



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114644618 A

(43) 申请公布日 2022.06.21

(21) 申请号 202011521011.6

(22) 申请日 2020.12.21

(71) 申请人 广州润尔眼科生物科技有限公司
地址 510627 广东省广州市天河区黄埔大道西100号之一1108房(仅限办公)

(72) 发明人 葛坚 王延东 刘奕志 吴凌云
尤旭 肖哲明 陈曙辉

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 王卫彬 何敏清

(51) Int. Cl.

C07D 401/12 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

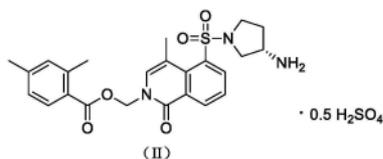
权利要求书2页 说明书15页 附图4页

(54) 发明名称

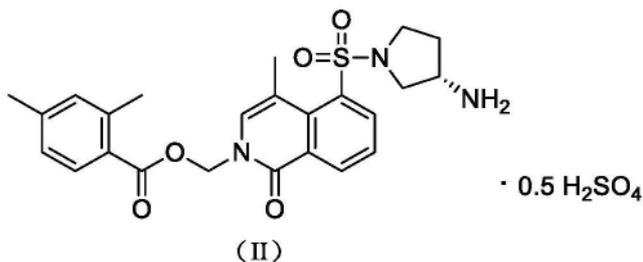
一种作为ROCK蛋白激酶抑制剂的异喹啉酮型化合物的盐型及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种作为ROCK蛋白激酶抑制剂的异喹啉酮型化合物的盐型及其制备方法,还包括所述盐型在制备治疗青光眼或高眼压症疾病的药物中的应用。



1. 式 (II) 化合物。



2. 式 (II) 化合物的A晶型,其特征在于其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $6.33\pm 0.20^\circ$, $10.62\pm 0.20^\circ$, $13.11\pm 0.20^\circ$ 。

3. 根据权利要求2所述的A晶型,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $3.30\pm 0.20^\circ$, $6.33\pm 0.20^\circ$, $10.62\pm 0.20^\circ$, $12.57\pm 0.20^\circ$, $13.11\pm 0.20^\circ$, $17.85\pm 0.20^\circ$, $18.51\pm 0.20^\circ$, $20.99\pm 0.20^\circ$ 。

4. 根据权利要求3所述的A晶型,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: 3.30° , 6.33° , 6.55° , 10.62° , 12.57° , 13.11° , 14.20° , 16.37° , 17.85° , 18.51° , 19.56° , 20.99° , 25.53° , 26.35° 。

5. 根据权利要求4所述的A晶型,其XRPD图谱如图1所示。

6. 根据权利要求2~5任意一项所述的A晶型,其差示扫描量热曲线在 $235.9^\circ\text{C}\pm 3.0^\circ\text{C}$ 处具有一个吸热峰的起始点。

7. 根据权利要求6所述的A晶型,其DSC图谱如图2所示。

8. 根据权利要求2~5任意一项所述的A晶型,其热重分析曲线在 $160.0\pm 3.0^\circ\text{C}$ 时失重达7.70%。

9. 根据权利要求8所述的A晶型,其TGA图谱如图3所示。

10. 式 (II) 化合物的B晶型,其特征在于其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $16.48\pm 0.20^\circ$, $16.95\pm 0.20^\circ$, $21.87\pm 0.20^\circ$ 。

11. 根据权利要求10所述的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: $9.69\pm 0.20^\circ$, $12.12\pm 0.20^\circ$, $16.48\pm 0.20^\circ$, $16.95\pm 0.20^\circ$, $17.94\pm 0.20^\circ$, $19.23\pm 0.20^\circ$, $20.37\pm 0.20^\circ$, $21.87\pm 0.20^\circ$ 。

12. 根据权利要求11所述的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: 4.80° , 9.69° , 12.12° , 14.61° , 16.48° , 16.95° , 17.94° , 19.23° , 20.37° , 21.87° , 27.53° , 28.72° , 33.61° 。

13. 根据权利要求12所述的B晶型,其XRPD图谱如图4所示。

14. 根据权利要求10~13任意一项所述的B晶型,其差示扫描量热曲线在 $239.5\pm 3.0^\circ\text{C}$ 处具有一个吸热峰的起始点。

15. 根据权利要求14所述的B晶型,其DSC图谱如图5所示。

16. 根据权利要求10~13任意一项所述的B晶型,其热重分析曲线在 $200.0\pm 3.0^\circ\text{C}$ 时失重达1.30%。

17. 根据权利要求16所述的B晶型,其TGA图谱如图6所示。

18. 式 (II) 化合物B晶型的制备方法,包括:

(a) 将式 (II) 化合物A晶型加入溶剂中形成混悬液;

(b) 将上述混悬液在50℃下搅拌3小时,过滤,干燥;

其中,所述溶剂选自异丙醇、四氢呋喃、乙腈、2-丁酮和乙酸乙酯。

19. 根据权利要求1所述化合物或权利要求2~9任意一项所述A晶型或权利要求10~17任意一项所述B晶型或根据权利要求18的方法制备得到的晶型在制备治疗青光眼或高眼压症疾病的药物中的应用。

一种作为ROCK蛋白激酶抑制剂的异喹啉酮型化合物的盐型及其制备方法

技术领域

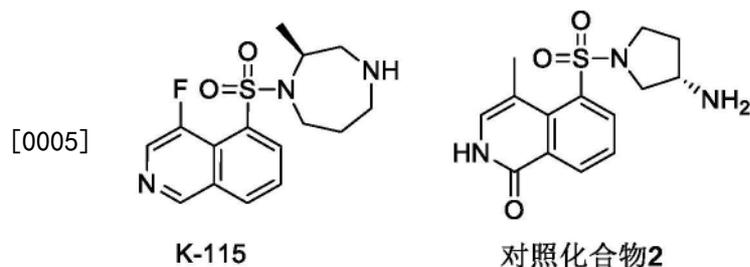
[0001] 本发明涉及一种作为ROCK蛋白激酶抑制剂的异喹啉酮型化合物的盐型及其制备方法,还包括所述盐型在制备治疗青光眼或高眼压症疾病的药物中的应用。

背景技术

[0002] RHO相关蛋白激酶(Rho associated kinase,简称ROCK),属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是RHO的下游靶效应分子,在人体内广泛表达。RHO相关蛋白激酶(ROCK)参与肌球蛋白轻链(MLC)的调节,适用于血管舒张的治疗,ROCK激酶还可以作用于小梁流出道细胞,舒张小梁细胞,降低房水外流阻力。最新的研究显示ROCK激酶抑制剂还可以促进角膜内皮细胞的损伤修复,防止纤维化,有巨大的应用前景。

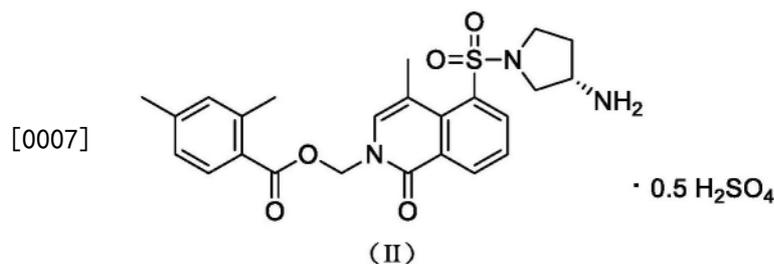
[0003] 异喹啉磺酰胺类化合物是一类重要的ROCK激酶抑制剂,目前已经上市的法舒地尔和K-115(专利W02006057397A1)均是异喹啉磺酰胺类化合物。其中法舒地尔是一种具有广泛药理作用的新型药物,为RHO激酶抑制物,通过增加肌球蛋白轻链磷酸酶的活性扩张血管,降低内皮细胞的张力,改善脑组织微循环,不产生和加重脑的盗血,同时可拮抗炎性因子,保护神经抗凋亡,促进神经再生。而K-115的获批的和潜在的应用非常广泛,包括青光眼,高眼压,糖尿病视网膜损伤并发症,老年黄斑变性,角膜损伤,白内障和青光眼手术后的恢复等等,同时可能进一步拓展至系统性药物。

[0004] 专利W02007026664A1报道了一系列具有ROCK激酶抑制作用的化合物,比如对照化合物2,该系列化合物具有较好的酶活性,但是它们在透膜性、药代动力学、成药性的等方面有待改进。本发明报道了一类通过结构修饰的类似化合物,显著地改善了这方面的性质。



发明内容

[0006] 本发明提供了式(II)化合物。



[0008] 本发明还提供式(II)化合物的A晶型,其特征在于其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $6.33\pm 0.20^\circ$, $10.62\pm 0.20^\circ$, $13.11\pm 0.20^\circ$ 。

[0009] 在本发明的一些方案中,上述A晶型的X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $3.30\pm 0.20^\circ$, $6.33\pm 0.20^\circ$, $10.62\pm 0.20^\circ$, $12.57\pm 0.20^\circ$, $13.11\pm 0.20^\circ$, $17.85\pm 0.20^\circ$, $18.51\pm 0.20^\circ$, $20.99\pm 0.20^\circ$ 。

[0010] 在本发明的一些方案中,上述A晶型的X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: 3.30° , 6.33° , 6.55° , 10.62° , 12.57° , 13.11° , 14.20° , 16.37° , 17.85° , 18.51° , 19.56° , 20.99° , 25.53° , 26.35° 。

[0011] 在本发明的一些方案中,上述A晶型,其XRPD图谱如图1所示。

[0012] 在本发明的一些方案中,上述A晶型的XRPD图谱解析数据如表1所示:

[0013] 表1式(II)化合物A晶型的XRPD图谱解析数据

编号	2 θ 角 ($^\circ$)	面间距 (\AA)	强度 (计数)	相对强度 (%)	编号	2 θ 角 ($^\circ$)	面间距 (\AA)	强度 (计数)	相对强度 (%)
1	3.30	26.76	348.60	43.99	8	16.37	5.42	178.19	22.49
2	6.33	13.95	779.58	98.38	9	17.85	4.97	228.61	28.85
[0014] 3	6.55	13.50	475.77	60.04	10	18.51	4.79	198.30	25.02
4	10.62	8.33	562.38	70.97	11	19.56	4.54	192.79	24.33
5	12.57	7.04	226.50	28.58	12	20.99	4.23	232.26	29.31
6	13.11	6.76	792.44	100.00	13	25.53	3.49	170.02	21.46
7	14.20	6.24	122.94	15.51	14	26.35	3.38	149.03	18.81

[0015] 在本发明的一些方案中,上述A晶型的差示扫描量热曲线在 $235.9^\circ\text{C}\pm 3.0^\circ\text{C}$ 处具有一个吸热峰的起始点。

[0016] 在本发明的一些方案中,上述A晶型的DSC图谱如图2所示。

[0017] 在本发明的一些方案中,上述A晶型的热重分析曲线在 $160.0\pm 3.0^\circ\text{C}$ 时失重达7.70%。

[0018] 在本发明的一些方案中,上述A晶型的TGA图谱如图3所示。

[0019] 本发明还提供式(II)化合物的B晶型,其特征在于其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $16.48\pm 0.20^\circ$, $16.95\pm 0.20^\circ$, $21.87\pm 0.20^\circ$ 。

[0020] 在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: $9.69\pm 0.20^\circ$, $12.12\pm 0.20^\circ$, $16.48\pm 0.20^\circ$, $16.95\pm 0.20^\circ$, $17.94\pm 0.20^\circ$, $19.23\pm 0.20^\circ$, $20.37\pm 0.20^\circ$, $21.87\pm 0.20^\circ$ 。

[0021] 在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: 4.80° , 9.69° , 12.12° , 14.61° , 16.48° , 16.95° , 17.94° , 19.23° , 20.37° , 21.87° , 27.53° , 28.72° , 33.61° 。

[0022] 在本发明的一些方案中,上述B晶型,其XRPD图谱如图4所示。

[0023] 在本发明的一些方案中,上述B晶型的XRPD图谱解析数据如表2所示:

[0024] 表2式(II)化合物B晶型的XRPD图谱解析数据

编号	2θ角 (°)	面间距 (Å)	强度 (计数)	相对强度 (%)	编号	2θ角 (°)	面间距 (Å)	强度 (计数)	相对强度 (%)
1	4.80	18.4	192.63	11.68	8	19.23	4.62	250.69	15.20
2	9.69	9.13	490.29	29.73	9	20.37	4.36	319.43	19.37
3	12.12	7.30	499.73	30.30	10	21.87	4.06	983.84	59.65
4	14.61	6.06	47.37	2.87	11	27.53	3.24	41.99	2.55
5	16.48	5.38	1649.30	100.00	12	28.72	3.11	159.82	9.69
6	16.95	5.23	1212.17	73.50	13	33.61	2.67	55.60	3.37
7	17.94	4.94	228.71	13.87					

[0025] [0026] 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 $239.5 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ 处具有一个吸热峰的起始点。

[0027] 在本发明的一些方案中,上述B晶型的DSC图谱如图5所示。

[0028] 在本发明的一些方案中,上述B晶型的热重分析曲线在 $200.0 \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ 时失重达1.30%。

[0029] 在本发明的一些方案中,上述B晶型的TGA图谱如图6所示。

[0030] 本发明还提供式(II)化合物B晶型的制备方法,包括:

[0031] (a) 将式(II)化合物A晶型加入溶剂中形成混悬液;

[0032] (b) 将上述混悬液在 50°C 下搅拌3小时,过滤,干燥。

[0033] 其中,所述溶剂选自异丙醇、四氢呋喃、乙腈、2-丁酮和乙酸乙酯。

[0034] 在本发明的一些方案中,上述式(II)化合物、A晶型和B晶型在制备ROCK蛋白激酶抑制剂相关药物上的应用。

[0035] 在本发明的一些方案中,上述式(II)化合物、A晶型和B晶型在制备治疗青光眼或高眼压症疾病的药物中的应用。

[0036] 技术效果

[0037] 式(I)化合物显著提高了活性药物的暴露量,同时,血药峰值浓度和作用时间均显著提高;在急性高眼压模型中,式(I)化合物在不同的测试剂量下都展示了良好的降压效果,同时具有一定的剂量相关性,降压幅度和持续作用时间均优于K-115;式(I)化合物具有优异的药效(最高降压效果和作用时间);式(I)化合物具有高系统安全性。

[0038] 定义和说明

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 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。

[0042] 本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构,如果本发明涉及化合物的绝对构型,则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶X射线衍射法(SXRD),把培养出的单晶用Bruker D8 venture衍射仪收集衍射强度数据,光源为CuK α 辐射,扫描方式: ϕ/ω 扫描,收集相关数据后,进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构,便可以确证绝对构型。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 本发明采用下述缩略词:r.t.代表室温;THF代表四氢呋喃;NMP代表N-甲基吡咯烷酮;MeSO₃H代表甲磺酸;DME代表乙二醇二甲醚;DCM代表二氯甲烷;Xphos代表2-双环己基膦-2' 4' 6'-三异丙基联苯;EtOAc代表乙酸乙酯;MeOH代表甲醇;acetone代表丙酮;2-Me-THF代表2-甲基四氢呋喃;IPA代表异丙醇。

[0046] 化合物依据本领域常规命名原则或者使用ChemDraw®软件命名,市售化合物采用供应商目录名称。本发明X射线粉末衍射(X-ray powder diffractometer,XRPD)方法

[0047] 仪器型号:PANalytical X'pert³ X射线粉末衍射仪

[0048] 测试方法:大约10mg样品用于XRPD检测。

[0049] 详细的XRPD参数如下:

[0050] 射线源:Cu, K α 1=1.540598 Å;Cu, K α 2=1.544426 Å

[0051] 光管电压:40kV,光管电流:40mA

[0052] 扫描范围:3-40deg

[0053] 步宽角度:0.0263deg

[0054] 步长:46.665秒

[0055] 本发明差热分析(Differential Scanning Calorimeter,DSC)方法

[0056] 仪器型号:TA2500差示扫描量热仪

[0057] 测试方法:取样品(~1-5mg)置于DSC铝盘内进行测试,铝盘压盖不扎孔,在50mL/min N₂条件下,以10°C/min的升温速率,加热样品从25°C(室温)到样品分解前。

[0058] 本发明热重分析(Thermal Gravimetric Analyzer,TGA)方法

[0059] 仪器型号:TAQ5000热重分析仪

[0060] 测试方法:取样品(~1-5mg)置于TGA铝盘内敞口进行测试,在10~25mL/min N₂条件下,以10°C/min的升温速率,加热样品从室温到350°C。

[0061] 本发明动态气体吸附分析(Dynamic Vapor Sorption,DVS)方法

[0062] 仪器型号:SMS DVS intrinsic动态气体吸附仪

[0063] 动态水分吸附实验由吸附和解吸附组成。通常认为在一个设定的相对湿度下,当样品重量 $dm/dt \leq 0.01\%$ 时,便认为样品在该相对湿度下对水分的吸附或解吸附已达到平衡。

[0064] 样品测试温度:T=25°C

[0065] 平衡时间:dm/dt:0.01%/min.

[0066] 相对湿度变化范围:0%~95%~0%;RH(%)测试每步湿度变化:5%

[0067] 引湿性评价分类如下:

[0068] 吸湿性分类	$\Delta W\%$
易潮解的	吸附足够多的水份成液体状
非常吸湿的	$\Delta W\% \geq 15\%$
吸湿的	$15\% > \Delta W\% \geq 2\%$
轻微吸湿的	$2\% > \Delta W\% \geq 0.2\%$
不吸湿的	$\Delta W\% < 0.2\%$

[0069] 注: $\Delta W\%$ 表示受试品在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $80 \pm 2\% \text{RH}$ 下的吸湿增重。

附图说明

[0070] 图1为(II)化合物A晶型的Cu-K α 辐射的XRPD谱图;

[0071] 图2为(II)化合物A晶型的DSC谱图;

[0072] 图3为(II)化合物A晶型的TGA谱图;

[0073] 图4为(II)化合物B晶型的Cu-K α 辐射XRPD谱图;

[0074] 图5为(II)化合物B晶型的DSC谱图;

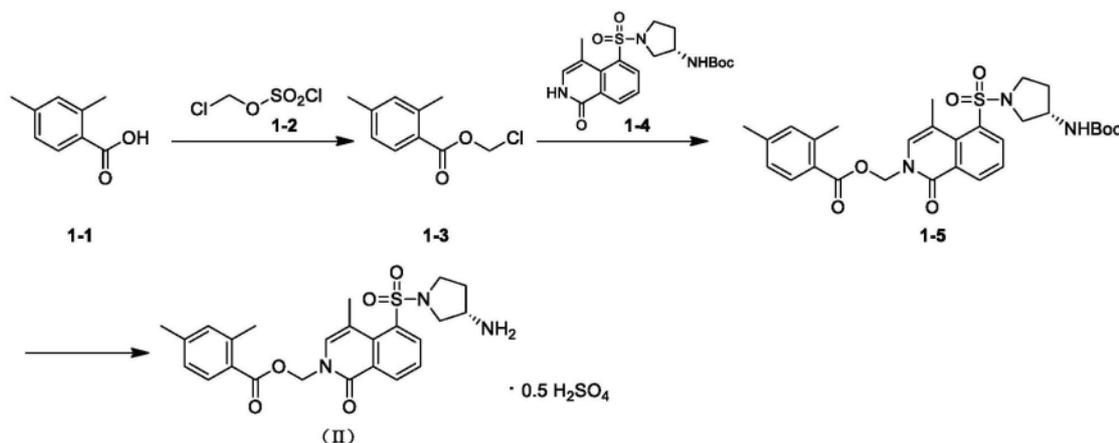
[0075] 图6为(II)化合物B晶型的TGA谱图;

[0076] 图7为(II)化合物B晶型的DVS谱图。

具体实施方式

[0077] 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。

[0078] 实施例1:式(II)化合物A晶型的制备



[0080] 第一步

[0081] 开启搅拌和氮气保护,依次将二氯甲烷(8.6L),水(8.6L),起始原料1-1(575.34g)加入到反应釜中。控制反应釜内温为 $10-15^\circ\text{C}$,依次向反应釜中加入碳酸氢钠(1289.36g),四丁基硫酸氢铵(133.87g)和起始原料1-2(760.25g),控制内温为 $10-15^\circ\text{C}$ 并搅拌2小时。将反应液静置分层,将有机相减压浓缩至无馏分流出为止。将浓缩液转移至三口瓶中并控制内温为 $60-70^\circ\text{C}$ 搅拌12小时后,自然冷至室温,粗产品用硅胶快速过滤后并用二氯甲烷冲洗

至无产品残留。将洗脱液减压浓缩至约1.2L后,用1%的碳酸氢钠水溶液(3L)洗涤,有机相用无水硫酸钠(500g)干燥,过滤后在将有机相减压浓缩至无馏分流出为止,得到中间体1-3不经纯化直接用于下一步。

[0082] MS-ESI计算值[M+H]⁺199,实测值199。

[0083] ¹H NMR(400MHz,CD₃Cl) δ7.81-7.79(d,J=8Hz,1H),7.01-6.95(m,2H),5.84(s,2H),2.52(s,3H),2.27(s,3H)。

[0084] 第二步

[0085] 将2-甲基四氢呋喃(9702mL)加入反应釜,开启搅拌并控制内温为10-20℃,再依次加入1-4(1078.26g),碳酸铯(1017.63g)和中间体1-3(631.71g)。将反应釜内温升至57-63℃搅拌2小时40分钟后停止反应。将反应釜内温降至15-25℃后向反应液中加入水(10.78L),搅拌后静置分层,所得水相用2-甲基四氢呋喃萃取两次(5390mL×2),将合并的有机相减压浓缩至约2.2L。向浓缩液中加入丙酮(1078mL)和正庚烷(2156mL)并继续浓缩至无馏分流出后至无馏分流出,即可得到松散固体。控制内温为10-30℃,将该固体用混合溶剂(11.0495L,丙酮:正庚烷=1:40)打浆搅拌三次,过滤并用正庚烷(1078mL)漂洗。滤饼真空减压干燥至恒重,得中间体1-5。

[0086] MS-ESI计算值[M+H]⁺570,实测值570。

[0087] ¹H NMR(400MHz,CD₃Cl) δ8.86-8.78(m,1H),8.13-8.04(m,1H),7.93-7.86(m,1H),7.58-7.49(m,1H),7.39-7.32(m,1H),7.09-6.99(m,2H),6.14(s,2H),4.86-4.76(m,1H),4.42-4.30(m,1H),3.73-3.61(m,2H),3.57-3.47(m,1H),3.46-3.37(m,1H),2.76-2.67(m,3H),2.59(s,3H),2.39-2.29(m,4H),2.09-1.97(m,1H),1.46(s,9H)。

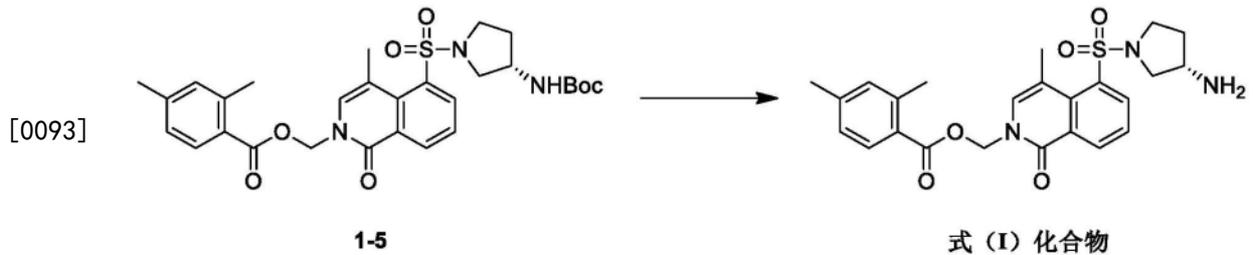
[0088] 第三步

[0089] 控制内温为20-30℃向5L三口瓶中依次加入无水四氢呋喃(4.24L)和浓硫酸(712.43g),搅拌均匀后备用。控制内温为20-30℃向反应釜中依次加入1-5(1062.15g)和四氢呋喃(4.24L),搅拌均匀后向体系中滴加预先配置好的硫酸四氢呋喃溶液,随后将反应内温控制在35-45℃搅拌4小时,体系中逐渐析出大量白色沉淀。向反应釜中缓慢加入甲基叔丁基醚(8.48L)内温控制在20-30℃并搅拌0.5小时,过滤后的固体在20-30℃下用混合溶剂(甲基叔丁基醚/四氢呋喃=10.6L/10.6L)及甲基叔丁基醚(21.2L)依次打浆0.5小时后,再依次用水打浆五次(21.2L×5),至滤液pH为7左右。控制内温为20-30℃,将该固体依次在甲基叔丁基醚(15.9L)和混合溶剂(甲基叔丁基醚/四氢呋喃=10.6L/5.3L)中打浆后,经过滤、漂洗及在45℃以下真空干燥得到式(II)化合物A晶型。经离子色谱检测,硫酸根的含量为9.17%,由此可以推断出式(II)化合物中还有0.5个硫酸盐。

[0090] MS-ESI计算值[M+H]⁺470,实测值470。

[0091] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ8.64-8.58(m,1H),8.26(d,J=8Hz,1H),7.74-7.62(m,3H),7.16-7.11(m,1H),7.11-7.05(m,1H),6.08(s,2H),3.94-3.89(m,1H),3.70-3.55(m,2H),3.55-3.44(m,1H),3.43-3.27(m,1H),2.59(s,3H),2.48-2.45(m,3H),2.35-2.29(m,1H),2.29-2.24(m,3H),2.16-1.90(m,1H)。

[0092] 实施例2:式(I)化合物的制备



[0094] 将化合物1-5 (2.2g, 3.84mmol) 溶于乙酸乙酯 (35mL) 中, 向反应液中加入盐酸乙酸乙酯溶液 (4M, 20mL) 并且在15℃下搅拌12小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液调节pH值为8, 用乙酸乙酯 (60mL×2) 萃取, 有机相用无水硫酸钠 (5g) 干燥, 过滤, 减压浓缩得到的粗品经过高效液相色谱法 (中性体系) 纯化得到式 (I) 化合物。MS-ESI计算值 $[M+H]^+$ 470, 实测值470。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ = 8.71 (dd, J = 1.4, 8.0Hz, 1H), 8.24 (dd, J = 1.5, 7.8Hz, 1H), 7.81 (d, J = 7.9Hz, 1H), 7.64 (t, J = 7.9Hz, 1H), 7.54 (d, J = 0.9Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.05 (d, J = 7.9Hz, 1H), 6.14 (s, 2H), 3.77-3.62 (m, 3H), 3.59-3.50 (m, 1H), 3.20 (dd, J = 4.9, 9.5Hz, 1H), 2.70 (d, J = 0.9Hz, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.30-2.23 (m, 1H), 1.96-1.86 (m, 1H)。

[0095] 实施例3: 式 (II) 化合物B晶型的制备

[0096] 称适量 (II) 化合物A晶型于样品瓶中, 加入一定体积表4中的溶剂, 制备不同单一溶剂的悬浊液或溶液。混悬液在50℃条件下持续搅拌3小时后, 样品过滤并将滤出的固体放入真空干燥箱, 在45℃条件下真空干燥去除残留溶剂。

[0097] 表3式 (II) 化合物B晶型制备

[0098]

编号	溶剂	样品量	溶剂体积	状态	晶型
1	异丙醇	100	2.0	混悬液	B晶型
2	四氢呋喃	100	2.0	混悬液	B晶型
3	乙腈	101	2.0	混悬液	B晶型
4	2-丁酮	100	2.0	混悬液	B晶型
5	乙酸乙酯	101	2.0	混悬液	B晶型

[0099] 实施例4: 式 (II) 化合物B晶型的吸湿性研究

[0100] 实验材料:

[0101] SMS DVS intrinsic动态气体吸附仪

[0102] 实验方法:

[0103] 取式 (II) 化合物B晶型10~15mg置于DVS样品盘内进行测试。

[0104] 实验结果:

[0105] 式 (II) 化合物B晶型的DVS谱图如图4所示, $\Delta W = 0.736\%$ 。

[0106] 实验结论:

[0107] 式 (II) 化合物B晶型在25℃和80%RH下的吸湿增重为0.736%, 有轻微吸湿性。

[0108] 生物测试实验

[0109] 实验例1. 房水中药代动力学测试

[0110] 实验目的:

[0111] 化合物为含有酯基官能团的前药分子, 滴眼给药时经眼组织中丰富的酯水解酶作

用可水解为活性药物分子(母药)。本实验检测化合物在体内产生活性药物成分的速度和活性药物成分暴露量。

[0112] 实验材料:

[0113] 雄性新西兰大白兔,月龄3-6月,体重2.0-5.0kg,购自邳州东方养殖有限公司。

[0114] 滴眼样品配置:

[0115] 使用溶媒为1.2%羟丙基甲基纤维素E5/20.5%泊洛沙姆P407/1.6%泊洛沙姆P188。

[0116] 实验操作:

[0117] 滴眼给药剂量为0.5mg/眼,双眼滴眼给药。给药后0.25h,0.5h,2h,4h,8h,24h采集房水,制备房水样品。所有样品运用液相色谱偶联质谱质谱联用技术对给药化合物在实验动物房水中含量进行定量检测,所测浓度值运用WinNonlin非房室模型,根据房水浓度-时间数据,计算半衰期,房水药峰值浓度,房水药峰值时间,单位暴露量等参数。

[0118] 表4新西兰兔房水中药代动力学测试结果

供试品	房水药峰值浓度 (nM)	半衰期 (h)	房水药峰值时间 (h)	单位暴露量 (nM.h)
式(I)化合物	7470	2.72	2.0	36581
对照化合物2	868	--	2.0	3555

[0119] “--”:未检测。

[0120] 结论:实验结果显示,房水中未检测到供试品化合物(前药分子),而主要检测到其酯水解后的活性代谢产物(母药分子),式(I)化合物显著提高了活性药物的暴露量,同时,血药峰值浓度和作用时间均显著提高。

[0121] 实施例2.急性高血压新西兰兔的降眼压试验

[0122] 实验目的:

[0123] 采用前房注射粘弹剂诱导兔子急性高眼压,通过滴眼给药来探究式(I)化合物在不同浓度下的降眼压作用。

[0124] 实验材料:

[0125] 雄性新西兰大白兔,日龄97-127天,体重2.5-3.4kg,购自邳州东方养殖有限公司。

[0126] 实验操作:

[0127] 50只雄性新西兰大白兔,根据体重进行随机分组,共5组,10只/组。1-5组动物右眼前房一次性注射医用透明质酸钠凝胶,100 μ L/眼,诱导动物产生高眼压。造模后5~15分钟,右眼分别滴眼给予溶媒、K-115和供试品(不同浓度的式(I)化合物),左眼滴眼给予溶媒,给药体积均为50 μ L/眼,给药前,给药后2,4,6,8和10小时分别测定动物双眼眼压。实验结果见表5:

[0128] 表5各组动物造模及给药前后双眼眼压(Mean \pm SEM)的变化结果

[0130]

测量时间点 眼压测量值		给药前	给药后 2 小时	给药后 4 小时	给药后 6 小时	给药后 8 小时	给药后 10 小时
阴性对照	左眼眼压 (mmHg)	9.93	6.40	6.97	9.83	12.03	13.63
	右眼眼压 (mmHg)	10.57	8.57	14.00	17.67	16.30	15.87
K-115 4mg/mL	左眼眼压 (mmHg)	11.80	6.50	8.54	11.40	13.20	13.37
	右眼眼压 (mmHg)	11.77	8.20	11.27	15.07	15.57	16.47
式 (I) 化合物 0.25mg/mL	左眼眼压 (mmHg)	10.53	6.07	6.60	9.10	11.50	12.43
	右眼眼压 (mmHg)	11.43	8.47	8.60	11.20	13.37	13.10
式 (I) 化合物 2.0 mg/mL	左眼眼压 (mmHg)	11.27	6.60	7.04	11.23	12.84	13.10
	右眼眼压 (mmHg)	11.23	8.52	11.56	13.81	12.96	11.96
式 (I) 化合物 8.0 mg/mL	左眼眼压 (mmHg)	11.20	5.93	6.43	10.10	11.87	13.19
	右眼眼压 (mmHg)	11.53	7.40	7.97	8.84	8.60	8.78

[0131] 结论:在急性高眼压模型中,式 (I) 化合物在不同的测试剂量下都展示了良好的降压效果,同时具有一定的剂量相关性,降压幅度和持续作用时间均优于K-115。

[0132] 实验例3.14天重复滴眼给药在正常眼压新西兰兔的降眼压和眼部毒性试验

[0133] 实验目的:

[0134] 采用正常眼压的兔子,通过14天重复滴眼给药探索式 (I) 化合物的降眼压作用和潜在的眼部毒性。

[0135] 实验材料:

[0136] 雄性新西兰大白兔,日龄97-127天,体重2.63.5kg,购自邳州东方养殖有限公司。

[0137] 实验操作一:

[0138] 雄性新西兰大白兔,随机分成7组,每组6只。将依据动物体重进行随机分组。1-7组动物双眼滴眼给予溶媒/对照品/供试品,给药体积均为50 μ L/眼,每天1次,连续14天,给药当天记为第1天。第1天给药前,给药后1,2,4,6,8和10小时分别测定动物眼压,第2-14天,K-115给药组在每天给药后1小时测定眼压,其余各组在每天给药后4小时测定动物眼压。实验结果见表6、7和8:

[0139] 表6各组动物第一天给药前后双眼眼压 (Mean \pm SEM) 的变化

[0140]

测量时间点 眼压测量值		给药前	给药后 1 小时	给药后 2 小时	给药后 4 小时	给药后 6 小时	给药后 8 小时	给药后 10 小时
		阴性对照	双眼平均眼压 (mmHg)	9.89	10.31	10.97	11.31	11.94
K-115 4mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	10.83	7.72	9.00	9.67	10.56	10.28	12.81
	眼压变化 (mmHg)	-0.94	2.59	1.97	1.64	1.38	2.69	1.61
式 (I) 化 合物 0.5mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	10.11	8.83	7.56	7.11	9.61	9.06	9.97
	眼压变化 (mmHg)	-0.22	1.48	3.41	4.2	2.33	3.91	4.45
式 (I) 化 合物 1.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	9.94	7.08	6.67	6.44	8.00	9.22	10.56
	眼压变化 (mmHg)	-0.05	3.23	4.3	4.87	3.94	3.75	3.86
式 (I) 化 合物 2.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	9.67	8.56	7.47	7.47	7.25	8.44	9.67
	眼压变化 (mmHg)	0.22	1.75	3.5	3.84	4.69	4.53	4.75
式 (I) 化 合物 4.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	9.67	10.44	7.81	6.47	6.22	7.33	8.64
	眼压变化 (mmHg)	0.22	-0.13	3.16	4.84	5.72	5.64	5.78
式 (I) 化 合物 8.0 mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	10.17	7.69	6.39	7.06	7.11	7.22	7.97
	眼压变化 (mmHg)	-0.28	2.62	4.58	4.25	4.83	5.75	6.45

[0141] 表7各组动物第2-7天重复给药前后双眼眼压 (Mean±SEM) 的变化

[0142]

测量时间点 眼压测量值		第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
		阴性对照	双眼平均眼压 (mmHg)	11.08	10.39	10.61	10.97
K-115 4mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	6.83	6.81	6.92	6.67	6.75	7.39
	眼压变化 (mmHg)	4.25	3.58	3.69	4.3	2.56	2.67
式 (I) 化合物 0.5mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	7.94	7.31	7.78	7.19	6.61	6.00
	眼压变化 (mmHg)	3.14	3.08	2.83	3.78	2.7	4.06
式 (I) 化合物	双眼平均眼压	7.64	7.50	7.33	7.44	6.92	7.00

1.0mg/mL	(mmHg)						
	眼压变化 (mmHg)	3.44	2.89	3.28	3.53	2.39	3.06
式 (I) 化合物 2.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	7.03	7.25	6.86	6.47	5.92	5.78
	眼压变化 (mmHg)	4.05	3.14	3.75	4.5	3.39	4.28
式 (I) 化合物 4.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	6.53	5.58	5.53	6.61	5.47	5.56
	眼压变化 (mmHg)	4.55	4.81	5.08	4.36	3.84	4.5
式 (I) 化合物 8.0 mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	6.33	5.78	5.97	6.42	5.56	5.28
	眼压变化 (mmHg)	4.75	4.61	4.64	4.55	3.75	4.78

[0143]

[0144] 表8各组动物第8-14天重复给药前后双眼眼压 (Mean±SEM) 的变化

[0145]

测量时间点 眼压测量值		第 8 天	第 9 天	第 10 天	第 11 天	第 12 天	第 13 天	第 14 天
		阴性对照	双眼平均眼压 (mmHg)	11.31	9.44	9.75	9.69	9.53
K-115 4mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	7.53	7.78	7.94	7.94	7.89	8.25	8.50
	眼压变化 (mmHg)	3.78	1.66	1.81	1.75	1.64	3.14	2.47
式 (I) 化 合物 0.5mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	7.11	6.19	6.75	6.44	6.25	8.08	7.25
	眼压变化 (mmHg)	4.2	3.25	3	3.25	3.28	3.31	3.72
式 (I) 化 合物 1.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	7.28	6.94	7.31	7.50	6.89	8.06	7.44
	眼压变化 (mmHg)	4.03	2.5	2.44	2.19	2.64	3.33	3.53
式 (I) 化 合物 2.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	6.78	5.72	5.94	6.03	6.03	7.11	7.06
	眼压变化 (mmHg)	4.53	3.72	3.81	3.66	3.5	4.28	3.91
式 (I) 化 合物 4.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	6.78	5.47	5.08	5.83	5.89	7.03	6.33
	眼压变化 (mmHg)	4.53	3.97	4.67	3.86	3.64	4.36	4.64
式 (I) 化 合物 8.0 mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	5.72	5.19	5.56	5.53	5.56	6.67	6.94
	眼压变化 (mmHg)	5.59	4.25	4.19	4.16	3.97	4.72	4.03

[0146] 结论:式 (I) 化合物单次给药在所有的测试剂量 (0.5-8.0mg/mL) 下都展示了更加优异的药效 (最高降压效果和作用时间), 显著优于K-115。在14天连续给药的情况下, 式 (I) 化合物在0.5mg/mL剂量下可以持续的维持显著的降压效果, 在峰值 (Cmax) 降压效果的评价

中依然显著优于K-115。

[0147] 实验操作二：

[0148] 42只雄性新西兰大白兔，随机分成7组，每组6只。依据动物体重进行随机分组。1-7组动物左眼滴眼给生理盐水，右眼分别滴眼给予溶媒/对照品/供试品，给药体积均为50 μ L/眼，每天1次，连续14天，给药当天记为第1天。第1天给药前，第1天给药后1,2,4,6,8和10小时分别测定动物眼压(表8)。试验开始前(第2天/第1天)、给药期间每天给药前(第1-14天)、末次(第14天)给药后1、2、4、24、48和72小时，用手持裂隙灯对动物双眼进行眼刺激反应检查和荧光素钠检查(参考评分标准进行评分)。

[0149] 表9各组动物第一天给药前后双眼眼压(Mean \pm SEM)的变化

测量时间点 眼压测量值		给药前	给药后 1 小时	给药后 2 小时	给药后 4 小时	给药后 6 小时	给药后 8 小时	给药后 10 小时
		阴性对照	双眼平均眼压 (mmHg)	9.33	8.89	9.56	9.89	10.78
K-115 4mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	10.17	5.50	7.06	9.00	9.17	10.61	12.33
	眼压变化 (mmHg)	0.83	-3.39	-2.50	-0.89	-1.61	0.23	0.17
式(I)化合物 0.25mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	9.84	6.22	6.17	6.67	8.06	9.72	10.95
	眼压变化 (mmHg)	0.50	-2.67	-3.39	-3.22	-2.72	-0.66	-1.22
[0150] 式(I)化合物 0.5mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	9.22	5.39	5.50	6.95	8.94	9.89	11.56
	眼压变化 (mmHg)	-0.11	-3.50	-4.05	-2.94	-1.84	-0.50	-0.61
式(I)化合物 1.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	9.17	5.56	5.39	6.67	7.33	10.50	10.89
	眼压变化 (mmHg)	-0.17	-3.33	-4.17	-3.22	-3.45	0.11	-1.28
式(I)化合物 2.0mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	9.72	8.11	5.84	6.06	7.11	9.00	10.05
	眼压变化 (mmHg)	0.39	-0.78	-3.72	-3.83	-3.67	-1.39	-2.11
式(I)化合物 4.0 mg/mL	双眼平均眼压 (mmHg)	10.00	6.61	5.84	5.72	6.61	8.39	10.67
	眼压变化 (mmHg)	0.67	-2.28	-3.72	-4.17	-4.17	-2.00	-1.50

[0151] 结论:式(I)化合物单次给药在所有的测试剂量(0.25-4.0mg/mL)下都展示了更加优异的药效(最高降压效果和作用时间),显著优于K-115。

[0152] 试验开始前(第2天/第1天)、给药期间每天第一次给药前(第1-14天)以及末次药后1、2、4、24、48和72小时,用手持裂隙灯对动物双眼进行眼刺激反应检查,评分分值标准如下:

[0153]

眼刺激反应	分值
角 膜	
无混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见	3
角膜不透明，虹膜无法辨认	4
虹 膜	
正常	0
皱褶明显加深、充血、肿胀，角膜周围轻度充血，瞳孔对光仍有反应	1
出血/肉眼可见坏死/对光无反应（或其中一种）	2
结 膜	
充血（指睑结膜和球结膜）	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
水 肿	
无水肿	0
轻微水肿（含眼睑）	1
明显水肿伴部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑超过半闭合	4
分泌物	
无分泌物	0
少量分泌物	1

	眼刺激反应	分值
[0154]	分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2
	分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3
	最大总积分	16

[0155] 眼刺激反应评价:将角膜、虹膜、结膜、水肿和分泌物的最大积分相加,得到每只动物眼每个时间点眼刺激症状的总积分。对于眼刺激症状评分分值,计算每个观察时间点、每组动物的积分均值,按下表判定每个时间点、每组动物眼刺激程度。

[0156] 眼刺激性评价标准

[0157]	分值	评价
	0-3	无刺激性
	4-8	轻度刺激性
	9-12	中度刺激性
	13-16	重度刺激性

[0158] 荧光素钠检查:每次眼刺激反应检查结束后,用手持裂隙灯进行荧光素钠检查,评分分值标准如下:

	荧光染色	
	用荧光素帮助诊断角膜上皮损伤。荧光染色区域可以参照角膜混浊程度的分级分为0~4级:	
	没有荧光染色。	0
[0159]	局部小面积轻度荧光染色。弥散光观察,角膜以下眼部结构清晰可见(瞳孔边缘清晰,观察不受荧光染色影响)。	1
	局部小面积中度荧光染色。弥散光观察,尽管角膜以下眼部某些细节丢失,但结构清晰可见。	2
	染色区域比较大的明显荧光染色。弥散光观察,角膜以下眼部结构刚刚能够辨识。	3
	严重荧光染色。弥散光观察,角膜以下眼部结构不能够辨识	4

[0160] 实验结果如下:

[0161] 根据眼刺激性评价标准进行评价,各组各时间点眼刺激反应总评分小于3,按标准分类均为无刺激性。

[0162] 试验期间,各组动物生理盐水处理眼别、溶媒、K-115和式(I)化合物处理眼的荧光素钠检查评分均低于1。每组动物在各个处理和个体时间点,均出现有角膜荧光染色评分为1的染色,考虑为生理性染色。各组各时间点均未出现角膜上皮损伤。

[0163] 结论:在本试验条件下,K-115在4mg/mL浓度下,连续14天滴眼,50微升/眼/天,无

刺激性。式 (I) 化合物在 0.25~4mg/mL 浓度范围内, 连续 14 天滴眼, 50 微升/眼/天, 无刺激性。

[0164] 实验例 4. 毒代动力学实验

[0165] 实验目的:

[0166] 检测连续 14 天给药后化合物在血浆中产生活性药物成分的速度和活性药物成分暴露量。

[0167] 实验材料:

[0168] 雄性新西兰大白兔, 月龄 3-6 月, 体重 2.0-5.0kg, 购自邳州东方养殖有限公司。

[0169] 实验操作:

[0170] 连续给药 14 天后, 在第 14-15 天, 选择式 (I) 化合物 (8.0mg/mL) 给药组按采集 0 小时 (给药前) 和给药后 0.5, 1, 2, 4, 8, 和 24 小时血样。从毒代实验动物耳中动脉, 或后肢隐静脉 (或其它合适位点) 采集大约 0.8mL 全血, 置于以乙二胺四乙酸二钾 (K_2EDTA) 作为抗凝剂的贴有标签的采血管中。采血后 60 分钟内在 3000 转/分和 2°C 至 8°C 条件下离心 10 分钟获得血浆。所有样品运用液相色谱偶联质谱质谱联用技术对给药化合物在实验动物血浆中含量进行定量检测。

[0171] 表 10 连续给药 14 天后新西兰兔血浆中活性化合物的测试结果

化合物编号	时间 (小时)	浓度. (ng/mL)	
		第一组	第二组
[0172] 式 (I) 化合物	0.00	BQL	BQL
	0.50	3.63	3.44
	1.00	2.87	2.20
	2.00	1.80	1.66
	4.00	0.934	0.818
	8.00	BQL	BQL
	24.0	BQL	BQL

[0173] 注: BQL 表示低于检测限。

[0174] 结论: 式 (I) 化合物在 8mg/mL 的高剂量下, 给药 4 小时后, 其代谢产物浓度为 0.934ng/mL; 给药 8 小时后, 其代谢产物浓度低于检测限, 系统安全性高。

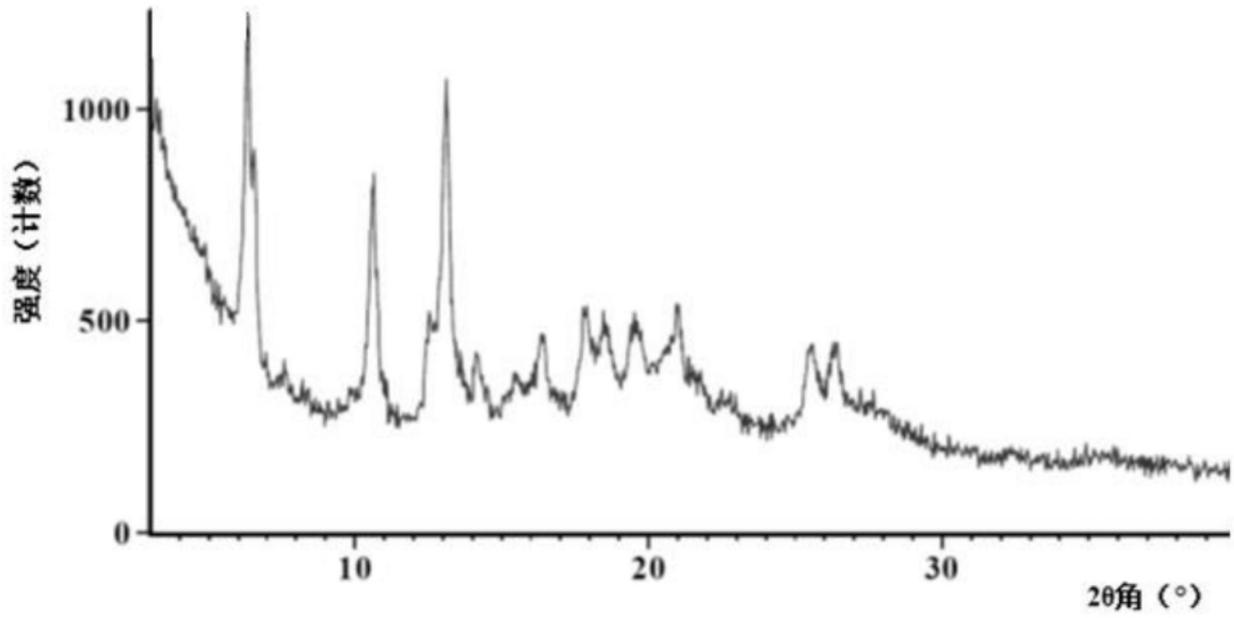


图1

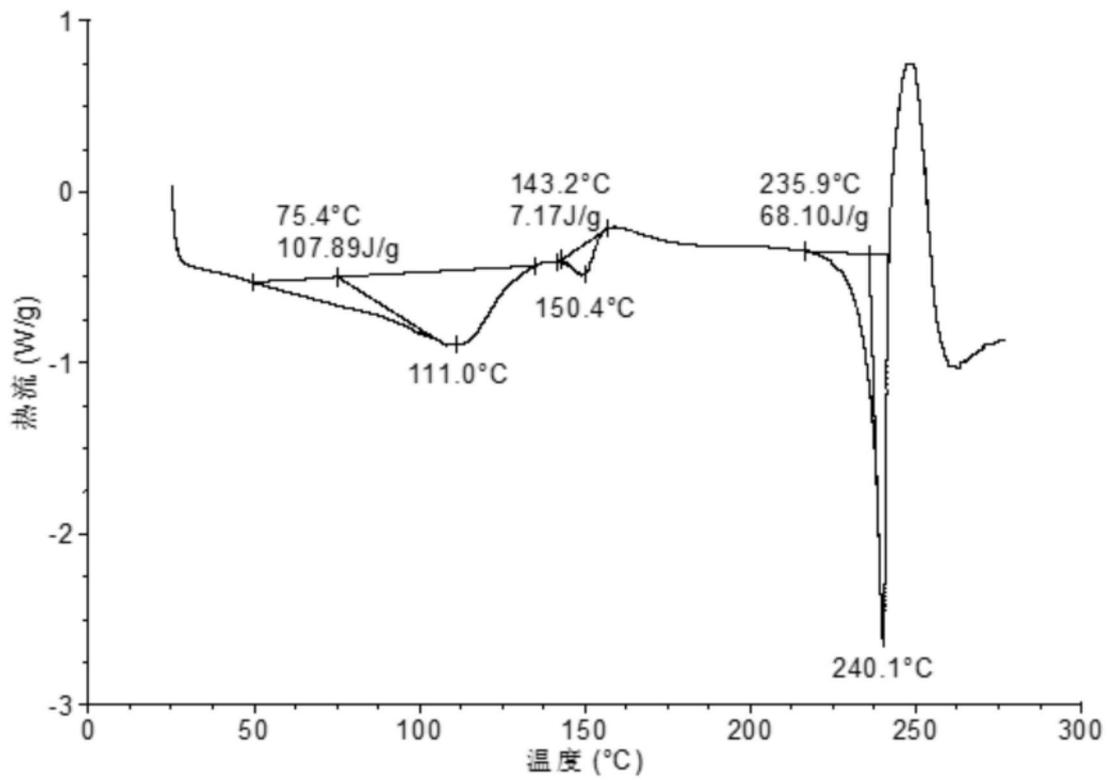


图2

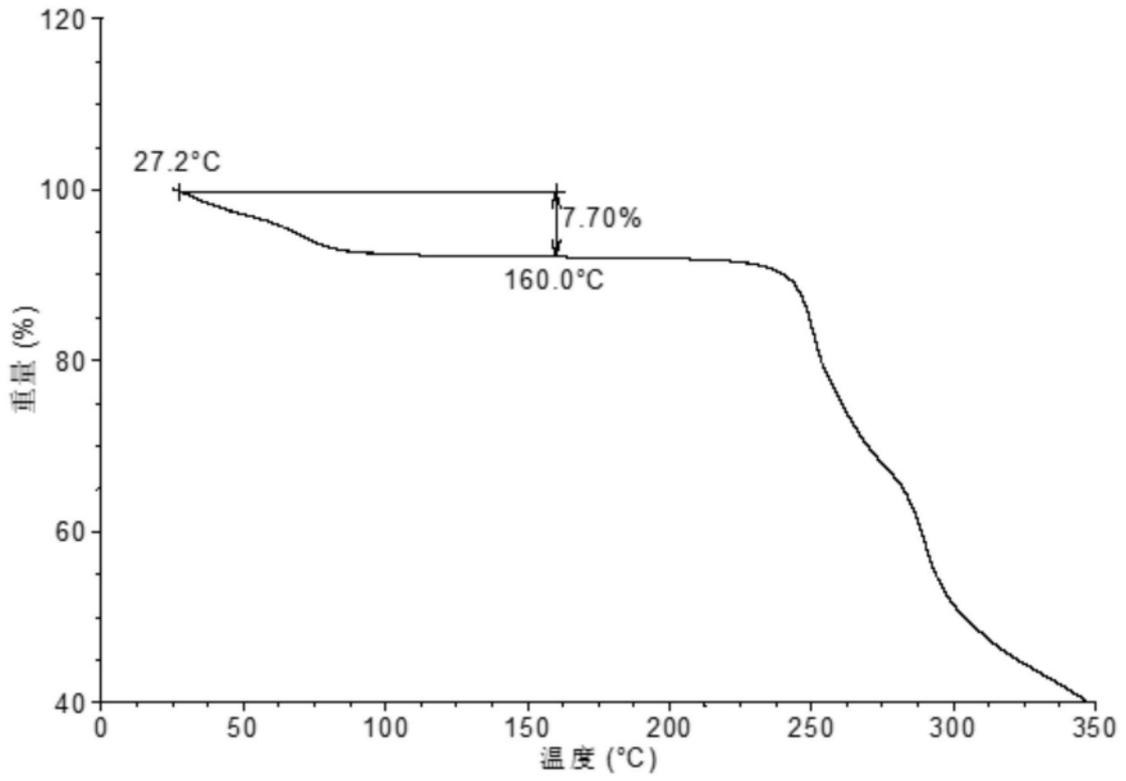


图3

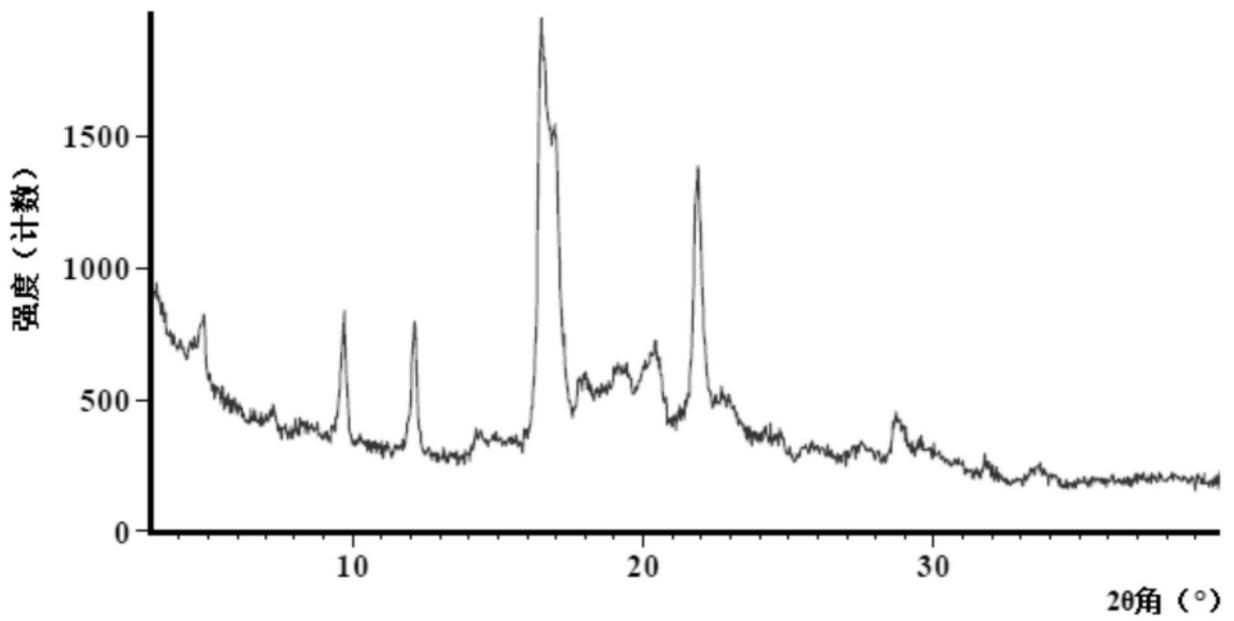


图4

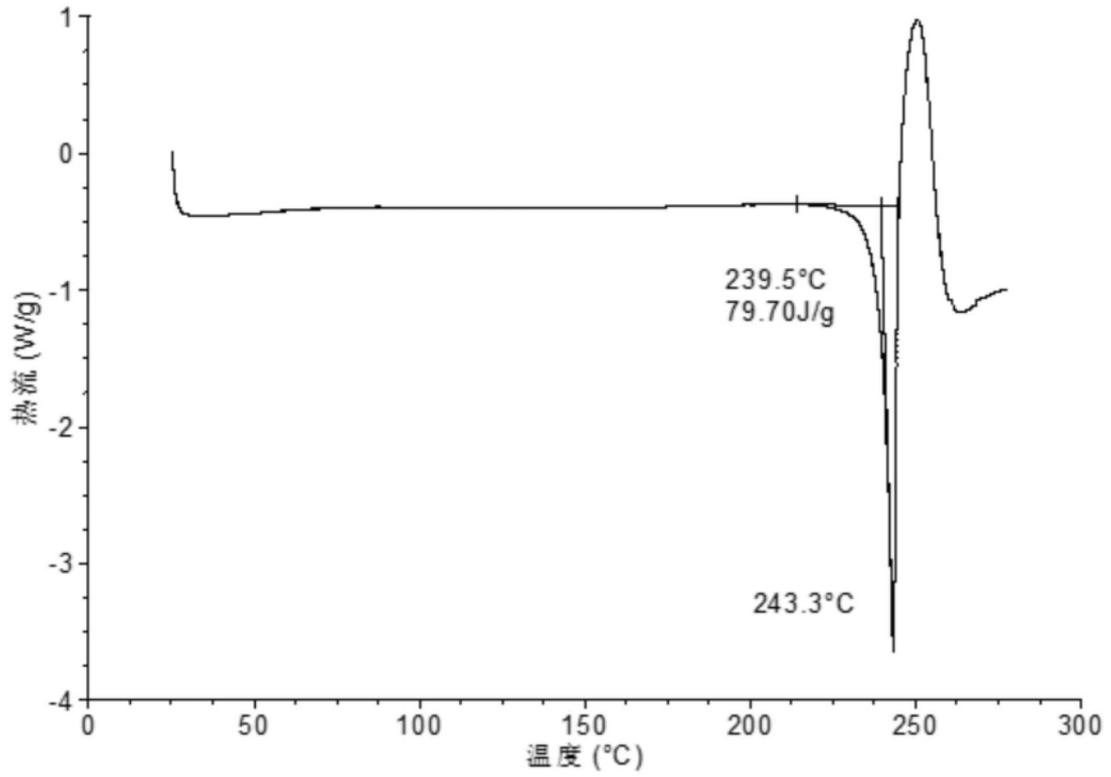


图5

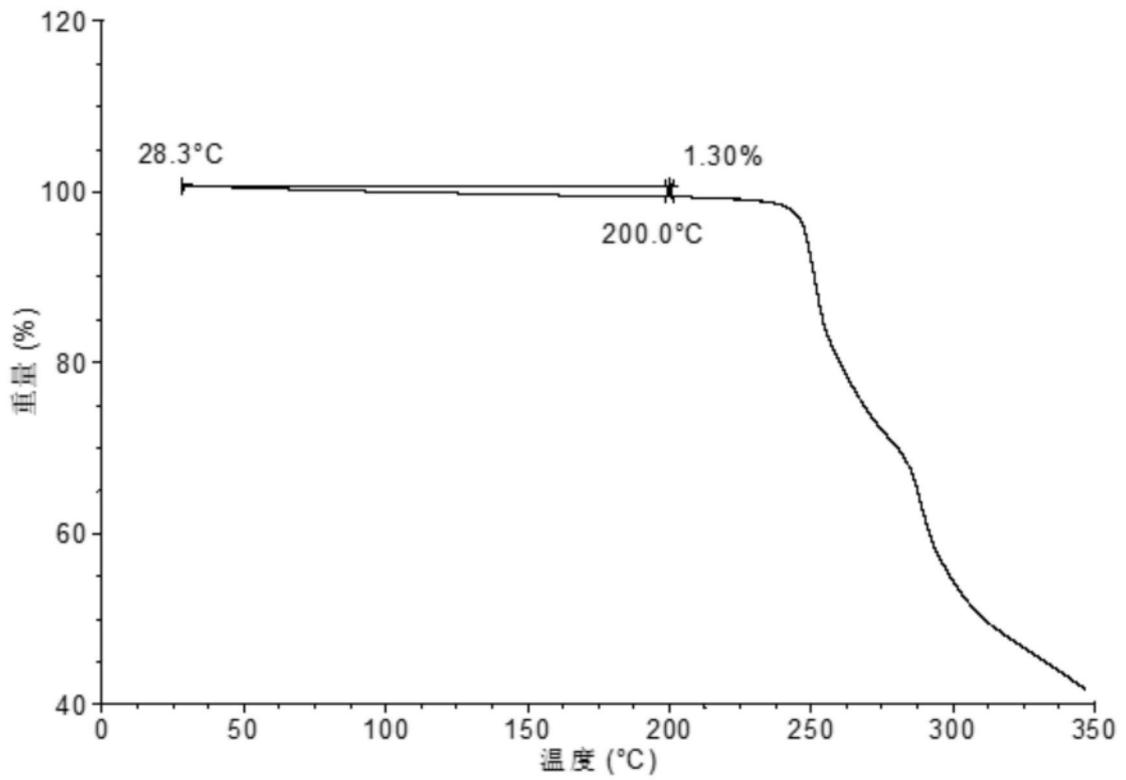


图6

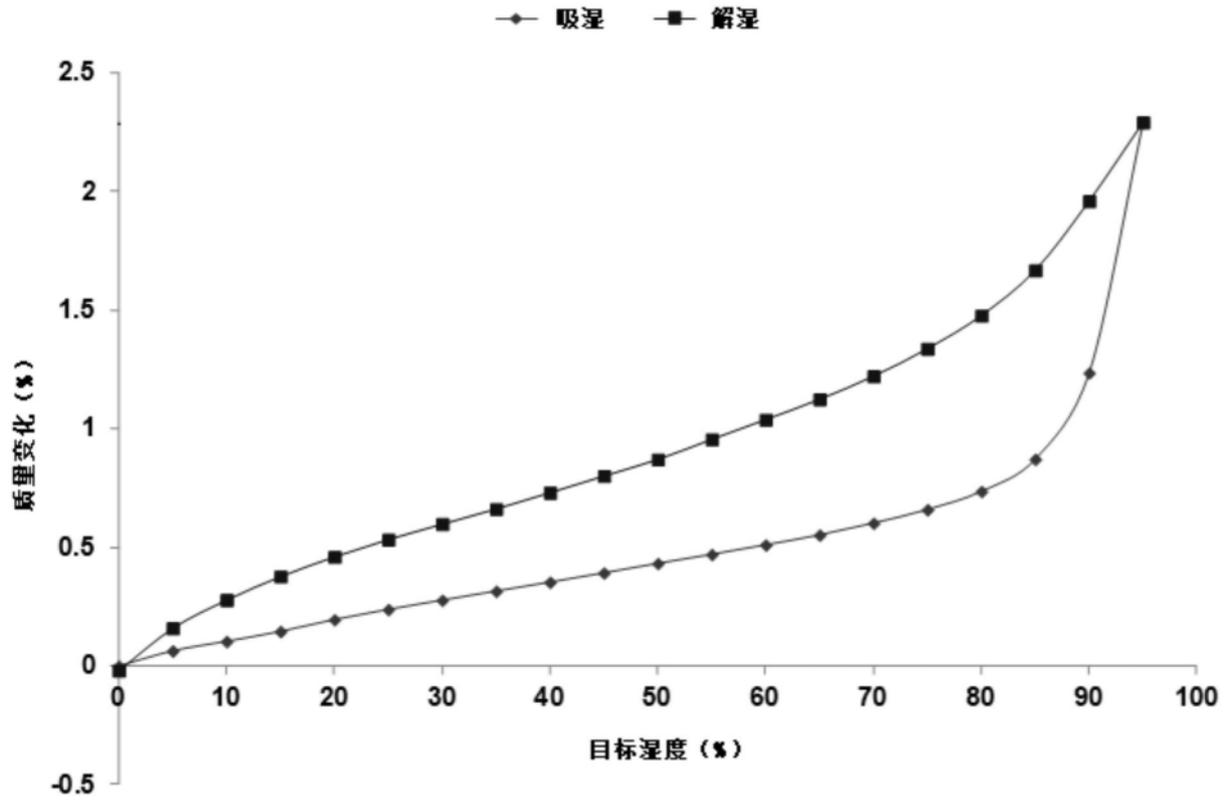


图7