



(21) 申請案號：107146220

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 20 日

(51) Int. Cl. : C07D207/08 (2006.01)

(30) 優先權：2017/12/21 中國大陸 201711394677.8

(71) 申請人：大陸商廣東眾生睿創生物科技有限公司 (中國大陸) GUANGDONG RAYNOVENT BIOTECH CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72) 發明人：袁之漆 YUAN, ZHILIANG (CN)；江志趕 JIANG, ZHIGAN (CN)；賀海鷹 HE, HAIYING (CN)；張曉 ZHANG, XIAO (CN)；許繼文 XU, JIWEN (CN)；周衛祥 ZHOU, WEIXIANG (CN)；黎 健 LI, JIAN (US)；陳 曙輝 CHEN, SHUHUI (US)

(74) 代理人：洪蘭心

審查人員：簡正芳

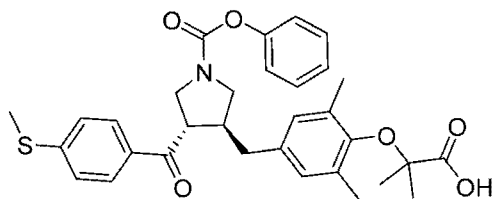
申請專利範圍項數：6 項 圖式數：3 共 26 頁

(54) 名稱

作為 PPAR 促效劑的吡咯啉衍生物的非晶形及其製備方法

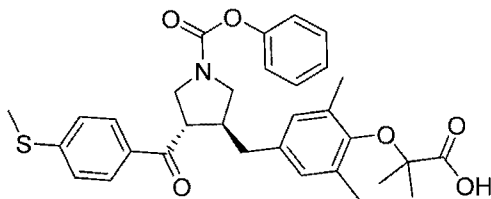
(57) 摘要

本發明關於一種作為 PPAR 促效劑的吡咯啉衍生物的非晶形及其製備方法。



(I)

The invention relates to an amorphous form of pyrrolidine derivative as PPAR agonist and a preparation method thereof.



(I)

指定代表圖：

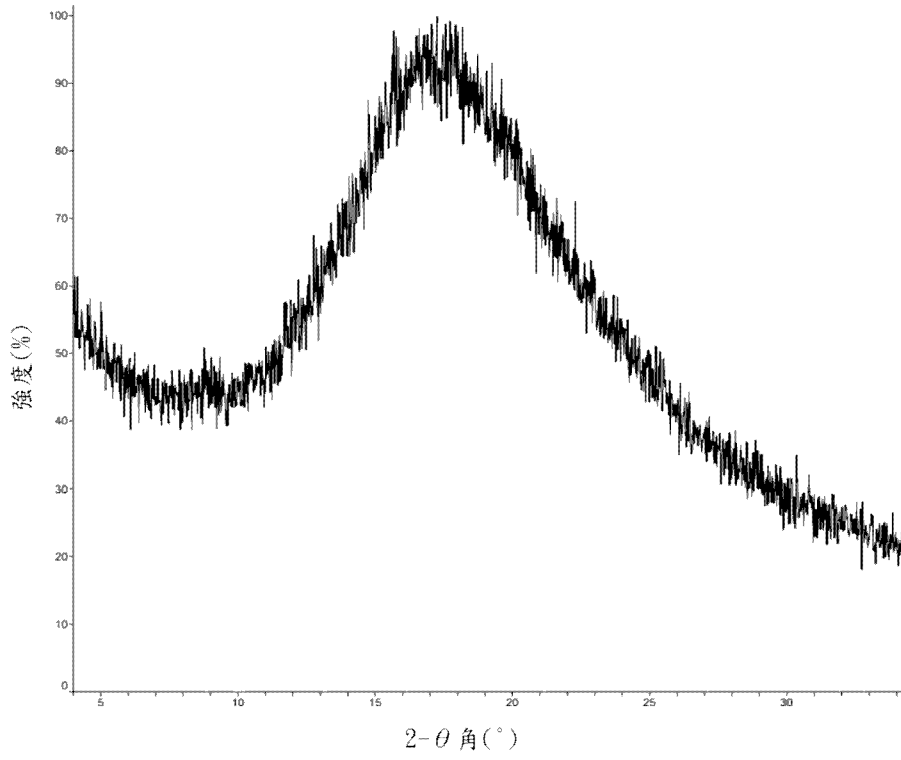
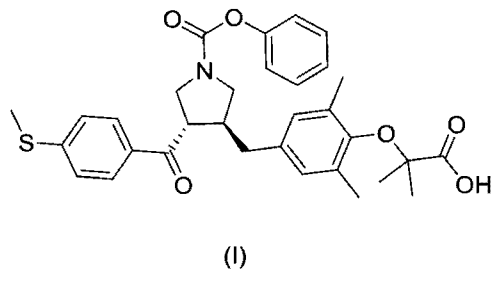


圖 1

特徵化學式：





公告本

I822716

## 【發明摘要】

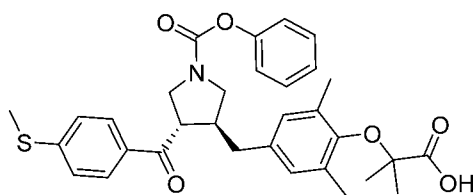
【中文發明名稱】 作為PPAR促效劑的吡咯啉衍生物的非晶形及其製備方法

【英文發明名稱】 AMORPHOUS FORM OF PYRROLIDINE DERIVATIVE AS

PPAR AGONIST AND PREPARATION METHOD THEREOF

【中文】

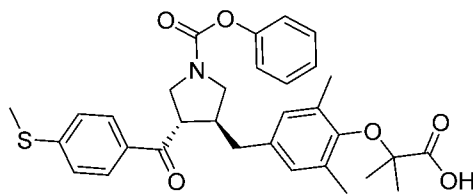
本發明關於一種作為 PPAR 促效劑的吡咯啉衍生物的非晶形及其製備方法。



(I)

【英文】

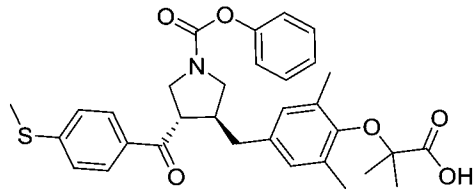
The invention relates to an amorphous form of pyrrolidine derivative as PPAR agonist and a preparation method thereof.



(I)

【指定代表圖】 圖1

【特徵化學式】



(I)

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 作為PPAR促效劑的吡咯啉衍生物的非晶形及其製備方法

【英文發明名稱】 AMORPHOUS FORM OF PYRROLIDINE DERIVATIVE AS PPAR AGONIST AND PREPARATION METHOD THEREOF

### 【技術領域】

【0001】本申請主張如下優先權：CN201711394677.8，申請日2017-12-21。

【0002】本發明關於一種作為PPAR促效劑的吡咯啉衍生物的非晶形及其製備方法。

### 【先前技術】

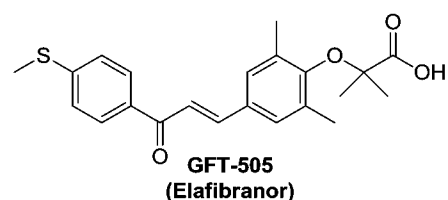
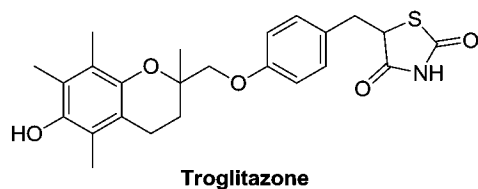
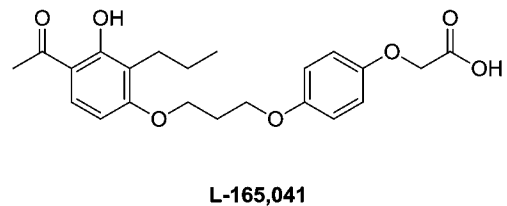
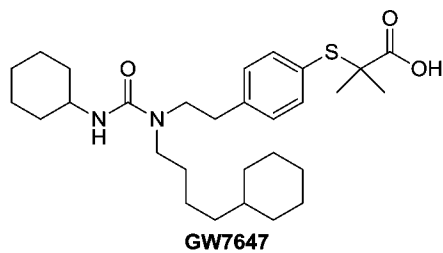
【0003】非酒精性脂肪肝病(Nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD)是發達國家或地區最常見的肝臟疾病，是指過多的脂肪以甘油三酯的形式堆積在肝臟中(脂肪變性> 5%的肝細胞組織)。除了有過多脂肪外，NAFLD的患者伴有肝細胞損傷和炎症(脂肪性肝炎)，後者即NASH(Nonalcoholic steatohepatitis)。NAFLD中單純的脂肪變性和短期的發病率或死亡率的增加沒有相關性，但一旦進展到NASH則顯著提高肝硬化、肝衰竭和肝細胞癌(HCC)的風險。由於NASH引起的肝硬化是肝移植日益增加的一個原因。在NASH患者中肝病所致的發病率和死亡率都大大增加，並且和心血管疾病發病率和死亡率增加密切相關。對無症狀的中年男性患者的診斷顯示：46%的患者為非酒精性脂肪肝病(NAFLD)，12.2%為NASH。NAFLD患者多為男性、老年人、高血壓患者和糖尿病人。60-76%的糖尿病人患有NAFLD，22%患有NASH。NAFLD的小兒患者也在逐年增長，肥胖兒童中有38-53%患有NAFLD。在中國，非酒精性脂肪肝發病已經增至第一。

第1頁，共21頁(發明說明書)

【0004】目前尚無FDA批准的藥物治療該疾病，中國臨床常用多烯磷脂醯膽鹼、水飛薊素、熊去氧膽酸、甘草酸等護肝藥物。

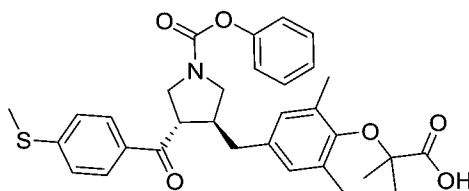
【0005】過氧化物酶體增植物活化受體(PPAR)是細胞核激素受體超家族的成員，其是調節基因表現的配體-活化的轉錄因子，主要有3個亞型：PPAP Alpha主要在棕色脂肪組織、肝臟、心臟和骨骼肌中表現，在膽酸、脂類及糖的代謝中發揮主要作用；PPAP Delta表現特異性不明顯，可能具有抗炎作用；Gamma對胰島素抵抗有一定作用。該受體與多種疾病狀態有關，包括血脂異常症、高脂血症、高膽固醇血症、動脈粥樣硬化、動脈粥樣化形成、高甘油三酯血症、心力衰竭、心肌梗塞、血管疾病、心血管疾病、高血壓、肥胖症、炎症、關節炎、癌症、阿茲海默症、皮膚病、呼吸疾病、眼部病症、IBD(炎症性腸病)、潰瘍性結腸炎及克隆氏病。從PPAR多種對肝臟功能有益的條件機制來看，PPAR促效劑是治療脂肪肝最有效的潛在藥物之一。

【0006】如下化合物為已有文獻報導的PPAR促效劑化合物。



## 【發明內容】

【0007】本發明的第一個目的在於從解決現有技術的不足出發，提供了式(I)所示化合物的非晶形，該非晶形具有相當的穩定性，進而具有一定的藥用前景，為式(I)所示化合物開發成臨床用藥提供了一種可行的原料藥選擇。



(I)

【0008】本發明的上述目的通過如下技術方案予以實現：

【0009】式(I)所示化合物的非晶形，其特徵在於所述非晶形的X-射線粉末繞射圖譜(XRPD)中沒有尖銳的繞射峰。

【0010】本領域的技術人員習知，非晶形(Amorphous)屬於熱力學高能態，為熱力學亞穩態結構，構成其化合物的基本微粒在三維空間呈現為無序排列，X-射線粉末繞射譜圖是判斷非晶形態最直觀的方式之一；具體的，當化合物以非晶形的形態存在時，其X-射線粉末繞射圖譜通常表現為沒有尖銳的繞射峰，即XRPD譜圖中體現為沒有繞射峰，或者有一個或者數個寬且平緩的繞射峰(業內常形象地稱之為「饅頭峰」)；本領域的技術人員可以理解，所述的非晶形XRPD譜圖中寬且平緩的繞射峰為相對於晶型XRPD譜圖中窄且尖銳的繞射峰而言，一般來說，非晶形XRPD譜圖中寬且平緩的繞射峰 $2\theta$ 角跨度可達 $5^\circ$ 甚至更大。

【0011】具體的，前述式(I)所示化合物的非晶形的X-射線粉末繞射圖譜在 $2\theta$ 角為 $10^\circ\sim 25^\circ$ 之間存在一個寬且平緩的繞射峰。

【0012】本發明的一個具體的方案中，所述式(I)所示化合物的非晶形其X-射線粉末繞射圖譜如圖1所示。

【0013】本發明的一些方案中，上述非晶形，其示差掃描熱析曲線(DSC)在 $69.28\pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $239.33\pm 3^{\circ}\text{C}$ 有兩個吸熱峰的起始點。

【0014】本發明的一個具體的方案中，上述非晶形，其DSC圖譜如圖2所示。

【0015】本發明的一些方案中，上述非晶形，其熱重分析曲線(TGA)在 $120.00\pm 3^{\circ}\text{C}$ 處失重達0.9958%。

【0016】本發明的一個具體的方案中，上述非晶形，其TGA圖譜如圖3所示。

【0017】本發明的第二個目的在於提供了一種式(I)化合物非晶形的製備方法，所述製備方法包括將式(I)化合物加入到溶劑中加熱攪拌或重結晶製得；所述溶劑選自：甲醇、乙醇、四氫呋喃、乙酸乙酯和正庚烷，所述加熱攪拌的攪拌溫度為 $25^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$ ，所述加熱攪拌(打漿)的時間為2小時~48小時，所述製備方法中化合物與溶劑的質量/體積比為1:3.5~6 g/mL。

【0018】該方法工藝穩定，反應條件溫和，原料易得，可用於大規模工業化生產式(I)化合物非晶形。

【0019】[技術效果]

【0020】發明人驚訝的發現，不同於常規以非晶形態存在之化合物穩定性不佳、藥用性能不好等缺陷，本發明提及的式(I)化合物非晶形具有較高的穩定性，具體表現為所述式(I)化合物非晶形在高溫、高濕等條件下具有較高的穩定性，基於已有的穩定性數據可以判斷：式(I)化合物非晶形具有一定的藥用前景；進一步的，本發明提及的式(I)化合物非晶形對與PPAR相關通路的細胞因子的抑制作用明顯，並通過 $\text{CCl}_4$ 誘導的C57BL/6小鼠急性肝損傷實驗和MCD飲食誘導的db/db小鼠NASH模型發現，式(I)化合物對肝損傷、NAS Score和肝纖維化的改善作用顯著。

【0021】綜上可知，本發明式(I)所示化合物的非晶形具有較好的穩定性，具有一定的藥用前景；因此，如果通過檢測手段證明式(I)所示化合物在

料藥和/或製劑產品中部分或全部以非晶形存在，則應被視為使用了本發明提供的式(I)所示化合物的非晶形。所述檢測手段除了前述提及的X-射線粉末繞射外，還可以進一步包括示差掃描熱析法(DSC)，紅外光譜法(IR)，拉曼光譜法(Raman)，固體核磁共振法(SSNMR)的方法及其他一切可以佐證使用了本發明所述式(I)所示化合物的非晶形的檢測方法，並可以採用本領域技術人員常用方法去除諸如藥物輔料等所帶來的影響，諸如差減圖譜法等。

**【0022】** [定義與說明]

**【0023】** 除非另有說明，本文所用的下列術語和短語旨在含有下列含義。一個特定的短語或術語在沒有特別定義的情況下不應該被認為是不確定的或不清楚的，而應該按照普通的含義去理解。當本文出現商品名時，旨在指代表其對應的商品或其活性成分。

**【0024】** 本發明的中間體化合物可以通過本領域技術人員所熟知的多種合成方法來製備，包括下面列舉的具體實施方式、其與其他化學合成方法的結合所形成的實施方式以及本領域技術人員所熟知的等同替換方式，優選的實施方式包括但不限於本發明的實施例。

**【0025】** 本發明具體實施方式的化學反應是在合適的溶劑中完成的，所述的溶劑須適合於本發明的化學變化及其所需的試劑和物料。為了獲得本發明的化合物，有時需要本領域技術人員在已有實施方式的基礎上對合成步驟或者反應流程進行修改或選擇。

**【0026】** 下面會通過實施例具體描述本發明，這些實施例並不意味著對本發明的任何限制。

**【0027】** 本發明所使用的所有溶劑是市售的，無需進一步純化即可使用。

**【0028】** 本發明所使用的溶劑可經市售獲得。本發明採用下述縮略詞：DCM代表二氯甲烷；DMF代表N,N-二甲基甲醯胺；DMSO代表二甲亞砜；EtOH

代表乙醇；MeOH代表甲醇；TFA代表三氟乙酸；TsOH代表對甲苯磺酸；mp代表熔點；EtSO<sub>3</sub>H代表乙磺酸；MeSO<sub>3</sub>H代表甲磺酸；ATP代表三磷酸腺苷；HEPES代表4-羥乙基哌嗪乙磺酸；EGTA代表乙二醇雙(2-胺基乙基醚)四乙酸；MgCl<sub>2</sub>代表氯化鎂；MnCl<sub>2</sub>代表氯化錳；DTT代表二硫蘇糖醇。

**【0029】 1.1 粉末X-射線繞射(X-ray powder diffractometer, XRPD)**

儀器型號：布魯克D8 advance (Bruker D8 Advance)X-射線繞射儀

測試方法：大約10 ~ 20 mg樣品用於XRPD檢測。

詳細的XRPD 參數如下：

光管：Cu, k $\alpha$ , ( $\lambda=1.54056\text{\AA}$ )

光管電壓：40 kV，光管電流：40 mA

發散狹縫：0.60 mm

探測器狹縫：10.50 mm

防散射狹縫：7.10 mm

掃描範圍：4-40 deg

步徑：0.02 deg

步長：0.12 秒

樣品盤轉速：15 rpm

**【0030】 1.2 差熱分析(Differential Scanning Calorimeter, DSC)**

儀器型號：TA Q2000示差掃描熱析儀

測試方法：取樣品(~ 1 mg)置於DSC鋁鍋內進行測試，方法為：在50mL/min N<sub>2</sub>條件下，加熱樣品從25°C - 350°C，升溫速率為10°C/min。

**【0031】 1.3 熱重分析(Thermal Gravimetric Analyzer, TGA)**

儀器型號：TA Q5000IR熱重分析儀

測試方法：取樣品(2 ~ 5 mg)置於TGA鉑金鍋內進行測試，方法為：在25mL/min N<sub>2</sub>條件下，以10°C/min的升溫速率，加熱樣品從室溫到-350°C，升溫速率為10°C/min。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0032】

圖1為式(I)化合物非晶形的Cu-K $\alpha$ 輻射的XRPD譜圖。

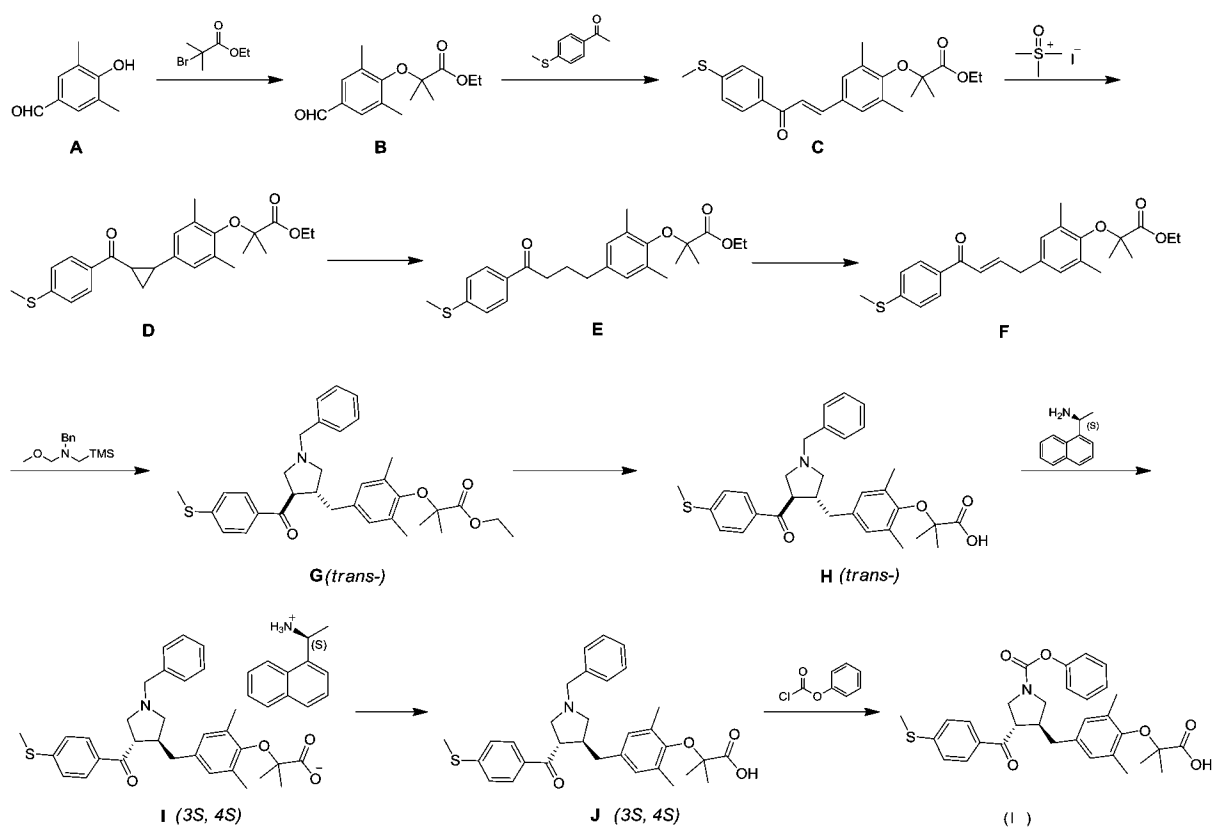
圖2為式(I)化合物非晶形的DSC譜圖。

圖3為式(I)化合物非晶形的TGA譜圖。

### 【實施方式】

【0033】下面通過實施例對本發明進行詳細描述，但並不意味著對本發明任何不利限制。本文已經詳細地描述了本發明，其中也公開了其具體實施例方式，對本領域的技術人員而言，在不脫離本發明精神和範圍的情況下針對本發明具體實施方式進行各種變化和改進將是顯而易見的。

#### 【0034】實施例1：式(I)化合物的製備



【0035】 第一步：化合物B的製備

【0036】 在25°C下向50 L的反應釜中加入乙腈(30 L)，啟動攪拌，然後加入化合物A(2.00 kg, 13.32 mol, 1.0 eq)，溴代異丁酸乙酯(7.79 kg, 39.95 mol, 3.0 eq)和碳酸鉀(5.52 kg, 39.95 mol, 3.0 eq)。反應液在80°C下攪拌16小時。將反應溫度降至25°C後過濾，濾液減壓濃縮。所得殘餘物溶解於乙酸乙酯(5 L)。濾餅用乙酸乙酯(5 L×2)洗滌，合併乙酸乙酯溶液。合併的有機相用氫氧化鈉水溶液(1 mol/L, 5 L/次)洗滌，直至通過薄層層析法(石油醚：乙酸乙酯=5:1)檢測至有機相中沒有原料點A。有機相通過飽和食鹽水(5 L×2)洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾，減壓濃縮。得到1.51 kg化合物B，產率：42.9%。

【0037】 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 9.85 (s, 1H), 7.50 (s, 2H), 4.31-4.23 (m, 2H), 2.25 (s, 6H), 1.45 (s, 6H), 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 1H)。

【0038】 第二步：化合物 C 的製備

【0039】在乾冰乙醇浴下(-60°C)，向乙醇(12 L)中通入氯化氫氣體(3.67 kg，100.54 mol, 5.3 eq)，並將體系溫度控制在 0°C 以下。向 50 L 的反應釜中加入乙醇(13 L)和新製備的氯化氫乙醇溶液，開啟攪拌，自然升溫至 25°C。然後加入化合物 B(5.01 kg, 18.97 mol, 1.0 eq)。待原料完全溶解後，分批加入對甲硫基苯乙酮(2.83 kg, 17.07 mol, 0.9 eq)。混合物在 25°C 下攪拌 16 小時。將反應體系抽濾，濾餅溶於乙酸乙酯(30 L)，用水(10 L×2)，氫氧化鈉水溶液(1 N, 8 L×2)和飽和食鹽水(8 L×2)洗滌，無水硫酸鈉(1.5 kg)乾燥，過濾，減壓濃縮，得到 6.10 kg 化合物 C，產率：76.8%。

【0040】MS m/z (ESI): 413.1 [M+1]。

【0041】<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.95 (d, J=8.28 Hz, 2H), 7.71 (d, J=15.56 Hz, 1H), 7.42 (d, J=15.56 Hz, 1H), 7.31-7.28 (m, 4H), 4.30 (q, J=7.28 Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 2.25 (s, 6H), 1.50 (s, 6H), 1.36 (t, J=7.15 Hz, 3H)。

【0042】第三步：化合物 D 的製備

【0043】在 50 L 反應釜中加入 N,N-二甲基甲醯胺(15 L)，開啟攪拌，加入三甲基碘化亞砷(3.78 kg, 16.01 mol 1.2 eq)，然後降溫至 0°C，分批加入三級丁醇鉀(1.79 kg, 16.01 mol, 1.2 eq)。在 0°C 下攪拌 30 分鐘後，緩慢加入化合物 C(5.5 kg, 13.34 mol, 1.0 eq)的 N,N-二甲基甲醯胺(15 L)溶液。混合物在 0°C 下攪拌 2 小時。將反應液緩慢倒入冰水(0-5°C，30 L)中，然後用石油醚/乙酸乙酯(1:1, 10 L×3)萃取。合併的有機相用水(10 L×2)和飽和食鹽水(10 L×2)洗滌，無水硫酸鈉(2 kg)乾燥，過濾，減壓濃縮，得到 5.48 kg 化合物 D，產率：96.3%。

【0044】MS m/z (ESI): 427.2 [M+1]。

【0045】<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.91 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.27 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.81 - 6.70 (m, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.29 (q, J=7.0 Hz, 2H),

2.83 - 2.74 (m, 1H), 2.56 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.18 (s, 6H), 1.84 (m, 1H), 1.46 (s, 6H), 1.35 (t, J=7.2 Hz, 3H)。

【0046】 第四步：化合物 E 的製備

【0047】 向乾燥的 50 升反應釜中加入乙醇 (35.0 L)，開啟攪拌，然後加入化合物 D(5.45 kg, 12.79 mol, 1.0 eq)和冰醋酸(2.30 kg, 38.37 mol, 3.0 eq)。將反應混合物加熱到 80°C 後，分批加入鋅粉(2.45 kg, 38.37 mol, 3.0 eq)。得到的懸濁液在 80°C 下繼續攪拌 16 小時。將反應液過濾，濾餅用乙酸乙酯(3 L×2)洗滌，合併有機相減壓濃縮。將濃縮液溶於乙酸乙酯(10 L)，抽入 50 L 分液漏斗中。向 50 L 分液漏斗中抽入乙酸乙酯(15 L)和水(10 L)，攪拌 5 分鐘後靜置分液。有機相依次用 10%碳酸鈉水溶液(10 L×2)和飽和食鹽水(10 L×1)洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾，減壓濃縮，得到 5.15 kg 化合物 E，產率：92.9%。

【0048】 MS m/z (ESI): 429.2 [M+1]。

【0049】 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.74 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.17 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.71 (s, 2H), 4.21 (q, J=7.1 Hz, 2H), 2.82 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.51 (t, J=7.7 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.09 (s, 6H), 1.94 (quin, J=7.5 Hz, 2H), 1.39 (s, 6H), 1.28 (t, J=7.0 Hz, 3H)。

【0050】 第五步：化合物 F 的製備

【0051】 向 50 L 反應釜中加入無水二氯甲烷(20 L)，啟動攪拌，然後加入化合物 E(5.21 kg, 12.02 mol, 1.0 eq)和 2,6-二甲基吡啶(4.50 kg, 42.07 mol, 3.5 eq)，降溫至 0°C。向反應液中滴加三甲矽基三氟甲磺酸酯(8.01 kg, 36.06 mol, 3.0 eq)，在 0°C 下繼續攪拌 30 分鐘左右。取反應液通過薄層層析法(石油醚：乙酸乙酯=5:1)檢測。向 50 L 分液漏斗中抽入冷水(5-10°C, 10 L)，隨後在攪拌下抽入反應液，攪拌 5 分鐘後分液。有機相用飽和食鹽水(10 L)洗滌，

減壓濃縮。將濃縮液加到甲醇/水 (2:1, 30 L)的混合溶液中，攪拌 20 分鐘左右，析出黃色固體。將混合物過濾，減壓抽乾得到黃色固體粗品。

【0052】在 50 L 反應釜中加入無水甲苯 (35 L)，啟動攪拌，將減壓抽乾的粗品加入反應釜。降溫至 0°C，將二氯二氰基苯醌(2.99 kg, 13.22 mol, 1.1 eq)分批加入反應釜中，在 0°C 下繼續攪拌 1 小時。取反應液通過薄層層析法(石油醚：乙酸乙酯=5:1)檢測。在 120 L 的桶中加入水(50 L)和亞硫酸鈉(3.00 kg)，攪拌澄清後，將反應液緩慢倒入該亞硫酸鈉溶液中，並加入乙酸乙酯 (15 L)。快速攪拌 10 分鐘，析出大量黃色固體，抽濾，濾餅用石油醚/乙酸乙酯 (3:1, 10 Lx2)洗滌。合併濾液並分出有機相。有機相用 5%亞硫酸鈉溶液(10 Lx2)和飽和食鹽水(10 Lx2)洗滌，無水硫酸鈉(2.00 kg)乾燥。過濾，減壓濃縮(40-50°C)。得到 4.29 kg 粗產品。隨後將粗產品加入 12 L 無水乙醇中，25°C 下攪拌 0.5 小時，隨後過濾。收集濾餅並減壓乾燥得到 3.50 kg 化合物 F，產率: 69.9%。

【0053】MS m/z (ESI): 427.2 [M+1]。

【0054】<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.85 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.28 - 7.27 (m, 2H), 7.22 - 7.14 (m, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.83 (s, 2H), 4.30 (s, 2H), 3.53 (d, J=6.8 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H), 2.21 (s, 6H), 1.49 (s, 6H), 1.38 (s, 3H)。

【0055】第六步：化合物 G 的製備

【0056】向乾燥的 50 升反應釜中加入 2-甲基四氫呋喃(30 L)，開啟攪拌，加入化合物 F(3.0 kg, 6.50 mol, 1.0 eq)和三氟乙酸(37.05 g, 0.33 mol, 0.05 eq)，然後緩慢加入 N-甲氧基甲基-N-(三甲基矽基)苄胺(1.85 kg, 7.80 mol, 1.2 eq)，控制內溫在 30°C 以下。滴加完畢在 25°C 下繼續攪拌 12 小時。將反應液抽入 50 L 分液漏斗中，依次用 5%碳酸鈉水溶液(10 Lx2)和飽和氯化

鈉水溶液(10 L×2)洗滌，無水硫酸鈉(2 kg)乾燥，過濾，減壓濃縮，得到 3.92 kg 化合物 G。

【0057】 MS m/z (ESI): 560.0 [M+1]。

【0058】 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.71 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.31 - 7.20 (m, 9H), 6.71 (s, 1H), 4.30 - 4.23 (m, 2H), 3.76 - 3.36 (m, 6H), 3.07 - 2.96 (m, 2H), 2.68 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.51 (s, 3H), 2.10 - 2.03 (m, 6H), 1.36 - 1.22 (m, 9H)。

【0059】 第七步：化合物 H 的製備

【0060】 將化合物 G(3.92 kg, 5.04 mol, 1.0 eq)用無水乙醇(20 L)溶解，加到 50 升反應釜中，開啟攪拌。將氫氧化鈉(604.8 g, 15.12 mol, 3.0 eq)溶於水(6 L)中，然後緩慢加到反應液中。加料完畢，在 25°C 下繼續攪拌 16 小時。將反應液減壓濃縮，除去大部分溶劑(乙醇)。將濃縮後的液體抽入 50 L 分液漏斗中，開啟攪拌，然後抽入乙酸乙酯(20 L)，用 10%的硫酸氫鉀水溶液(10 L×2)和飽和氯化鈉水溶液(10 L×2)洗滌，無水硫酸鈉(1.5 kg)乾燥，減壓濃縮。大約濃縮至剩餘 8 L 左右溶劑，有大量固體析出，停止濃縮，降至 25 °C。將濃縮的懸浮液過濾，濾餅用乙酸乙酯(2 L×3)洗滌，抽乾，通過真空乾燥箱減壓乾燥，得到 2.44 kg 化合物 H，產率：89.85%。

【0061】 MS m/z (ESI): 532.1[M+1]。

【0062】 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.66 (dd, J=4.0, 8.3 Hz, 2H), 7.41 - 7.33 (m, 2H), 7.23 - 7.08 (m, 5H), 6.79 (d, J=2.0 Hz, 2H), 4.12 (q, J=7.0 Hz, 2H), 3.93 - 3.60 (m, 4H), 3.48 - 3.32 (m, 1H), 2.97 - 2.84 (m, 1H), 2.67 (d, J=7.8 Hz, 2H), 2.57 - 2.49 (m, 3H), 2.25 - 2.13 (m, 6H), 1.46 (s, 6H), 1.36 (t, J=7.2 Hz, 3H)。

【0063】第八步：化合物 I 的製備

【0064】向乾燥的 50 升反應釜中加入乙腈(24 L)和異丙醇(6 L)，開啟攪拌，然後加化合物 H(3.04 kg, 5.65 mol, 1.0 eq)。在 80°C 下緩慢加入(S)-(-)-(1-萘基)乙胺(724.79 g)。加料完畢，在 80°C 下繼續攪拌 1 小時。停止加熱，自然冷卻，在 30°C 下繼續攪拌 16 小時。停止攪拌，抽濾，濾餅用異丙醇(2 L ×2)洗滌，抽乾後，將固體轉移至旋蒸中減壓乾燥，得到 1.63 kg 化合物 I。

【0065】手性拆分條件：手性柱：Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D.，3μm；流動相：40% 甲醇(0.05% DEA) -CO<sub>2</sub>；流速：4 mL/min；柱溫：40°C。

【0066】化合物 I 對應的保留時間：1.604 分鐘。

【0067】第九步：化合物 J 的製備

【0068】向乾燥的 50 L 反應釜中加入無水乙醇(30 L)和無水甲醇(4.5 L)，開啟攪拌，加入化合物 I(2.93 kg，4.17 mol, 1.0 eq)。升溫至 80°C 攪拌 1 小時，停止加熱，自然冷卻，在 30°C 下繼續攪拌 16 小時。將懸浮液抽濾，濾餅用乙醇(2 L×2)洗滌後減壓乾燥。向殘餘物中加入甲醇(1.5 L)和乙酸乙酯(15 L)，攪拌後抽入 50 L 分液器中。有機相用 10%的硫酸氫鉀水溶液(10 L×5)，飽和氯化鈉水溶液(5 L×2)洗滌，無水硫酸鈉(1 kg)乾燥，過濾，減壓濃縮，得到 0.97 kg 化合物 J。

【0069】手性拆分條件：手性柱：Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D.，3μm；流動相：40% 甲醇(0.05% DEA)- CO<sub>2</sub>；流速：4 mL/min；柱溫：40°C。

【0070】化合物 J 對應的保留時間：1.576 分鐘。

【0071】第十步：式(I)化合物的製備

【0072】向乾燥的 50 L 反應釜中加入無水二氯甲烷(7 L)，開啟攪拌，加入化合物 J(700 g, 1.31 mol, 1.0 eq)和三乙胺(1.33 kg, 13.1 mol, 10.0 eq)。在 0°C 下向反應液中滴加氯甲酸苯酯(2.24 kg, 13.1 mol, 10.0 eq)。加料完畢，在

0°C下繼續攪拌 1 小時。向反應液中加入碳酸鉀(543.37 g, 3.94 mol, 3.0 eq) 的純水(3 L)溶液，升溫至 40°C繼續攪拌 20 分鐘。然後加入氫氧化鋰(165.60 g, 3.94 mol, 3.0 eq)，在 25°C下繼續攪拌 20 分鐘。將反應混合物分液，有機相用飽和氯化鈉水溶液(2 L)洗滌，無水硫酸鈉(500 g)乾燥，過濾，減壓濃縮。濃縮液用乙酸乙酯(1.5 L)溶解，然後在快速攪拌下緩慢加入正庚烷(5.6 L)。加完繼續攪拌 30 分鐘，過濾。將濾餅加到正庚烷/乙酸乙酯(4:1, 3.5 L×3)中，快速攪拌打漿 30 分鐘，過濾。得到的濾餅用三級丁基甲醚(5 L)溶解，依次用 5%硫酸氫鉀水溶液(1.5 L×2)，去離子水(1 L×2)洗滌，無水硫酸鈉(300 g)乾燥，過濾，減壓濃縮。得到的固體通過真空烘箱乾燥(40-45°C)，得到式(I)化合物。

【0073】MS m/z (ESI): 584.1 [M+23]。

【0074】<sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD-d<sub>4</sub>) δ ppm 7.65 (d, J=6.8 Hz, 2H), 7.43 - 7.37 (m, 2H), 7.29 - 7.22 (m, 3H), 7.16 (t, J=7.2 Hz, 2H), 6.87 (s, 2H), 4.13 - 3.92 (m, 2H), 3.89 - 3.80 (m, 1H), 3.69 (dd, J=5.4, 10.7 Hz, 1H), 3.58 - 3.49 (m, 1H), 2.81 (d, J=14.1 Hz, 2H), 2.71 - 2.63 (m, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.23 (s, 6H), 1.43 (s, 6H)。

【0075】手性拆分條件：手性柱：Chiralpak AD-3 100×4.6mm I.D.，3μm；流動相：40% of methanol (0.05% DEA) in CO<sub>2</sub>；流速：2.8mL/min；柱溫：40°C。

【0076】式(I)化合物對應的保留時間：2.018分鐘。

【0077】實施例2.式(I)化合物非晶形的製備

【0078】控制溫度在25°C，將粗品淡黃色固體式(I)化合物(310.5 g)加入到3 L 反應瓶中，然後加入正庚烷(1500 mL)，加料完畢，反應在25°C攪拌2 h，過

濾，濾餅用正庚烷(500 mL)洗滌，然後過濾得到粗品，粗品經真空乾燥箱乾燥，XRPD檢測其形態，所得終產物的形態為非晶形。

【0079】所得終產物的Cu-K $\alpha$ 輻射的XRPD譜圖如圖1所示；DSC譜圖為圖2所示；TGA譜圖如圖3所示。

【0080】實施例3.式(I)化合物非晶形的製備

【0081】稱取式(I)化合物(40.0mg)加到4.0 mL玻璃瓶中，加入150 $\mu$ L的乙酸乙酯，使其成混濁液。在磁力攪拌器上40 $^{\circ}$ C攪拌2天後，將樣品離心，取上清液置於通風櫥中揮發至溶劑揮發乾。然後將得到固體置於40 $^{\circ}$ C真空乾燥箱中乾燥過夜。所得終產物為與實施例1相同的非晶形。

【0082】實施例4.式(I)化合物非晶形的製備

【0083】稱取式(I)化合物(39.9mg)加到4.0 mL玻璃瓶中，加入150 $\mu$ L的四氫呋喃，使其成混濁液。在磁力攪拌器上40 $^{\circ}$ C攪拌2天後，將樣品離心，取上清液置於通風櫥中揮發至溶劑揮發乾。然後將得到固體置於40 $^{\circ}$ C真空乾燥箱中乾燥過夜。所得終產物為與實施例1相同的非晶形。

【0084】實施例5.式(I)化合物非晶形在高溫、高濕條件下的固體穩定性試驗

【0085】平行稱取2份式(I)化合物非晶形樣品，每份大約100 mg，置於玻璃樣品瓶的底部，攤成薄薄一層。樣品用鋁箔紙封瓶口，並在鋁箔紙上扎些小孔，保證樣品能與環境空氣充分接觸，置於40 $^{\circ}$ C/75%濕度條件恆溫恆濕箱。在上述條件下放置的樣品於第10天，30天，60天，90天取樣檢測，檢測結果與0天的初始檢測結果進行比較，HPLC分析方法如表1所示，試驗結果見下表2所示：

表1.HPLC分析方法

色譜柱：	Waters Xbridge C18 (3.5 $\mu$ m，150mm*4.6mm)
------	--

流速：	1.0 mL/min		
檢測波長：	220 nm		
柱溫：	35°C		
進樣體積：	10 $\mu$ L		
運行時間：	50 min		
流動相：	流動相 A: 0.1%TFA –水 流動相 B:乙腈		
梯度：	時間(min)	流動相 A(%)	流動相 B(%)
	0.00	90	10
	5.00	65	35
	35.00	5	95
	38.00	5	95
	40.00	90	10
	45.00	90	10
稀釋劑	水: 乙腈= 50: 50 (v/v)		
洗針液	水: 乙腈= 50: 50 (v/v)		

表2.式(I)化合物非晶形的固體穩定性試驗

時間點(天)	外觀	純度(%)	總雜質(%)
0	灰白色粉末	97.37	2.63
10	灰白色粉末	97.49	2.51
30	灰白色粉末	97.31	2.69
60	灰白色粉末	97.59	2.41
90	灰白色粉末	97.28	2.72

【0086】以上實驗數據表明：本發明所提供的式(I)化合物非晶形在高溫、高濕條件下未發現含量及雜質情況的明顯變化，具有較高的高溫、高濕穩定性。

【0087】實施例6.式(I)化合物非晶形在高濕條件下固體物理穩定性試驗

【0088】平行稱取2份式(I)化合物非晶形，每份大約100 mg，放置於玻璃樣品瓶的底部，攤成薄薄一層，鋁箔紙封瓶口，並在鋁箔紙上扎些小孔，保證樣品能與環境空氣充分接觸。把製備的樣品分別放置於25°C/92.5%的相對條件下，考察樣品第10天的物理穩定性。同時，單獨稱取一份大約100 mg式(I)化合物非晶形，放置於玻璃樣品瓶的底部，用螺紋瓶蓋密封後，保存

於-20°C條件下，作為對照品使用。在第10天，取出所有樣品，恢復至室溫，觀察樣品外觀變化，並用XRPD檢測樣品形態。通過對加速樣品與對照樣品的比較，判斷式(I)化合物非晶形的固體物理穩定性。下表3為式(I)化合物非晶形固體物理穩定性實驗結果。

表3.式(I)化合物非晶形在高濕條件下固體物理穩定性試驗

考察項目	時間點	25°C/92.5%相對濕度(敞口)
形態	10 天	非晶形
性狀	10 天	灰白色粉末

【0089】以上實驗數據表明：本發明所提供的式(I)化合物非晶形在高濕條件下未發現形態及性狀的變化，具有較高的高濕穩定性。

【0090】實施例7.式(I)化合物非晶形在不同溶劑中的穩定性試驗

【0091】取約20mg的式(I)化合物非晶形多份，分別加入0.3 - 0.4 mL的下表中的單一或混合溶劑，40°C條件下攪拌。攪拌2天後，若樣品為溶液狀態或接近溶液狀態，則過濾後自然揮發除去溶劑；若樣品仍為混懸液，則離心樣品，收集沉澱，上清液置於通風櫥中揮發至溶劑揮發乾。然後將得到沉澱和揮乾溶劑後的固體置於40°C真空乾燥箱中乾燥過夜。收集所有樣品中的固體，XRPD檢測其狀態。結果見表4。

表4.式(I)化合物非晶形在不用溶劑中的穩定性實驗

序號	溶劑	外觀	結果
1	甲醇	揮發除去溶劑後析出固體	非晶形
2	乙醇	混懸液(2 天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形
3	乙腈	混懸液(2 天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形
4	丙酮	混懸液(2 天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形
5	乙酸乙酯	混懸液(2 天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形
6	四氫呋喃	混懸液(2 天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形

7	1,4-二氧六環	混懸液(2天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形
8	甲醇：水=3:1	揮發除去溶劑後析出固體	非晶形
9	乙醇：水=3:1	混懸液(2天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形
10	乙腈：水=3:1	混懸液(2天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形
11	丙酮：水=3:1	混懸液(2天)/揮發除去溶劑後析出固體	均為非晶形

**【0092】** 以上實驗數據表明：本發明所提供的式(I)化合物非晶形在常規溶劑中未發生形態變化，具有較高的穩定性。

**【0093】** 生物活性測試

**【0094】** 實驗例8.體外評價

**【0095】** PPAR促效活性體外測試原理

**【0096】** 細胞核激素受體(NHR)測試

**【0097】** PathHunter的NHR蛋白相互作用和核轉移測試是用來檢測在均一的、非成像的實驗中的細胞核核激素受體的活化能力。該技術被稱為酶碎片互補(ETC)，由DiscoverX開發。

**【0098】** NHR蛋白測試是基於檢測：在活化狀態下標準長度的NHR蛋白，和一個含有類固醇受體共活化肽(SRCP)區域，並帶有一個或多個標準的LXXLL作用序列的細胞核融合蛋白的蛋白-蛋白相互作用。

**【0099】** NHR被標記在EFC測試體系的ProLink<sup>TM</sup>組分上，而SRCP區域和酶受體組分(EA)融合並在細胞核中表現。當與配體結合時，NHR會轉移到細胞核並且得到SRCP區域，在這裡就產生了互補作用，生成了一當量的活化-牛乳糖(-Gal)，並伴有化學光訊號的生成。和這種途徑所相關的效益，包括降低化合物孵育時間，對NHR靶點的直接測試，使用標準長度的人類NHR序列，以及基於破壞蛋白-蛋白相互作用去選擇一些全新種類的化合物。

**【0100】** NHR NT實驗檢測了一個NHR在細胞質和細胞核隔室之間的轉移。受體被標記在EFC測試體系的ProLink™組分上，同時EA和細胞核序列融合，從而限制了EA對細胞核的表現。NHR向細胞核的轉移導致了和EA的互補作用，生成了一當量的活化-牛乳糖(-Gal)，並伴有化學光訊號的生成。

**【0101】** 細胞處理：

- 1.PathHunter NHR細胞株按照標準操作從冷凍庫存中展開。
- 2.將細胞接種在20 uL/孔的384孔白色細胞板，並於測試前在37°C 孵育適當的時間。培養基中含有濾除血清的活性碳葡聚糖，以降低荷爾蒙表現的等級。

**【0102】** 促效劑實驗模式：

- 1.對於激動活性測定，細胞需要和化合物一起孵育以誘發反應。
- 2.由緩衝溶液將化合物配成庫存溶液，5倍稀釋。
- 3.將5 uL已5倍稀釋的化合物溶液加入到細胞中，並在37°C (或室溫)孵育3-16小時。保證最終的媒介濃度為1%。

**【0103】** 抑制劑實驗模式：

- 1.對於抑制活性測定，需將細胞預先與拮抗劑孵育，然後用促效劑在EC80濃度處挑戰。
- 2.由緩衝溶液將化合物配成庫存溶液，5倍稀釋。
- 3.將5 uL已5倍稀釋的化合物溶液加入到細胞中，並在37°C (或室溫)孵育60分鐘。保證最終的媒介濃度為1%。
- 4.將5 uL用緩衝溶液6倍稀釋的EC80促效劑加入到細胞中，並在37°C (或室溫)孵育3-16小時。

**【0104】** 訊號檢測：

1. 實驗訊號由單次加入的12.5 uL或15 uL(50% v/v)PathHunter測試試劑混合物生成，該試劑之後需在室溫孵育一小時。

2. 對微孔板的生成的化學發光訊號將由PerkinElmer Envision儀器檢測。

**【0105】數據分析：**

1. 化合物活性由CIBS數據分析軟體分析得到(ChemInnovation, CA)。

2. 對於促效劑模式的實驗，百分比活性由以下公式計算得到：

$$\% \text{活性} = 100\% \times (\text{所測化合物RLU均值} - \text{介質背景RLU均值}) / (\text{配體最大控制均值} - \text{介質背景RLU均值})$$

3. 對於拮抗劑模式的實驗，百分比活性由以下公式計算得到：

$$\% \text{抑制} = 100\% \times (1 - (\text{所測化合物RLU均值} - \text{介質背景RLU均值}) / (\text{EC80對照化合物的RLU均值} - \text{介質背景RLU均值}))$$

4. 需要注意的是，配體的反應會造成受體活性的下降(具有持續活性靶點的反向促效劑)。這些反向促效劑的活性由以下公式計算得到：

$$\% \text{反向激動活性} = 100\% \times ((\text{介質背景RLU均值} - \text{所測化合物RLU均值}) / (\text{介質背景RLU均值} - \text{配體最大控制RLU均值}))$$

實驗結果見表5：

表5. 本發明化合物體外篩選試驗結果

化合物	PPAR Alpha		PPAR Delta		PPAR Gamma	
	EC <sub>50</sub> nM	最高激發反應值%	EC <sub>50</sub> nM	最高激發反應值%	EC <sub>50</sub> nM	最高激發反應值%
GW7647	A	100%	/	/	/	/
L-165,041	/	/	A	100%	/	/
Troglitazone	/	/	/	/	E	100%
GFT-505 (Elafibranor)	E	I	C	II	E	II

式(I)化合物	A	I	A	II	E	I
---------	---	---	---	----	---	---

註1：以已知的PPAR $\alpha$  促效劑GW7647、PPAR $\delta$  促效劑L-165,041和PPAR $\gamma$  促效劑Troglitazone的體外平臺最高激發反應值為100%，其他化合物的最高響應值與其做對比，得到相應的最高激發反應值。一般認為最高激發反應值大於80%為完全促效劑，大於50%小於80%為部分促效劑，而小於50%則促效效應不完全。

註2：A  $\leq$  100 nM；100nM < B  $\leq$  150 nM；150nM < C  $\leq$  200 nM；200nM < D  $\leq$  250 nM；E > 250 nM。

註3：100%  $\geq$  I  $\geq$  80%；80% > II  $\geq$  50%；III < 50%。

【0106】以上實驗數據表明：式(I)化合物對PPAR Alpha和Delta受體的活化作用顯著，並選擇性地對PPAR Gamma受體具有活化作用。

【0107】綜合以上對於式(I)化合物非晶形穩定性及活性的評價實驗可知：不同於本領域對於藥物非晶形的通常認識，本發明提供的式(I)化合物非晶形具有較高的化學性質和物理形態的穩定性，並且式(I)化合物非晶形對與PPAR相關通路的細胞因子的抑制作用明顯，對肝損傷、NAS Score和肝纖維化的改善作用顯著；可知式(I)化合物非晶形具有較好的藥用前景。

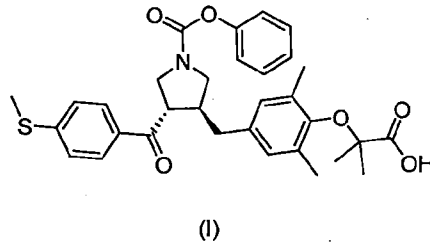
### 【符號說明】

【0108】無

## 公告本

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種式(I)所示化合物的非晶形，



其中所述非晶形的X-射線粉末繞射圖譜如圖1所示。

【第2項】如請求項1所述的式(I)所示化合物的非晶形，其中所述非晶形的示差掃描熱析曲線在 $69.28\pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $239.33\pm 3^{\circ}\text{C}$ 有兩個吸熱峰的起始點。

【第3項】如請求項2所述的式(I)所示化合物的非晶形，其中所述非晶形的DSC圖譜如圖2所示。

【第4項】如請求項1所述的式(I)所示化合物的非晶形，其中所述非晶形的熱重分析曲線在 $120.00\pm 3^{\circ}\text{C}$ 處失重達0.9958%。

【第5項】如請求項4所述的式(I)所示化合物的非晶形，其中所述非晶形的TGA圖譜如圖3所示。

【第6項】一種如請求項1所述的式(I)化合物非晶形的製備方法，包括將式(I)化合物加入到溶劑中加熱攪拌或重結晶製得，所述溶劑選自：甲醇、乙醇和正庚烷，所述加熱攪拌的攪拌溫度為 $25^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$ ，所述加熱攪拌的時間為2小時~48小時，所述製備方法中化合物與溶劑的質量/體積比為1: 3.5~6 g/mL。

【發明圖式】

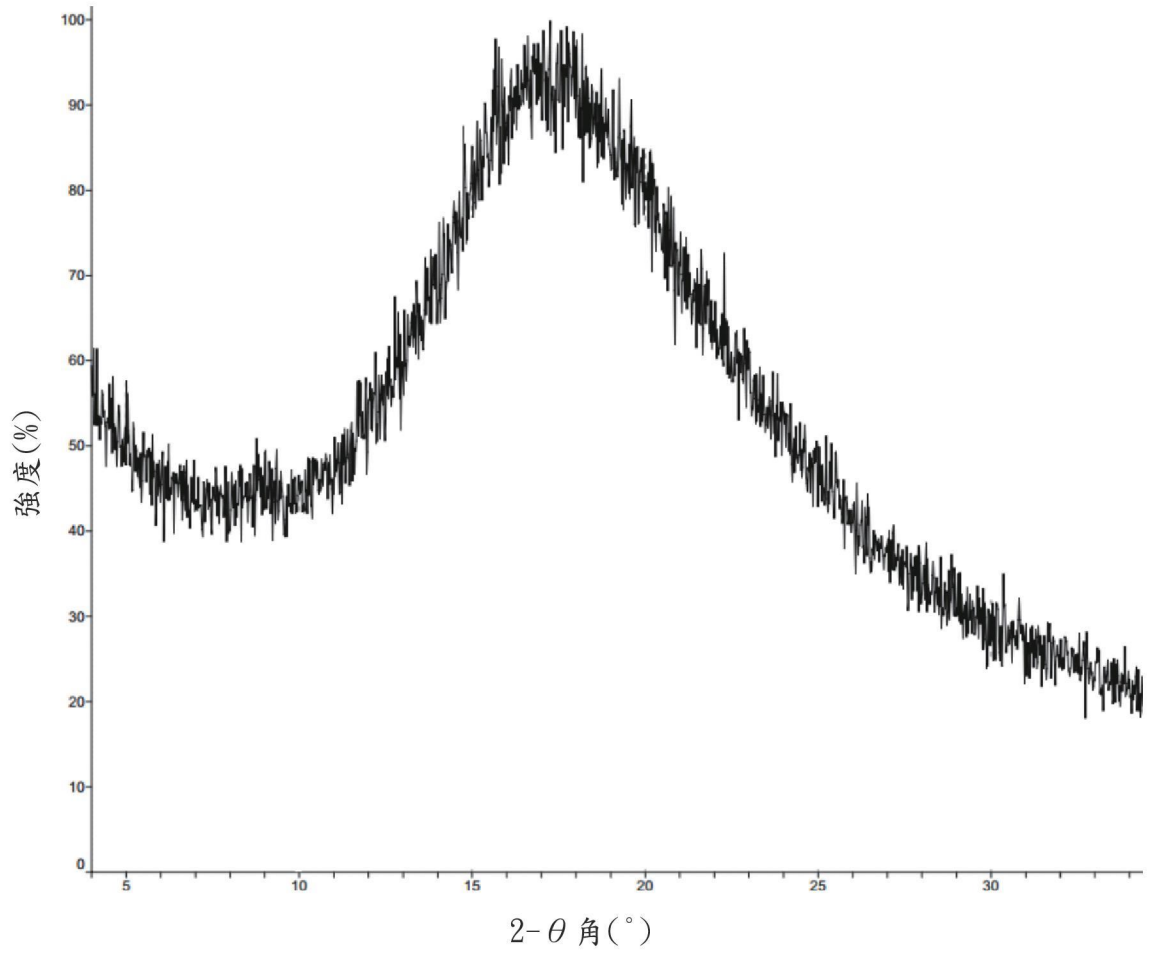


圖 1

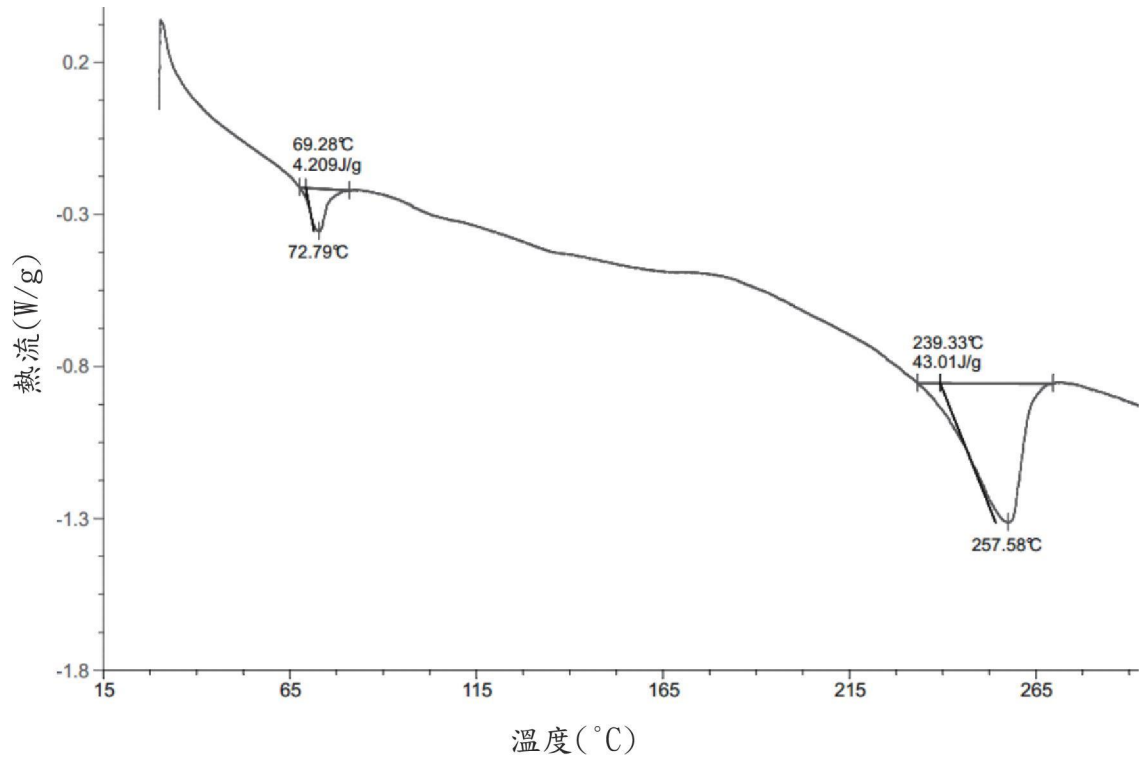


圖 2

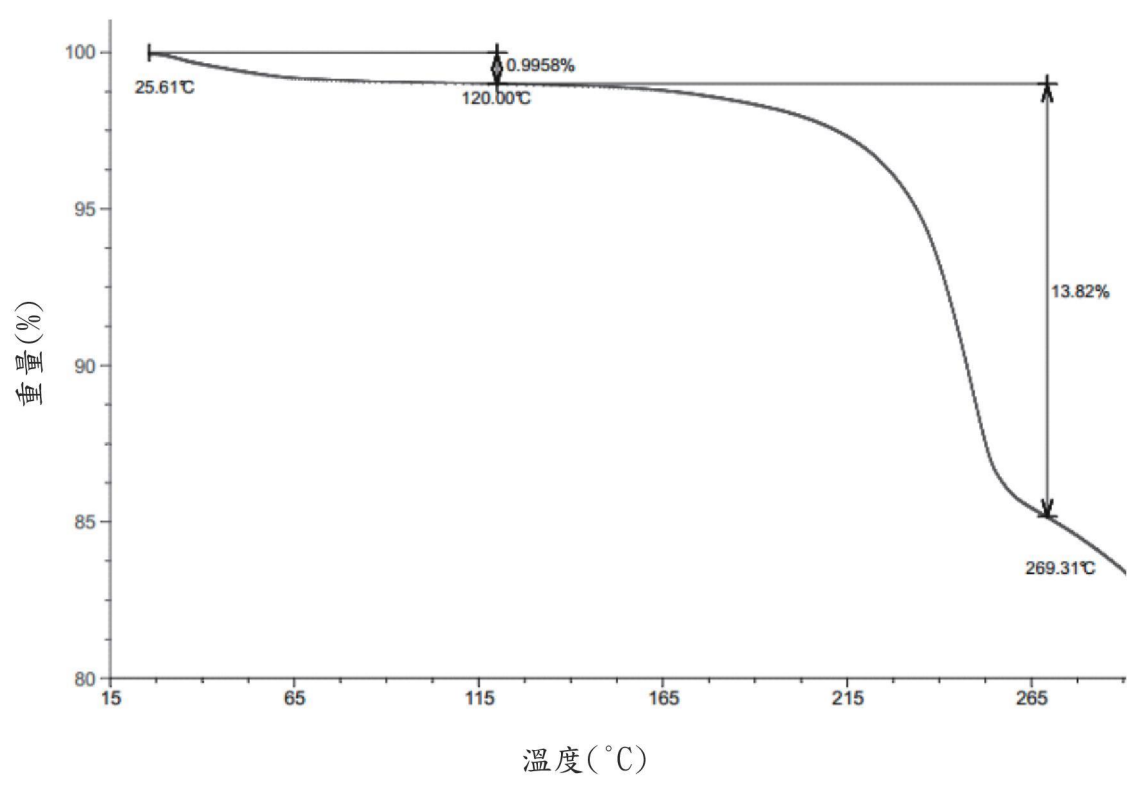


圖3