(S)-7-(1-(丙烯酰基-d₃)哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺,为灰白色固体。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ7.50-7.44(m,2H),7.42-7.35(m,2H),7.17-7.10(m,1H),7.09-6.99(m,4H),6.64(s,1H),4.52-4.40(m,1H),4.10-3.95(m,2H),2.29-3.25(m,2H),3.04-2.86(m,1H),2.63-2.50(m,1H),2.32-2.13(m,1H),2.06-1.81(m,2H),1.75-1.45(m,2H),1.35-1.08(m,2H)。MS(ESI,m/e)[M+]⁺475.2。

实施例7化合物1的多晶型物研究

(1) 无定形形式的多晶型物研究-从化合物1的无定形式制备晶型A

[0125] (S)-7-(1-(丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(化合物1)通过在W02014173289A公开的方法制备,并进一步冻干得到化合物1的无定形式。

[0126] 对于表4a至4k、表5a至5e和表6中的各实验,称量约20mg的无定形式的化合物1至玻璃小瓶中,接着添加相应的溶剂。如有需要,将混合物加热,以得到澄清溶液。然后将混合物保持在室温而不搅拌1-2天,以观察是否有固体从该澄清溶液中产生。通过偏振光显微镜检查来监测固体。

[0127] 表4化合物1(ee值=90%)为起始物质

表4a

实验 ID	溶剂		室 温	加 热	结果(1-2d)
	EA (mL)	己烷 (mL)			
1-1	0.5	0.1	Y	----	无固体
1-2	0.5	0.2	Y	----	少量固体
1-3	0.5	0.3	N	Y	油状物
1-4	0.5	0.4	N	Y	油状物
1-5	1	0.2	Y	----	无固体
1-6	1	0.3	Y	----	无固体
1-7	1	0.4	Y	----	无固体
1-8	1	0.5	Y	----	无固体
1-9	1	0.6	Y	----	少量固体
1-10	1	0.7	Y	----	少量固体
1-11	1	0.8	N	Y	油状物
1-12	1	0.9	N	Y	油状物

表4b

实验 ID	溶剂		室 温	加 热	结果(1-2d)
	EA (mL)	庚烷(mL)			
2-1	0.5	0.1	Y	----	无固体
2-2	0.5	0.2	Y	----	少量固体

2-3	0.5	0.3	N	Y	油状物
2-4	0.5	0.4	N	N	油状物
2-5	1	0.2	Y	----	无固体
2-6	1	0.3	Y	----	无固体
2-7	1	0.4	Y	----	无固体
2-8	1	0.5	Y	----	无固体
2-9	1	0.6	Y	----	少量固体
2-10	1	0.7	Y	----	少量固体
2-11	1	0.8	Y	----	油状物
2-12	1	0.9	N	Y	油状物

表4c

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	EA (mL)	环己烷(mL)			
3-1	0.5	0.2	Y	----	无固体
3-2	0.5	0.3	Y	----	少量固体
3-3	0.5	0.4	Y	----	油状物
3-4	0.5	0.5	Y	----	油状物
3-5	0.5	0.6	N	Y	油状物
3-6	1	0.6	Y	----	少量固体
3-7	1	0.8	Y	----	少量固体
3-8	1	1.0	Y	----	少量固体
3-9	1	1.2	Y	----	少量固体
3-10	1	1.4	Y	----	油状物

表4d

实验 ID	溶剂		室 温	加 热	结果(1-2d)
	DCM (mL)	己烷(mL)			
4-1	0.5	0.4	Y	----	无固体
4-2	0.5	0.6	Y	----	无固体
4-3	0.5	0.8	Y	----	无固体
4-4	0.5	1.0	N	Y	油状物
4-5	1.0	1.4	Y	----	无固体
4-6	1.0	1.6	Y	----	无固体
4-7	1.0	1.8	Y	----	无固体
4-8	1.0	2.0	N	Y	油状物

表4e

实验 ID	溶剂		室 温	加 热	结果(1-2d)
	1,2-二氯乙烷 (mL)	己烷(mL)			
5-1	0.5	0.6	Y	----	无固体
5-2	0.5	0.8	Y	----	无固体
5-3	0.5	1.0	Y	----	无固体
5-4	0.5	1.1	N	Y	油状物
5-5	1.0	1.4	Y	----	无固体
5-6	1.0	1.6	Y	----	无固体
5-7	1.0	1.8	Y	----	无固体
5-8	1.0	2.0	Y	----	无固体
5-9	1.0	2.2	N	Y	油状物

表4f

实验 ID	溶剂		室 温	加 热	结果(1-2d)
	MeOAc (mL)	己烷(mL)			
6-1	0.5	0.3	Y	----	少量固体
6-2	0.5	0.4	Y	----	油状物
6-3	0.5	0.5	Y	----	油状物
6-4	0.5	0.6	N	Y	油状物
6-5	1.0	0.6	Y	----	少量固体
6-6	1.0	0.8	Y	----	少量固体
6-7	1.0	1.0	Y	----	少量固体
6-8	1.0	1.2	Y	----	少量固体
6-9	1.0	1.4	N	Y	油状物

表4g

实验 ID	溶剂		室 温	加 热	结果(1-2d)
	甲苯(mL)	己烷 (mL)			
7-1	1.0	0.2	Y	----	少量固体
7-2	1.0	0.3	Y	----	少量固体
7-3	1.0	0.4	Y	----	少量固体
7-4	1.0	0.5	N	Y	油状物
7-5	1.0	0.6	N	Y	油状物

表4h

实验 ID	溶剂		室 温	加 热	结果(1-2d)
	甲苯(mL)	环己烷 (mL)			
8-1	1.0	0.1	Y	----	少量固体
8-2	1.0	0.2	Y	----	少量固体
8-3	1.0	0.3	Y	----	油状物
8-4	1.0	0.4	N	Y	油状物
8-5	1.0	0.5	N	Y	少量固体
8-6	1.5	0.4	Y	----	少量固体
8-7	1.5	0.5	Y	----	少量固体

表4i

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	MeOAc (mL)	环己烷(mL)			
9-1	0.4	1.0	Y	----	少量固体
9-2	0.5	1.0	Y	----	少量固体
9-3	0.6	1.0	Y	----	少量固体
9-4	0.8	1.0	Y	----	少量固体
9-5	1.0	1.0	Y	----	少量固体

表4j

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	IPAC (ml)	环己烷(ml)			
10-1	1.0	0.2	Y	----	少量固体
10-2	1.0	0.4	Y	----	少量固体
10-3	1.0	0.6	Y	----	少量固体
10-4	1.0	0.8	Y	----	少量固体
10-5	1.0	1.0	Y	----	少量固体
10-6	1.0	1.2	N	Y	油状物

表4k

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	乙酸异丁酯(mL)	环己烷(mL)			
11-1	1.0	0.2	Y	----	少量固体
11-2	1.0	0.4	Y	----	少量固体
11-3	1.0	0.6	Y	----	少量固体
11-4	1.0	0.8	Y	----	少量固体
11-5	1.0	1.0	Y	----	少量固体
11-6	1.0	1.2	N	Y	油状物

Y=是,且N=否。

表5化合物1 (ee值=97%) 作为起始物质

表5a

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	EA (mL)	己烷(mL)			
12-1	1	0.2	Y	----	无固体
12-2	1	0.3	Y	----	无固体
12-3	1	0.4	Y	----	无固体
12-4	1	0.5	Y	----	无固体
12-5	1	0.6	Y	----	固体
12-6	1	0.7	Y	----	固体
12-7	1	0.8	N	Y	油状物
12-8	1	0.9	N	Y	油状物

表5b

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	EA (mL)	庚烷(mL)			
13-1	1	0.2	Y	----	无固体
13-2	1	0.3	Y	----	无固体
13-3	1	0.4	Y	----	无固体
13-4	1	0.5	Y	----	无固体
13-5	1	0.6	Y	----	固体
13-6	1	0.7	Y	----	固体
13-7	1	0.8	Y	----	油状物
13-8	1	0.9	N	Y	油状物

表5c

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	MeOAc (ml)	环己烷(ml)			
14-1	0.4	1.0	Y	----	无固体
14-2	0.5	1.0	Y	----	无固体
14-3	0.6	1.0	Y	----	固体

14-4	0.8	1.0	Y	----	固体
14-5	1.0	1.0	Y	----	无固体
14-6	1.0	1.5	Y	----	固体
14-7	1.0	2.0	Y	----	固体
14-8	1.0	2.2	N	Y	油状物

表5d

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	EA (ml)	环己烷(ml)			
15-1	0.5	0.2	Y	----	无固体
15-2	0.5	0.3	Y	----	固体
15-3	0.5	0.4	Y	----	油状物
15-4	0.5	0.5	Y	----	油状物
15-5	0.5	0.6	N	Y	油状物
15-6	1	0.6	Y	----	固体
15-7	1	0.8	Y	----	固体
15-8	1	1.0	Y	----	固体
15-9	1	1.2	Y	----	固体
15-10	1	1.4	Y	----	油状物

表5e

实验 ID	溶剂		室温	加热	结果(1-2d)
	MeOAc (ml)	己烷(ml)			
16-1	0.5	0.3	Y	----	固体
16-2	0.5	0.4	Y	----	无固体
16-3	0.5	0.5	Y	----	无固体
16-4	0.5	0.6	N	Y	无固体
16-5	1.0	0.6	Y	----	固体
16-6	1.0	0.8	Y	----	固体
16-7	1.0	1.0	Y	----	固体
16-8	1.0	1.2	Y	----	固体
16-9	1.0	1.4	N	Y	油状物

Y=是,且N=否。

[0128] 表4a至4k和表5a至5e中的实验以相同规模进行(即,起始物质-无定形化合物1的

量为约20mg)。然而,起始物质的ee值似乎对在每个实验中要形成的固体的量具有显著的影响。如表4a至4k中从90%ee的无定形化合物1开始的实验所示,由此形成的固体是极少量的。表5a至5e中从97%ee的无定形化合物1开始的实验产生显著量的固体。此外,在表4a至4k中的实验中所得到的固体在从具有90%ee的起始物质结晶时显示低的ee值。表4a至4k中使用EA/己烷作为结晶体系的一个固体样品仅显示45%ee值。

[0129] 表5a的结果通过类似于实施例2的放大实验得到进一步证实,其证实了所得固体为期望的晶型(晶型A)。

[0130] 如表4a至4k和表5a至5e所示,结晶固体的形成会根据具体的溶剂、各溶剂比例等变化。

[0131] 表6中的结果进一步证实了结晶固体的形成取决于溶剂的具体比例。

表6

溶剂-1 (0.5 mL)	己烷		MTBE		庚烷		环己烷		H ₂ O		乙醚	
	V/mL	结果	V/mL	结果	V/mL	结果	V/mL	结果	V/mL	结果	V/mL	结果
THF	0.4	少量固体	2.0	少量固体	0.4	少量固体	0.4	少量固体	----	----	2.0	无固体
Me-THF	0.4	少量固体	1.5	无固体	0.4	无固体	----	----	----	----	----	----
DME	0.6	少量固体	1.5	无固体	0.6	少量固体	0.8	少量固体	----	----	1.5	无固体
EtOH	2.0	无固体	5.0	无固体	2.5	油状物	2.0	无固体	5.0	无固体	5.0	无固体
i-PrOH	1.5	无固体	2.5	无固体	----	----	2.0	无固体	2.0	少量固体	----	----
吡啶	1.0	无固体	4.0	无固体	----	----	1.0	无固体	2.0	无固体	----	----
乙酸丙酯	0.3	无固体	0.8	无固体	----	----	----	----	----	----	----	----
乙酸异丁酯	0.2	无固体	2.0	无固体	----	----	----	----	----	----	----	----
n-BuOH	0.5	无固体	2.0	无固体	----	----	----	----	0.5	无固体	----	----
1,2-二氯乙烷	1.0	无固体	5.0	无固体	----	----	1.2	无固体	----	----	----	----
DCM	1.0	油状物	5.0	无固体	----	----	1.2	无固体	----	----	----	----
甲苯	0.2	油状物和少量固体	0.5	无固体	0.2	无固体	0.2	油状物和少量固体	----	----	0.5	无固体

(2) 晶型的多晶型物研究-从结晶形式制备晶型A

慢速蒸发

[0132] 称重约15mg的样品(晶型A)至3-mL玻璃小瓶,接着添加相应的溶剂或溶剂混合物(参见表7)得到澄清的溶液。接着,小瓶以具有3~4个针孔的石蜡膜覆盖,并保持在室温以允许溶液缓慢地蒸发。分离固体进行XRPD分析。然而如表7所总结的,没有产生晶体形式。

[0133] 表7慢速蒸发实验

实验ID	溶剂(v/v)	固体形式
------	---------	------

1	MeOH	无定形
2	EtOH	无定形
3	IPA	无定形
4	ACN	无定形
5	丙酮	油状物
6	EtOAc	油状物
7	THF	油状物
8	DCM	无定形
9	甲苯	油状物
10	乙酸	油状物
11	EtOH/H ₂ O (4:1)	无定形
12	丙酮/H ₂ O (4:1)	无定形
13	THF/H ₂ O (4:1)	无定形
14	DCM/正庚烷 (4:1)	无定形
15	EtOH/正庚烷 (4:1)	无定形
16	EtOAc/正庚烷 (6.5:1)	油状物
17	ACN/MTBE (4:1)	油状物

反溶剂添加

[0134] 称重约15mg的样品(晶型A)至20-mL玻璃小瓶,接着添加0.4-1.2mL相应的溶剂(参见表8)。混合物然后以800rpm的速度在室温磁力搅拌得到澄清的溶液。接着,将相关的反溶剂(参见表8)添加至溶液以诱导析出或直到反溶剂的总量达到15.0mL。如果没有发生析出,然后转移溶液于室温慢速蒸发。结果总结在表8中。

[0135] 表8反溶剂添加实验

实验ID	反溶剂	溶剂	固体形式
1	H ₂ O	EtOH	油状物
2	H ₂ O	THF	油状物
3	H ₂ O	乙酸	油状物
4	正庚烷	1,4-二噁烷	油状物
5	MTBE	ACN	油状物
6	MTBE	NMP	N/A
7	MTBE	EtOH	油状物
8	MTBE	DCM	油状物

N/A: 没有获得固体。

慢速冷却

[0136] 在3-mL玻璃小瓶中,于室温,将约20mg的样品(晶型A)悬浮在1.0mL的相应的溶剂(参见表9)中。于50℃将悬浮液转移至浆料中,以800rpm的速度使用磁力搅拌。样品于50℃

平衡2小时并使用0.45 μ m尼龙膜过滤。接着,将滤液缓慢地从50 $^{\circ}$ C冷却至5 $^{\circ}$ C,速率为0.1 $^{\circ}$ C/min。所得固体于5 $^{\circ}$ C保持恒温,然后分离用于XRPD分析。如表9中所总结,没有获得晶体形式。

[0137] 表9慢速冷却实验

实验ID	溶剂(v/v)	固体形式
1	IPA	N/A
2	MIBK	N/A
3	IPAc	N/A
4	甲苯	N/A
5	EtOH/H ₂ O (1:2)	凝胶
6	丙酮/H ₂ O (1:2)	凝胶
7	EtOAc/正庚烷 (1:2)	无定形
8	CHCl ₃ /正庚烷 (1:2)	N/A
9	THF/正庚烷 (1:2)	油状物*
10	ACN/MTBE (1:2)	油状物*

N/A:没有获得固体。

*:转移澄清溶液于室温蒸发。

溶液蒸气扩散

[0138] 在3-mL小瓶中将约15mg的样品(晶型A)溶解于0.5-1.5mL的相应溶剂(参见表10)中,得到澄清溶液。接着将溶液置于具有3mL的相关反溶剂的20-mL小瓶中。该20-mL小瓶以盖密封并保持在室温,允许足够的时间使有机蒸气与溶液接触。在11天结束时,转移澄清溶液于室温蒸发。所得固体由XRPD表征。结果总结在表10中。

[0139] 表10溶液蒸气扩散实验

实验ID	溶剂	反溶剂	固体形式
1	EtOH	H ₂ O	无定形*
2	ACN	H ₂ O	N/A
3	丙酮	H ₂ O	无定形*
4	THF	H ₂ O	无定形*
5	乙酸	H ₂ O	油状物
6	EtOH	正庚烷	N/A
7	THF	正庚烷	无定形*
5	DCM	正庚烷	无定形*
8	DMAc	MTBE	N/A
9	IPA	MTBE	N/A
10	1,4-二噁烷	MTBE	N/A
11	甲苯	MTBE	N/A
12	NMP	MTBE	N/A

N/A:没有获得固体。

*:经由慢速蒸发产生固体。

聚合物诱导的结晶实验

[0140] 在3-mL小瓶中将约15mg的样品(晶型A)溶解于1.0mL的相应的溶剂(参见表11)得到澄清的溶液。溶液然后使用0.45 μ m尼龙膜过滤。将约2mg的聚合物混合物添加至滤液中。混合物于室温搅拌以诱导析出。分离固体用于XRPD分析。如表11中所总结,没有获得晶体。

[0141] 表11聚合物诱导的结晶实验

实验ID	溶剂(v/v)	聚合物混合物	固体形式
1	EtOH	A	无定形
2	ACN	A	无定形
3	丙酮	A	无定形
4	THF	A	无定形
5	DCM	A	无定形
6	EtOAc	A	无定形
7	EtOH	B	无定形
8	ACN	B	无定形
9	丙酮	B	无定形
10	THF	B	无定形
11	DCM	B	无定形
12	EtOAc	B	无定形

聚合物混合物A:聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)、聚氯乙烯(PVC)、聚乙酸乙烯酯(PVAc)、羟丙甲纤维素(HPMC)、甲基纤维素(MC)(质量比为1:1:1:1:1:1)

聚合物混合物B:聚己内酯(PCL)、聚乙二醇(PEG)、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、藻酸钠(SA)和羟基乙基纤维素(HEC)(质量比1:1:1:1:1)。

实施例8化合物1的绝对构型的确定

制备BG-13单晶

[0142] 六个单晶生长实验(参见表12)经由慢速冷却进行。BG-13的合适的单晶通过在MeOH/H₂O(1:1, v/v)中慢速冷却获得。晶体数据和结构精修列于表13中。

[0143] 表12单晶生长实验

实验 ID	重量 (mg)	溶剂 (1 mL, v/v)	方法	温度 (°C)	溶解 (Y/N*)	观察结果
1	5.6	IPA/H ₂ O (3/1)	冷却	60	N	块样晶体
2	5.5	IPA/H ₂ O (3/1)	冷却	60	N	块样晶体
3	5.4	IPA/H ₂ O (3/1)	冷却	60	N	块样晶体
4	5.5	IPA/H ₂ O (3/1)	冷却	60	N	块样晶体
5	4.7	MeOH/H ₂ O (2/1)	冷却	60	N	晶体
6	5.5	MeOH/H ₂ O (1/1)	冷却	60	N	晶体

表13BG-13的单晶数据和结构精修

[0144] 单晶的数据在具有CCD检测器的Bruker APEX DUO单晶衍射仪 (Cu K α , $\lambda=1.54178 \text{ \AA}$, 173.15K) 上产生。

实验式	C ₃₃ H ₃₄ N ₅ O ₆	-
-----	---	---

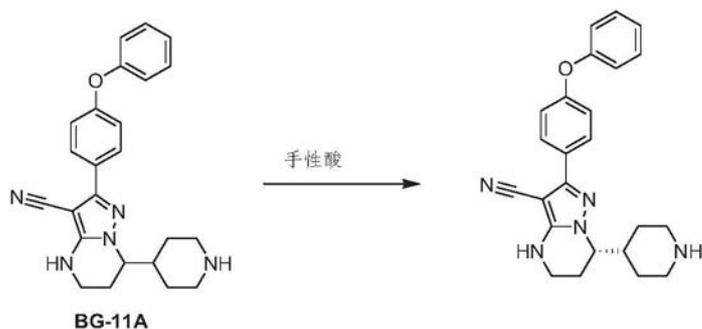
式量	596.65	
温度	173.15	-
波长	1.54178 Å	-
晶系, 空间群	单斜	C2
晶胞尺寸	a = 16.7939(4) Å b = 7.9871(2) Å c = 23.5438(5)	$\alpha = 90.00^\circ$ $\beta = 108.0460(10)^\circ$ $\gamma = 90.00^\circ$
体积	3002.69(12) Å ³	
Z, 计算密度	4	1.320 mg/mm ³
吸收系数	0.756 mm ⁻¹	
F(000)	1260.0	
晶体尺寸	0.3 × 0.21 × 0.08 mm ³	
数据收集的 θ 范围	1.97 至 64.96°	
极限指标	-19 ≤ h ≤ 17 -7 ≤ k ≤ 9 -27 ≤ l ≤ 24	
收集的反射/独特性	5073/3756[R(int) = 0.1062]	
完整度	92.8%	
精修方法	F ² 上的全矩阵最小平方	
数据/限制/参数	3756/1/398	
F ² 的拟合优度	1.192	
最终 R 指标[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0819	wR ₂ = 0.2294
绝对结构 Flack	0.0(3)	
最大衍射峰和洞	0.50 和 -0.57 e.Å ⁻³	

[0145] BG-13证实为(2R,3R)-二苯甲酰基酒石酸(L-DBTA)盐且游离碱与L-DBTA的摩尔比为2:1。L-DBTA中两个碳(C32和C32')的构型均证实为R。游离碱中C6的构型经确定为S,如图8至图10所示。粉末X射线衍射图法也用来表征单晶的结构,如图11所示。

化合物1的绝对构型

[0146] 化合物1的绝对构型从中间体BG-13的单晶X射线结构分析推断为S。

实施例9 BG-11A的手性拆分



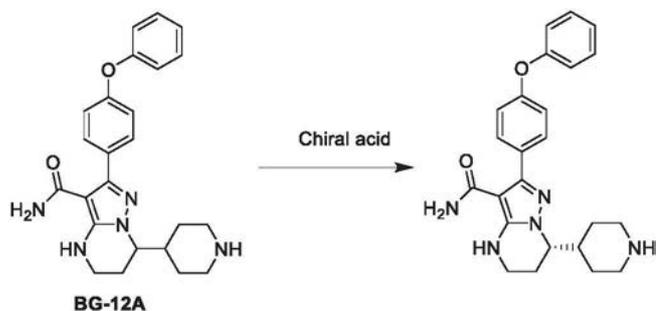
[0147] 一般操作：在升高的温度，向化合物BG-11A在制备的溶剂体系中的溶液中添加手性酸。在该温度搅拌后，将其冷却至室温并于室温搅拌过夜。固体经过滤并以制备的溶剂体系洗涤。ee值由手性HPLC直接从其相关盐或其Boc-衍生物测试（参见表14）。其他手性酸或溶剂体系不给出ee值、低ee值或不给出期望的手性化合物。

[0148] 表14 BG-11A的手性拆分

溶剂体系	11A 的量	手性酸	温度	ee 值	收率
EtOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (1.9 L)	40.0 g	D-DBTA (0.5 当量)	70°C至室温	>85% ee	42.2%
i-PrOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (1.0 当量)	70°C至室温	77% ee	38.5%
i-PrOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 当量)	70°C至室温	85% ee	38.9%
EtOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 当量)	70°C至室温	86% ee	39.8%
MeOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 当量)	70°C至室温	82% ee	42.2%
AcOH/H ₂ O 3/1 (40 mL)	1 g	D-DBTA (0.55 当量)	60°C至室温	83% ee	27.6%
1,4-二噁烷/H ₂ O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 当量)	60°C至室温	无固体	无固体
MeOH/H ₂ O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 当量)	60°C至室温	36% ee	未称重
CH ₃ CN/H ₂ O 9/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 当量)	60°C至室温	14% ee	未称重
CH ₃ CN/H ₂ O 6/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 当量)	60°C至室温	89% ee	未称重
i-PrOH/H ₂ O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 当量)	60°C至室温	79% ee	未称重

CH ₃ CN/H ₂ O 4/1 (1 mL)	50 mg	D-DBTA (1.0 当量)	60°C至室温	24% ee	46%
CH ₃ CN/H ₂ O 4/1 (1.5 mL)	50 mg	D-DBTA (1.0 当量)	60°C至室温	91% ee	33.7%

实施例10 BG-12A的手性拆分和手性纯度的改善



[0149] 一般操作：在升高的温度，向化合物BG-12A在制备的溶剂体系中的溶液中添加手性酸。在该温度搅拌后，将其冷却至室温并于室温搅拌过夜。固体经过滤并以制备的溶剂体系洗涤。手性纯度由手性HPLC直接从其相关盐或游离碱测试（参见表15）。其他手性酸或溶剂体系不给出ee值、低ee值或不给出期望的手性化合物。

[0150] 表15 BG-12A的手性拆分

溶剂体系	BG-12A 的量	手性酸	温度	ee 值	收率
MeOH/H ₂ O 3/1 (1500 mL)	50 g	L-DBTA (0.35 当量)	50°C至室温	85.6% ee	43.1%
EtOH/H ₂ O 6/1 (250 mL)	14.4 g	L-DBTA (0.55 当量)	78°C至室温	79.1% ee	41.8%
n-BuOH/H ₂ O 6/1 (20 mL)	1 g	L-DBTA (0.8 当量)	80°C至室温	95% ee	20%
MeOH (4 mL)	500 mg	L-DBTA (1.1 当量)	回流至室温	无固体	
EtOH (17 mL)	1.0 g	L-DBTA (1.1 当量)	回流至室温	40%ee	未称重
EtOH (30 mL)	500 mg	L-DBTA (2.2 当量)	回流至室温	无 ee	未称重

[0151] 所得L-DBTA盐 (31g, 85.6% ee) 添加至THF/H₂O (1/1, 1034mL)，将悬浮液加热至70°C并搅拌直到所有固体溶解。然后添加517mL的水。然后溶液缓慢地冷却至40°C并添加晶种 (10mg)。搅拌约2小时后，溶液缓慢地冷却至环境温度并搅拌2天。过滤，固体以THF/H₂O=1/1 (20mL) 洗涤并减压干燥，得到产物，为白色固体 (22.5g, 72%收率, >98.5ee值)。

[0152] 所获得的游离碱 (6.02g, 79.1% ee) 溶解在 (1g/15mL) EtOH/H₂O (6/1, 90mL) 中，于78°C搅拌，使得所有起始物质都溶解。然后添加L-DBTA (2.84g, 7.9mmol, 0.55当量) 在EtOH/H₂O (6/1, 7mL) 中的溶液。快速形成固体，混合物在该温度搅拌1小时，然后移除加热体系。使混合物冷却至室温。过滤，固体以EtOH/H₂O (6/1, 10mL) 洗涤。收集的固体在NaOH水溶液和DCM中转化为游离碱，得到产物 (4.7g, 收率: 32.6%, 93% ee)，为白色泡沫。

[0153] 所获得的游离碱 (70.0g, 90.5% ee) 在CH₃CN/H₂O (1/1, 700mL) 中的悬浮液加热至60

℃,得到澄清的溶液。然后向上述溶液中添加L-DBTA (33g, 0.55当量)。于60℃搅拌约2小时后,混合物缓慢地冷却至室温并搅拌过夜。过滤,固体以CH₃CN/H₂O (1/1, 50mL) 洗涤,减压干燥,得到产物,为灰白色固体 (80g, 收率:80% ee值>98%)。

实施例11功效测试

[0154] (S)-7-(1-丙烯酰基哌啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺在下文中使用其晶型A进行测试。

测试1:激酶的抑制和选择性

方法:

(1) BTK激酶测定法

[0155] 在基于时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 方法的测定中测试化合物1的晶型A对BTK激酶 (aa2-659, Carna Biosciences) 的抑制。测试在384孔低体积黑板在含有BTK激酶、5μM ATP、2μM肽底物和0-10μM化合物的反应混合物中在含有50mM Tris pH7.4、10mM MgCl₂、2mM MnCl₂、0.1mM EDTA、1mM DTT、0.005% Tween-20、20nM SEB和0.01% BSA的缓冲液中进行。激酶与化合物于室温温育60分钟且反应通过添加ATP和肽底物引发。室温反应60分钟后,根据制造商说明书 (CisBio Bioassays) 添加等体积的终止/检测液。终止/检测液在含有50mM HEPES pH 7.0、800mM KF、20mM EDTA和0.1% BSA的缓冲液中含有Eu³⁺穴状化合物-缀合的单克隆抗体 (PT66) 抗磷酸酪氨酸和XL665-缀合的链霉亲和素。将各板密封并在室温温育1小时,且在PHERAstar FS板阅读器 (BMG Labtech) 上记录TR-FRET信号 (在665nm发射对在620nm发射的荧光比例,在337nm波长激发)。肽底物的磷酸化导致抗磷酸酪氨酸抗体结合至生物素化的肽底物,这将荧光供体 (Eu³⁺穴状物) 置于与受体 (链霉亲和素-XL665) 非常近的地方,由此导致高度的荧光共振能量从供体荧光团 (在620nm) 转移至受体荧光团 (在665nm)。BTK激酶活性的抑制导致TR-FRET信号的降低。化合物1的IC₅₀通过Graphpad Prism软件将数据拟合成四参数逻辑斯蒂方程 (logistic equation) 而得到。

(2) 生化激酶选择性

[0156] 晶型A的选择性在Reaction Biology Corp.公司在1μM针对一组342种激酶描绘曲线。晶型A对于329种激酶展现小于70%的抑制,且对于包括BTK的13种激酶展现大于70%的抑制。晶型A的IC₅₀ (参见表13),包括ITK、TEC、JAK3和EGFR测定通过使用TR-FRET测定和对应的肽作为底物在百济神州 (BeiGene) 内部进行。

[0157] ITK的IC₅₀确定:ITK测定的实验方案类似于BTK测定,除了进行以下改良:3μM ATP和2μM TK底物用于该激酶反应中。

[0158] TEC的IC₅₀确定:Tec测定的实验方案类似于BTK测试,除了进行以下改良:1) 280μM ATP和2nM Poly-GT底物用于激酶反应中;2) 反应缓冲液不含有SEB。

[0159] JAK3的IC₅₀确定:JAK3测定的实验方案类似于BTK测试,除了进行以下改良:1) 3.4μM ATP和3μM肽底物 (B-EE-15, 生物素-EQEDEPEGDYFEWLE) 用于激酶反应中;2) 反应缓冲液含有50mM Tris pH7.8、10mM MgCl₂、5mM DTT、0.01% Triton X-100和0.01% BSA。

[0160] EGFR的IC₅₀确定:EGFR测定的实验方案类似于BTK测试,除了进行以下改良:1) 20μM ATP、1.44μM TK底物-生物素 (酪氨酸激酶的一种通用底物) 和0-1000nM化合物 (最终浓度为1% DMSO) 用于激酶反应;2) 反应缓冲液含有50mM HEPES pH7.5、10mM MgCl₂、1mM EGTA、0.01% Brij-35、2.5mM DTT和0.1% BSA;3) 终止/检测液含有25mM HEPES pH7.5、400mM KF、

50mM EDTA、0.01% Triton-X100和0.1% BSA。

结果:

[0161] 晶型A对于BTK激酶的IC₅₀为0.27nM。晶型A显示为强效的、特异性的和不可逆的BTK激酶抑制剂。就其选择性而言,当在1μM针对一组342种人激酶描绘曲线时,晶型A仅抑制13种其他激酶超过70%。

[0162] 表16晶型A的酶抑制活性

酶	IC ₅₀ (nM)
BTK	0.27
ITK	53
TEC	1.9
JAK3	600
EGFR	3.6
BLK	1.13
BMX/ETK	0.62
BRK	33
ERBB4/HER4	1.58
FGR	155
FRK/PTK5	379
LCK	187
TXK	2.95

注: BTK、EGFR、ITK、TEC和JAK3测试通过使用TR-FRET测定和相应的肽作为底物进行。在ATP针对5种激酶的K_M并且预温育1小时测量晶型A的IC₅₀。HER4、BMX、TXK、BLK FGR、LCK、FRK/PTK5测定Reaction Biology Corp.公司使用³³P-ATP和滤膜结合测定进行。在1μM ATP测量并且预温育1小时测量晶型A的IC₅₀。

测试2:通过晶型A的BTKpY223细胞测定

方法:

[0163] BTKpY223细胞测定是基于HTRF的测定,意在定量确定在BTK Tyr223的磷酸化的内生水平。磷酸化的Tyr223对于BTK的完全活化是必要的。该测定在拉莫斯(Ramos)细胞(CRL-1596, ATCC)中以BTKpY223测定试剂盒(63IDC000, Cisbio)中进行。

[0164] 简单来说,拉莫斯细胞在含0.5% FBS的RPMI1640中血清饥饿2小时。饥饿后,细胞与晶型A一起温育以在不同浓度在CO₂温育器中检测1小时。接种后,细胞以1mM过钒酸盐(PV)或Na₃VO₄(OV)刺激20分钟。然后,细胞减速旋转并以1x裂解缓冲液于室温裂解10分钟(在试剂盒中提供4x裂解缓冲液)。温育期间,1x抗体混合物通过在检测缓冲液(试剂盒中提供)稀释抗-BTK-d2和抗-pBTK-K而制备。将2ul/孔的1x抗体混合物分配至OptiPlate-384测

定板 (6005620, Perkin Elmer) 中。此后, 将18 μ L的细胞裂解液转移至预载抗体溶液的测定板。温和地混合并简单旋转后, 将板密封并于暗处在室温保持18小时。荧光发射在两个不同的波长 (665nm和620nm) 在相容的HTRF阅读器 (PHERAstar FS, BMG) 上测量。化合物1的效力基于在665nm和620nm的信号强度之间的比例的抑制来计算。IC₅₀值以GraphPadPrism软件使用S形剂量-响应函数来计算。

结果:

[0165] 晶型A在B细胞淋巴瘤细胞系拉莫斯细胞中在低至1.8 \pm 0.2nM (n=3) 的浓度抑制BTK的磷酸化。

测试3: 晶型A对血液癌细胞系 (Rec-1、Mino、JEK0-1和TMD-8) 中肿瘤细胞增殖的作用

方法:

[0166] 3种MCL细胞 (Rec-1、Mino和JEK0-1) 和1种ABC型弥散性大B细胞淋巴瘤细胞系 (TMD8) 用于该研究中。细胞系保养在补充以10%胎牛血清/FBS (Thermo Scientific); 100单位/ml青霉素 (Gibco) 和0.1mg/ml链霉素 (Gibco) 的RPMI-1640中并保持于37 $^{\circ}$ C在润湿化的5%CO₂/空气中。细胞系从购买的原始细胞中放样30代以内的冷冻原种中得到恢复。

[0167] 化合物在Rec-1、Mino、JEK0-1和TMD-8细胞中的生长抑制活性使用CellTiter-Glo荧光细胞活力测定 (Promega) 确定。针对各细胞系优化96孔板的每孔接种的细胞数, 以确保6天治疗期间的对数生长。细胞以10点稀释系列处理, 一式三份。暴露于化合物6天后, 添加体积等于各孔中细胞培养基的体积的CellTiter-Glo试剂。在定轨摇床上混合混合物2分钟以实现细胞裂解, 接着室温温育10分钟以实现荧光信号的发展和稳定化, 荧光信号对应于ATP的量且因此对应于代谢活性细胞的量。使用PHERAstar FS阅读器 (BMG Labtech) 测量荧光信号。细胞活力的IC₅₀值以GraphPad Prism软件确定并且为3个独立测定的平均值。

结果:

[0168] 化合物1的晶型A对3种MCL细胞系和1种ABC型弥散型大B-细胞淋巴瘤细胞系 (TMD8) 中的细胞增殖展现出特异性和强效抑制作用 (表17)。

表17晶型A对血液肿瘤细胞增殖的抑制

细胞系	细胞类型	效力IC ₅₀ (nM)	标准偏差 (nM)
Rec-1	MCL	0.36	0.03
Mino	MCL	3.8	1.8
JEK0-1	MCL	20.0	NA
TMD-8	DLBCL (ABC)	0.54	0.3

测试4: 小鼠中晶型A的药物动力学研究

方法:

[0169] 对于时间过程研究, 将小鼠随机分成7组, 每组4只小鼠。小鼠以单剂量的化合物1的晶型A治疗并且在给药后的不同时间点 (30分钟, 1、2、4、12、24小时) 使用二氧化碳实施安乐死。对于剂量依赖性研究, 将小鼠随机分成9组, 每组4只小鼠。小鼠以不同剂量水平的化合物1的晶型A治疗并且在给药4小时后使用二氧化碳实施安乐死。治疗以10ml/kg体重的体积通过口服管饲 (p.o.) 给予。在给药前即时评估体重并相应地调节给药体积。

[0170] PK样品制备: 对于时间过程研究, 血样 (每8小鼠50 μ L) 于给药后15min在异氟烷/氧气麻醉下从眶后静脉窦进行收集 (该组小鼠也用于24小时时间点) 或在针对其他时间点的

安乐死后心穿刺术进行收集。对于剂量依赖性研究,血样于给药后30min在异氟烷/氧气麻醉下从眶后静脉窦进行收集。血浆通过在3,000g离心10分钟收集并在-80℃保持冷冻直到分析。

[0171] PK分析:最大血浆浓度(C_{max})和达到C_{max}(T_{max})的时间直接从血浆浓度对时间曲线获取。

结果:

[0172] 晶型A在ICR小鼠中快速吸收并消除。

测试5:TMD-8异种移植模型中晶型A的功效研究

肿瘤移植方法:

[0173] 动物以环磷酰胺(在盐水中制备,150mpk腹腔注射(i.p.))和双硫仑(在0.8% Tween80/盐水中制备,125mpk口服管饲(p.o.)),每一剂环磷酰胺后1小时)预处理2天,每天一次。然后在第二剂环磷酰胺后24小时向动物接种TMD-8细胞。移植当天,将细胞培养基替换为新鲜培养基。4小时后,移去培养基并且如上所述收集细胞。将细胞重新悬浮于冷的(4℃)PBS中且添加相同体积的基质胶(BD,Cat#356237),得到最终浓度为 2.5×10^7 个细胞/ml。接种前,将重悬的细胞置于冰上。细胞接种前,用75%乙醇清洁每个小鼠的右侧腋下区域。经由26号针头在右前肋腹向每只动物皮下注射在200μl细胞悬浮液中的 5×10^6 个细胞。

[0174] 对于体内功效研究,从细胞接种后第3天开始,将动物随机分成期望数量的组,每组10只小鼠。小鼠一天两次(BID)以媒介物(0.5%羧甲基纤维素(CMC)+0.2%Tween 80)和不同剂量水平的化合物1的晶型A治疗39天。治疗通过以10ml/kg体重的容量口服管饲(p.o.)。在给药前即时评估体重并且相应地调整给药体积。每周两次在两个维度上使用卡尺测量肿瘤体积(在该研究中从接种后第11天可测量)。使用下式计算肿瘤体积: $V=0.5 \times (a \times b^2)$,其中a和b分别是肿瘤的长径和短径。使用斯氏T-检验(student T-test)进行统计学分析。 $P<0.05$ 被认为是统计学上显著的。在整个研究持续期间一个人负责肿瘤测量。还每周两次记录体重。在研究的持续期间还每天监控小鼠毒性的临床指征。

结果:

[0175] 晶型A的体内功效在NOD/SCID小鼠中皮下生长的TMD-8DLBCL异种移植植物中进行检查。在每日两次(BID)在不同的剂量水平以良好耐受方式每日口服给予之后,化合物1的晶型A诱导剂量依赖性抗肿瘤作用。在最低剂量测试的化合物1的晶型A已经显示强的抗肿瘤活性。在整个研究中所有治疗组对动物体重没有显著影响。

测试6:系统性REC-1异种移植植物模型中晶型A的功效研究

肿瘤移植方法:

[0176] 动物以环磷酰胺(在盐水中制备,150mpk腹腔注射)和双硫仑(在0.8%TW-80于盐水中制备,125mpk口服管饲,每一剂环磷酰胺后1小时)预处理2天,每天一次。然后在第二剂环磷酰胺后24小时向动物接种REC-1细胞。移植当天,将细胞培养基替换为新鲜培养基。4小时后,移去培养基并且如上所述收集细胞。将细胞重新悬浮于冷的(4℃)PBS中得到最终浓度为 1×10^8 个细胞/ml。移植前,将重悬的细胞置于冰上。经由尾静脉向每只动物注射在100μl的细胞悬浮液中的 1×10^7 个细胞。

[0177] 对于体内功效研究,从细胞接种后第8天开始,将动物随机分成期望数量的组,每组10只小鼠。小鼠一天两次(BID)以媒介物(0.5%羧甲基纤维素(CMC)+0.2%Tween 80)、不

同剂量水平的化合物1的晶型A治疗71天。所有剂量在接种后第78天停止。治疗通过以10ml/kg体重的容量口服管饲(p.o.)。在给药前即时评估体重并且相应地调整给药体积。每周两次记录体重(从第33天起变为每周三次)。在研究持续期间还每天观察小鼠的疾病的临床指征。研究结束时全部存活。在严重毒性作用诸如运动丧失的情况下,对小鼠实施安乐死并评定为死亡。

[0178] 对于数据分析:通过Kaplan-Meier方法进行存活分析。存活时间定义为从肿瘤细胞接种日到动物死亡或被实施安乐死的时间。对于各组,计算平均存活时间(MST)、具有95%置信区间的存活时间的范围(RST)和寿命的增加(ILS)。平均存活定义为当50%的小鼠已经死亡时的时间。ILS使用下式计算:

$$\% \text{ ILS} = (\text{MST} - \text{MST}_{\text{媒介物}}) / \text{MST}_{\text{媒介物}} \times 100$$

使用Gehan-Breslow-Wilcoxon监测在各组之间进行统计学分析。 $P < 0.05$ 被认为是统计学上显著的。

结果:

[0179] 化合物1的晶型A显示出针对NOD/SCID小鼠中系统性REC-1MCL嫁接物的剂量依赖性抗肿瘤活性。化合物1的晶型A在该异种移植模型中是显著有效的。

测试7:晶型A的毒理学

[0180] 实施综合的非临床毒性研究项目,包括在大鼠和犬中的28天GLP研究和一些探究性研究来评价化合物1的晶型A在不同剂量的临床前安全性。这些研究考虑到对于抗癌药物的临床前开发可获得的管理指导。在这些研究中,化合物1展示出有利的毒理学和安全性药理学特性。在整个研究中,在任何剂量水平上没有发生测试项目相关的死亡。

在整个研究中,在临床化学或凝结(coagulation)中没有记录毒理学上显著的变化。在恢复期后没有记录这些变化。

测试8:晶型A的药物动力学

[0181] 经充分验证的LC-MS/MS方法可很好地用于Sprague-Dawley大鼠和小猎犬中在单剂量给予和多剂量给予后化合物1的晶型A的药物动力学(PK)研究。

[0182] 化合物1的晶型A在大鼠中具有良好的口服生物利用度。它在大鼠中很快被吸收并展现出高的血浆清除率(CL)。在雌性大鼠中,动力学相对于剂量范围上是线性的。雄性大鼠的线性度不足够好。在雄性和雌性大鼠中,在多次口服给药后没有统计学上显著累计化合物1。化合物1的晶型A在剂量范围上展现适度的清除率(CL)、相当好的生物利用度(F%)、相对于剂量范围的线性PK,且在犬中多次口服给药后没有化合物1的积累。

测试9:晶型A的ADME

[0183] 化合物1广泛分布至各种组织,但在脑组织中低,表明该药物不容易穿过血脑屏障。

[0184] 在人肝微粒体中确定化合物1的晶型A对于7种主要药物代谢CYP同工酶(CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A)的 IC_{50} 值并且还评价了化合物1对主要CYP同工酶上的时间依赖抑制潜能。对于CYP2C8($IC_{50} = 4.03 \mu\text{M}$)、CYP2C9($IC_{50} = 5.69 \mu\text{M}$)和CYP2C19($IC_{50} = 7.58 \mu\text{M}$)显示弱抑制,但是对于其他CYP同工酶抑制较低。化合物1对于这7种主要的人CYP上不太可能是时间依赖性CYP抑制剂。CYP3A是人肝微粒体中负责代谢的主要CYP同工型。

实施例12临床试验研究

(1) 在患有晚期B细胞恶性肿瘤的患者中化合物1的正在进行的1期临床试验结果

[0185] 化合物1的首先在人中 (first-in-human) 的多中心、开放标签的1期试验在澳大利亚和新西兰进行,并由两个部分——涉及25位患者的剂量递增阶段和剂量扩张阶段构成,其中我们计划招募总计100位患者。招募总计39位患者,包括来自最初递增增加部分的全部25位患者和来自正在进行的剂量扩张部分的14位患者。基于化合物1在剂量扩张阶段中的药物动力学、药效学、安全性和功效。在正在进行的剂量扩张试验中进一步探索320mg每天一次 (QD) 和160mg每天两次 (BID)。

[0186] 2015年10月19日,数据分析的截止日期,已经观察到29个客观响应,包括3个完全响应 (CR)、1个非常好的部分响应 (VGPR) 和25个部分响应 (PR)。组织学的响应总结在表18中。39位患者中的31位仍然进行研究治疗,没有进展,包括到目前为止所有实现客观响应的患者。

[0187] 表18患者的组织学响应

	随访天数 中值(范围)	最佳响应				ORR (CR + PR)
		CR	PR	SD	PD	
慢性淋巴细胞性白血病	220 (83-329)	0/14 (0%)	13/14 ¹ (93%)	1/14 (7%)	0 (0%)	13/14 (93%)
套细胞淋巴瘤	148 (84-392)	2/10 (20%)	6/10 (60%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	8/10 (80%)
瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症	271 (11-398)	0/7 (0%)	6/7 ² (86%)	0/7 (0%)	1/7 (14%)	6/7 (86%)
DLBCL	29 (20-236)	1/4 (25%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)
惰性 NHL	233 (215-250)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
毛细胞白血病	362	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
伯基特样淋巴瘤	84	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)

¹包括五位在最新评估中具有淋巴球增多的患者;²包括一位具有VGPR的患者

注:CR=完全响应;PR=部分响应;SD=病情稳定 (stable disease);PD=进行性疾病;
ORR=客观响应率

[0188] 8位患者中止使用化合物1,包括6位由于疾病发展且2位由于与他们潜在的恶性肿瘤相关的不良事件。3位患者在研究期间由于疾病进展或疾病进展的并发症的原因而死亡。没有药物相关的严重不良事件 (SAE)。不良事件的绝大多数,不管与治疗的关系,在严重性

上为1级或2级且不是治疗限制性的。在 ≥ 3 级AE的19位中,4位由研究者评估为可能为药物相关的-所有的均为自限性中性粒细胞减少,不需要治疗中止。有一例大出血,定义为3级或更高级出血事件或者任何等级的颅内出血事件:在具有GI道的淋巴瘤参与的套细胞淋巴瘤患者中的GI出血;该出血事件在停药(drug hold)期间发生,并且在重新开始化合物1治疗后快速解决,并且因此不被认为是药物相关的。6位患者具有心房纤颤/颤振(AF)的基线史,并且没有报道恶化或新的AF事件。

(2) 在患瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)的患者中化合物1的正在进行的1期临床试验结果

[0189] 化合物1在B细胞恶性肿瘤中的多中心、开放标签的1期试验在澳大利亚、新西兰、韩国和美国进行,且在由包括治疗未经治疗和复发性/难治性的瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(R/R WM)的疾病特异性队列中由剂量递增阶段和剂量扩张阶段构成。试验的剂量递增阶段测试范围在40mg至320mg的每日总剂量,且进行中的剂量扩张部分为160mg每天两次(BID)或320mg每天一次(QD)的测试剂量。在2017年3月31日,48位患者登记参加研究。根据经修正的第六届WM国际研讨会(IWWM)标准确定响应。

[0190] 到目前为止,化合物1显示对于化合物1相关的毒性耐受良好,没有停止。不良事件(AE)在严重性和自限性中一般是轻度的。在48位患者中可评价为安全的任何归因的最频发的AE($> 10\%$)为瘀点/紫癜/挫伤(35%)、上呼吸道感染(31%)、便秘(25%)、腹泻(19%)、鼻出血(19%)、恶心(17%)、咳嗽(15%)、贫血(15%)、头疼(15%)、中性粒细胞减少(13%)和皮疹(13%),其中所有在严重性均在1级或2级,除了3级或4级的贫血和中性粒细胞减少(各为8%)以及3级或4级的腹泻和头疼(各为2%)。5例严重的AE被评估为可能与化合物1相关;这些包括胸腔积血、心房纤颤、结肠炎、发热性中性粒细胞减少和头疼各1例。在受到特别关注的AE中,总计有3例心房纤颤(均为1级或2级)和1例严重的出血(胸腔积血),定义为3级或更高级的出血或任何等级的中央神经系统出血。3个事件导致治疗中止:支气管扩张、前列腺腺癌和幽门腺癌各1例。

[0191] 在数据截止时,42位患者可用于响应的评价。不可评价功效的患者包括2位随访时间小于12周的患者,3位基线IgM $< 500\text{mg/dl}$ 的患者和1位由于冷沉蛋白基线IgM不精确的患者。在12.3个月(4.4-30.5个月)的中值随访时,ORR为90%(38/42位患者)且主要响应率为76%(32/42位患者),其中在43%(18/42)的患者具有VGPR且在33%(14/42)的患者中具有部分响应。

(3) 在患慢性淋巴细胞性白血病和小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)的患者中化合物1的正在进行的1期临床试验结果

[0192] 化合物1在患有B细胞恶性肿瘤的患者中的多中心、开放标签的1期试验在澳大利亚、新西兰、韩国和美国进行,且在由包括治疗未经治疗(TN)和复发性/难治性(R/R) CLL/SLL的疾病特异性队列中由剂量递增阶段和剂量扩张阶段构成。试验的剂量递增阶段测试范围在40mg至320mg的每日总剂量,且进行中的剂量扩张部分为160mg每天两次(BID)或320mg每天一次(QD)的测试剂量。在2017年3月31日,69位患有CLL或SLL的患者(18TN,51R/R)登记参加研究。

[0193] 化合物1显示为在CLL/SLL中耐受良好。任何归因的大多数频发不良事件(AE)($\geq 10\%$)为瘀点/紫癜/挫伤(46%)、疲劳(29%)、上呼吸道感染(28%)、咳嗽(23%)、腹泻

(22%)、头疼(19%)、血尿(15%)、恶心(13%)、皮疹(13%)、关节痛(12%)、肌肉痉挛(12%)和尿路感染(12%);所有这些事件为1级或2级,除了1例3级紫癜(皮下出血),其为仅有的主要出血事件。另外的受关注的不良事件包括2级腹泻和2级心房纤颤各1例。总计18例严重AE(SAE)发生在13位患者中,其中在不止1位患者中没有SAE发生。仅1位患者由于AE,即2级胸腔积液而中止治疗。

[0194] 在数据截止时,66位患者(16TN和50R/R)具有超过12周的随访并可评价其功效,并且3位另外的患者具有小于12周的随访。在10.5个月(2.2-26.8个月)的中值随访时,总响应率(ORR)为94%(62/66),其中在3%(2/66)的患者中完全响应(CR),在82%(54/66)的患者中部分响应(PR)且在9%(6/66)的患者中具有淋巴细胞增多的PR(PR-Ls)。在5%t3/66的患者中观察到病情稳定(SD)。具有胸腔积液的患者在第12周前中止治疗且不可用于响应的评价。有1例霍奇金转化。在TN CLL/SLL中,在7.6个月(3.7-11.6个月)的中值随访时间,ORR为100%(16/16),其中在6%(1/16)的患者中CR,在81%(13/16)的患者中PR且在13%(2/16)的患者中PR-L。在R/R CLL/SLL中,在14.0个月(2.2-26.8个月)的中值随访时间,ORR为92%(46/50),其中在2%(1/50)的患者中CR,在82%(41/50)的患者中PR且在8%(4/50)的患者中PR-L。在6%(3/50)患者中观察到病情稳定。

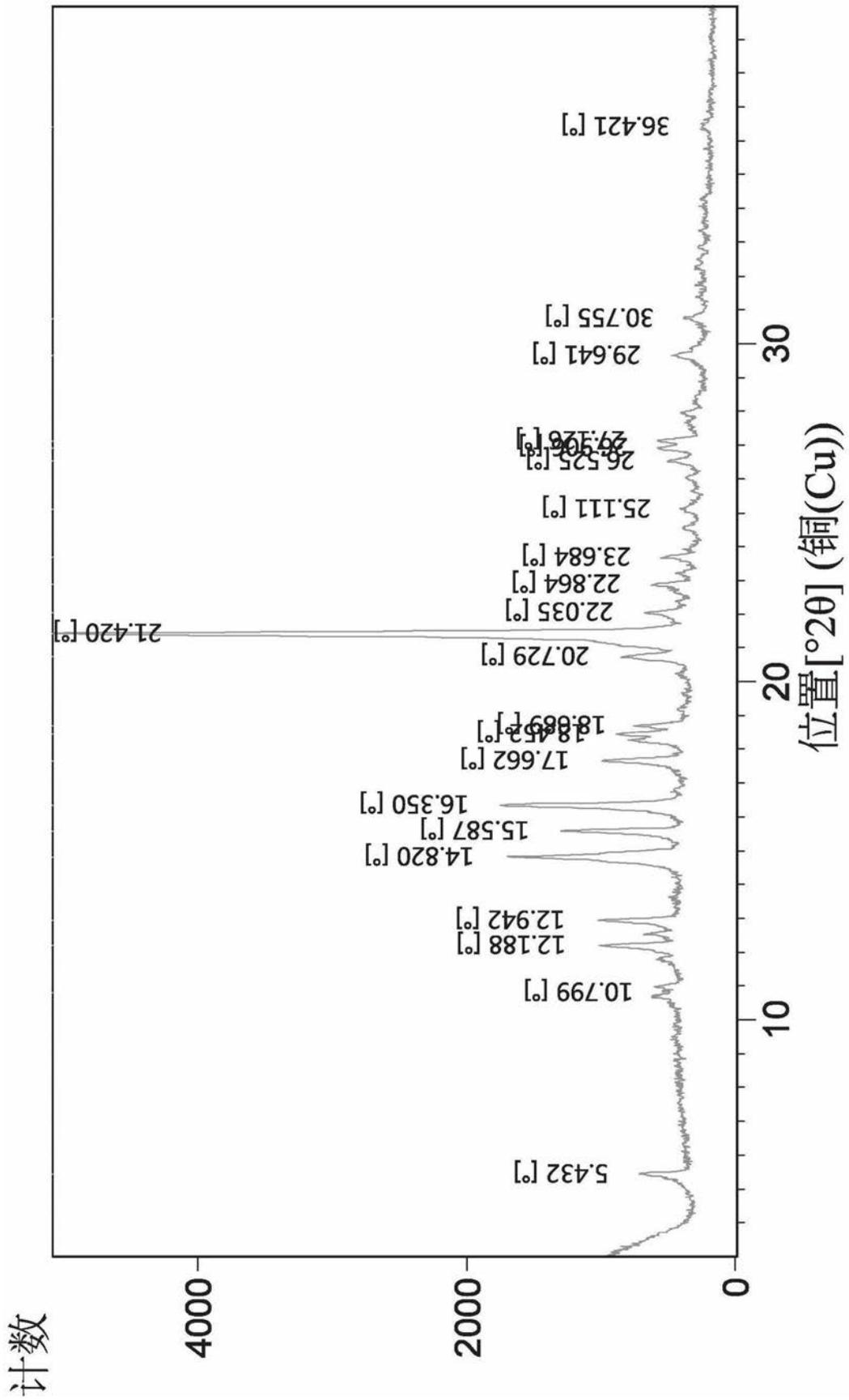


图1

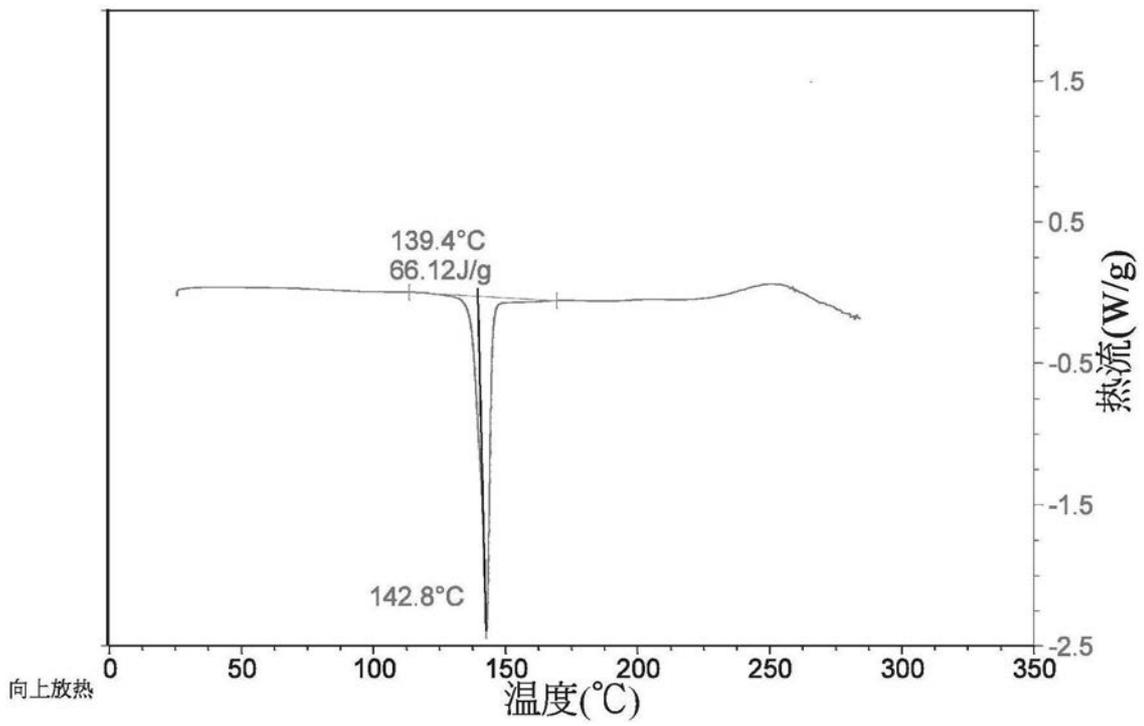


图2

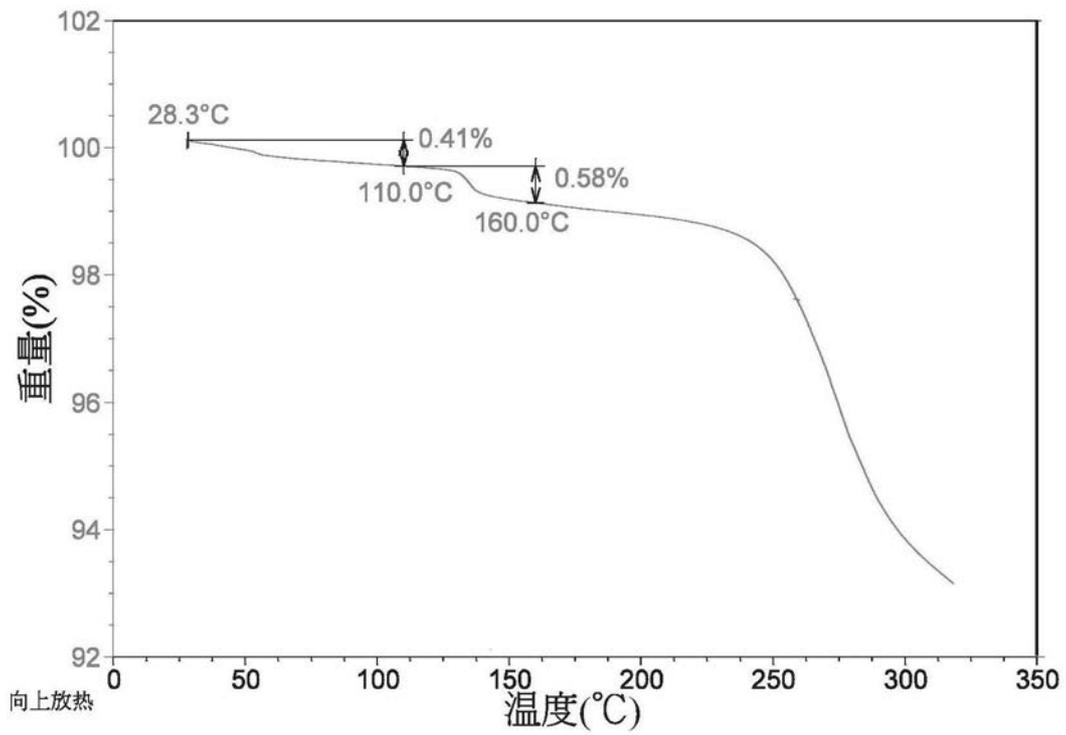


图3

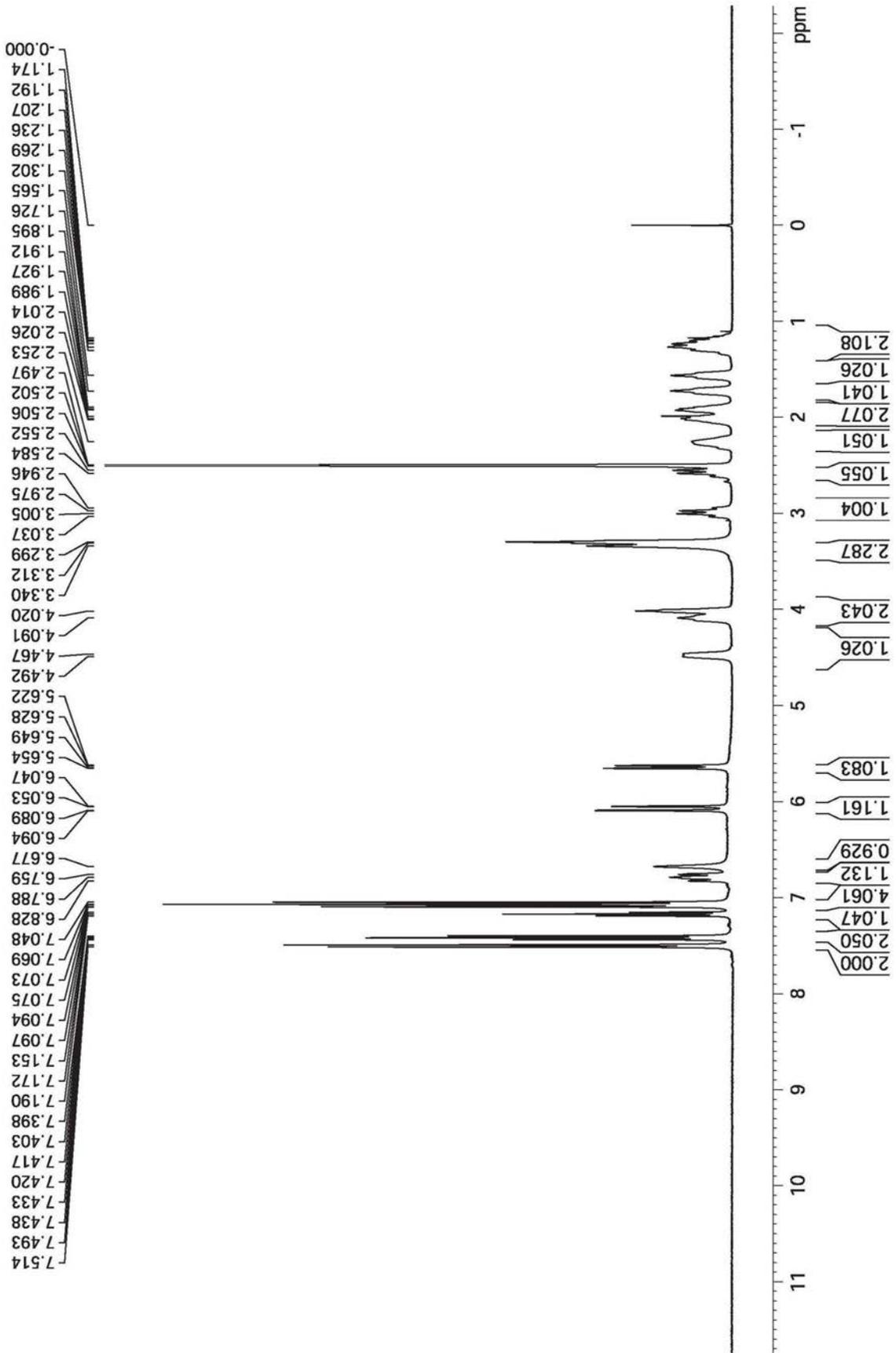


图4

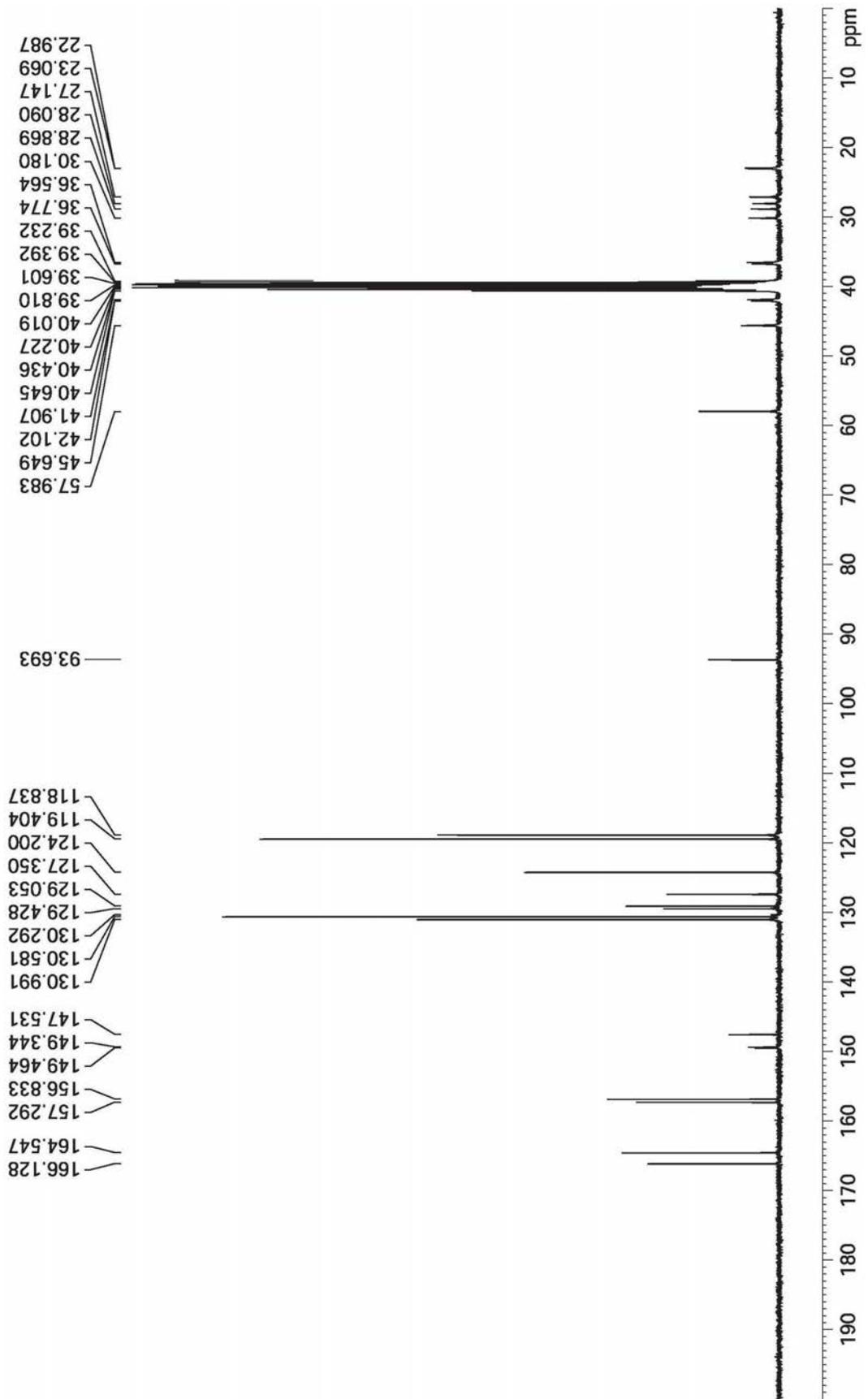


图5

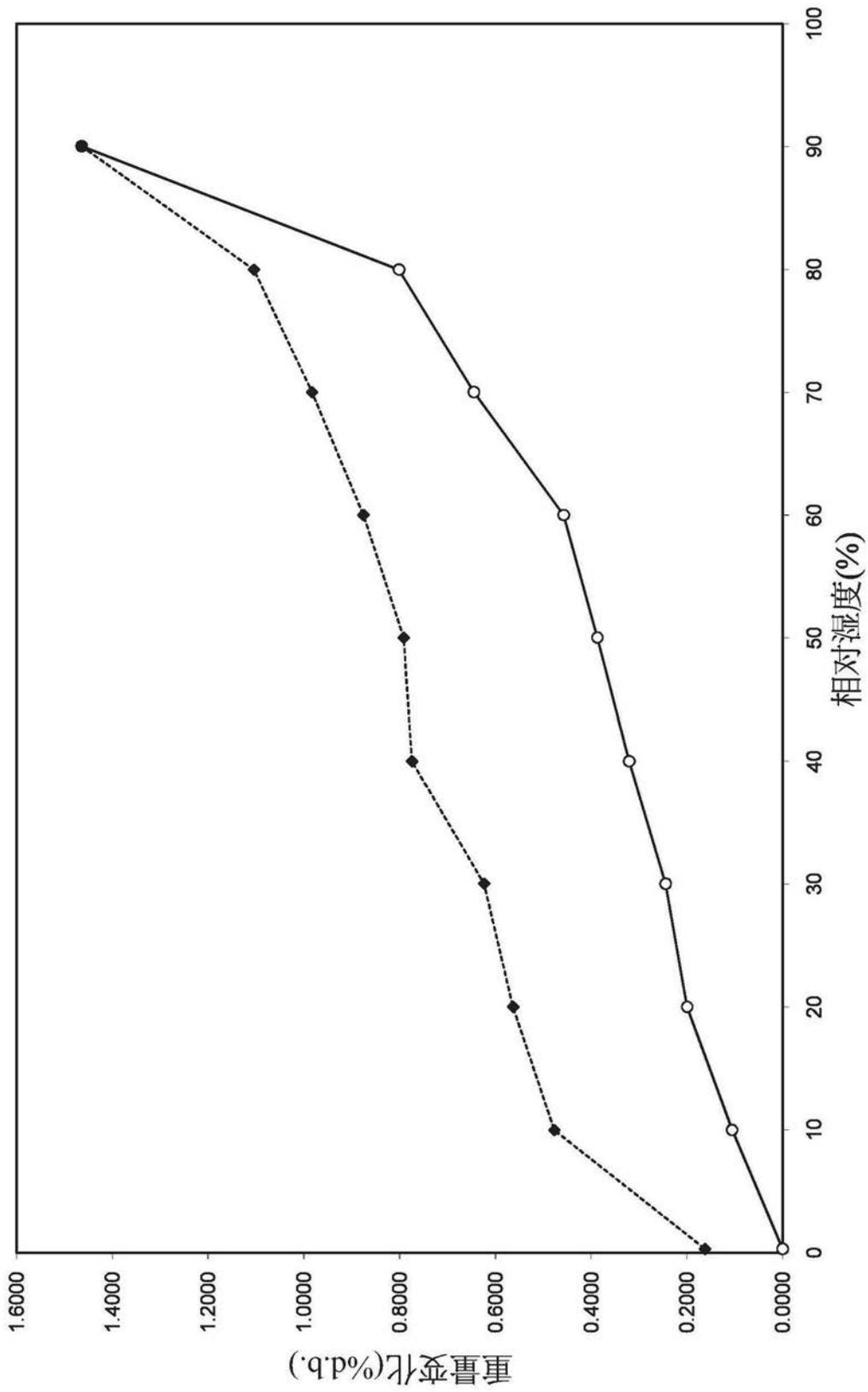


图6

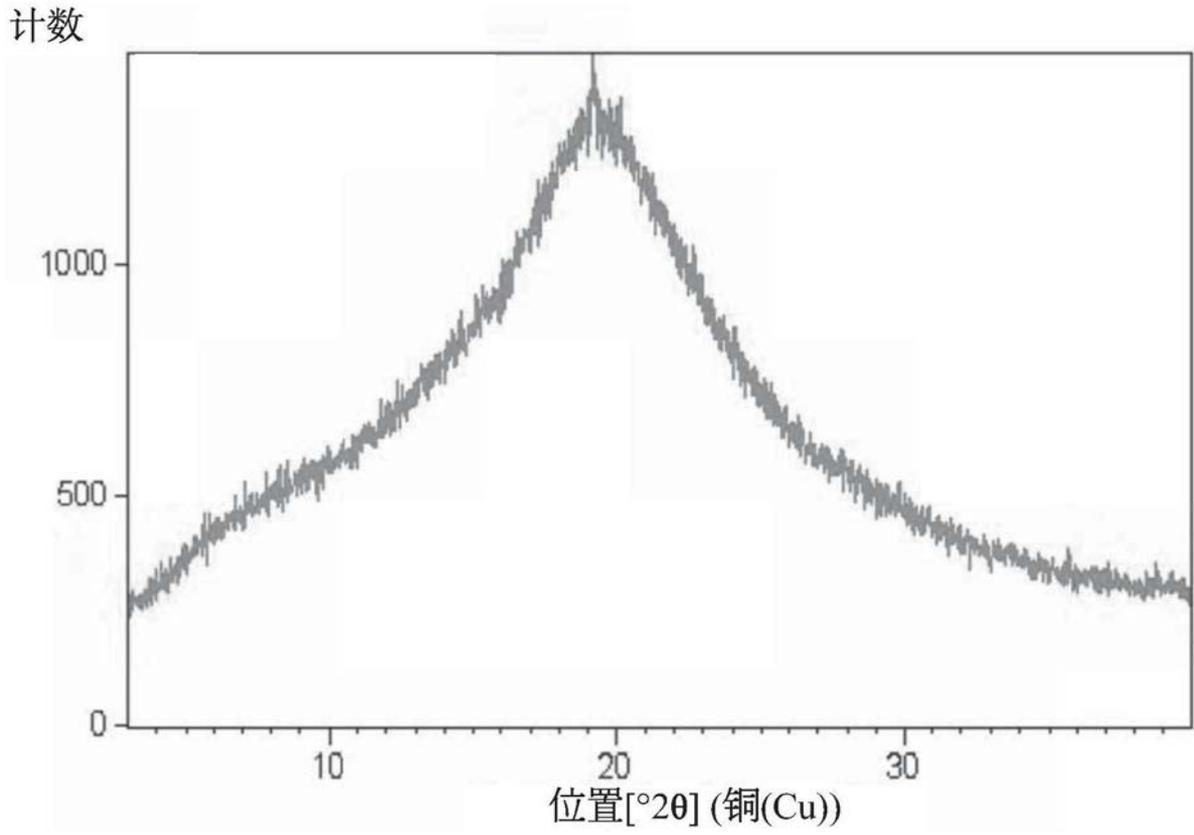


图7A

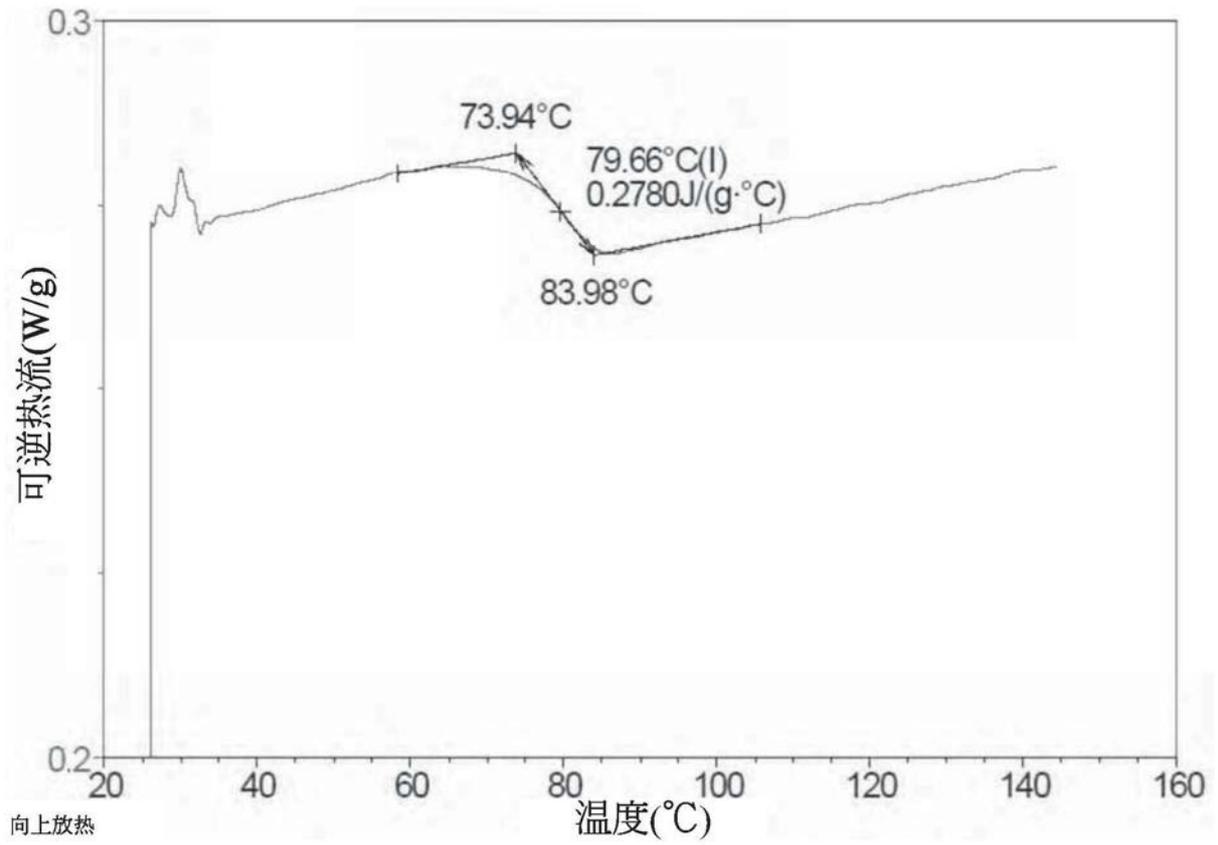


图7B

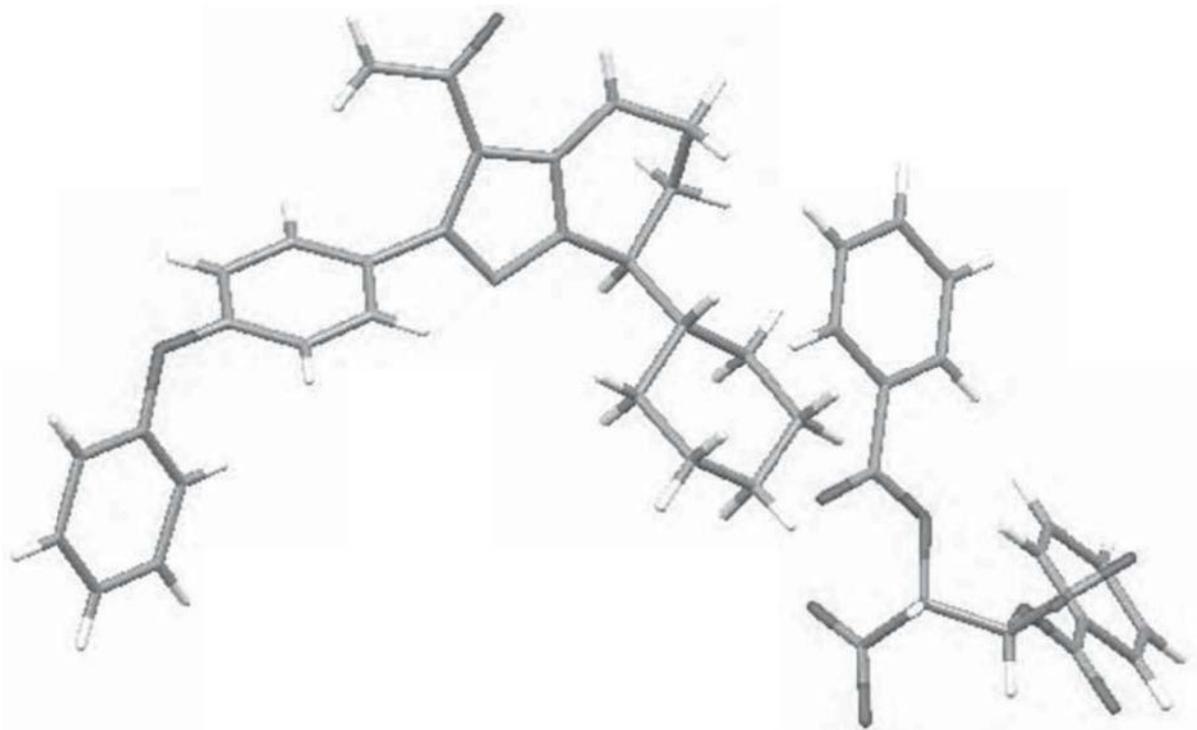


图8

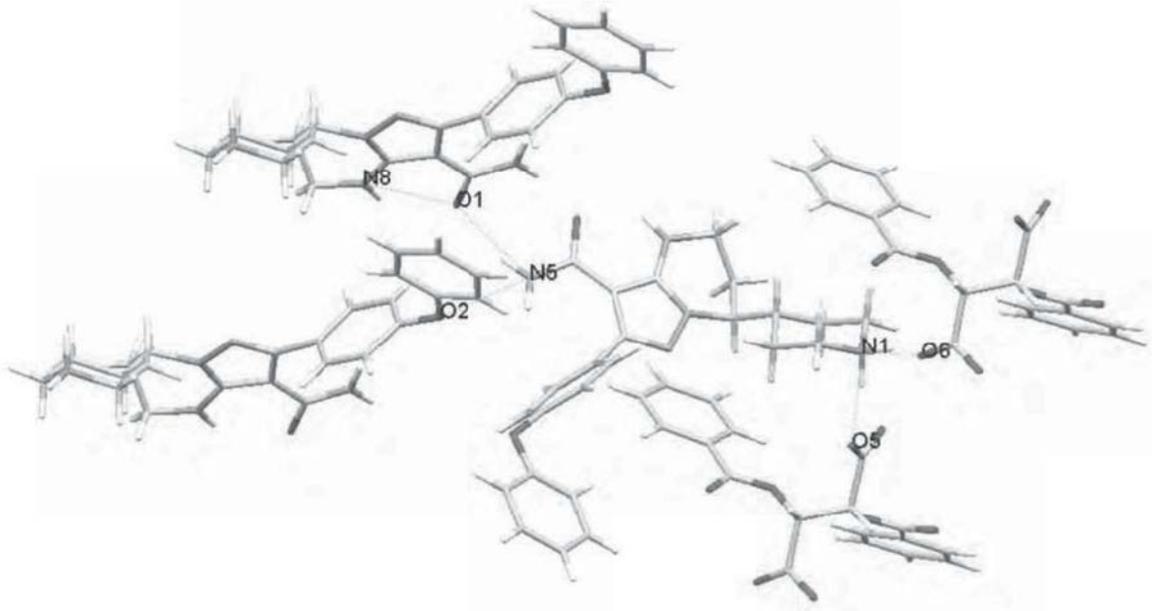


图9

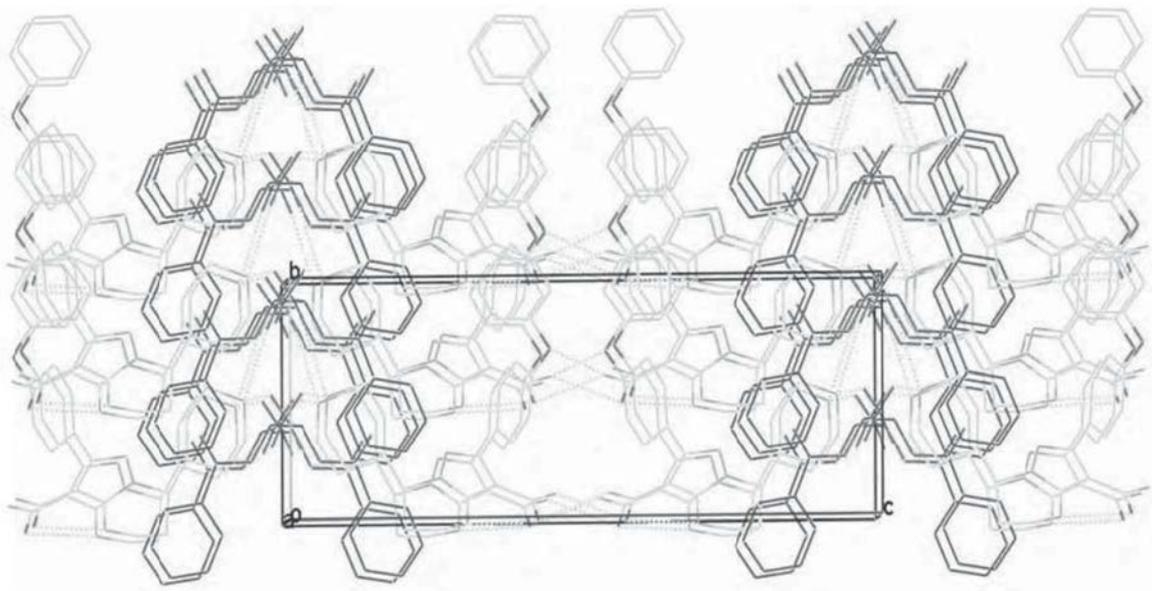


图10

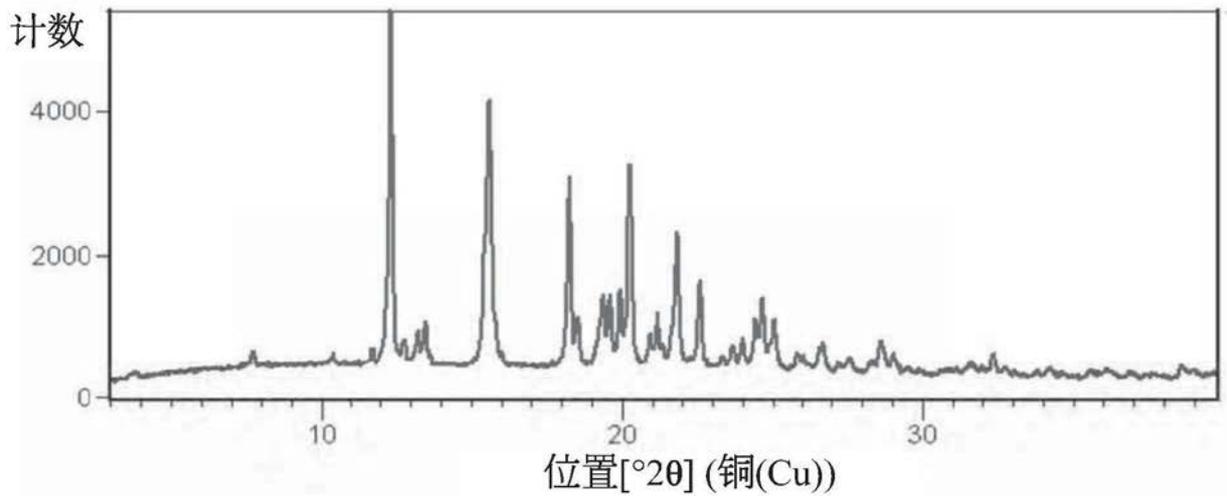


图11