



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114466837 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 31

(21) 申请号 202080066483.9

(22) 申请日 2020.09.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114466837 A

(43) 申请公布日 2022.05.10

(66) 本国优先权数据
201910933542.7 2019.09.29 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2020/118426 2020.09.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/058001 ZH 2021.04.01

(73) 专利权人 正大天晴药业集团股份有限公司
地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号

(72) 发明人 王普军 郭猛 胡明通 吴杰
敖汪伟 张寅生

(51) Int.Cl.
C07D 207/34 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 105431413 A, 2016.03.23
CN 105658624 A, 2016.06.08
CN 105980378 A, 2016.09.28
CN 109153640 A, 2019.01.04
WO 2019165374 A1, 2019.08.29

审查员 蒋薇薇

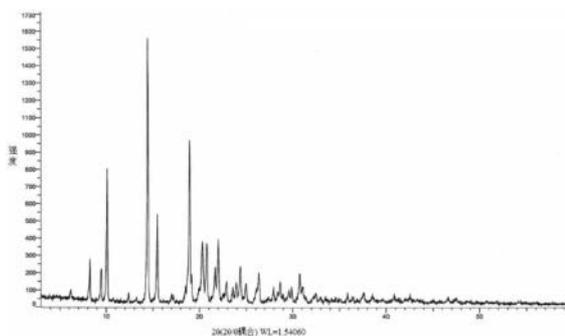
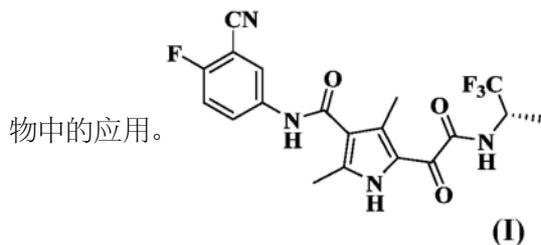
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

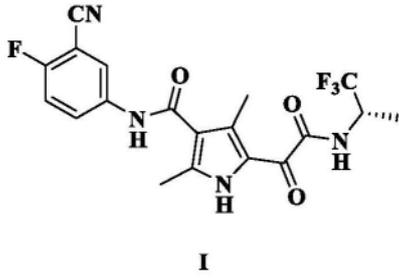
N杂五元环化合物的晶型及其应用

(57) 摘要

公开了N杂五元环化合物的晶型,具体涉及式I化合物的晶型,还包括所述晶型在制备预防或者治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的药



1. 式I化合物的结晶,



其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 和 $18.97 \pm 0.20^\circ$ 。

2. 如权利要求1所述的式I化合物的结晶,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $9.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 、 $18.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.33 \pm 0.20^\circ$ 和 $22.02 \pm 0.20^\circ$ 。

3. 如权利要求1所述的式I化合物的结晶,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $9.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 、 $18.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.33 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.80 \pm 0.20^\circ$ 、 $21.67 \pm 0.20^\circ$ 、 $22.02 \pm 0.20^\circ$ 、 $24.37 \pm 0.20^\circ$ 、 $26.37 \pm 0.20^\circ$ 和 $30.77 \pm 0.20^\circ$ 。

4. 如权利要求1所述的式I化合物的结晶,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $9.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 、 $18.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.33 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.80 \pm 0.20^\circ$ 、 $21.67 \pm 0.20^\circ$ 、 $22.02 \pm 0.20^\circ$ 、 $22.88 \pm 0.20^\circ$ 、 $23.93 \pm 0.20^\circ$ 、 $24.37 \pm 0.20^\circ$ 、 $24.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $26.37 \pm 0.20^\circ$ 、 $28.68 \pm 0.20^\circ$ 和 $30.77 \pm 0.20^\circ$ 。

5. 如权利要求1所述的式I化合物的结晶,其XRPD图谱如图1所示。

6. 如权利要求1所述的式I化合物的结晶,其DSC曲线在 $227.34 \pm 5^\circ\text{C}$ 处有吸热峰。

7. 晶型组合物,所述权利要求1-6任一项所述的式I化合物的结晶占晶型组合物重量的50%以上。

8. 如权利要求7所述的晶型组合物,所述权利要求1-6任一项所述的式I化合物的结晶占晶型组合物重量的80%以上。

9. 如权利要求7所述的晶型组合物,所述权利要求1-6任一项所述的式I化合物的结晶占晶型组合物重量的90%以上。

10. 如权利要求7所述的晶型组合物,所述权利要求1-6任一项所述的式I化合物的结晶占晶型组合物重量的95%以上。

11. 药物组合物,其包含治疗有效量的如权利要求1-6任一项所述的式I化合物的结晶、或权利要求8-10任一项所述的晶型组合物。

12. 权利要求1-6任一项所述的式I化合物的结晶、权利要求8-10任一项所述的晶型组合物、或者权利要求11所述的药物组合物在制备预防或治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病药物中的用途。

13. 如权利要求12所述的用途,其中所述受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病指乙型肝炎病毒感染引起的疾病。

N杂五元环化合物的晶型及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年09月29日向中国国家知识产权局提交的第201910933542.7号中国专利申请的优先权和权益,所述申请公开的内容通过引用整体并入本文中。

技术领域

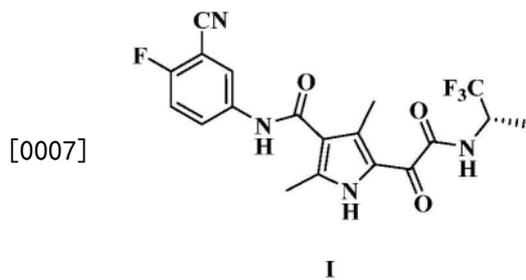
[0003] 本申请涉及N杂五元环化合物的晶型,具体涉及式I化合物的晶型,还包括所述晶型在制备预防或者治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的药物中的应用。

背景技术

[0004] 当前,针对慢性乙型病毒性肝炎不可治愈只能控制,目前主要限于两类药剂(干扰素和核苷类似物/病毒聚合酶的抑制剂)。HBV的治愈率低部分是由于受感染肝细胞的细胞核中共价闭合环状DNA(cccDNA)的存在和持续性。目前治疗方案无法将储存库中的cccDNA清除掉,而一些HBV的新靶点如核心抑制剂(Core inhibitors,例如病毒的衣壳蛋白形成或装配抑制剂和cccDNA抑制剂及干扰素刺激基因激活剂等)有望给治愈乙肝带来希望(Mayur Brahmania, et al. New therapeutic agents for chronic hepatitis B)。HBV衣壳由核心蛋白装配而成,在逆转录以前,HBV逆转录酶、pgRNA需要被衣壳蛋白正确包裹。因此,阻断衣壳蛋白装配,或加快衣壳蛋白降解,都会阻断衣壳蛋白装配过程,从而影响病毒复制。

[0005] 发明概述

[0006] 一方面,本申请提供式I化合物的结晶,



[0008] 又一方面,本申请提供晶型组合物,其中,所述式I化合物的结晶占晶型组合物重量的50%以上,较好为80%以上,更好是90%以上,最好是95%以上。

[0009] 又一方面,本申请提供一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的本申请所述式I化合物的结晶或其晶型组合物。

[0010] 另一方面,本申请还提供本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物在制备预防或治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的药物中的用途。

[0011] 另一方面,本申请还提供本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物在制备预防或治疗乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

[0012] 另一方面,本申请还提供本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物在预防或者治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病中的用途。

[0013] 另一方面,本申请还提供一种治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的方法,包括

对需要该治疗的哺乳动物,给予治疗有效量的本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物。

[0014] 另一方面,本申请还提供了预防或治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物。

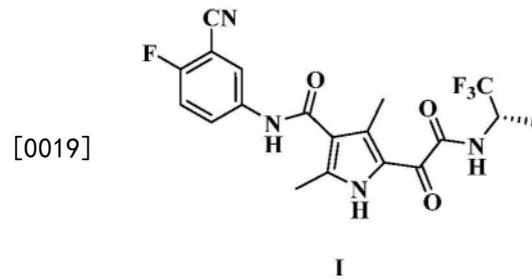
附图说明

[0015] 图1为式I化合物的A型结晶的XRPD谱图。

[0016] 图2为式I化合物的A型结晶的DSC谱图。

[0017] 发明详述

[0018] 一方面,本申请提供式I化合物的结晶,



[0020] 再一方面,本申请提供上述式I化合物的A型结晶,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 和 $18.97 \pm 0.20^\circ$;本申请的一些方案中,上述A型结晶的X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $9.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 、 $18.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.33 \pm 0.20^\circ$ 和 $22.02 \pm 0.20^\circ$;本申请的一些方案中,上述A型结晶的X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $9.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 、 $18.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.33 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.80 \pm 0.20^\circ$ 、 $21.67 \pm 0.20^\circ$ 、 $22.02 \pm 0.20^\circ$ 、 $24.37 \pm 0.20^\circ$ 、 $26.37 \pm 0.20^\circ$ 和 $30.77 \pm 0.20^\circ$;本申请的一些方案中,上述A型结晶的X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $8.25 \pm 0.20^\circ$ 、 $9.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $10.10 \pm 0.20^\circ$ 、 $14.46 \pm 0.20^\circ$ 、 $15.48 \pm 0.20^\circ$ 、 $18.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.33 \pm 0.20^\circ$ 、 $20.80 \pm 0.20^\circ$ 、 $21.67 \pm 0.20^\circ$ 、 $22.02 \pm 0.20^\circ$ 、 $22.88 \pm 0.20^\circ$ 、 $23.93 \pm 0.20^\circ$ 、 $24.37 \pm 0.20^\circ$ 、 $24.97 \pm 0.20^\circ$ 、 $26.37 \pm 0.20^\circ$ 、 $28.68 \pm 0.20^\circ$ 、和 $30.77 \pm 0.20^\circ$ 。

[0021] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的XRPD图谱中,衍射峰的峰位置及相对强度由下表1表示:

[0022] 表1 A型结晶的XRPD数据

[0023]

编号	2 θ 角 ($\pm 0.20^\circ$)	相对强度 (%)	编号	2 θ 角 ($\pm 0.20^\circ$)	相对强度(%)	编号	2 θ 角 ($\pm 0.20^\circ$)	相对强度 (%)
1	6.18	3.1	11	20.80	21.5	20	27.95	4.6

编号	2θ角 (±0.20°)	相对强度 (%)	编号	2θ角 (±0.20°)	相对强度(%)	编号	2θ角 (±0.20°)	相对强度 (%)
2	8.25	14.9	12	21.67	12.1	21	28.40	3.3
3	9.46	11.8	13	22.02	22.7	22	28.68	6.5
4	10.10	51.1	14	22.88	6.9	23	29.61	3.6
5	12.39	3.2	15	23.58	4.6	24	29.89	4.8
6	14.46	100.0	16	23.93	6.6	25	30.77	10.8
7	15.48	32.6	17	24.37	13.4	26	31.07	5.4
8	18.97	60.3	18	24.97	7.2	27	32.49	3.2
9	19.96	4.4	19	26.37	10.5	28	37.62	2.9
10	20.33	22.7						

[0025] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的X射线粉末衍射(XRPD)图谱如图1所示。

[0026] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的差示扫描量热(DSC)曲线在 $227.34 \pm 5^\circ\text{C}$ 处有吸热峰。

[0027] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的DSC图谱如图2所示。

[0028] 又一方面,本申请提供一种A型结晶的制备方法,所述方法包括如下步骤:

[0029] 将上述式I化合物加入溶剂中,然后分离固体。

[0030] 本申请的一些方案中,A型结晶的制备方法包括如下步骤:将上述式I化合物加入溶剂中,析晶,然后分离固体。

[0031] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的制备方法,其中溶剂与式I化合物的体积质量比为 $1\text{ml} \sim 400\text{ml/g}$;在一些实施方案中,其中溶剂与式I化合物的体积质量比为 $5\text{ml} \sim 250\text{ml/g}$;在一些实施方案中,其中溶剂与式I化合物的体积质量比为 $10\text{ml} \sim 220\text{ml/g}$;在一些实施方案中,其中溶剂与式I化合物的体积质量比为 10ml/g 、 20ml/g 、 30ml/g 、 40ml/g 、 50ml/g 、 60ml/g 、 70ml/g 、 80ml/g 、 90ml/g 、 100ml/g 、 110ml/g 、 120ml/g 、 130ml/g 、 140ml/g 、 150ml/g 、 160ml/g 、 170ml/g 、 180ml/g 、 190ml/g 、 200ml/g 、 210ml/g 、 220ml/g 或者任意比例形成的范围;在一些实施方案中,其中溶剂与式I化合物的体积质量比为 10ml/g 、 50ml/g 或者 220ml/g 。

[0032] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的制备方法,其中溶剂选自甲醇、乙腈、四氢呋喃或水中的一种或多种的混合物。本申请的一些方案中,上述A型结晶的制备方法,其中溶剂选自甲醇、乙腈与水的混合物、或四氢呋喃与水的混合物。

[0033] 在本申请的一些实施方案中,所述甲醇与式I化合物的体积质量比为 $10 \sim 100\text{ml/g}$;在本申请的一些实施方案中,所述甲醇与式I化合物的体积质量比为 10ml/g 、 20ml/g 、 30ml/g 、 40ml/g 、 50ml/g 、 60ml/g 、 70ml/g 、 80ml/g 、 90ml/g 、 100ml/g 或者任意比例形成的范围;在本申请的一些实施方案中,所述甲醇与式I化合物的体积质量比为 $10 \sim 50\text{ml/g}$;在本申请的一些实施方案中,所述甲醇与式I化合物的体积质量比为 50ml/g 。

[0034] 在本申请的一些实施方案中,所述乙腈与水的体积比为 $1:1 \sim 10:1$;在本申请的一些实施方案中,为 $1:1$ 、 $2:1$ 、 $3:1$ 、 $4:1$ 、 $5:1$ 、 $6:1$ 、 $7:1$ 、 $8:1$ 、 $9:1$ 、 $10:1$ 或者任意比例形成的范围;在本申请的一些实施方案中,为 $2:1 \sim 5:1$;在本申请的一些实施方案中,为 $3.4:1$ 。

[0035] 在本申请的一些实施方案中,所述四氢呋喃与水的体积比为 $1:1 \sim 1:10$;在本申请

的一些实施方案中,为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10或者任意比例形成的范围;在本申请的一些实施方案中,为1:1~1:5;在本申请的一些实施方案中,为1:5。

[0036] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的制备方法,其中分离固体的方式选自过滤。

[0037] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的制备方法,将上述式I化合物加入溶剂中,搅拌溶清,任选地通过加热使溶液溶清;在一些具体的实施方案中,加热至50~80℃;在一些具体的实施方案中,加热至60℃。

[0038] 本申请的一些方案中,上述A型结晶的制备方法,任选地包括冷却至室温的过程和/或在冰水浴中进行冷却析晶,和/或任选地加入水使得析晶。

[0039] 本申请中,XRPD采用Bruker D8 ADVANCE X-射线粉末衍射仪检测,光管:Cu, α , ($\lambda=1.54056\text{\AA}$),光管电压:40kV,光管电流:40mA;发散狭缝:0.618mm;扫描范围:3-60deg;步径:0.02deg;步长:0.1秒。

[0040] 本申请中,DSC采用梅特勒DSC 1型差热扫描量热仪检测,温度范围:50-300℃,升温速率:10.00K/min。

[0041] 又一方面,本申请提供晶型组合物,其中,本申请所述式I化合物的结晶占晶型组合物重量的50%以上,较好为80%以上,更好是90%以上,最好是95%以上。

[0042] 又一方面,本申请提供包含本申请所述A型结晶的晶型组合物,其中,所述A型结晶占晶型组合物重量的50%以上,较好为80%以上,更好是90%以上,最好是95%以上。

[0043] 又一方面,本申请提供一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的本申请所述式I化合物的结晶、或其晶型组合物。本申请的药物组合物中可含有或不含有药理学上可接受的辅料。此外,本申请的药物组合物可进一步包括一种或多种其他治疗剂。

[0044] 另一方面,本申请还提供本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物在制备预防或治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的药物中的用途。

[0045] 另一方面,本申请还提供本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物在制备预防或治疗乙型肝炎病毒感染的药物中的用途。

[0046] 另一方面,本申请还提供本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物在预防或者治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病中的用途。

[0047] 另一方面,本申请还提供一种预防或治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的方法,包括对需要该治疗或预防的哺乳动物,优选人类,给予治疗有效量的本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物。

[0048] 另一方面,本申请还提供了预防或治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病的本申请所述式I化合物的结晶、其晶型组合物、或者其药物组合物。

[0049] 在本申请的一些实施方式中,所述受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病指乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的疾病。

[0050] 在本申请的一些实施方式中,所述受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病指乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的肝脏疾病。

[0051] 在本申请的部分实施方式中,所述预防或治疗受益于衣壳蛋白装配抑制的疾病指控制、降低或清除HBV以预防、缓解或治愈受感染患者的肝脏疾病。

[0052] 定义和说明

[0053] 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。

[0054] 需要说明的是,在粉末X-射线衍射光谱中,峰的位置或峰的相对强度可能会因为测定仪器、测定方法/条件等因素而产生差异。对任何特定的晶型,峰的位置可能存在误差,2 θ 值的测定误差可以为 $\pm 0.2^\circ$ 。因此,在确定每种晶型时,应该将此误差考虑在内,在误差内也属于本申请的范围。

[0055] 需要说明的是,对于同种晶型,DSC的吸热峰出现位置可能会因为测定仪器、测定方法/条件等因素而产生差异。对任何特定的晶型,吸热峰的位置可能存在误差,误差可以为 $\pm 5^\circ\text{C}$,可以为 $\pm 3^\circ\text{C}$ 。因此,在确定每种晶型时,应该将此误差考虑在内,在误差内也属于本申请的范围。

[0056] 所述词语“包括(comprise)”或“包含(comprise)”及其英文变体例如comprises或comprising应理解为开放的、非排他性的意义,即“包括但不限于”。

[0057] 术语“药学上可接受的辅料”是指与活性成份一同给药的、有利于活性成份给药的惰性物质,包括但不限于国家食品药品监督管理局许可的可接受的用于人或动物(例如家畜)的任何助流剂、增甜剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、矫味增强剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、崩解剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。所述辅料的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各类淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0058] 术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

[0059] 本申请的药物组合物可通过将本申请的化合物与适宜的药学上可接受的辅料组合而制备,例如可配制成固态、半固态、液态或气态制剂,如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球及气溶胶等。

[0060] 给予本申请所述结晶、晶型组合物或其药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、局部、吸入、肠胃外、舌下、阴道内、鼻内、眼内、腹膜内、肌内、皮下、静脉内给药。

[0061] 本申请的药物组合物可以采用本领域众所周知的方法制造,如常规的混合法、溶解法、制粒法、制糖衣药丸法、磨细法、乳化法、冷冻干燥法等。

[0062] 在一些实施方案中,药物组合物是口服形式。对于口服给药,可以通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的辅料混合,来配制该药物组合物。这些辅料能使本申请的化合物被配制成片剂、丸剂、锭剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、浆剂、悬浮剂等,用于对患者的口服给药。

[0063] 本申请化合物的治疗剂量可根据例如以下而定:治疗的具体用途、给予化合物的方式、患者的健康和状态,以及签处方医师的判断。本申请化合物在药用组合物中的比例或浓度可不固定,取决于多种因素,它们包括剂量、化学特性(例如疏水性)和给药途径。

[0064] 术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状,且包括:

[0065] (i) 抑制疾病或疾病状态,即遏制其发展;

[0066] (ii) 缓解疾病或疾病状态,即使该疾病或疾病状态消退。

[0067] 术语“预防”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以预防疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状,且包括:预防疾病或疾病状态在哺乳动物中出现,特别是当这类哺

乳动物易患有该疾病状态,但尚未被诊断为已患有该疾病状态时。

[0068] 针对药物或药理学活性剂而言,术语“治疗有效量”是指无毒的但能达到预期效果的药物或药剂的足够用量。有效量的确定因人而异,取决于受体的年龄和一般情况,也取决于具体的活性物质,个案中合适的有效量可以由本领域技术人员根据常规试验确定。

[0069] 本申请所述结晶的治疗有效量为从约0.0001到20mg/Kg体重/天,例如从0.001到10mg/Kg体重/天。

[0070] 本申请所述结晶的剂量频率由患者个体的需求决定,例如,每天1次或2次,或每天更多次。给药可以是间歇性的,例如,其中在若干天的期间内,患者接受本申请所述结晶的每日剂量,接着在若干天或更多天的期间,患者不接受本申请所述结晶的每日剂量。

[0071] 本申请所使用的所有溶剂是市售的,无需进一步纯化即可使用。

[0072] 本申请采用下述缩略词:DMF代表N,N-二甲基甲酰胺;EA代表乙酸乙酯;MeOH代表甲醇;DMSO代表二甲亚砜;HATU代表2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐;DIPEA代表N,N-二异丙基乙胺。

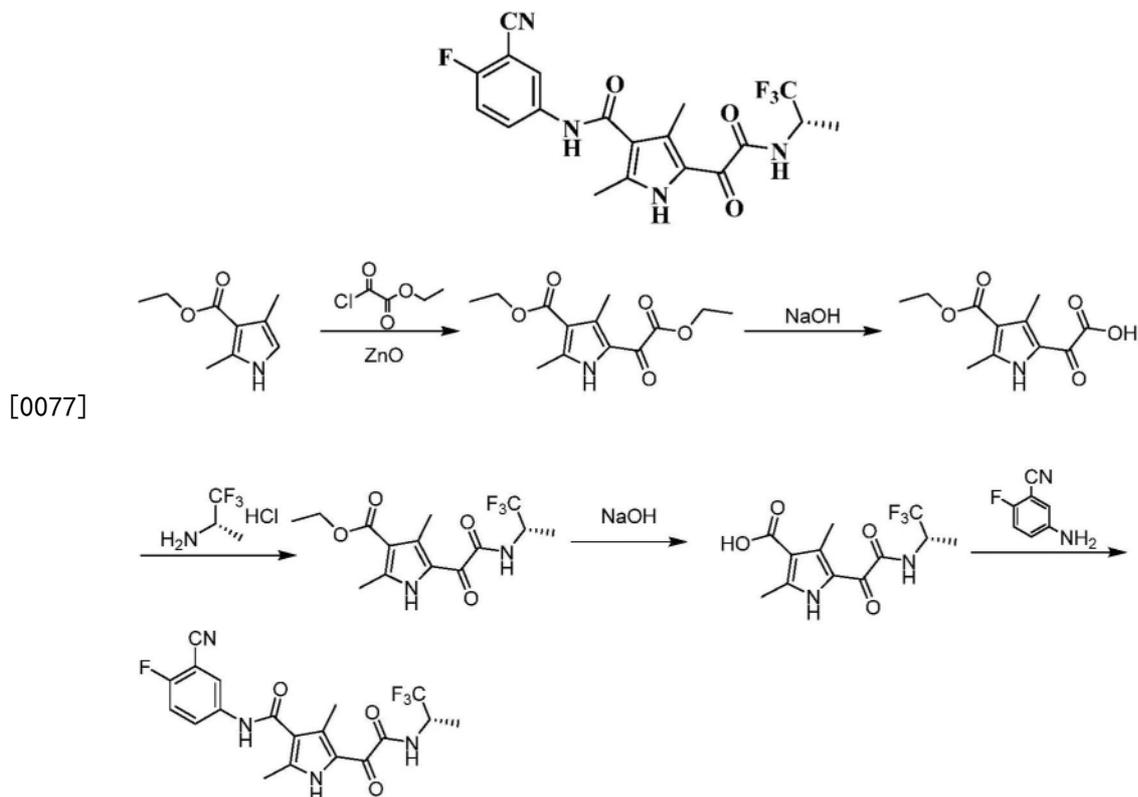
[0073] 技术效果

[0074] 本申请的结晶具有良好的药理活性,同时具有良好的高湿、高温或光照稳定性,证明其良好的药学性质和较高的成药前景。

具体实施方式

[0075] 下面通过实施例对本申请进行详细描述,但并不意味着对本申请任何不利限制。本文已经详细地描述了本申请,其中也公开了其具体实施方式,对本领域的技术人员而言,在不脱离本申请精神和范围的情况下针对本申请具体实施方式进行各种变化和改进将是显而易见的。

[0076] 实施例1 式I化合物的制备



[0078] 步骤A:冰浴中, N_2 保护下,反应瓶中依次加入2-氯-2-氧代乙酸乙酯(40.8g)和氧化锌(1.22g),然后加入2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯(5g),加料完毕,混合物在冰浴下搅拌10分钟,撤去冰浴,室温搅拌。反应结束,将反应液缓慢滴加到200mL冰水混合物中,加入EA(200mL),分层,有机相用无水硫酸钠干燥,浓缩,柱层析制备得到5-(2-乙氧基-2-氧代乙酰基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯(4.5g)。MS(ESI⁺, [M+Na]⁺)m/z:290.07。

[0079] 步骤B:反应瓶中,依次加入5-(2-乙氧基-2-氧代乙酰基)-2,4-二甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯(3.5g)、MeOH(40mL),冰浴下滴加氢氧化钠(1.05g)的水(20mL)溶液,室温下搅拌。反应结束,用2N盐酸水溶液调节水相pH为3-4,加入EA(100mL*2)萃取,有机相用水(30mL)洗涤,浓缩,得到2-(4-(乙氧基羰基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)-2-氧代乙酸(2.7g)。MS(ESI⁻, [M-H]⁻)m/z:238.1。

[0080] 步骤C:室温下,向反应瓶中,依次加入2-(4-(乙氧基羰基)-3,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)-2-氧代乙酸(1g)、DMF(20mL)、HATU(2.07g)及DIPEA(1.08g),加料完毕,室温下搅拌10分钟,加入(S)-1,1,1-三氟丙-2-胺盐酸盐(0.63g)。反应结束,将反应液倒入50mL水中,EA(50mL*3)萃取,有机相用饱和硫酸钠水溶液(50mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液,浓缩、经柱层析纯化,得到(S)-2,4-二甲基-5-(2-氧代-2-((1,1,1-三氟丙-2-基)氨基)乙酰基)-1H-吡咯-3-羧酸乙酯(0.5g)。MS(ESI⁻, [M-H]⁻)m/z:333.4。

[0081] 步骤D:反应瓶中,加入(S)-2,4-二甲基-5-(2-氧代-2-((1,1,1-三氟丙-2-基)氨基)乙酰基)-1H-吡咯-3-羧酸乙酯(300mg)、MeOH(2mL)、加入NaOH(72mg)的水(1mL)溶液,加毕,加热反应温度至80℃反应过夜。反应结束,浓缩,然后加入水(20mL)及EA(60mL),分离水层,有机相加水(30mL)洗涤,分层,合并水相,用2N盐酸调节水相,使pH为3左右,然后加入EA(100mL*2)萃取,分层,浓缩有机相,得到(S)-2,4-二甲基-5-(2-氧代-2-((1,1,1-三氟丙-2-基)氨基)乙酰基)-1H-吡咯-3-羧酸(230mg)。MS(ESI⁻, [M-H]⁻)m/z:305.4。

[0082] 步骤E:室温下,向反应瓶中依次加入(S)-2,4-二甲基-5-(2-氧代-2-((1,1,1-三氟丙-2-基)氨基)乙酰基)-1H-吡咯-3-羧酸(230mg)、DMF(5mL)、HATU(428mg)及DIPEA(194mg),加料完毕,搅拌10分钟,再加入5-氨基-2-氟苄腈(123mg),加热至40℃搅拌反应20小时。反应结束,加入水(20mL)及EA(60mL),分层,无水硫酸钠干燥,过滤,收集滤液,旋干,拌样,柱层析纯化得到(S)-N-(3-氰基-4-氟苯基)-2,4-二甲基-5-(2-氧代-2-((1,1,1-三氟丙-2-基)氨基)乙酰基)-1H-吡咯-3-甲酰胺(180mg)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ12.05(s,1H),10.20(s,1H),9.49(d,J=9.0Hz,1H),8.20(dd,J=6.0,2.5Hz,1H),7.98-7.91(m,1H),7.53(t,J=9.0Hz,1H),4.78-4.67(m,1H),2.40(s,3H),2.32(s,3H),1.34(d,J=7.0Hz,3H)。MS(ESI⁻,[M-H]⁻)m/z:423.0。

[0083] 实施例2 式I化合物的A型结晶的制备

[0084] 在室温下,将500mg式I化合物加入至25ml无水甲醇中搅拌,升温至60℃溶清,降至室温,放入冰水浴中,有大量白色固体析出,过滤,滤饼用无水甲醇淋洗,并于70℃鼓风干燥8h,得到类白色的式I化合物的A型结晶固体300mg,样品用XRPD检测,如图1所示,DSC检测如图2所示。

[0085] 实验例1 结晶稳定性实验

[0086] 1.1样品制备

[0087] 称取实施例2制备得到的式I化合物的A型结晶500mg,置于干燥洁净的称量瓶中,摊成薄薄一层,作为供试样品。将样品放置于影响因素试验条件下(40℃,60℃,75%RH,925%RH,高温高湿(40℃,75%RH)),其样品为完全暴露放样。在10天取样分析。光照(可见光1200000Lux·hr,紫外216W.hr/m²)条件下放置的样品为室温完全暴露放样。

[0088] 1.2色谱条件

[0089] 色谱柱采用Waters XBridge Shield RP18柱(4.6mm×150mm,3.5μm)。

[0090] 水分含量采用梅特勒V20型水分测定仪测定。

[0091] 1.3样品溶液的制备

[0092] 取出样品约12.5mg,适量的稀释剂乙腈-水(70:30)溶解。作为检测有关物质的浓度。

[0093] 表2 稳定性试验结果

考察项目	0(天)	高温 40℃ 10天	高温 60℃ 10天	高湿 75%RH 10天	高湿 92.5%RH 10天	光照 10天	高温高湿 (40℃, 75%RH) 10天
有关物质 ^a (%)	0.57	0.65	0.65	0.63	0.65	0.64	0.63
水分(%)	0.13	0.17	0.16	0.15	0.17	0.16	0.16

[0095] ^a有关物质是指总杂。

[0096] 表2的结果说明本申请结晶的有关物质和水分在上述多个考察项目下保持稳定,证明该结晶具有良好的高湿、高温或光照稳定性。

[0097] 实验例2 体外活性研究

[0098] 2.1 体外细胞HBV DNA抑制活性

[0099] 取处于指数生长期状态良好的HepG2.2.15 (武汉病毒所) 或HepAD38细胞一瓶, 加入5mL PBS清洗一遍, 加入3mL胰酶。室温消化5min, 弃掉2mL胰酶后再放入细胞培养箱中消化10min, 取出显微镜下观察 (是否为单个圆形, 细胞间无粘连), 加入10mL完全培养基终止消化。吹打成单细胞悬液后, 取10 μ L细胞悬液使用细胞计数仪计数, 完全培养基进行稀释, 调整细胞密度至1*10⁵个/mL。使用排枪接种于24孔板上 (24孔板提前使用50 μ g/mL Collagen I溶液包被), 1mL/孔, 置恒温CO₂培养箱中培养48h。

[0100] 使用完全培养基将DMSO溶解的化合物稀释, 2倍梯度, 共10个浓度, 进行化合物加样, 每72h更换含化合物的新鲜培养基, 化合物处理细胞6天。吸去上清后, 每孔加入300 μ L裂解液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1% NP-40), 室温放置裂解10min后, 提取DNA, 用实时荧光定量PCR仪测定胞内病毒衣壳中HBV DNA, 根据Ct值计算抑制率, 四参数法计算EC50值。结果如表3及表4所示。

[0101] 表3 HepAD38细胞中抗HBV活性实验结果

[0102]	编号	EC50 (nM)
	式I化合物	24

[0103] 表4 HepG2.2.15细胞中抗HBV活性实验结果

[0104]	编号	EC50 (nM)
	式I化合物	17.4

[0105] 2.2 体外细胞毒性

[0106] 取处于指数生长期状态良好的HepG2.2.15细胞 (武汉病毒所) 一瓶, 加入5mL PBS清洗一遍, 加入2mL胰酶。放入细胞培养箱中进行消化, 不时取出显微镜下观察, 待细胞刚脱落时, 弃掉1mL胰酶, 仅仅留下残液, 放入37 $^{\circ}$ C培养箱中消化8-15min, 取出在显微镜下观察细胞 (是否为单个圆形, 细胞间无粘连), 加入5mL MEM培养基进行细胞重悬。使用细胞计数仪计数, 完全培养基进行稀释, 调整细胞密度至2*10⁵个/mL。使用排枪接种于96孔板上 (96孔板提前使用50 μ g/mL Collagen I溶液包被), 100 μ L/孔, 置恒温CO₂培养箱中培养24h, 给药处理, 每隔3天, 更换含化合物的新鲜培养基, 对照孔加不含药物的DMSO浓度为0.5%的培养基, 并设普通培养基的对照孔, 给药处理6天后, 加CCK-8, 10 μ L/孔, 1-2h后酶标仪450nm处检测其吸光值, 计算抑制率, 并计算CC50。结果如表5所示。

[0107] 表5

[0108]	细胞	CC50 (μ M)	编号
	HepG2.2.15	>100	式I化合物

[0109] 2.3 CYP450酶抑制研究

[0110] 500 μ L最终的温孵体系中, 含50 μ L人肝微粒体 (蛋白浓度: 0.2mg/mL, Corning), 1 μ L混合的CYP450特异性底物 (CYP 1A2、CYP 2B6、CYP 2C9、CYP2C19、CYP 2D6、CYP 3A4), 398 μ L PBS缓冲液 (PH7.4), 1 μ L特异性阳性抑制剂 (阳性对照组) 或受试化合物 (乙腈配制), 50 μ L NADPH+MgCl₂。每个CYP450亚型做2份, 每份0.5mL。每管先配好总体积为450 μ L的底物和酶的混匀液及NADPH分别在37 $^{\circ}$ C预温孵5min后, 加入50 μ L NADPH+MgCl₂混合溶液反应, 于30min取出50 μ L用含内标的冰乙腈300 μ L终止反应。另外平行做2份空白组各500 μ L, 不加NADPH, 作为阴性对照组。

[0111] 样品前处理:50 μ L温孵样品,加入300 μ L含内标的冰乙腈沉淀,涡旋震荡5min后,离心(12000rpm,4 $^{\circ}$ C)10min。吸取上清液75 μ L,加入75 μ L超纯水,稀释混匀,1 μ L进样分析。结果如表6所示。

[0112] 表6

编号	各亚型 IC50 (μ M)					
	3A4	2D6	2C19	2C9	2B6	1A2
[0113] 式 I 化合物	>200	54	20	>200	>200	49

[0114] 2.4 血浆蛋白结合试验

[0115] 血浆样品配制:分别吸取495 μ L相应种属(小鼠、大鼠、犬、猴及人)的空白血浆,加入5 μ L相应受试化合物溶液或阳性对照,即得血浆样品溶液,使化合物血浆药物浓度分别为1 μ M、10 μ M(乙腈配制)。

[0116] 预处理好的透析膜置于高通量平衡透析装置中,吸取100 μ L血浆样品溶液及PBS缓冲液,分别加到透析膜的两侧(样品侧及缓冲液侧)(n=3),用贴膜将平衡装置封好后,放入37 $^{\circ}$ C温孵过夜(100rpm),达到透析平衡后,分别从样品侧及缓冲液侧吸取50 μ L样品,用含内标的冰乙腈终止反应。

[0117] 样品前处理:50 μ L血浆侧样品,加入450 μ L含内标的冰乙腈沉淀,涡旋震荡5min后,离心(12000rpm,4 $^{\circ}$ C)10min。吸取上清液75 μ L,加入75 μ L超纯水稀释混匀,1 μ L进样分析;50 μ L PBS侧样品,加入250 μ L含内标的冰乙腈沉淀,涡旋震荡5min后,离心(12000rpm,4 $^{\circ}$ C)10min。吸取上清液75 μ L,加入75 μ L超纯水稀释混匀,2 μ L进样分析。结果如表7所示。

[0118] 表7

编号	浓度	结合率 (%)				
		人	大鼠	小鼠	犬	猴
[0119] 式 I 化合物	1 μ M	97.3	95.0	85.4	94.0	90.2
	10 μ M	97.3	95.3	85.5	93.9	90.5

[0120] 实验例3 体外肝微粒体稳定性

[0121] 300 μ L最终的温孵体系中,含30 μ L肝微粒体(蛋白浓度:0.15mg/mL,Corning),30 μ L NADPH+MgCl₂,3 μ L底物(乙腈配制),237 μ L PBS缓冲液。每个种属做2份,每份0.3mL。每管先配好总体积为270 μ L的底物及酶的混匀液,和NADPH分别在37 $^{\circ}$ C预温孵5min后,加入30 μ L NADPH+MgCl₂混合溶液反应,分别于0、10、30、60min取出50 μ L用含内标的冰乙腈300 μ L终止反应。

[0122] 样品前处理:50 μ L温孵样品,加入300 μ L含内标地西洋的冰乙腈沉淀,涡旋震荡5min后,离心(12000rpm,4 $^{\circ}$ C)10min。吸取上清液75 μ L至96孔板中用75 μ L超纯水稀释混匀,进样0.5 μ L,进行LC-MS/MS分析。结果如表8所示。

[0123] 表8体外肝微粒体稳定性

编号	人肝微粒体 60min 剩余量(%)	大鼠肝微粒体 60min 剩余量(%)	小鼠肝微粒体 60min 剩余量(%)
[0124] 式I化合物	99	99	96

[0125] 实验例4 体内动物药效

[0126] 4.1 AAV小鼠模型评价抗病毒效果

[0127] 取6-8周龄雄性C57BL/6小鼠(上海灵畅生物科技有限公司),按照 1×10^{11} vg剂量,尾静脉注射rAAV8-1.3HBV病毒(北京五加和,adr亚型)至C57BL/6小鼠体内。注射病毒第2、4周,小鼠眼眶采血,分离血清,测定血清中HBeAg和HBsAg表达水平以及HBV DNA拷贝数,判断模型构建成功与否。结合血清学HBeAg、HBsAg和HBV DNA的定量检测结果,挑选出的小鼠各自HBV DNA表达水平都大于 1×10^4 IU/mL,HBeAg大于 1×10^3 NCU/mL和HBsAg大于 1×10^3 ng/mL。小鼠进行分组,设空白对照组、溶媒对照组、受试物组。每组小鼠以灌胃方式连续给药3周,每日1次,停药1周。实验过程中,隔周分别眼眶采血,分离血清,荧光定量PCR方法检测DNA含量。结果如表9和表10所示。

[0128] 表9 血清中HBV DNA下降水平(log10)(给药剂量10mpk)

编号	第7天	第14天	第21天	第28天
[0129] 式I化合物	2.67	3.80	4.30	3.50

[0130] 表10 血清中HBV DNA下降水平(log10)(给药剂量1mpk)

编号	第7天	第14天	第21天	第28天
[0131] 式I化合物	2.49	3.41	3.65	3.25

[0132] 4.2 pAAV/HBV模型实验方法

[0133] 取6-8周龄雄性C57BL/6小鼠(上海灵畅生物科技有限公司),将纯化的重组质粒pAAV/HBV1.2(10 μ g)溶解在PBS中,每只小鼠注射体积约为其体重的10%,通过尾静脉在3-8s内注射到小鼠体内。注射质粒3天后眼眶取血检测血清HBV DNA,挑选出模型小鼠血清DNA均一的进行分组,设模型对照组、溶媒对照组、受试物组。每组小鼠以灌胃方式连续给药10天,每日1次,剂量为3mg/kg。分别于给药后的0、4、7、10天取小鼠血清,第10天处死小鼠取肝组织样本,荧光定量PCR方法检测小鼠血清和肝脏中HBV DNA拷贝数。结果如表11所示。

[0134] 表11 血清中HBV DNA下降水平(log10)(给药剂量3mpk)

编号	第4天	第7天	第10天
[0135] 式I化合物	2.95	4.13	2.71

[0136] 实验例5 体内药物代谢动力学

[0137] 大鼠体内药物代谢动力学(PK)研究

[0138] SD大鼠(上海西普尔-必凯),体重180~220g,适应3~5天后,随机分组,每组3只,按20mg/kg剂量分别灌胃系列化合物。

[0139] 受试动物(SD大鼠)给药前禁食12h,给药后4h给食物,实验前后和实验过程中均自由饮水。

[0140] 给药后,于0min、15min、30min、1h、2h、4h、6h、8h、10h、24h、30h、48h于眼眶取血0.2mL左右,EDTA-K2抗凝后,30min内于4 $^{\circ}$ C,4000rpm条件下离心10min分离血浆。收集全部

血浆后立即于-20℃保存待测。

[0141] 吸取50μL待测血浆样品和标曲样品,加入500μL含内标(地西洋20mg/mL)的乙腈溶液,振荡混匀5min,12000rpm离心10min,取上清75μL,加入75μL超纯水稀释,混匀,吸取1μL用于LC/MS/MS测定。结果如表12所示。

[0142] 表12

编号	式 I 化合物		
	IV 5mg/kg	PO 10mg/kg	
[0143]	$T_{1/2}$ (h)	52.8	45.6
	V_z (mL/kg)	2.58	NA
	Cl (mL/h/kg)	0.03	NA
	C_{max} (ng/mL)	3512	4111
	$AUC_{(0-48h)}$ (ng*h/mL)	126939	254490
[0144]	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng*h/mL)	147701	283784
	F (%)	NA	100%

[0145] NA表示未检测。

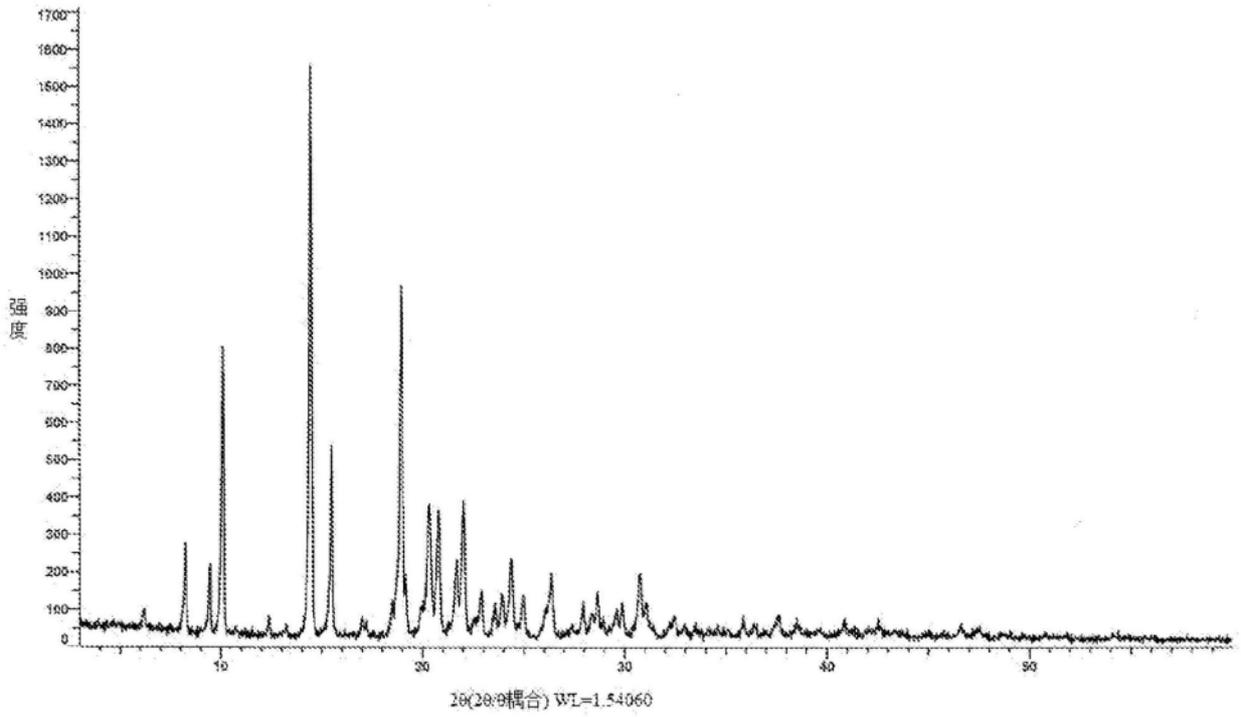


图1

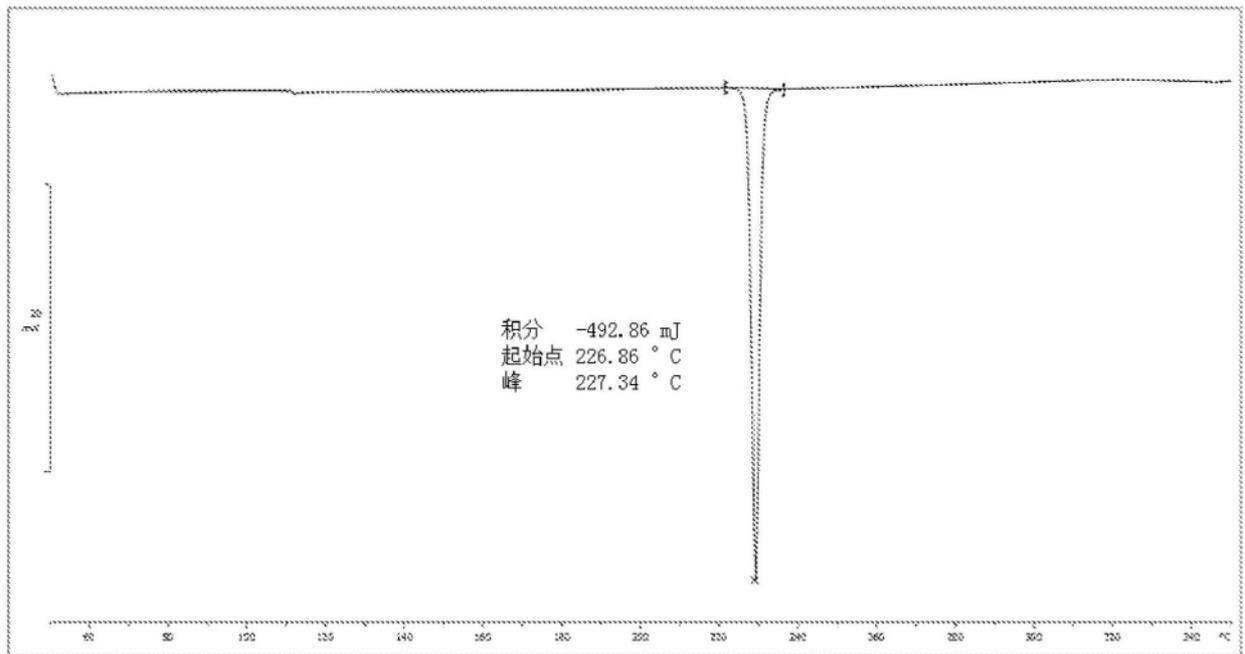


图2