



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108026087 B

(45) 授权公告日 2021.06.04

(21) 申请号 201680045214.8

(22) 申请日 2016.07.01

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108026087 A

(43) 申请公布日 2018.05.11

(30) 优先权数据  
15175066.8 2015.07.02 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.02.01

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/040728 2016.07.01

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/004537 EN 2017.01.05

(73) 专利权人 中枢疗法公司  
地址 美国马里兰

(72) 发明人 M·奥斯特迈尔 U·韦特曼  
H·埃贝尔 R·焦万尼尼  
S·朔伊雷尔 S·弗拉蒂尼

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038  
代理人 于巧玲

(51) Int.Cl.  
C07D 405/14 (2006.01)  
A61K 31/506 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 102933579 A, 2013.02.13  
CN 102256963 A, 2011.11.23  
CN 102066359 A, 2011.05.18

审查员 杜姣

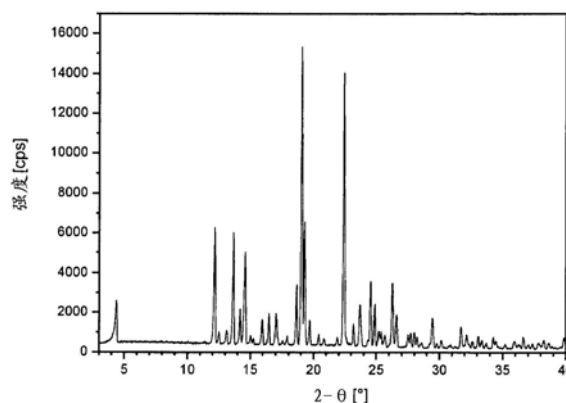
权利要求书5页 说明书40页 附图11页

### (54) 发明名称

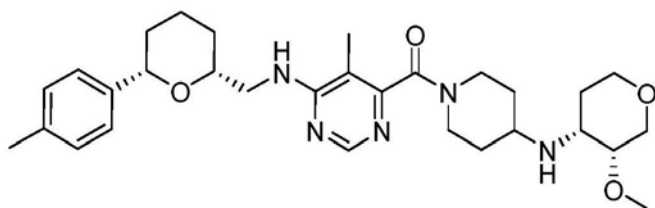
氨基嘧啶甲酮衍生物的柠檬酸盐

### (57) 摘要

本发明提供四氢吡喃基甲基氨基嘧啶酰胺, 例如(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的柠檬酸盐, 包含该盐的药物组合物, 制备该盐的方法以及使用该盐的医学治疗方法。

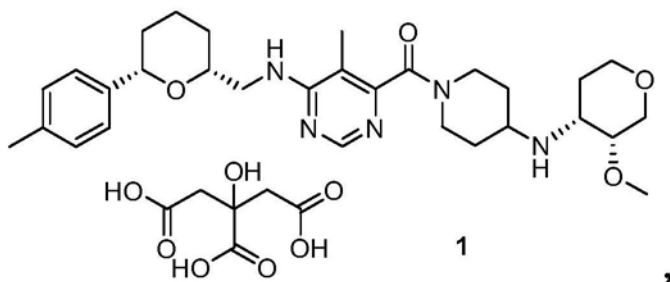


1. 化合物I的柠檬酸盐的晶体形式:



I

具有式



1

其中所述柠檬酸盐的晶体显示出包括在如下 $2-\theta$ 值的峰的X-射线粉末衍射图谱: $12.2 \pm 0.2$ ,  $13.7 \pm 0.2$ ,  $14.6 \pm 0.2$ ,  $18.7 \pm 0.2$ ,  $19.1 \pm 0.2$ ,  $22.4 \pm 0.2$ ,  $24.6 \pm 0.2$ , 和  $26.3 \pm 0.2$ , 所述 $2-\theta$ 值是使用 $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ , 40kV, 40mA的单色CuK $\alpha$ 1辐射测定的。

2. 根据权利要求1的晶体形式, 其中所述X-射线粉末衍射图谱包括在 $19.1^\circ$ 和 $22.4^\circ$ 的峰。

3. 根据权利要求2的晶体形式, 其特征在于, X-射线粉末衍射图谱包括在 $12.2^\circ$ 的峰。

4. 根据权利要求3的晶体形式, 其特征在于, X-射线粉末衍射图谱包括在 $13.7^\circ$ 的峰。

5. 根据权利要求4的晶体形式, 其特征在于, X-射线粉末衍射图谱包括在 $14.6^\circ$ 的峰。

6. 根据权利要求5的晶体形式, 其特征在于, X-射线粉末衍射图谱包括在 $18.7^\circ$ 的峰。

7. 根据权利要求6的晶体形式, 其特征在于, X-射线粉末衍射图谱包括在 $24.6^\circ$ 的峰。

8. 根据权利要求7的晶体形式, 其特征在于, X-射线粉末衍射图谱包括在 $26.3^\circ$ 的峰。

9. 根据权利要求1-8任一项的晶体形式, 其中在所述衍射角 $2-\theta$ 的峰的相对强度是至少10%。

10. 根据权利要求1-8任一项的晶体形式, 其中在所述衍射角 $2-\theta$ 的峰的相对强度是至少15%。

11. 根据权利要求1的晶体形式, 其中所述X-射线粉末衍射图谱基本上如图2所示。

12. 根据权利要求1的晶体形式, 其特征在于, 以根据衍射角 $2\theta$ , 晶面间距离 $d$ 和相对强度(以相对于最强峰的百分比表示)表示的以下X-射线粉末衍射图谱为特征:

2- $\theta$ [ $^{\circ}$ ]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
4.36	20.24	17
12.17	7.27	41
12.51	7.07	6
13.13	6.74	7
13.66	6.48	39

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
14.20	6.23	14
14.60	6.06	32
15.03	5.89	5
15.25	5.81	4
15.97	5.54	11
16.51	5.37	13
17.05	5.20	13
17.54	5.05	4
17.88	4.96	5
18.65	4.75	22
19.05	4.66	100
19.68	4.51	11
20.42	4.35	6
20.84	4.26	4
21.25	4.18	3
21.90	4.06	5
22.42	3.96	92
23.19	3.83	9
23.70	3.75	16
24.34	3.65	4
24.56	3.62	23
24.89	3.57	16
25.20	3.53	7
25.36	3.51	7
25.67	3.47	6
26.26	3.39	23
26.59	3.35	12

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
27.51	3.24	6
27.71	3.22	6
28.01	3.18	7
28.23	3.16	5
28.57	3.12	3
29.44	3.03	12
30.15	2.96	4

13. 根据权利要求1-8,11或12任一项的晶体形式,其中所述形式具有拉曼光谱,其包括在以波数用 $\text{cm}^{-1}$ 计所表示的如下任一个或全部的拉曼位移处的峰:1718,1242,731,662,553。

14. 根据权利要求9的晶体形式,其中所述形式具有拉曼光谱,其包括在以波数用 $\text{cm}^{-1}$ 计所表示的如下任一个或全部的拉曼位移处的峰:1718,1242,731,662,553。

15. 根据权利要求1-8,11或12任一项的晶体形式,其中所述形式具有 $212 \pm 5^\circ\text{C}$ 的熔点。

16. 根据权利要求9的晶体形式,其中所述形式具有 $212 \pm 5^\circ\text{C}$ 的熔点。

17. 根据权利要求1-8,11或12任一项的晶体形式,其中所述形式具有实质上与图3所示相同的示差扫描量热曲线。

18. 药物组合物,包含与一种或多种惰性载体和/或稀释剂一起的根据权利要求1的晶体形式。

19. 药物组合物,包含与一种或多种惰性载体和/或稀释剂一起的根据权利要求2-8任一项的晶体形式。

20. 药物组合物,包含与一种或多种惰性载体和/或稀释剂一起的根据权利要求9的晶体形式。

21. 药物组合物,包含与一种或多种惰性载体和/或稀释剂一起的根据权利要求10-17任一项的晶体形式。

22. 根据权利要求1-17任一项的晶体形式在制备用于治疗病症的药物中的用途,所述病症选自疼痛、骨关节炎、糖尿病性肾病和糖尿病多发性神经病。

23. 权利要求22的用途,其中所述病症是疼痛。

24. 权利要求23的用途,其中所述病症是炎性疼痛。

25. 权利要求22的用途,其中所述病症是慢性疼痛。

26. 权利要求22的用途,其中所述病症是由于骨关节炎引起的疼痛。

27. 权利要求22的用途,其中所述病症是神经性疼痛或内脏痛。

28. 权利要求22的用途,其中所述病症选自急性和慢性轻度至中度肌肉骨骼疼痛,腰痛,慢性腰痛,类风湿性关节炎相关疼痛,肩痛,牙痛,骨关节炎的体征和症状,膝骨关节炎,髋部骨关节炎,手骨关节炎,与骨关节炎相关的疼痛,癌性疼痛,糖尿病多发性神经病,内脏

痛,急性疼痛,糖尿病性肾病和神经性疼痛。

29. 权利要求22的用途,其中所述病症选自如下的疼痛:(a) 三叉神经痛和(b) 化疗导致的神经损伤引起的疼痛。

30. 权利要求22的用途,其中所述病症是骨关节炎。

## 氨基嘧啶甲酮衍生物的柠檬酸盐

[0001] 相关申请的交叉引用

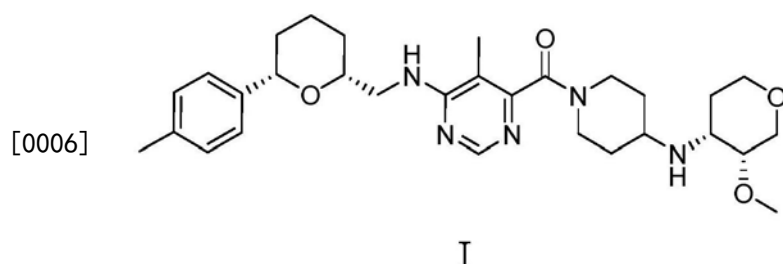
[0002] 本申请要求于2015年7月2日提交的欧洲专利申请序列号 15175066.8的权益和优先权,其内容通过参考引入本文。

## 发明领域

[0003] 本发明提供(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的柠檬酸盐和制备它的方法。本发明还提供相同的柠檬酸盐用于治疗医学病症,例如急性和慢性轻度至中度肌肉骨骼疼痛,腰痛,慢性腰痛,类风湿性关节炎相关疼痛,肩痛,牙痛,骨关节炎的症状和体征,膝骨关节炎,髌部骨关节炎,手骨关节炎,与骨关节炎相关的疼痛,癌性疼痛,糖尿病多发性神经病,内脏痛,急性疼痛,糖尿病性肾病,神经性疼痛,以及包含该相同盐的药物组合物。

[0004] 背景

[0005] WO 2011/073154公开大量的四氢吡喃基-甲基-氨基-(杂)芳基-酰胺,并没有公开如本文列举的化合物的特定盐或晶体形式。其中,WO 2011/073154公开了化合物I



[0007] WO 2011/073154公开的化合物是有效的CCR2拮抗剂。然而,为了证明可用作人类药物的开发使用,除了体外和体内的药代动力学和药理学性质以及安全性外,原料药及其固体形式还必须满足关于化学、制造和控制(CMC)的要求的一系列的标准:如固体形式特征、纯度、干燥时间、过滤性、稳定性、热稳定性、吸湿性、再现性和进一步的物理化学性质,包括溶解性和固有溶解速率。

[0008] 在开发用于人类医学用途的药品过程中,最大的挑战之一是鉴定一种原料药,其效力、有功效,满足安全要求,且同时具有适合于人类药物开发的固体形式,即累积地满足所有上述标准。这是因为每个固体形式,其盐和多晶型形式都具有理化和药代动力学性质,这恰恰是不可预见和不可预期的。

[0009] 此外,由于固体、盐和多晶型形式的不可预料和不可预期的性质,对于本领域技术人员如何设计具有期望特性的固体形式既没有通用的也没有具体的指导。因此,广泛和创造性的研究和实验对于实现满足所有要求的所选原料药的特定固体形式是至关重要的。一个关键参数的优化常常导致另一个或其他参数的恶化。

## 发明内容

[0010] 本发明下的目标技术问题是提供可开发用作人类药物的具有 CCR2拮抗活性的原料药 (drug substance), 即, 其中:

[0011] a) 原料药的特征在于高的药理学效力、功效、体外和体内药代动力学, 以及必要的安全特性; 和

[0012] b) 原料药及其固体形式符合一系列的关于化学、制造和控制 (CMC) 的标准, 例如固体形式特征、纯度、干燥时间、过滤性、稳定性、热稳定性、吸湿性、再现性和包括溶解度和固有溶解速率在内的其它物理化学性质。

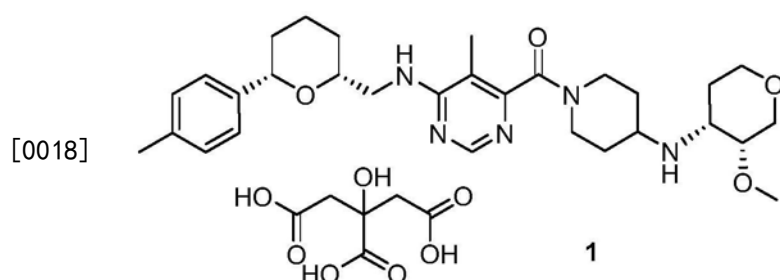
[0013] 出乎意料地发现化合物I满足了大部分上述提到的用作人类药物所需的标准, 如所验证 (见下文的生物学数据)。这些参数包括血浆蛋白结合 (与药代动力学和药效学相关), 体外代谢稳定性 (与药代动力学有关), 药代动力学和安全性 (hERG, 与心血管安全性有关以及药物诱导的磷脂沉积 (phospholipidosis)) 有关。

[0014] 然而, 化合物I的游离碱却证明是处于亚稳态并因此经历变态的无定形物质。它不适合作为开发的原料药, 因为它不能满足可重复制造的要求。

[0015] 从在所有常用溶剂如乙醇, 乙醇/水, 2-丙醇, 2-丙醇/水, 丙酮, 乙酸乙酯, 2-丁酮或四氢呋喃的溶液中获得晶体形式的化合物I的尝试失败。从在所有常用溶剂如乙醇, 乙醇/水, 2-丙醇, 2-丙醇/水, 丙酮, 乙酸乙酯, 2-丁酮或四氢呋喃的溶液中获得晶体形式的化合物 I 的尝试仅仅产生无定形物质。由于这些失败, 研究了化合物I与各种酸的盐形式。

[0016] 为了确保药物制造过程中物理化学性质的可重现性, 必须总是以明确的晶体变体获得原料药。当原料药或其盐的晶体形式存在不同的多晶型变体 (多晶型) 时, 可能发生一种多晶型自发转化为另一种多晶型。这种自发的转换现象是不能容忍的, 应该通过一切手段来避免。因此, 需要确保药物制造过程的重现性, 以鉴定原料药的盐, 其仅以一种晶体形式存在, 或者至少以降低的转向多晶型的趋势为特征。

[0017] 根据本发明, 如上概括的技术问题已经通过实验和创新得到解决, 其得到鉴定特定的化合物 (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基) 嘧啶-1-基) (5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基) 四氢-2H-吡喃-2-基) 甲基氨基) 嘧啶-4-基) 甲酮柠檬酸盐1



[0019] 柠檬酸盐1是结晶, 即通过特定的晶体变体来定义, 因此可以获得高纯度和重现性高的稳定性的原料药。

[0020] 其中制备和分析了化合物I的各种盐形式。例如, 通过结晶获得化合物I的柠檬酸盐, 氢溴酸盐, 盐酸盐, 乙磺酸盐和甲磺酸盐的晶体形式。这些盐形式的分析意外地揭示了化合物I的柠檬酸盐, 乙磺酸盐和甲磺酸盐仅表现出一种多晶型形式。这与化合物I的氢溴酸盐和盐酸盐获得不同的多晶型变体形成对比。

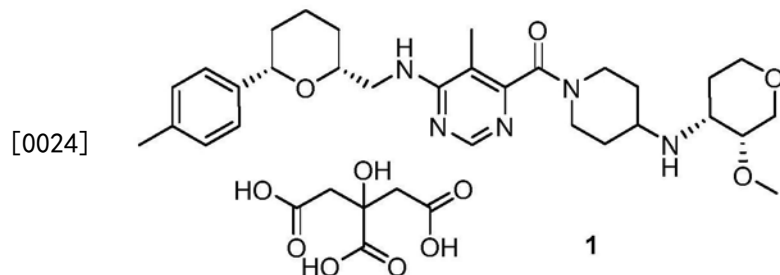
[0021] 原料药的另一个关键参数是吸湿性。在生产过程中原料药的盐通过吸附吸水, 导



致药品中原料药的量减少,因此降低药效。另外,原料药的盐或药品吸水可能导致原料药的分解。因此,鉴定不吸湿或仅具有很小吸湿性的原料药或其盐是至关重要的。

[0022] 不可预期地,化合物I的柠檬酸盐1的晶体形式的特征在于,在相对湿度高达90%时低的和可逆的水吸收(在80%相对湿度下2.6%的水吸收和在90%相对湿度下3.4%的水吸收)。相反,化合物I的相应氢溴酸盐,盐酸盐,乙磺酸盐和甲磺酸盐的晶体形式在80%这么低的相对湿度下容易吸收大量的水并变得不可逆潮解。

[0023] 因此,本发明的一个方面提供了具有下式1的化合物:



[0025] 在某些实施方案中,化合物以晶体形式提供。

[0026] 本发明的另一方面提供药物组合物,其包含(i)本文所述的化合物如柠檬酸盐1和(ii)一种或多种载体和/或稀释剂。在某些实施方案中,药物组合物被配制用于口服给药。

[0027] 本发明的另一个方面提供了柠檬酸盐1或包含所述柠檬酸盐1的药物组合物,用于治疗医学病症。示例性的医学病症包括例如治疗疼痛(例如炎性疼痛或神经性疼痛)和骨关节炎。

[0028] 本发明的另一个方面提供了治疗患者的医学病症的方法,其中所述方法包括向有其需要的患者给药治疗有效量的本文所述的化合物如柠檬酸盐1以治疗所述医学病症。示例性的医学病症包括例如疼痛(例如炎性疼痛或神经性疼痛)和骨关节炎。

[0029] 附图的简单说明

[0030] 图1表示化合物(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的无定形碱的X-射线粉末衍射图谱。

[0031] 图2表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐的X-射线粉末衍射图谱。

[0032] 图3表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐的热分析和熔点测定(DSC/TG)。

[0033] 图4表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐的吸附等温线。

[0034] 图5表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮氢溴酸盐的X-射线粉末衍射图谱。

[0035] 图6表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-

((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮氢溴酸盐的热分析和熔点测定(DSC/TG)。

[0036] 图7表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮氢溴酸盐的吸附等温线。

[0037] 图8表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮盐酸盐的X-射线粉末衍射图谱。

[0038] 图9表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮盐酸盐的热分析和熔点测定(DSC/TG)。

[0039] 图10表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮盐酸盐的吸附等温线。

[0040] 图11表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮乙磺酸盐的X-射线粉末衍射图谱。

[0041] 图12表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮乙磺酸盐的热分析和熔点测定(DSC/TG)。

[0042] 图13表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮乙磺酸盐的吸附等温线。

[0043] 图14表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮甲磺酸盐的X-射线粉末衍射图谱。

[0044] 图15表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮甲磺酸盐的热分析和熔点测定(DSC/TG)。

[0045] 图16表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮甲磺酸盐的吸附等温线。

[0046] 图17表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐的FT-RAMAN光谱。

[0047] 图18表示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮乙磺酸盐的FT-RAMAN光谱。

[0048] 发明详述

[0049] 发明提供4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的盐形式,包含这些盐的药物组合物,用于制备盐形式的方法,以及使用这些盐的治疗方法,例如治疗疼痛和其他医学病症。如本文所述,相比于4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮其他盐形式,4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的柠檬酸盐令人惊讶地发现提供了多种不可预料的益处。例如,4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的柠檬酸盐发现显示出在相对湿度高达90%时低的和可逆的水吸收,这与相应的氢溴酸盐,盐酸盐,乙磺酸盐和甲磺酸盐的盐形式形成对比,后者在低至80%的相对湿度下容易吸收大量的水,并变得不可逆潮解。进一步地还不可预期地发现4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的柠檬酸盐显示出仅仅一种多晶形晶体形式,其与由氢溴酸和盐酸形成的相应的结晶盐表现出不同的多晶形变体形成对比。因此,4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐由于多种不可预期出的有益效果作为药物的开发出乎意料地优越。

[0050] 以下分部分进一步描述本发明的各个方面和实施例。在一个特定部分中描述的本发明的各方面和实施例不限于任何特定部分。

[0051] 为了便于理解本发明,下面定义了许多术语和短语。

[0052] 术语“受试者”和“患者”是指要通过本发明的方法治疗的生物体。这样的生物体包括哺乳动物(例如鼠科动物,猿猴,象马的动物,牛科动物,猪的动物,犬科动物,猫科动物等),最优选人类。

[0053] 术语“有效量”是指足以实现有益或所需结果的化合物的量。有效量可以以一次或多次给药、应用或剂量给药,并不意图限于特定的制剂或给药途径。

[0054] 术语“治疗”包括导致病症、疾病、障碍的改善的任何作用,例如减轻、减少、调节、改善或消除等,或改善其症状。

[0055] 在整个说明书中,其中组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,或者其中方法和方法被描述为具有,包括或包含特定步骤的情况下,预期还存在本发明的组合物基本上由所述组分组成或由所述组分组成,并且存在根据本发明的过程和方法基本上由所述处理步骤组成或由所述处理步骤组成。

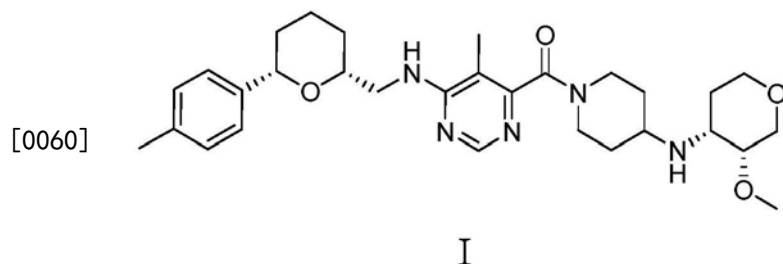
[0056] I. 4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的盐形式

[0057] 本发明的一个方面提供4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的盐形式。如下和工作实施例所述,本文公开描述了4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的盐形式,其通过将4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-

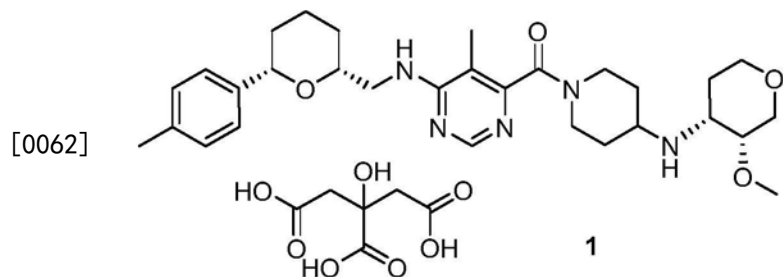
基) (5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基) 四氢-2H-吡喃-2-基) 甲基氨基) 嘧啶-4-基) 甲酮与选自柠檬酸, 氢溴酸, 盐酸, 乙磺酸和甲磺酸的酸反应制备。

[0058] 相比于4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基) 哌啶-1-基) (5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基) 四氢-2H-吡喃-2-基) 甲基氨基) 嘧啶-4-基) 甲酮的其他盐形式, 4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基) 哌啶-1-基) (5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基) 四氢-2H-吡喃-2-基) 甲基氨基) 嘧啶-4-基) 甲酮柠檬酸盐令人惊讶地发现提供多重不可预料的益处。例如, 4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基) 哌啶-1-基) (5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基) 四氢-2H-吡喃-2-基) 甲基氨基) 嘧啶-4-基) 甲酮柠檬酸盐发现在高达90%的相对湿度下显示出低的和可逆的水吸收, 其与对应的氢溴酸盐, 盐酸盐, 乙磺酸盐, 和甲磺酸盐的盐形式形成对比, 后者在相对湿度低至80%时容易吸收大量的水分并且变得不可逆地潮解。进一步还不可预期地发现4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基) 哌啶-1-基) (5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基) 四氢-2H-吡喃-2-基) 甲基氨基) 嘧啶-4-基) 甲酮柠檬酸盐表现出仅一种多晶形晶体形式, 其与由氢溴酸和盐酸形成的对应结晶盐形成对比, 后者表现出不同的多晶形变体。因此, 4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基) 哌啶-1-基) (5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基) 四氢-2H-吡喃-2-基) 甲基氨基) 嘧啶-4-基) 甲酮柠檬酸盐由于有益的多种不可预期的性质作为药物开发是出乎意料地优越。

[0059] 因此, 本发明的一个方面提供化合物I的柠檬酸盐:



[0061] 具有式:



[0063] 在某些实施方式中, 所述柠檬酸盐是晶体形式。

[0064] 在某些实施方式中, 晶体形式的特征在于, 显示包括在以下2-θ值的峰的X-射线粉末衍射图谱: 19.1°和22.4°, 所述2-θ值采用λ=1.54056 Å, 40kV, 40mA的单色CuKα1辐射测定的。在某些实施方式中, 晶体形式的特征在于, X-射线粉末衍射图谱还包括在12.2°的峰。在某些实施方式中, 晶体形式的特征在于, X-射线粉末衍射图谱还包括在13.7°的峰。在某些实施方式中, 晶体形式的特征在于, X-射线粉末衍射图谱还包括在14.6°的峰。在某些实施方式中, 晶体形式的特征在于, X-射线粉末衍射图谱还包括在18.7°的峰。在某些实施方式中, 晶体形式的特征在于, X-射线粉末衍射图谱还包括在24.6°的峰。在某些实施方式中,

晶体形式的特征在于,X-射线粉末衍射图谱还包括在 $26.3^{\circ}$ 的峰。

[0065] 在某些实施方式中,晶体形式显示包括在以下 $2-\theta$ 值的峰的X-射线粉末衍射图谱: $12.2\pm 0.2$ , $13.7\pm 0.2$ , $14.6\pm 0.2$ , $19.1\pm 0.2$ ,和 $22.4\pm 0.2$ ,所述 $2-\theta$ 值采用 $\lambda=1.54056\text{\AA}$ ,40kV,40mA的单色 CuK $\alpha$ 1辐射测定的。在某些其他实施方式中,晶体形式显示包括在以下 $2-\theta$ 值的峰的X-射线粉末衍射图谱: $12.2\pm 0.2$ , $13.7\pm 0.2$ , $14.6\pm 0.2$ , $18.7\pm 0.2$ , $19.1\pm 0.2$ , $22.4\pm 0.2$ , $24.6\pm 0.2$ ,和 $26.3\pm 0.2$ ,所述 $2-\theta$ 值采用 $\lambda=1.54056\text{\AA}$ ,40kV,40mA的单色CuK $\alpha$ 1辐射测定的。

[0066] 在某些实施方式中,在所述衍射角 $2-\theta$ 的峰的相对强度是至少 10%。在某些其他实施方式中,在所述衍射角 $2-\theta$ 的峰的相对强度是至少15%。

[0067] 在某些实施方式中,晶体形式具有实质上如图2所示的X-射线粉末衍射图谱。

[0068] 在某些实施方式中,晶体形式的特征在于,以衍射角 $2\theta$ ,晶面间距离 $d$ 和相对强度(以相对于最强峰的百分比表示)表示的以下X-射线粉末衍射图谱:

[0069]

$2-\theta$ [ $^{\circ}$ ]	$d$ -值 [ $\text{\AA}$ ]	强度 $I/I_0$ [%]
4.36	20.24	17
12.17	7.27	41
12.51	7.07	6
13.13	6.74	7
13.66	6.48	39
14.20	6.23	14
14.60	6.06	32
15.03	5.89	5
15.25	5.81	4

[0070]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
15.97	5.54	11
16.51	5.37	13
17.05	5.20	13
17.54	5.05	4
17.88	4.96	5
18.65	4.75	22
19.05	4.66	100
19.68	4.51	11
20.42	4.35	6
20.84	4.26	4
21.25	4.18	3
21.90	4.06	5
22.42	3.96	92
23.19	3.83	9
23.70	3.75	16
24.34	3.65	4
24.56	3.62	23
24.89	3.57	16
25.20	3.53	7
25.36	3.51	7
25.67	3.47	6
26.26	3.39	23
26.59	3.35	12
27.51	3.24	6
27.71	3.22	6
28.01	3.18	7
28.23	3.16	5

	2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
[0071]	28.57	3.12	3
	29.44	3.03	12
	30.15	2.96	4

[0072] 晶体形式可以根据它的拉曼光谱进一步表征。因此,在某些实施方式中,晶体形式具有拉曼光谱,其包括在如下任一个或全部的以波数用 $\text{cm}^{-1}$ 计所表示的拉曼位移处的峰: 1718,1242,731,662,553。

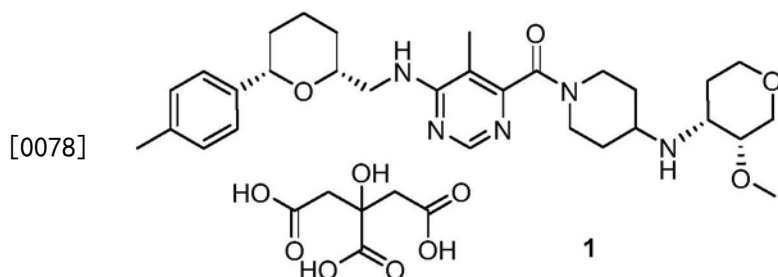
[0073] 晶体形式可以根据它的熔点进一步表征。因此,在某些实施方式中,晶体形式具有熔点 $212 \pm 5^\circ\text{C}$ 。

[0074] 晶体形式可以根据它的示差扫描量热曲线来表征。因此,在某些实施方式中,晶体形式具有实质上与图3所示相同的示差扫描量热曲线。

[0075] 期望地,在4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐中,柠檬酸对4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的摩尔比是大约1:1。在某些实施方式中,在4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐中,柠檬酸对4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的摩尔比在1.2:1至1:1.2的范围。在某些其他实施方式中,在4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐中,柠檬酸对4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的摩尔比是1:1。

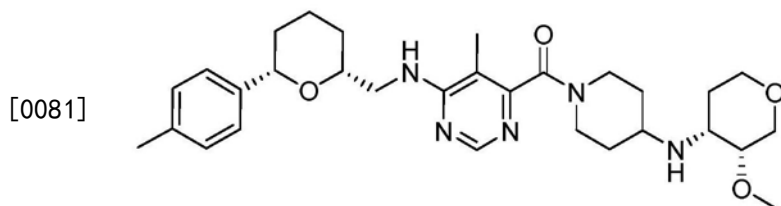
[0076] 化合物(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮(I)以及它的制备方法特别公开在W0 2011/073154中。因此,对于制备这个化合物的方法的细节,参考W0 2011/073154(实施例30,第150页)。

[0077] 还提供制备柠檬酸盐1的方法。例如,本发明的一个方面提供制备化合物1的方法



[0079] 包括以下的步骤:

[0080] a) 向化合物I在有机溶剂的溶液中加入柠檬酸



[0082] b) 分离纯形式的所得盐1。

[0083] 在某些实施方式中,该方法进一步特征在于,步骤a)的有机溶剂选自乙酸乙酯、异丙醇和异丙醇与水的混合物。

[0084] II. 治疗应用

[0085] 如本文第I部分所述那些的化合物(例如柠檬酸盐1)和本文所述的药物组合物可用作药物。该药物可用于治疗其中抑制CCR2活性提供治疗益处的障碍。

[0086] 趋化因子受体CCR2已经被报道被牵涉作为炎症和免疫调节障碍和疾病以及自身免疫病如风湿性关节炎和动脉粥样硬化的重要介质。参见例如W02010/070032。因此,调节趋化因子受体CCR2的药剂可用于治疗这样的障碍和疾病。

[0087] 更一般地说,广为接受的是许多病症和疾病涉及炎症过程。这种炎症通过从单核细胞分化而形成的巨噬细胞的活性被决定性地触发和/或促进。进一步已经发现,单核细胞的特征在于例如膜驻留的CCR2的高表达,而巨噬细胞中的CCR2表达更低。CCR2是单核细胞运输的关键调节剂,其可以被描述为单核细胞沿着单核细胞趋化蛋白(MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4)的梯度向着炎症的移动。

[0088] 因此,为了减少巨噬细胞诱导的炎症,期望通过拮抗剂来阻断单核细胞CCR2,使得单核细胞可以被更少地被触发移向转化成巨噬细胞的炎症区域。

[0089] 因此,本发明的一个方面提供了治疗患者的CCR2相关病症的方法,其中所述方法包括向有其需要的患者给药治疗有效量的本文所述的化合物(例如柠檬酸盐1或其晶体形式)以治疗所述病症。在某些实施方案中,CCR2相关病症是MCP-1相关病症。

[0090] 在某些实施方案中,CCR2相关病症是疼痛。预期用于治疗疼痛的示例性类型包括例如炎症性疼痛,神经性疼痛和内脏疼痛。在某些实施方案中,疼痛是慢性疼痛。在某些实施方案中,疼痛是由于骨关节炎引起的疼痛。预期用于治疗的疼痛的其它示例性类型包括例如腰痛,髌痛,腿痛,非疱疹性神经痛,疱疹后神经痛,糖尿病性神经病,神经损伤-诱导的疼痛,获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关神经性疼痛,头部创伤,毒素和化学疗法引起的神经损伤,幻肢痛,痛性创伤性单神经病,痛性多神经病,丘脑痛综合征,中风后疼痛,中枢神经系统损伤,手术后疼痛,腕管综合征,三叉神经痛,乳房切除术综合征,开胸术后综合征,残肢痛,重复性运动疼痛,神经性疼痛相关的痛觉过敏和异常性疼痛,酒精中毒和其他药物引起的疼痛。

[0091] 在某些其他实施方案中,CCR2相关病症是免疫相关疾病。示例性的免疫相关疾病包括例如类风湿性关节炎,幼年型类风湿性关节炎,全身性发作的幼年型类风湿性关节炎,牛皮癣关节炎,强直性脊柱炎,胃溃疡,血清阴性关节病,骨关节炎,炎性肠病和溃疡性结肠炎。

[0092] 在某些其他实施方案中,CCR2相关病症是纤维化病症。示例性的纤维化病症包括



例如肝纤维化(包括但不限于酒精诱导的肝硬化,病毒诱导的肝硬化,自身免疫诱导的肝炎);肺纤维化(包括但不限于硬皮病,特发性肺纤维化);肾纤维化(包括但不限于硬皮病,糖尿病性肾炎,肾小球性肾炎,狼疮性肾炎);皮肤纤维化(包括但不限于硬皮病,肥厚和瘢痕疙瘩,烧伤);骨髓纤维化;神经纤维瘤病;纤维瘤;肠纤维化;和手术操作导致的纤维化粘连。

[0093] 在某些其他实施方案中,CCR2相关病症是炎性障碍。

[0094] 本发明的另一方面提供了治疗选自疼痛,骨关节炎,糖尿病性肾病和糖尿病多发性神经病的病症的方法,其中所述方法包括向有其需要的患者给药治疗有效量的本文所述的化合物(例如柠檬酸盐1或其晶体形式)以治疗所述病症。

[0095] 在某些实施方案中,所述病症是疼痛。在某些实施方案中,所述病症是炎性疼痛。在某些实施方案中,所述病症是慢性疼痛。在某些实施方案中,所述病症是由于骨关节炎引起的疼痛。在某些实施方案中,所述病症是神经性疼痛或内脏疼痛。

[0096] 在某些实施方案中,所述病症选自急性和慢性轻度至中度肌肉骨骼疼痛,腰痛,慢性腰痛,类风湿性关节炎相关的疼痛,肩痛,牙痛,骨关节炎的体征和症状,膝关节骨关节炎,髋部骨关节炎,手骨关节炎,与骨关节炎相关的疼痛,癌症疼痛,糖尿病多发性神经病,内脏痛,急性疼痛,糖尿病性肾病和神经性疼痛。在某些实施方案中,所述病症是选自如下的疼痛:(a) 三叉神经痛和(b) 化疗导致的神经损伤引起的疼痛。

[0097] 在某些实施方式中,所述病症是骨关节炎。

[0098] 在某些实施方案中,所述方法包括向所述患者给药治疗有效量的柠檬酸盐1以治疗所述病症。

[0099] 更具体的实施方案中,本发明提供使用本文所述的化合物治疗其中CCR2受体的抑制是有益的疾病,例如:(i) 急性和慢性轻度至中度肌肉骨骼疼痛(腰痛,慢性腰痛,与类风湿性关节炎相关的疼痛,肩痛,牙痛);(ii) 骨关节炎的症状和体征(膝关节和/或髋部的骨关节炎,手骨关节炎,与骨关节炎相关的疼痛);(iii) 癌症疼痛;(iv) 糖尿病多发性神经病;(v) 内脏痛,(vi) 急性疼痛,(vii) 糖尿病性肾病;和(viii) 神经性疼痛。

[0100] III. 药物组合物

[0101] 本发明的另一方面提供了包含本文所述化合物(例如柠檬酸盐1) 以及一种或多种惰性载体和/或稀释剂的药物组合物。药物组合物可以配制用于通过特定的途径给药,如口服给药。

[0102] 更一般地,合适的给药形式是例如片剂,胶囊剂,溶液剂,糖浆剂,乳剂或可吸入粉剂或气雾剂。在每种情况下,药学上有效的化合物的含量应当占全部组合物的0.1-90重量%,优选0.5-50重量%,即,其量足以达到下文所特定的剂量范围。

[0103] 制剂可以以如下的形式口服给药:片剂,作为粉末,作为胶囊(例如硬明胶胶囊)中的粉末,作为溶液或悬浮液。当通过吸入给药时,活性物质组合可以以粉末,水性或水性-乙醇溶液或使用推进剂气体制剂的形式给予。

[0104] 合适的片剂可以通过如下获得:例如,通过将活性物质与已知赋形剂,例如惰性稀释剂如碳酸钙,磷酸钙或乳糖,崩解剂如玉米淀粉或海藻酸,粘合剂如淀粉或明胶,润滑剂如硬脂酸镁或滑石,和/或用于延迟释放的试剂如羧甲基纤维素,邻苯二甲酸醋酸纤维素或聚乙酸乙烯酯混合。片剂还可以包含数层。相应地包衣片剂可通过如下制备:用片剂包衣通

常使用的物质(例如可力酮(collidone)或虫胶,阿拉伯树胶,滑石粉,二氧化钛或糖)对类似于片剂制备的片芯进行包衣。为了实现延迟释放或防止不相容性,核心还可以由多个层组成。类似地,片剂包衣可由若干层组成,可能使用上述用于片剂的赋形剂以实现延迟释放。

[0105] 含有根据本发明的活性物质或其组合的糖浆剂可以另外含有甜味剂如糖精,甜蜜素,甘油或糖和增香剂,例如香草醛或橙提取物的调味剂。它们也可含有悬浮助剂或增稠剂如羧甲基纤维素钠,润湿剂如脂肪醇与环氧乙烷的缩合产物,或防腐剂如对羟基苯甲酸酯。

[0106] 含有一种或多种活性物质或活性物质组合的胶囊可通过例如将活性物质与惰性载体如乳糖或山梨醇混合并将其装入明胶胶囊中来制备。

[0107] 合适的栓剂可以通过例如与为此目的而提供的载体例如中性脂肪或聚乙二醇或其衍生物混合来制备。

[0108] 可以使用的赋形剂包括例如水,药学上可接受的有机溶剂例如石蜡(例如石油馏分),植物油(例如花生油或芝麻油),单或多官能醇(例如乙醇或甘油),载体例如例如(例如高岭土,粘土,滑石,白垩),合成矿物粉末(例如高度分散的硅酸和硅酸盐),糖(如蔗糖,乳糖和葡萄糖),乳化剂(例如木质素,用过的亚硫酸盐液体,甲基纤维素,淀粉和聚乙烯吡咯烷酮)和润滑剂(例如硬脂酸镁,滑石,硬脂酸和月桂基硫酸钠)。

[0109] 对于口服给药,除了上述载体外,片剂还可以当然含有添加剂如柠檬酸钠,碳酸钙和磷酸二钙以及各种添加剂如淀粉,优选马铃薯淀粉,明胶等。而且,可以同时使用润滑剂如硬脂酸镁,月桂基硫酸钠和滑石来进行压片过程。在含水悬浮液的情况下,活性物质可以与除了上述赋形剂之外的各种增味剂或着色剂组合。

[0110] IV.医学应用中使用的试剂盒

[0111] 本发明的另一个方面提供了用于治疗医学病症的试剂盒。该试剂盒包括:i) 用于治疗医学病症的说明书,该医学病症诸如疼痛,骨关节炎,糖尿病性肾病或糖尿病多发性神经病(例如,疼痛选自急性和慢性轻度至中度肌肉骨骼疼痛,腰痛,慢性腰痛,类风湿性关节炎有关的疼痛,肩痛,牙痛,与骨关节炎有关的疼痛,癌症疼痛,内脏痛,急性疼痛,糖尿病性肾病和神经性疼痛);和ii) 本文所述的化合物,例如柠檬酸盐1。试剂盒可以包含一种或多种的单位剂型,其含有有效治疗所述医学病症例如疼痛的一定量的柠檬酸盐1。

## 实施例

[0112] 通过参考下面的实施例将更容易地理解本发明,这些实施例被包括仅仅是为了说明本发明的某些方面和实施方式的目的,而不是意在限制本发明。

[0113] 略写列表

[0114] AUC 血浆浓度-时间曲线下面积

[0115] BR 氢溴酸盐(与氢溴酸的盐)

[0116] BS 碱(不限定盐)

[0117]  $C_{max}$  峰浓度

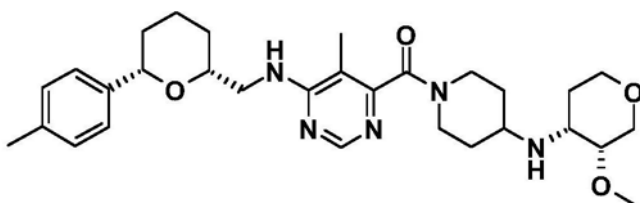
[0118] CI 柠檬酸盐(与柠檬酸的盐)

[0119] CL 清除率

[0120] CL 盐酸盐(与盐酸的盐)

- [0121] ES 乙磺酸盐(与一摩尔乙磺酸的盐)
- [0122] d.b. (基于)干燥基准
- [0123] DSC 差示扫描量热计
- [0124] DMSO 二甲基亚砷
- [0125] DMSO-d<sub>6</sub> 氘化DMSO
- [0126] DVS 动力蒸汽吸附
- [0127] EDTA 乙二胺四醋酸
- [0128] EGTA 乙二醇四醋酸
- [0129] ESI 电喷射离子化作用
- [0130] f 雌性
- [0131] F 口服生物利用度
- [0132] FCS 胎牛血清
- [0133] HEPES 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸
- [0134] hERG 人类ether-a-go-go-related基因
- [0135] HR 高分辨率
- [0136] IV,i.v. 静脉注射
- [0137] m 雄性
- [0138] M mol/L
- [0139] McIlvaine buffer 柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液
- [0140] MRT<sub>disp</sub> 静脉注射给药后平均滞留时间
- [0141] MRT<sub>tot</sub> 口服给药后平均滞留时间
- [0142] MS 质谱法
- [0143] MS 甲磺酸盐(与一摩尔甲磺酸的盐)
- [0144] m/z 质量对电荷比率
- [0145] NMR 核磁共振
- [0146] PBS 磷酸盐缓冲盐水
- [0147] PK 药代动力学
- [0148] PO,p.o. 经口服
- [0149] r.h. 相对湿度
- [0150] RT 室温
- [0151] **Sörensen**buffer NaOH/NaCL/甘氨酸-缓冲液
- [0152] t<sub>max</sub> 最大血浆浓度的时间
- [0153] TG 热重分析法
- [0154] V<sub>ss</sub> 稳态分布体积
- [0155] VLE 非常低的内毒素
- [0156] XRPD X-射线粉末衍射
- [0157] 实施例1-化合物I的盐的制备和理化表征
- [0158] 制备化合物I的多种盐并表征,包括化合物I的柠檬酸盐。实验过程和结果提供如下。化合物I具有如下式:

[0159]



[0160] 部分I:采用的分析方法的描述

[0161] 用于表征化合物I的盐的分析方法的描述提供如下。

[0162] ESI质谱法 (ESI+)

[0163]

仪器	QTOF 2 (Micromass, Manchester, UK)
仪器控制软件	Masslynx 4.1
离子源	ESI + (Lockspray 源)
Lockspray/DXC	开关 (on/off)
校准	于乙腈/水 (1:1) 的 0.1 % 磷酸, 锁定质量 (lockmass) 校准
分辨率 MS1 (LM/HM)	5/5
分辨率 (FWHM)	16000 在 m/z 491 (W 模式)
MCP 电压	2200 V
毛细管电压	+ 2.8 kV
锥电压	25 V
碰撞能量	5 V
碰撞气体	氦气
源温度	120 °C
去溶剂化温度 (Desolvation temperature)	150 °C
锥气体 (Cone gas)	氦气 75 L/h
去溶剂化气体 (Desolvation gas)	氦气 450 L/h
喷雾溶剂	乙腈/水 9:1
注射泵	Harvard Apparatus 55-2222
喷雾溶剂流量	5 µL/min
样品浓度	5 ng/µL 喷雾溶剂
试剂	乙腈 (ULC/MS, Biosolve) 水 (通过 Milli-Q-system 纯化)
扫描范围	50-1000 u (TOF 扫描, 分布数据)
扫描时间	2.9 s

[0164]

组合扫描数	20
精确质量确定	中心 5 点/80%, Np=0.35, 锁定质量(lockmass): 588.8692
数据开始 (Data threshold)	1.0 %

[0165]  $^1\text{H}$  NMR谱学

[0166]

仪器	Bruker DRX 400
频率	400.13 MHz
软件	TopSpin® version 1.3 PL8
脉冲程序	zg30
溶剂	DMSO-d <sub>6</sub>
浓度	10.3 mg/0.6 mL
温度	30 °C
校准	TMS ( $\delta$ = 0.00 ppm)
扫描宽度	8013 Hz
尺度	64 K 数据点
脉冲宽度	30 度
驰豫延迟	10 s
扫描数	32
虚拟扫描 (Dummy scans)	8
变迹法 (Apodization)	冲零到 (zerofilling to) 128 K 数据点 高斯放大 (Gaussian multiplication) (GB: 0.25, LB: -0.25 Hz)

[0167]  $^{13}\text{C}$  NMR谱学

[0168]

仪器	Bruker DRX 400
频率	100.61 MHz
软件	TopSpin® version 1.3 PL8

[0169]

脉冲程序	Zgpg
溶剂	DMSO-d <sub>6</sub>
浓度	10.3 mg/0.6 ml
温度	30 °C
校准	DMSO-d <sub>6</sub> ( $\delta$ = 39.5 ppm)
扫描宽度	27778 Hz
尺度	64 K 数据点
脉冲宽度	90 度
驰豫延迟	4 s
扫描数	4096
虚拟扫描 (Dummy scans)	32
变迹法 (Apodization)	冲零到 128 K 数据点 指数放大 (Exponential multiplication) (LB: 2.5 Hz)

[0170] X-射线粉末 (XRPD) 图

[0171] 使用装配有MYTHEN检测器和Cu-阳极作为X射线源,具有单色 CuK $\alpha$ 1辐射 ( $\lambda$  = 1.54056 Å, 40kV, 40mA) 的STOE-STADI P-衍射仪以透射模式产生X-射线粉末图。

[0172] 拉曼 (FT-RAMAN) 谱学

[0173] 使用Bruker RAM II FT-RAMAN模块仪器 (分辨率2cm<sup>-1</sup>, 64次扫描, 激光功率500mW (聚焦激光)) 在沸点管中测量样品。分析: 矢量在3500cm<sup>-1</sup>-50cm<sup>-1</sup>的光谱范围内的缩放。

[0174] 差示扫描量热法-熔点

[0175] 化合物通过差示扫描量热法 (DSC) 测定的熔点来表征, 熔点通过峰最大值或起始温度来评估。实验的升温速度为10°C/min。给出的值是使用来自TA Instruments的Q-series™的DSC仪器测定的。

[0176] 热重分析法 (TG)

[0177] 热重分析法数据用来自TA Instruments的Q系列的TG仪器采集的。该方法测量在受控气氛下材料的重量变化作为温度的函数。

[0178] 动力蒸汽吸附 (DVS)

[0179] 使用来自Hiden Isochema的IGAsorp水吸附监测器产生吸附等温线。吸附和解吸等温线在25°C和10%r.h下获得, 步距为10%r.h. 到90%r.h。

[0180] 仅对于BR盐形式: 吸附等温线登记在来自Surface Measurement Systems的DVS-1水吸附监测器上。

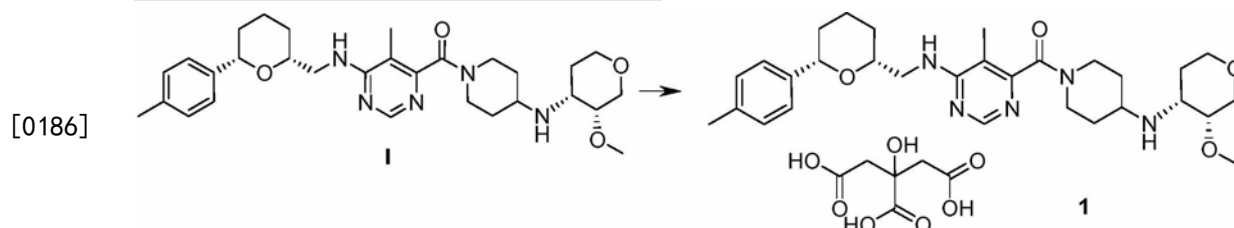
[0181] 溶解度

[0182] 使用自动化摇瓶方法(在室温下)测定溶解度,并且在该自动化装置内通过紫外光谱测定溶解的原料药的定量。

[0183] 部分II: (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐(1)的制备

[0184] 以下提供制备标题化合物的示例性过程,以及物理特征数据。制备过包括制备标题化合物的两种不同途径。

[0185] 制备项a)从游离碱I开始制备柠檬酸盐:



[0187] 向游离碱I (200mg, 0.372mmol) 在乙酸乙酯(2mL) 的溶液中加入柠檬酸一水合物(78.2mg; 0.372mmol)。将该溶液搅拌过夜(18h)。过滤混悬液并且将产物在40℃真空干燥得到140mg 0.192 mmol (52%) 无色晶体。以下提供柠檬酸盐1的物理表征数据。

[0188] NMR ( $^1\text{H}$ , 400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 11.7-8.5 (2H, 宽), 8.34 (1H, s), 7.22 (2H, m), 7.12 (2H, m), 7.08 (1H, t), 4.49 (1H, m), 4.31 (1H, d), 4.09 (1H, m), 3.85 (1H, m), 3.74 (1H, m), 3.57-3.44 (2H, m), 3.48 (1H, m), 3.47 (1H, m), 3.35 (3H, s), 3.35 (1H, m), 3.33 (1H, m), 3.29 (1H, m), 3.27 (1H, m), 3.04 (1H, m), 2.84 (1H, m), 2.58 (2H, d), 2.50 (2H, d), 2.28 (3H, s), 2.12 (1H, m), 1.94 (1H, m), 1.91 (3H, s), 1.88 (1H, m), 1.78 (1H, m), 1.76 (1H, m), 1.70 (1H, m), 1.66 (1H, m), 1.63 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.37 (1H, m), 1.24 (1H, m) (包括旋转异构体)。

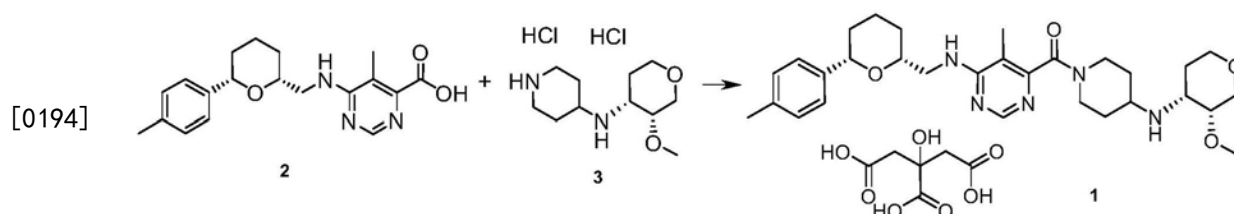
[0189] NMR ( $^{13}\text{C}$ , 100MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 176.6, 171, 165.4, 161.0, 156.6, 155.4, 140.3, 136.0, 128.5, 125.6, 109.3, 78.5, 75.4, 72.4, 72.2, 71.2, 64.8, 64.4, 64.4, 55.5, 55.5, 51.5, 51.4, 50.2, 45.6, 44.1, 44.1, 38.8, 33.3, 29.6, 28.7, 28.7, 25.1, 23.1, 20.6, 11.7 (包括旋转异构体)。

[0190] HRMS (ESI):  $m/z$  538.3400 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4$ )

[0191] 拉曼(FT-RAMAN) 光谱(特征谱带) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 1718, 1242, 731, 662, 553

[0192] 另外的表征数据参见以下表II和图2-4和17。

[0193] 制备项b) 柠檬酸盐制备之后的酰胺偶合:



[0195] 在50℃下将4.99kg (30.75mol) 的1,1'-羰基二咪唑加入到 10.0kg (29.29mol) 的2在75L的2-甲基四氢呋喃的混悬液中。用5L 2-甲基四氢呋喃冲洗药粉漏斗。在50℃将反应混合物搅拌 70min。然后,将8.83kg (30.75mol) 的3加入到反应混合物中并且漏斗用5L 2-

甲基四氢呋喃冲洗。接下来,加入7.41kg (73.23mol) 的三乙胺和10L的2-甲基四氢呋喃并在回流下将反应混合物搅拌 1h。然后,将混合物冷却到60℃并且加入6.07kg (43.94mol) 碳酸钾在55L水的溶液并且在55℃下分离相。用60L水洗涤有机层通过在真空蒸馏除去80L溶剂。所得的残余物用80L异丙醇稀释并且通过真空蒸馏除去55L溶剂。所得的残余物用40L异丙醇稀释并且通过真空蒸馏除去40L溶剂。接下来,加入在11L水中的5.85kg (27.83mol) 柠檬酸一水合物并用30L的异丙醇冲洗滴液漏斗。反应混合物加热到75℃,搅拌直到形成溶液,然后过滤。滤液用2L水和20L异丙醇的混合物冲洗。然后用30L的异丙醇稀释滤液并且在65℃用在项a)中获得的100g的1接种。接下来,混合物在30分钟内冷却到55℃然后进一步在55℃搅拌1h。在55℃用60L 的异丙醇在1h之内稀释得到混悬液,然后在3h之内冷却到20℃。然后,在20℃搅拌该混悬液17h并且通过过滤分离。滤饼用各为 19L异丙醇和1L水的混合物洗涤两次。产物在50℃真空干燥得到 17.76kg的化合物(83%)。柠檬酸盐1的物理表征数据提供如下。

[0196] NMR ( $^1\text{H}$ , 400MHz, DMSO- $d_6$ ): 11.7-8.5 (2H, 宽), 8.34 (1H, s), 7.22 (2H, m), 7.12 (2H, m), 7.08 (1H, t), 4.49 (1H, m), 4.31 (1H, d), 4.09 (1H, m), 3.85 (1H, m), 3.74 (1H, m), 3.57-3.44 (2H, m), 3.48 (1H, m), 3.47 (1H, m), 3.35 (3H, s), 3.35 (1H, m), 3.33 (1H, m), 3.29 (1H, m), 3.27 (1H, m), 3.04 (1H, m), 2.84 (1H, m), 2.58 (2H, d), 2.50 (2H, d), 2.28 (3H, s), 2.12 (1H, m), 1.94 (1H, m), 1.91 (3H, s), 1.88 (1H, m), 1.78 (1H, m), 1.76 (1H, m), 1.70 (1H, m), 1.66 (1H, m), 1.63 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.37 (1H, m), 1.24 (1H, m) (包括旋转异构体)。

[0197] NMR ( $^{13}\text{C}$ , 100MHz, DMSO- $d_6$ ): 176.6, 171, 165.4, 161.0, 156.6, 155.4, 140.3, 136.0, 128.5, 125.6, 109.3, 78.5, 75.4, 72.4, 72.2, 71.2, 64.8, 64.4, 64.4, 55.5, 55.5, 51.5, 51.4, 50.2, 45.6, 44.1, 44.1, 38.8, 33.3, 29.6, 28.7, 28.7, 25.1, 23.1, 20.6, 11.7 (包括旋转异构体)。

[0198] HRMS (ESI): m/z 538.3400 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ;  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4$ )。

[0199] 拉曼 (FT-RAMAN) 谱图 (特征谱带) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 1718, 1242, 731, 662, 553。

[0200] 对于另外的表征数据参见如下的表II和图2-4和17。

[0201] 部分III: (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的另外的盐的制备

[0202] 如下所述制备和表征 (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮另外的盐。

[0203] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮氢溴酸盐的制备

[0204] 将1.916mL (0.1M) 氢溴酸加入103mg (0.1916mmol) 的 (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮于2mL甲醇的溶液中并在50℃搅拌2h。然后,于40℃在真空干燥器中除去溶剂。接下来,将4mL四氢呋喃加入残余物中。超声处理混合物,然后在40℃搅拌2h,之后在室温保存4h。然后,在真空干燥器中除去溶剂以产生 (4-((3R,4R)-3-甲氧基四



氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的氢溴酸盐。

[0205] 表征数据参见如下表III和图5-7。

[0206] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮盐酸盐的制备

[0207] 将0.558mL (0.1M) 的盐酸加入30mg (0.0557mmol) 的 (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮于1mL甲醇的溶液中并在50℃搅拌2h。然后,在40℃在真空干燥器中除去溶剂。然后,向残余物加入1.2mL四氢呋喃。超声处理混合物,然后在40℃搅拌2h,之后在室温保存4h。然后,在真空干燥器中除去溶剂以产生(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮盐酸盐。

[0208] 数据表征参见如下表IV和图8-10。

[0209] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮乙磺酸盐的制备

[0210] 1.860mL (0.1M) 乙磺酸加入100mg (0.186mmol) (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮于2mL甲醇的溶液中并在50℃搅拌2h。然后,在40℃在真空干燥器中除去溶剂。接下来,向残余物中加入4mL丙酮。超声处理混合物,然后在40℃搅拌2h,之后在室温保存4h。然后,在真空干燥器中除去溶剂以产生(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的乙磺酸盐。

[0211] 拉曼(FT-RAMAN)图谱(特征谱带) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 1637, 1253, 1014, 740, 719, 534, 525, 219。

[0212] 对于表征数据,参见下表V和图11-13和18。

[0213] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮甲磺酸盐的制备

[0214] 将0.558mL (0.1M) 甲磺酸加入到30mg (0.0557mmol) (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮于1mL甲醇的溶液中并在50℃搅拌2h。然后,在40℃在真空干燥器中除去溶剂。接下来,向残余物加入1.2mL甲苯。超声处理混合物,然后在50℃搅拌2h,之后在室温过夜保存。然后,在真空干燥器中除去溶剂以产生(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮甲磺酸盐。

[0215] 对于表征数据,参见下表VI和图14-16。

[0216] 部分IV: (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的盐的物理表征数据

[0217] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,

6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮的盐的示例性物理表征数据提供如下。

[0218] 在水性介质中的溶解度

[0219] 表I显示(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐在不同水性介质中在2,4和6h的溶解度。

[0220] 表I.

介质	2 h [mg/ml]	4 h [mg/ml]	6 h [mg/ml]
水	>1	>1	>1
0.1 N HCl	>1	>1	>1
0.01 N HCl	>1	>1	>1
McIlvaine buffer pH 2.2	>1	>1	>1
McIlvaine buffer pH 3.0	>1	>1	>1
McIlvaine buffer pH 4.0	>1	>1	>1
McIlvaine buffer pH 4.5	没测定	>1	>1
McIlvaine buffer pH 5.0	>1	>1	>1
McIlvaine buffer pH 6.0	>1	>1	>1
McIlvaine buffer pH 6.8	>1	>1	>1
McIlvaine buffer pH 7.4	>1	>1	>1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -缓冲液 pH 7.4	>1	>1	>1
Sörensen pH 10	>1	>1	>1
0.1 N NaOH	>1	>1	>1
EtOH	9.2	9.8	10

[0223] 表I的数据证明(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐在酸性、中性和碱性水性介质中是高度可溶的。

[0224] 柠檬酸盐1的固态特征

[0225] 柠檬酸盐1的各种固态特征描述如下。

[0226] 外观

[0227] 在固态时,(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐是白色微晶材料。

[0228] 吸附行为

[0229] 仅仅 (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐显示针对相对湿度高达80%的稳定性。发现吸收2.6%的水。水吸收是可逆的,并且在吸附实验之后化合物仍然保持固体材料。所有其他盐在更高的相对湿度下(依赖于在60-70%相对湿度开始的盐形式)变成液相。

[0230] 结晶度和多晶形现象

[0231] 柠檬酸盐1

[0232] 如图2的X-射线粉末衍射图所看到的,柠檬酸盐1是高度结晶。X-射线粉末反射和强度(标准化的)显示于表II。表II.

[0233]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
4.36	20.24	17
12.17	7.27	41
12.51	7.07	6
13.13	6.74	7
13.66	6.48	39
14.20	6.23	14
14.60	6.06	32
15.03	5.89	5
15.25	5.81	4
15.97	5.54	11
16.51	5.37	13
17.05	5.20	13
17.54	5.05	4
17.88	4.96	5
18.65	4.75	22
19.05	4.66	100
19.68	4.51	11
20.42	4.35	6
20.84	4.26	4
21.25	4.18	3
21.90	4.06	5
22.42	3.96	92
23.19	3.83	9
23.70	3.75	16
24.34	3.65	4
24.56	3.62	23

[0234]

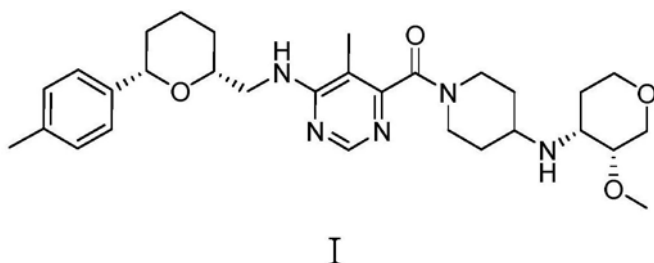
2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
24.89	3.57	16
25.20	3.53	7
25.36	3.51	7
25.67	3.47	6
26.26	3.39	23
26.59	3.35	12
27.51	3.24	6
27.71	3.22	6
28.01	3.18	7
28.23	3.16	5
28.57	3.12	3
29.44	3.03	12
30.15	2.96	4

[0235] 在上面的表II中,值“2- $\theta$ [°]”表示衍射角度数且d-值[Å]表示晶格面之间的特定距离Å。

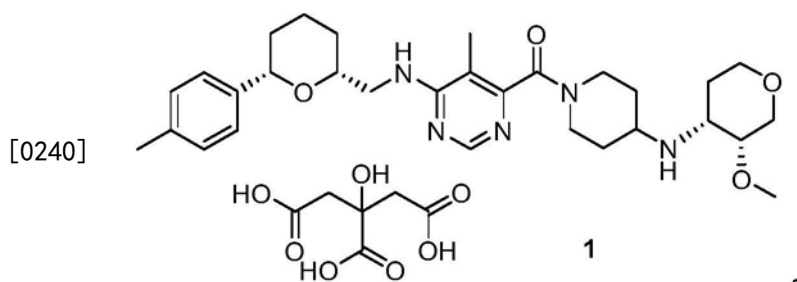
[0236] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐晶体特征在于x-射线粉末图尤其具有特征值2- $\theta$ =19.1°(100%相对强度),22.4°(92%相对强度),12.2°(41%相对强度),13.7°(39%相对强度),和14.6°(32%相对强度)(其在图2的图、表II中是最显著的峰)。

[0237] 因此,根据第一方面本发明提供化合物I的柠檬酸盐

[0238]



[0239] 具有式



[0241] 在第二实施方式中,盐1是晶体形式。

[0242] 在根据前述实施方式的任一个的第三实施方式中,化合物1的晶体形式显示出包括在以下 $2-\theta$ 值的峰的X-射线粉末衍射图谱:  $19.1^\circ$ 和 $22.4^\circ$ ,所述 $2-\theta$ 值是采用 $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ , 40kV, 40mA的单色CuK $\alpha$ 1 辐射测定的。

[0243] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出进一步包括在 $12.2^\circ$ 的峰的X-射线粉末衍射图谱。

[0244] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出进一步包括在 $13.7^\circ$ 的峰的X-射线粉末衍射图谱。

[0245] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出进一步包括在 $14.6^\circ$ 的峰的X-射线粉末衍射图谱。

[0246] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出进一步包括在 $18.7^\circ$ 的峰的X-射线粉末衍射图谱。

[0247] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出进一步包括在 $24.6^\circ$ 的峰的X-射线粉末衍射图谱。

[0248] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出进一步包括在 $26.3^\circ$ 的峰的X-射线粉末衍射图谱。

[0249] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出包括在以波数用 $\text{cm}^{-1}$ 计所表示的如下任一个或全部的拉曼位移处的峰的拉曼光谱: 1718, 1242, 731, 662, 553。

[0250] 在根据前述实施方式的任一个的进一步的实施方式中,晶体形式显示出熔点 $212 \pm 5^\circ\text{C}$ 。

[0251] 柠檬酸盐1可以以药物组合物提供。因此,本发明的另一个方面是药物组合物,其含有根据前述任一个实施方式的盐,任选与一种或多种惰性载体和/或稀释剂在一起。

[0252] 从几个实验中已经获得(4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮柠檬酸盐的仅仅一种晶体形式。

[0253] 式(I)化合物的氢溴酸盐

[0254] 如图5中的X-射线粉末衍射图所证明的,式(I)化合物的氢溴酸盐是中等结晶度的。X-射线粉末反射和强度(标准化的)显示于表 III。

[0255] 表III.

[0256]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
4.73	18.67	100
7.60	11.62	37
9.48	9.32	15
12.74	6.94	34
14.46	6.12	78
15.25	5.81	62
17.38	5.10	56
18.16	4.88	17
19.36	4.58	62
20.39	4.35	83
22.01	4.03	17
22.72	3.91	25
24.05	3.70	37
24.94	3.57	26
25.23	3.53	41
25.65	3.47	27
26.35	3.38	19

[0257]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
27.25	3.27	19
28.00	3.18	15
28.92	3.08	21
29.49	3.02	15
29.59	3.02	16

[0258] 在上面的表III中,值“2- $\theta$ [°]”表示衍射角度数且d-值[Å]表示晶格面之间的特定

距离 Å。

[0259] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮氢溴酸盐特征在于,x-射线粉末图尤其具有特征值 $2-\theta=4.7^{\circ}$  (100%相对强度), $20.4^{\circ}$  (83%相对强度), $14.5^{\circ}$  (78%相对强度), $15.3^{\circ}$  (62%相对强度),和 $19.4^{\circ}$  (62%相对强度) (其是图5的图、表III中最显著的峰)。

[0260] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮氢溴酸盐的不同多晶形变体已经由X-射线粉末衍射鉴别。

[0261] 式(I)化合物的盐酸盐

[0262] 如图8的X-射线粉末衍射图可以看出,式(I)化合物的盐酸盐是中等结晶度的。X-射线粉末反射和强度(标准化的)显示于表IV。

[0263] 表IV.



[0264]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
4.05	21.78	24
4.74	18.63	93
7.68	11.50	28
9.49	9.31	19
10.17	8.69	17
12.27	7.21	16
12.85	6.88	29
13.55	6.53	19
14.05	6.30	22
14.55	6.08	64
15.37	5.76	98
16.09	5.51	23
16.58	5.34	19
17.52	5.06	100
18.14	4.89	25
19.12	4.64	23
19.53	4.54	39
20.46	4.34	77
22.16	4.01	23
22.79	3.90	26
23.22	3.83	20
24.13	3.69	44
25.02	3.56	23
25.42	3.50	24
25.87	3.44	18
26.57	3.35	15

[0265]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
27.39	3.25	18
28.06	3.18	16
29.07	3.07	18
29.85	3.00	12

[0266] 在上面的表IV中,值“2- $\theta$ [°]”表示衍射角度数且d-值[Å]表示晶格面之间的特定距离Å。

[0267] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮盐酸盐特征在于,x-射线粉末图尤其具有特征值2- $\theta$ = 17.5°(100%相对强度),15.4(98%相对强度),4.7°(93%相对强度),20.5°(77%相对强度),和14.6°(64%相对强度), (其是图8的图、表IV中最显著的峰)。

[0268] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮盐酸盐不同多晶形变体已经由X-射线粉末衍射鉴别。

[0269] 式(I)化合物的乙磺酸盐

[0270] 如图11的X-射线粉末衍射图可以看出,式(I)化合物乙磺酸盐是高结晶度的。X-射线粉末反射和强度(标准化的)显示于表V。

[0271] 表V.

[0272]

2- $\theta$ [ $^{\circ}$ ]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
5.33	16.56	66
7.87	11.23	48
9.14	9.67	7
9.97	8.87	24
10.93	8.09	23
12.23	7.23	9
12.43	7.12	11
13.26	6.67	83
14.55	6.08	48
14.83	5.97	18
15.07	5.88	10
15.29	5.79	17
15.77	5.61	51
16.05	5.52	25
16.18	5.47	19
16.46	5.38	12
16.88	5.25	10
17.90	4.95	100
18.32	4.84	34
18.49	4.79	22
19.29	4.60	36
19.44	4.56	40
20.03	4.43	63
20.14	4.41	45
20.85	4.26	66
21.08	4.21	11

[0273]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
21.37	4.15	12
21.92	4.05	18
22.22	4.00	21
22.49	3.95	16
22.71	3.91	7
23.33	3.81	10
23.53	3.78	9
23.79	3.73	8
23.98	3.71	20
24.43	3.64	15
24.68	3.60	14
25.00	3.56	17

[0274] 在上面的表V中,值“2- $\theta$ [°]”表示衍射角度数且d-值[Å]表示晶格面之间的特定距离Å。

[0275] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮乙磺酸盐特征在于,x-射线粉末图尤其具有特征值2- $\theta$ =17.9°(100%相对强度),13.3(83%相对强度),5.3°(66%相对强度),20.9°(66%相对强度),和20.0°(63%相对强度)(其是图11、表V中最显著的峰)。

[0276] 式(I)化合物的甲磺酸盐

[0277] 如图14的X-射线粉末衍射图可以看出,式(I)化合物的甲磺酸盐是中等结晶度的。X-射线粉末反射和强度(标准化的)显示于表 VI。

[0278] 表VI.

[0279]

2- $\theta$ [°]	d-值 [Å]	强度 I/I <sub>0</sub> [%]
5.36	16.48	30
5.57	15.85	27
7.84	11.27	43
9.91	8.92	51
11.05	8.00	21
12.33	7.17	77
13.26	6.67	26
14.69	6.03	100
14.95	5.92	50
15.78	5.61	20
16.47	5.38	23
17.74	4.99	53
18.42	4.81	38
19.09	4.65	33
19.29	4.60	41
19.91	4.46	32
20.67	4.29	55
21.23	4.18	21
22.28	3.99	28
23.74	3.74	16
24.33	3.66	23
24.84	3.58	15
25.60	3.48	21
29.79	3.00	16
17.74	16.48	30
18.42	15.85	27

[0280]	2- $\theta$	d-值	强度
	[ $^{\circ}$ ]	[Å]	I/I <sub>0</sub> [%]
	19.09	11.27	43

[0281] 在上面的表VI中,值“2- $\theta$ [ $^{\circ}$ ]”表示衍射角度数且d-值[Å]表示晶格面之间的特定距离Å。

[0282] (4-((3R,4R)-3-甲氧基四氢-吡喃-4-基氨基)哌啶-1-基)(5-甲基-6-(((2R,6S)-6-(对-甲苯基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基氨基)嘧啶-4-基)甲酮甲磺酸盐特征在于,x-射线粉末图尤其具有特征值2- $\theta$ =14.7°(100%相对强度),12.3(77%相对强度),20.7°(55%相对强度),17.7°(53%相对强度),和9.9°(51%相对强度)(其是图14、表 VI中最显著的峰)。

[0283] 热分析

[0284] 柠檬酸盐1晶体的热分析显示熔点=212±5°C(开始,DSC:10 K·min<sup>-1</sup>加热速率;DSC/TG图显示于图3)。干燥后发生1.6%重量损失。因此,柠檬酸盐吸收溶剂的倾向低(在水的情况下意味着低吸湿性)。

[0285] 化合物I的氢溴酸盐晶体的热分析显示熔点=248±5°C(开始,DSC:10K·min<sup>-1</sup>加热速率;DSC/TG图显示于图6)。在40-110°C之间发生宽的吸热效应伴随重量损失(干燥后2.9%重量损失)。

[0286] 化合物I的盐酸盐晶体的热分析显示熔点=233±5°C(开始,DSC:10K·min<sup>-1</sup>加热速率;DSC/TG图显示于图9)。在40-80°C之间发生宽的吸热效应。在130-150°C之间发生弱的吸热效应(干燥后2.8%重量损失)。

[0287] 化合物I的乙磺酸盐晶体的热分析显示熔点=199±5°C(开始,DSC:10K·min<sup>-1</sup>加热速率;DSC/TG图显示于图12)。在40-100°C之间发生弱的宽吸热效应。干燥后2.4%的损失与吸热效应相关。

[0288] 化合物I的甲磺酸盐晶体的热分析显示熔点=226±5°C(开始,DSC:10K·min<sup>-1</sup>加热速率;DSC/TG图显示于图15)。在30-110°C之间发生弱的宽吸热效应。

[0289] 吸附等温线

[0290] 柠檬酸盐1晶体的吸附等温线显示在10-80%的湿度范围水吸收2.6%(如图4所示的图线)。

[0291] 化合物I的氢溴酸盐晶体的吸附等温线显示在10-80%的湿度范围水吸收4.5%(如图7所示的图线)。

[0292] 化合物I的盐酸盐晶体的吸附等温线显示在10-80%的湿度范围水吸收15%(如图10所示的图线)。

[0293] 化合物I的乙磺酸盐晶体的吸附等温线显示在10-80%的湿度范围水吸收20%(如图13所示的图线)。

[0294] 化合物I的甲磺酸盐晶体的吸附等温线显示在10-80%的湿度范围水吸收30%(如图16所示的图线)。

[0295] 化合物I的盐的选择的物理特征的总结

[0296] 化合物I的柠檬酸盐,氢溴酸盐,盐酸盐,乙磺酸盐和甲磺酸盐的选择的特征表示在表VII中。

[0297] 表VII.

参数	化合物 I 的盐形式				
	柠檬酸盐	氢溴酸盐	盐酸盐	乙磺酸盐	甲磺酸盐
结晶度	高度	中度	中度	高度	中度
熔点 [°C] (开始)	212 ± 5	248 ± 5	233 ± 5	199 ± 5	226 ± 5
热行为	在熔化前 没有其他 效应	宽的吸热效应 40-110 °C	宽的吸热 效应 40-80 °C 弱的吸热 效应 130-150 °C	弱的宽的 吸热效应 40-100 °C	弱的宽的 吸热效应 30-110 °C

[0298]

参数	化合物 I 的盐形式				
	柠檬酸盐	氢溴酸盐	盐酸盐	乙磺酸盐	甲磺酸盐
干燥失重 [%]	1.6	2.9	2.8	2.4	
吸湿行为 (高达 80% r. h.)	2.6% 水 吸收	4.5% 水吸收 潮解	15% 水吸 收 潮解	20% 水吸 收 潮解	30% 水吸 收
吸湿行为 (高达 90% r. h.)	3.4 % 水 吸收	20% 水吸收 潮解	40% 水吸 收 潮解	45% 水吸 收 潮解	45% 水吸 收
多晶形指示	无	有	有	无	无

[0299]

[0300] 实施例2--表征化合物I及其柠檬酸盐1的生物学活性数据

[0301] 进行实验评估化合物I及其柠檬酸盐1的生物学活性。实验过程的描述和结果提供如下。

[0302] 部分I:生物学测定的描述

[0303] 血浆蛋白结合

[0304] 使用Dianorm Teflon透析细胞 (micro 0.2)。每个细胞由供体 (即缓冲液室) 和受体室 (即血浆室) 组成, 被具有5kDa截留分子量的超薄半透膜隔开。在DMSO中以1mM制备每种测试化合物的储备溶液, 并稀释至1.0μM的终浓度。将200μL透析缓冲液 (100mM磷酸钾, pH7.4) 的等分试样分配到缓冲液室中。将200μL测试化合物透析溶液的等分试样分配到血浆室中。在37℃下旋转下孵育2小时。然后, 透析液转移到反应试管中。用于缓冲液部分的试管含有0.2mL乙腈/水 (80/20体积/体积)。将25μL血浆透析液的等分试样转移到深孔板中并与25μL乙腈/水 (80/20体积), 25μL缓冲液, 25μL校准溶液和25μL内标溶液混合。蛋白质沉淀通过加入200μL乙腈进行。将 50μL缓冲液透析液的等分试样转移到深孔板中并与25μL空白血浆, 25μL内标溶液和200μL乙腈一起混合。用下式计算结合百分比: %结合 = (血浆浓度 - 缓冲液浓度 / 血浆浓度) × 100。

[0305] 体外代谢稳定性

[0306] 在肝细胞悬液中测定测试化合物的代谢降解。肝细胞在合适的缓冲系统中孵育。在培养箱 (37℃, 10%CO<sub>2</sub>) 中 (通常) 30分钟预孵育后, 将5μL测试化合物溶液 (1μM) 加入到395μL肝细胞悬浮液中 (细胞密度为0.25-5Mio细胞/mL, 通常1Mio细胞/mL, 最终DMSO 浓度0.05%)。将细胞孵育6小时 (培养箱, 定轨摇床), 并在0, 0.5, 1, 2, 4和6小时取样 (25μL)。将样品转移至乙腈中, 离心沉淀 (5分钟)。将上清液转移到新的96深孔板中, 在氮气下蒸发并重新悬浮。通过HPLC-MS/MS分析母体化合物的下降。CL<sub>int</sub>计算如下 CL<sub>固有</sub> = 剂量 / AUC = (C<sub>0</sub> / CD) / (AUD + clast / k) × 1000 / 60。C<sub>0</sub>: 孵育中的初始浓度 [μM], CD: 活细胞的细胞密度 [10e6细胞/mL], AUD: 曲线下的面积 [μM × h], clast: 最后数据点的浓度 [μM], k: 母体下降的回归线的斜率 [h<sup>-1</sup>]。计算的体外肝脏固有清除率可以放大到固有的体内肝脏清除率, 并用于预测使用肝脏模型 (充分搅拌的模型) 的肝脏体内血液清除率 (CL)。

[0307] • CL<sub>固有\_体内</sub> [ml/min/kg] = (CL<sub>固有</sub> [μL/min/10e6细胞] × 肝细胞构成 [10e6细胞/g肝脏] × 肝脏系数 [g/kg体重]) / 1000

[0308] • CL [ml/min/kg] = CL<sub>固有\_体内</sub> [ml/min/kg] × 肝血流量 [ml/min/kg] / (CL<sub>固有\_体内</sub> [ml/min/kg] + 肝血流量 [ml/min/kg])

[0309] 药代动力学 (动物实验)

[0310] 在单次静脉注射 (IV) 或口服 (PO) 剂量后, 检测了测试化合物的药代动力学

[0311] • 雌性BALB/c小鼠 (平均体重: 25g)

[0312] • 雄性Wistar (Han) 大鼠 (平均体重: 260g)

[0313] • 雄性和雌性**Göttingen**小型猪 (Minipigs) (平均体重: 24kg)

[0314] • 雄性比格犬 (beagle dogs) (平均体重: 15kg)

[0315] 所有非啮齿动物物种在给药之前禁食过夜, 而小鼠和大鼠可自由获取食物和水。化合物的p.o.剂量通常以0.5% Natrosol的悬浮液或 0.5% Natrosol/0.015% 吐温80混悬液的形式给药。对于i.v.给药目的时, 剂量以0.9% NaCL溶液形式施用, 或以含有9.1% HP-β环糊精的水溶液形式施用。



[0316] 通过静脉取样收集血液并将血液浸在EDTA涂敷的管中。在给予测试化合物后达48小时,收集样品。然后通过离心分离血浆(5分钟,在4℃约9000g)。对于测试化合物的测定,将血浆转移到PCR板中。所有样品都储存在大约-20℃直到生物分析。通过HPLC MS/MS测定血浆中的测试化合物浓度。定量下限为0.5 nmol/L~1 nmol/L。

[0317] hERG-通道测定

[0318] 细胞:

[0319] HEK(人胚胎肾)293细胞用hERG cDNA稳定转染。用于膜片钳实验中测定的细胞在没有抗生素的情况下培养。

[0320] 移液管(Pipettes)和溶液

[0321] 用含有(mM):NaCl(137),KCl(4.0),MgCl<sub>2</sub>(1.0),CaCl<sub>2</sub>(1.8),Glucose(10),HEPES(10),用NaOH调的pH 7.4的浴溶液(bath solution)对细胞进行超融合。使用水平拉制器(DMZ-Universal Puller,Zeitz-Instrumente,Martinsried,德国)由硼硅酸盐玻璃管(Hilgenberg,Malsfeld,德国)制备膜片移液管(patch pipettes),并用含有(mM):K-天冬氨酸盐(aspartate)(130),MgCl<sub>2</sub>(5.0),EGTA(5.0),K<sub>2</sub>ATP(4.0),HEPES(10.0),KOH调的pH 7.2的移液管溶液填充。微电极的电阻在2和5MΩ之间的范围内。

[0322] 刺激和记录:

[0323] 使用EPC-10膜片钳放大器(HEKA Electronics,Lambrecht, Germany)和PatchMaster软件(HEKA)记录膜电流。电流信号在2.5kHz进行贝塞尔(Bessel)过滤,然后在5kHz进行数字化。

[0324] 使用膜片钳技术的全细胞配置,通常在28℃记录hERG介导的膜电流。将转染的HEK293细胞夹持在-60mV的保持电位,并使用具有固定振幅的脉冲模式激活hERG介导的失活尾电流(激活/失活:40mV持续2000ms;恢复:120mV持续2ms;在2ms内变为40mV;失活尾电流:40mV为50ms)以15s间隔重复。在每个脉冲内间隔期间,记录4个按比例缩小0.2倍的脉冲,用于P/n泄漏减少过程。 $R_s$ 补偿被使用直到安全地允许记录没有振鸣的水平。记录剩下的未补偿的 $R_s$ 以及实际温度和保持电流。

[0325] 化合物的制备和应用:

[0326] 将测试物品的浓度依次应用于所研究的每个不同的细胞。在施加第一测试物品浓度之前,测量基线电流的稳态水平至少90秒。

[0327] 将测试物品溶解于DMSO中以产生最高终浓度的1000倍的储备液。将该储备液在DMSO中进一步稀释至其余终浓度的1000倍的储备液。细胞外缓冲液中的最终稀释物在开始实验之前各自通过1:1000稀释步骤从这些储液中新鲜制备。

[0328] 数据分析:

[0329] 在变到+40mV之后3ms测量峰值电流幅度。对于基线和每个浓度,应用下一个浓度之前将最后三次扫描的峰值电流平均。计算每个细胞的残余电流( $I/I_0$ ),作为实际平均峰值电流和平均基线峰值电流的分数。电流抑制表示为 $(1-I/I_0)*100\%$ 。所有细胞的电流抑制以平均值±SD记录。根据平均电流抑制数据,使用最小二乘法程序基于希尔方程估计 $IC_{50}$ 。

[0330] 体外磷脂沉积(Phospholipidosis)测定

[0331] 1.细胞培养:

- [0332] 细胞系:U937。细胞密度:0.5Mio.细胞/mL。培养基的量:3mL/ 孔。
- [0333] 2.材料和设备:
- [0334] -Falcon组织培养烧瓶175cm<sup>2</sup>
- [0335] -测试试管Sarstedt
- [0336] -6-孔微量培养板
- [0337] -层流
- [0338] -冷冻离心机
- [0339] -移液管
- [0340] -流式细胞测定仪:Coulter Epics XL/MCL (Beckman Coulter Inc.,Bullerton, California,USA)
- [0341] 3.培养基和添加剂:
- [0342] 3.1含有10%FCS和0.005%庆大霉素的RPMI1640的制备:
- [0343] 介质:
- [0344] -VLE RPMI 1640培养基 (1x),储存在2-8℃
- [0345] 添加剂:
- [0346] -胎牛血清,储存在-20℃
- [0347] -庆大霉素,**Gibco**<sup>®</sup>Invitrogen,浓度10mg/mL (=1%溶液)
- [0348] 将56mL FCS和2.6mL庆大霉素加入到500mL RPMI1640中。在2-8℃储存现成可用的培养基。
- [0349] 3.2甲醛工作溶液 (浓度3.7%) 的制备:
- [0350] 稀释37%甲醛于1x PBS (稀释比例1:10) 中以制备3.7%工作溶液,其储存在2-8℃。
- [0351] 3.3缓冲液
- [0352] PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca<sup>2+</sup>,Mg<sup>2+</sup>。储存在RT。
- [0353] 4.用于细胞染色的染料
- [0354] 4.1活细胞染色:
- [0355] 4.1.1碘化丙啶 (PI;Molecular Probes,Eugene,Oregon,USA)
- [0356] PI储备液:1mg/mL PBS (储存在4℃黑暗处)。
- [0357] PI现成溶液:用PBS 1:100稀释储备液 (每次实验新鲜制备)。
- [0358] 4.1.2尼罗红 (NR;Molecular Probes,Eugene,Oregon)
- [0359] NR储备液:1mg/mL DMSO (储存在4℃黑暗处)。
- [0360] NR现成溶液用于活细胞染色:用PBS 1:100稀释NR储备液 (每次实验新鲜制备)。
- [0361] 4.2固定细胞染色
- [0362] 制备尼罗红储备液 (浓度1mg/mL):溶解1mg尼罗红在1mL 100%DMSO中,储存在2-8℃。
- [0363] 制备尼罗红工作溶液用于固定细胞染色 (浓度1μg/mL):稀释尼罗红储备液在1x PBS中 (稀释比率1:1000)。工作溶液必须在染色细胞前马上制备和使用。
- [0364] 5.细胞接种和处理:
- [0365] 如下可以进行细胞接种和处理:

[0366] -将测试化合物溶解于100%DMSO中至100倍最终浓度,并按照计划的实验将它们稀释。

[0367] -首先填充30 $\mu$ L储备液在6孔板的相关孔中并且用含有0.5 Mio.细胞/mL的3mL细胞悬浮液/孔再悬浮(终浓度DMSO=1%)。

[0368] -每个化合物和浓度使用一个孔

[0369] -在37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>和95%相对湿度在不改变培养基下培养48小时

[0370] 6.细胞收获:

[0371] 细胞收获可以如下进行:

[0372] -在Sarstedt管中(在冰上)转移细胞悬液

[0373] -离心:在130 $\times$ g, 4分钟, 4 $^{\circ}$ C;丢弃上清液

[0374] -每个试管重悬于3mL PBS中(冰冷)

[0375] -在Sarstedt管中(冰上)填充1mL细胞悬浮液进行流式细胞术测定(碘化丙啶为0.5mL, 尼罗红活细胞染色为0.5mL)

[0376] -残余物的离心:4分钟, 在130 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C;丢弃上清液

[0377] -每管加1mL 3.7%甲醛溶液

[0378] -固定30分钟(在RT固定后的细胞)

[0379] -离心:在130x g下4分钟, RT;丢弃上清液

[0380] -每个管重新悬浮在1.3mL尼罗红工作液中用于固定细胞染色

[0381] -孵育染料5分钟

[0382] -离心:在130x g下4分钟, RT;丢弃上清液

[0383] -重悬于3mL PBS中

[0384] -离心:在130x g下4分钟, RT;丢弃上清液

[0385] -重悬于0.5mL PBS(=尼罗红染色固定细胞的部分)中,使用流式细胞术方法测定磷脂沉积

[0386] 7.细胞染色和流式细胞仪测量

[0387] 从每个样品制备3x 0.5mL细胞悬浮液用于流式细胞术测量(用于存活力测定的非固定细胞,于磷脂沉积分析的非固定细胞和固定细胞)。

[0388] 7.1 PI染色和流式细胞仪测量用于确定存活力

[0389] 在即将测量之前,每个样品(0.5mL非固定细胞悬浮液)加入 12.5 $\mu$ L PI现成溶液,在测量之前将其在冰上保持另外15分钟。

[0390] 每个样品,在高流速下分析10,000个(10000个)细胞以下参数:

[0391] -测量10,000个细胞的时间,非门控(ungated)

[0392] -前向散射(线性)对侧向散射(线性),非门控

[0393] -黄色荧光( $\lambda$ =568-590nm;对数)对细胞数量(线性),非门控。

[0394] 测量10,000个细胞的时间与样品中的细胞密度相关。

[0395] 根据细胞培养基加暴露于载体的对照细胞的分析,定义活的和死亡的细胞之间荧光依赖性分化的截止门(Cut-off gates)。荧光低于截止值的细胞被定义为有活力的。样本的绝对存活力是活细胞与总细胞数的关系,以百分比表示。

[0396] 7.2尼罗红染色和流式细胞术测量用来确定PL

[0397] 7.2.1尼罗红活细胞染色

[0398] 在即将测量之前,每个样品(0.5mL非固定细胞悬浮液)添加50μL NR现成溶液用于活细胞染色的。样品在冰上保持另外5分钟。之后,它们用4mL PBS (4℃,250xG,8分钟)洗涤一次,最后再悬浮于400 μL PBS中。

[0399] 7.2.2尼罗红固定细胞染色

[0400] 说明见上文(6.细胞收获)。根据以下程序测量尼罗红染色的非固定细胞以及尼罗红染色的固定细胞。

[0401] 每个样品,在高流速下分析10,000个细胞的以下参数:

[0402] -前向散射(线性)与侧向散射(线性),非门控

[0403] -绿色荧光( $\lambda=504-541\text{nm}$ ;对数)与细胞数量(线性),非门控

[0404] -远红色荧光( $\lambda=660-680\text{nm}$ ;对数)与细胞数量(线性),非门控

[0405] 8.信号分析

[0406] 从测试化合物的磷脂沉积发生能力(phospholipidogenic potential)分析中排除小于90%相对存活力的样品。根据所有分析参数的一致性和绝对荧光强度,选择具有90-95%存活力的样品用于每种情形的评估。

[0407] 对于具有相对对照>90%(基于PI排除)的存活力的所有样品,对于绿色荧光以及对于远红色荧光计算NR染色后的平均绝对荧光强度。

[0408] 对于每个通道,特定样品的绝对荧光强度与各个实验的所有细胞培养基加上暴露于载体的对照细胞的平均绝对荧光强度相关。每通道,样品的相对荧光强度是该样品的绝对荧光强度对设定为100的对照的平均绝对荧光强度的关系,并以对照细胞荧光强度的百分比表示。

[0409] 9.磷脂沉积评估

[0410] 基于在固定细胞和非固定细胞所用的两个波长下的信号强度,手工评估测试化合物的磷脂沉积发生能力。

[0411] 部分II:化合物I(游离碱)及其柠檬酸盐1的生物学活性测定结果

[0412] 下表总结了化合物I及其柠檬酸盐1的生物学数据,其如上述的测定中确定。

[0413] 化合物I的体外血浆蛋白结合。

种类	小鼠	大鼠	狗	小型猪	人
[0414] 结合分数 [%]	95.1	68.9	70.4	60.8	84.7
未结合分数 [%]	4.9	31.1	29.6	39.2	15.3

[0415] 在肝细胞培养物中化合物I的体外代谢稳定性。

种类	小鼠	大鼠	狗	小型猪	人
[0416] CL 固有, 体外 [μL/min/10e6 细胞]	16.4	8.77	3.15	2.73	4.11
CL, 体内 [mL/min/kg]	49	26	14	6.8	7.9

[0417] 动物中化合物I的静脉注射药代动力学。

种类	小鼠	大鼠	狗	小型猪
动物数/性别	$n = 2f$	$n = 2m$	$n = 3m$	$n = 1m/1f$
静脉注射 PK 参数 (平均值)				
IV 剂量 ( $\mu\text{mol/kg}$ )	10	5	5	5
AUC (0-无限大) ( $\text{nM} \cdot \text{h}$ )	1990	1490	5990	4310
CL ( $\text{mL/min/kg}$ )	86.0	56.1	14.0	20.0
$V_{ss}$ ( $\text{L/kg}$ )	3.29	5.04	4.94	5.07
$\text{MRT}_{\text{disp}}$ (h)	0.623	1.49	6.40	4.15

[0419] 动物中化合物I的口服药代动力学。

种类	小鼠	大鼠	狗	小型猪
动物数量 /性别	$n = 3m/0f$	$n = 3m/0f$	$n = 3m/0f$	$n = 3m/0f$
口服 PK 参数 (平均值)				
口服剂量 ( $\mu\text{mol/kg}$ )	20	20	5	没进行
$C_{\text{max}}$ (nM)	974	580	317	没进行
$t_{\text{max}}$ (h)	1.00	1.50	0.917	没进行
AUC (0-无限大) ( $\text{nM} \cdot \text{h}$ )	3160	2270	1500	没进行
$\text{MRT}_{\text{tot}}$ (h)	3.99	5.49	5.77	没进行
F (%)	79	38	25	没计算

[0422] 大鼠中柠檬酸盐1的口服药代动力学。

种类	大鼠
动物数量 /性别	$n = 3m/0f$
口服 PK 参数 ° (平均值)	
口服剂量 ( $\mu\text{mol/kg}$ )	20
$C_{\text{max}}$ (nM)	454
$t_{\text{max}}$ (h)	1.08
AUC (0-无限大) ( $\text{nM} \cdot \text{h}$ )	1710
$\text{MRT}_{\text{tot}}$ (h)	3.3

[0424] hERG-介导的钾电流的抑制

[0425] 化合物I抑制hERG-介导的钾电流,  $IC_{50} > 30\mu M$  (在 $10\mu M$  12%抑制, 在 $30\mu M$  28%抑制)。

[0426] 体外磷脂沉积测定

[0427] 在体外磷脂沉积测定中化合物I显示磷脂沉积发生的倾向; 化合物I的最低磷脂沉积发生浓度为 $200\mu M$ 。

[0428] 参考加入

[0429] 为了所有目的, 将本文提及的每个专利文献和科学文献的全部公开内容通过参考加入本文。

[0430] 等价物

[0431] 不脱离本发明的精神或基本特征的情况下, 可以以其他具体形式来实施本发明。因此, 上述实施方式在所有方面均被认为是说明性的, 而不是限制本文所述的发明。因此, 本发明的范围由附属的权利要求而非上述说明书来表示, 并且在权利要求的等同物的含义和范围内发生的所有改变都旨意被包括在其中。

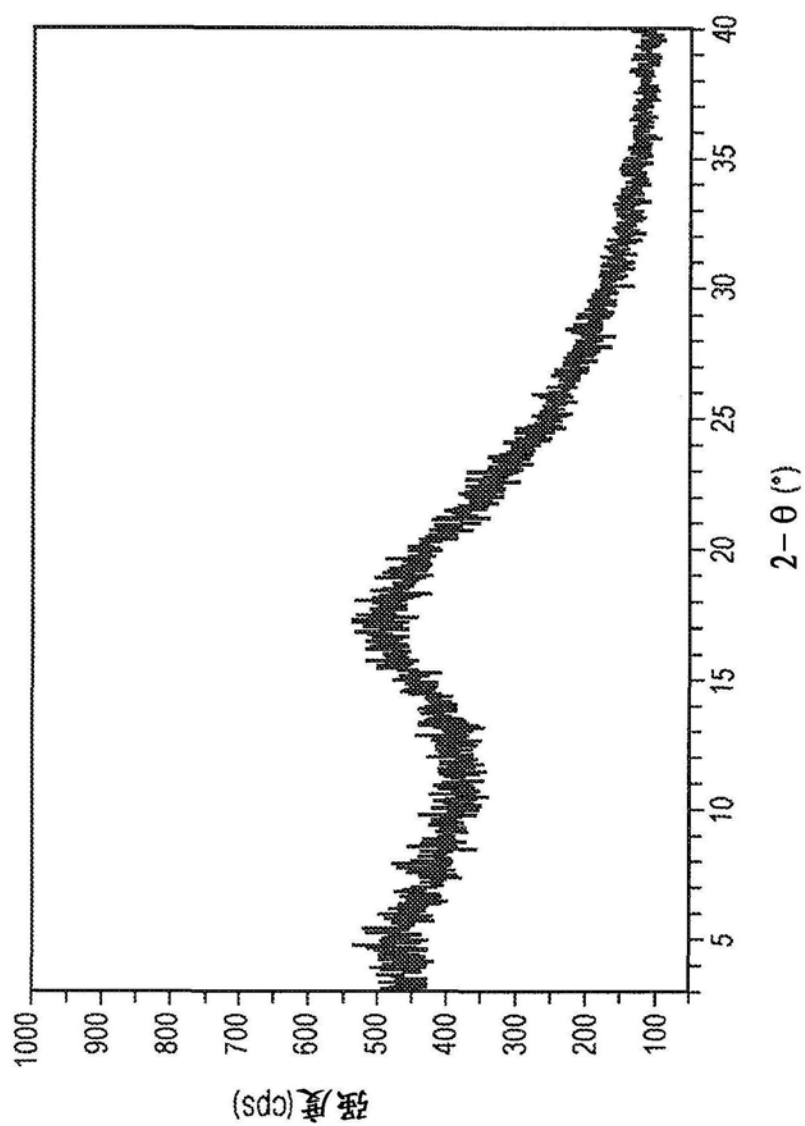


图1

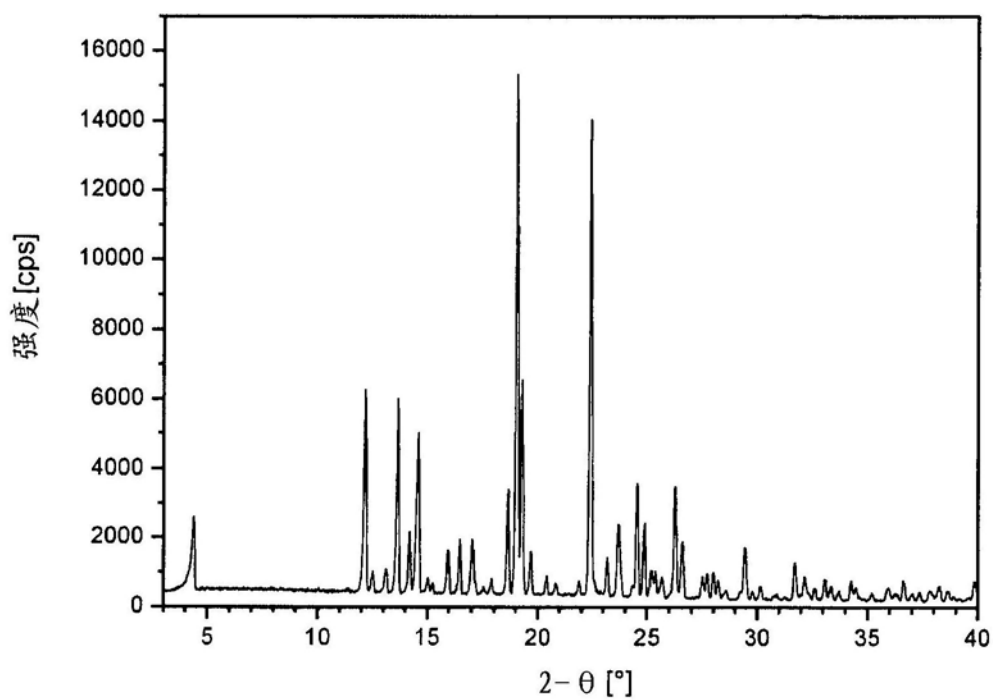


图2

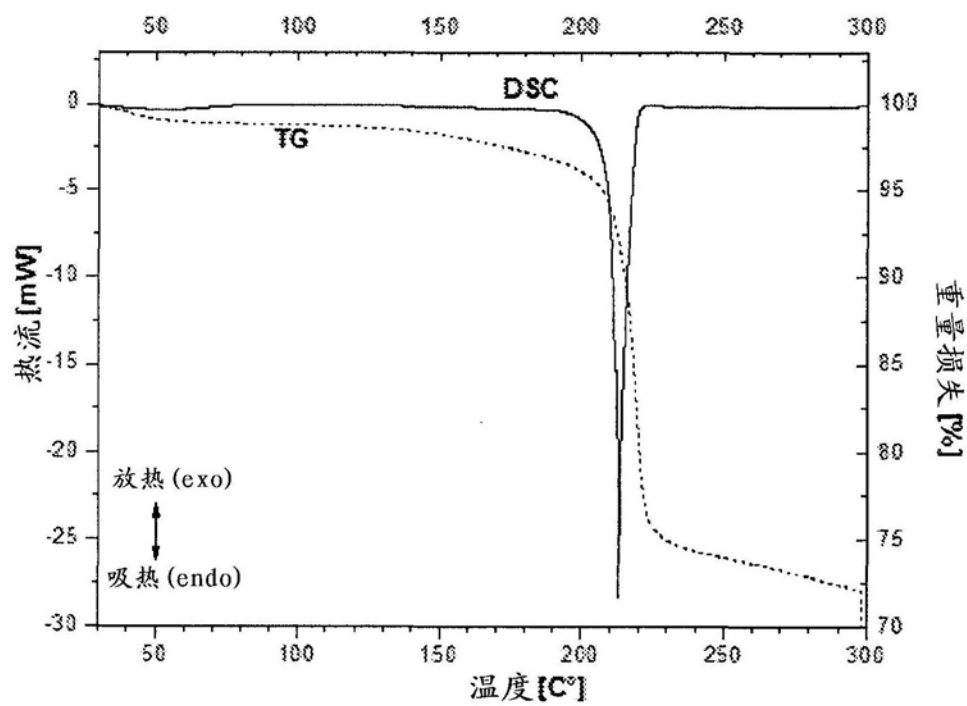


图3



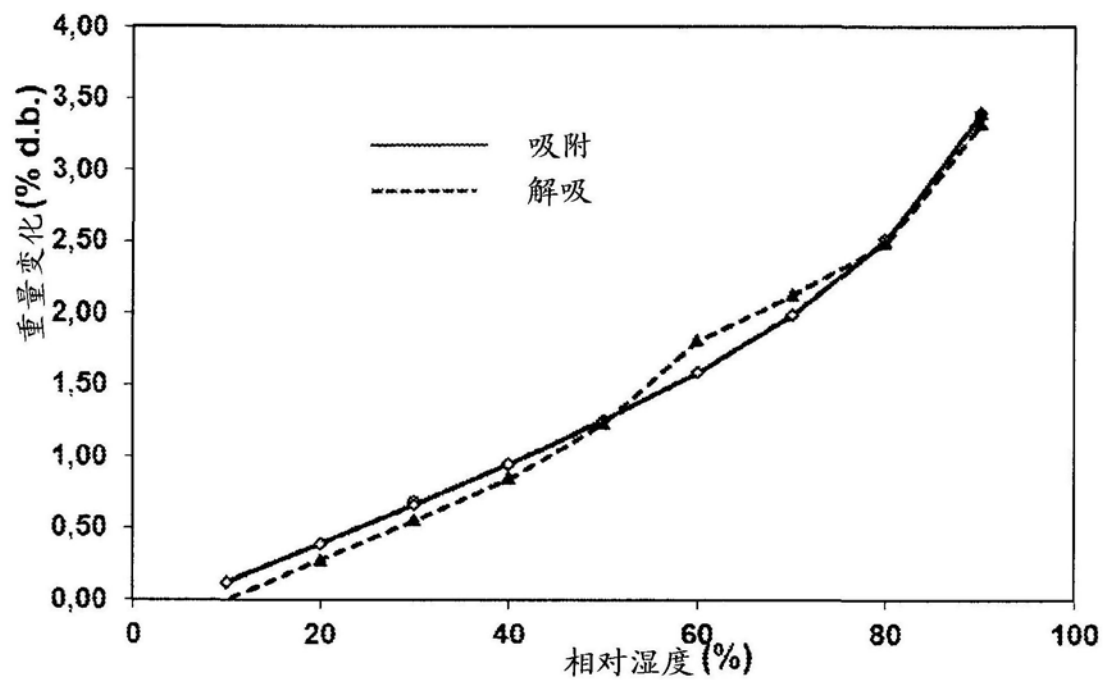


图4

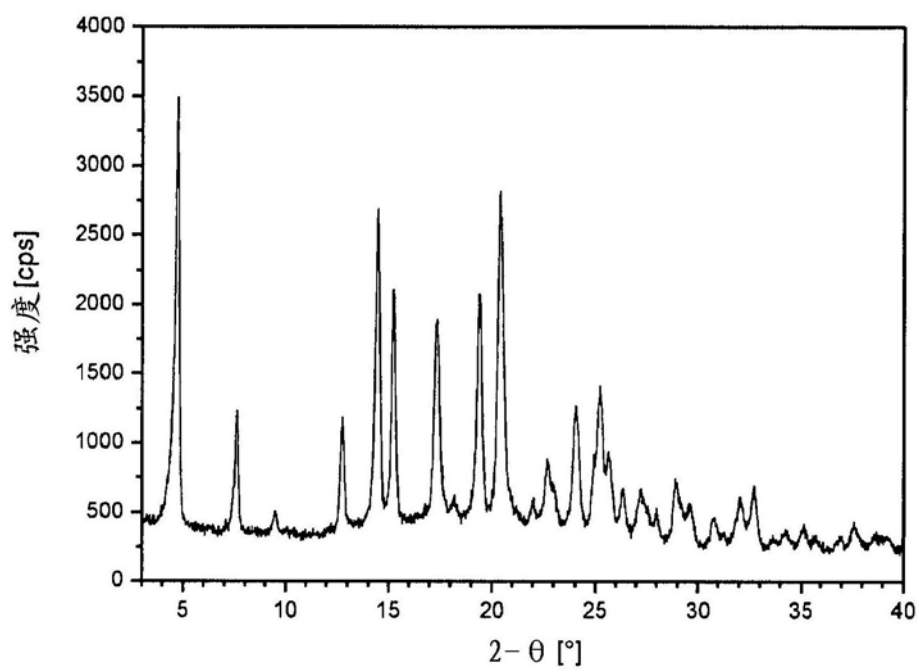


图5

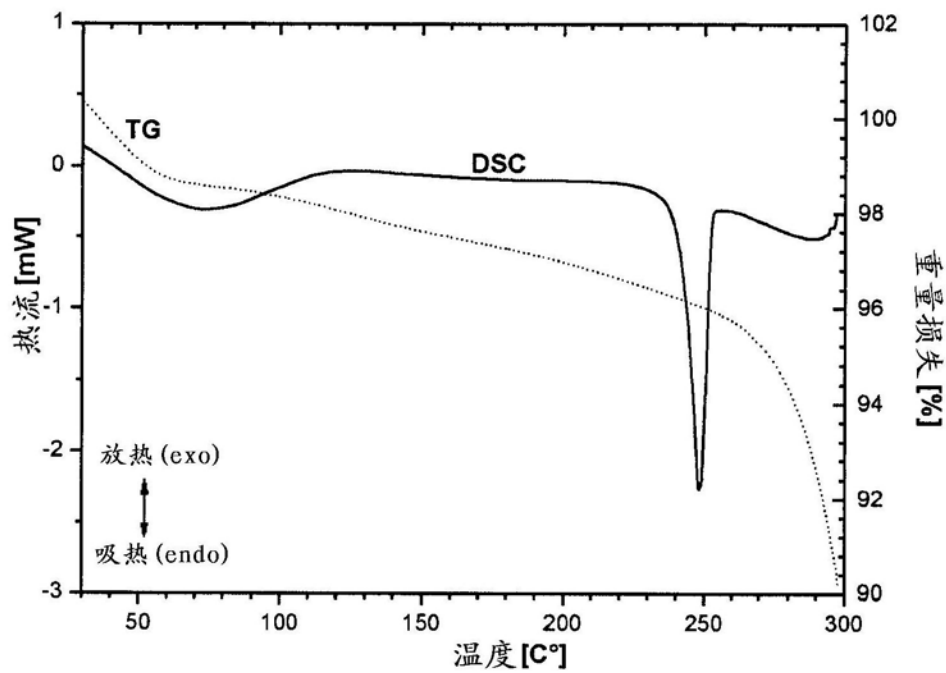


图6

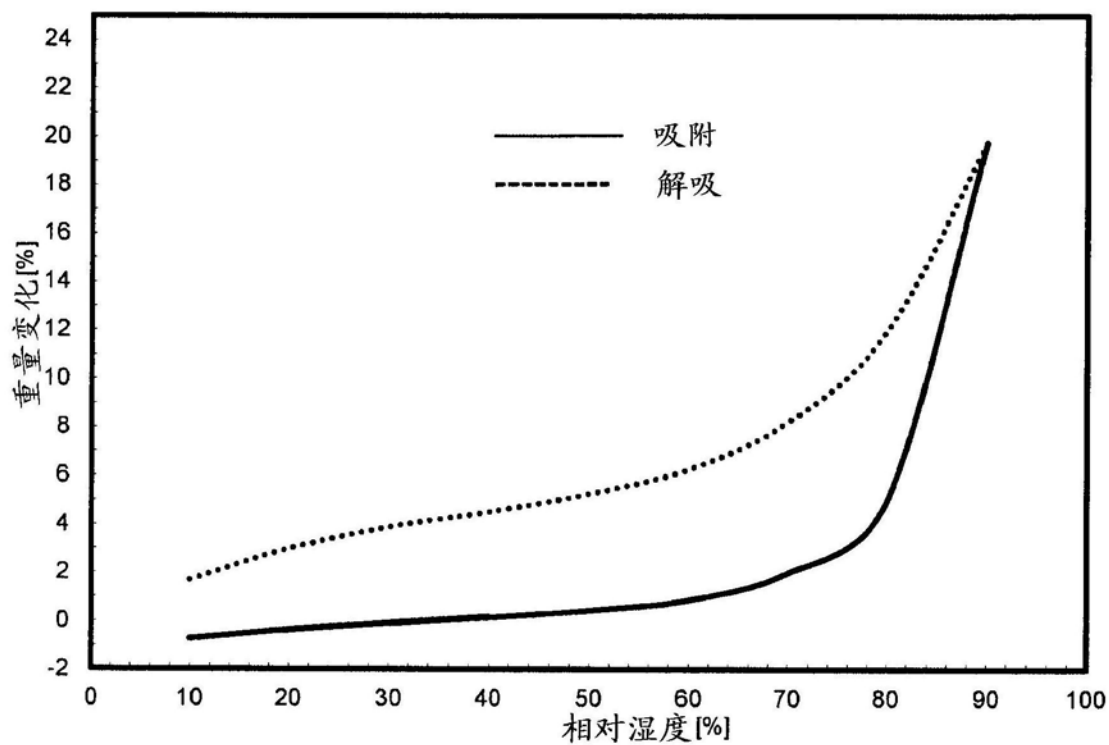


图7

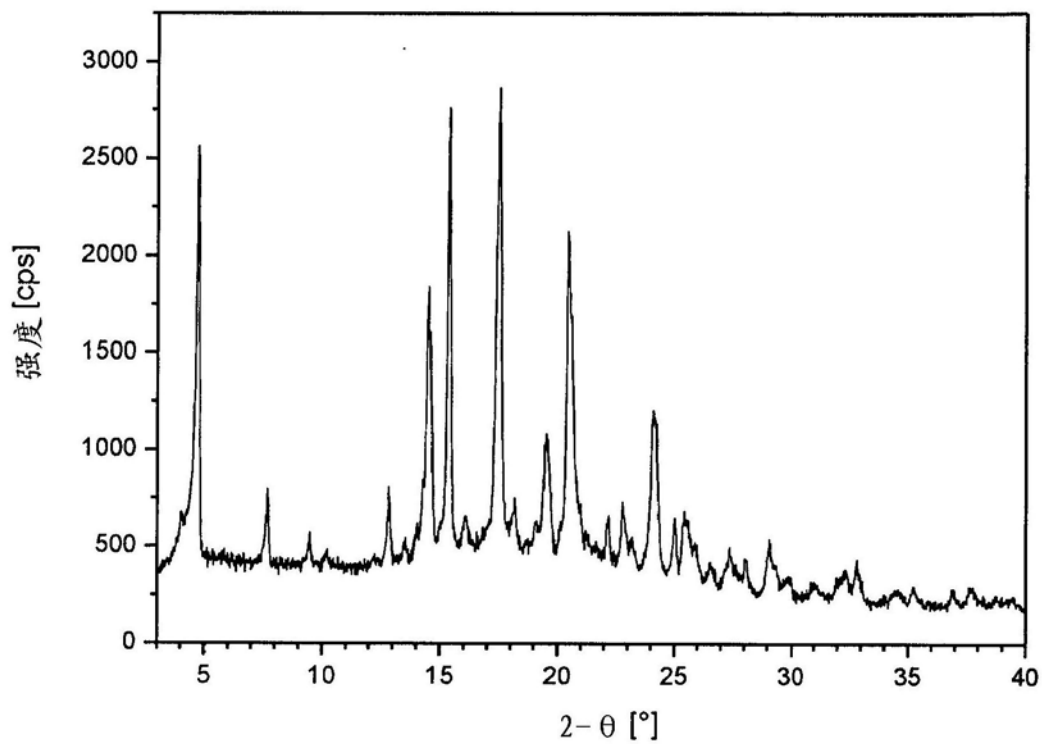


图8

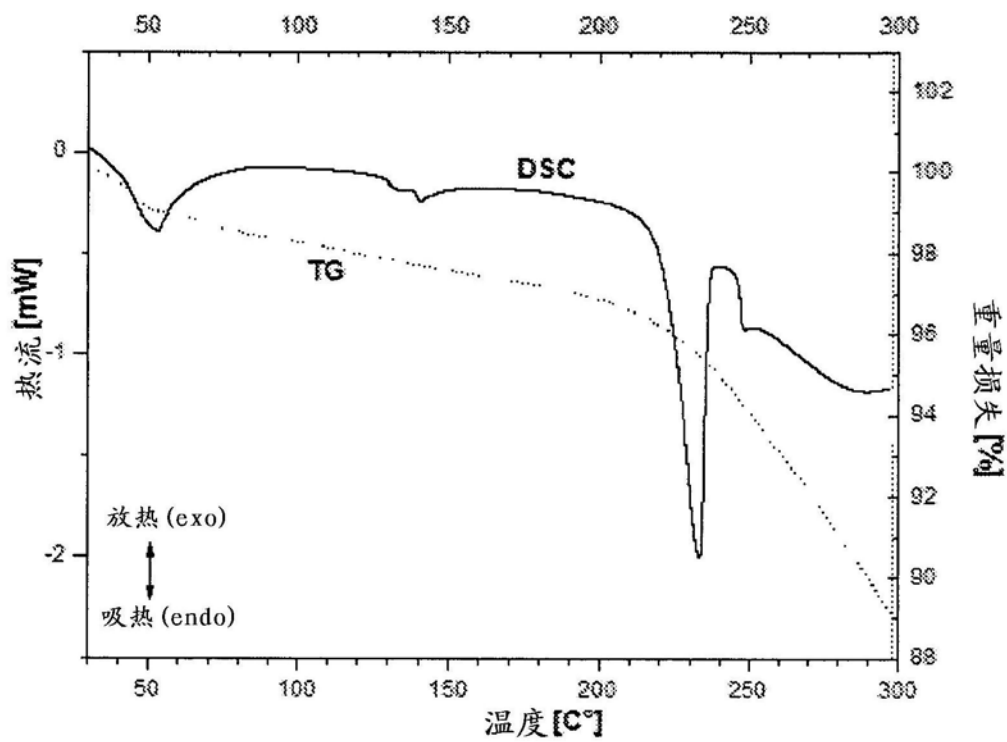


图9

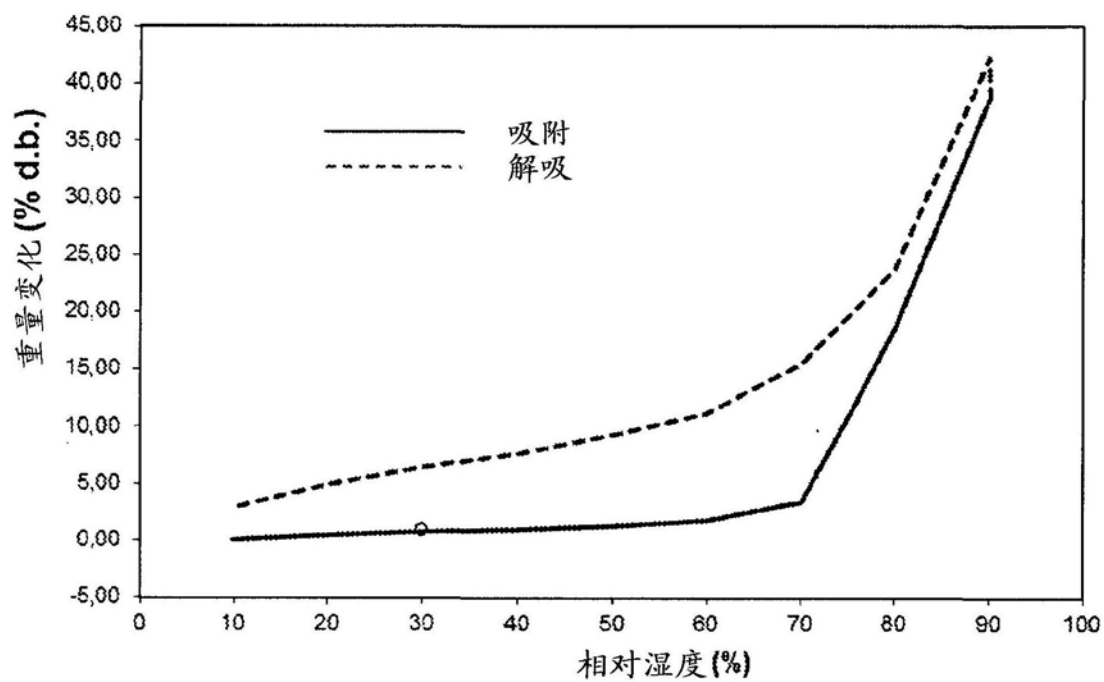


图10

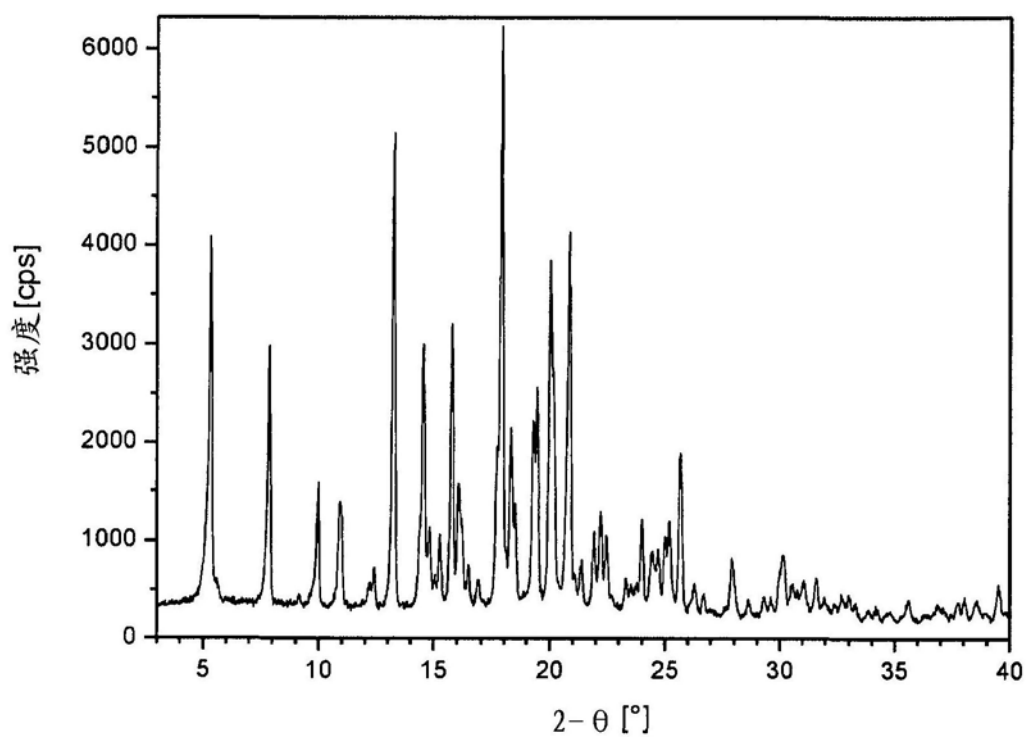


图11

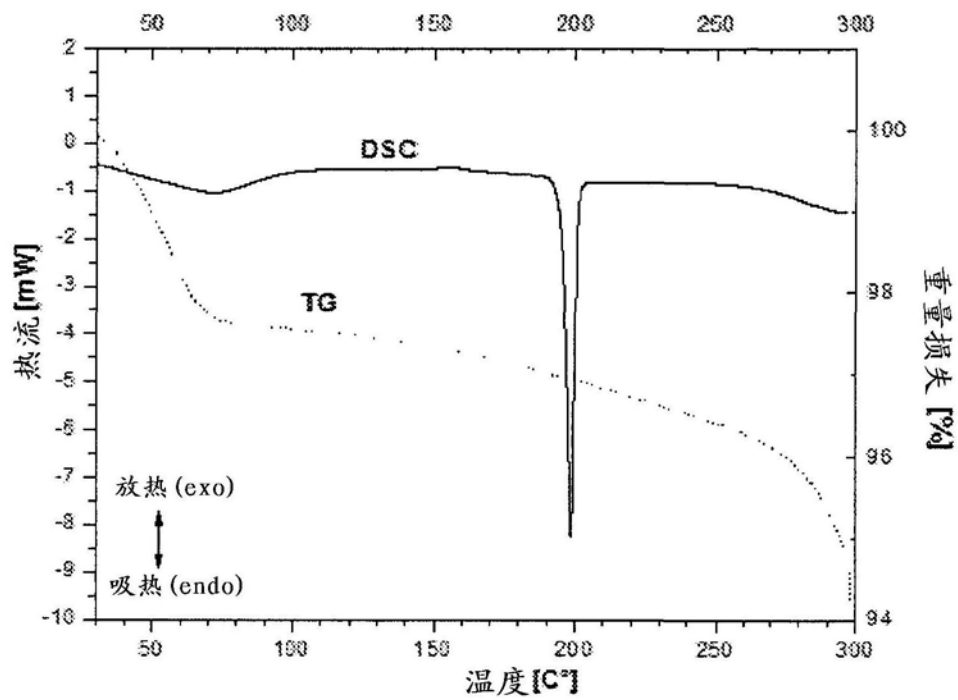


图12

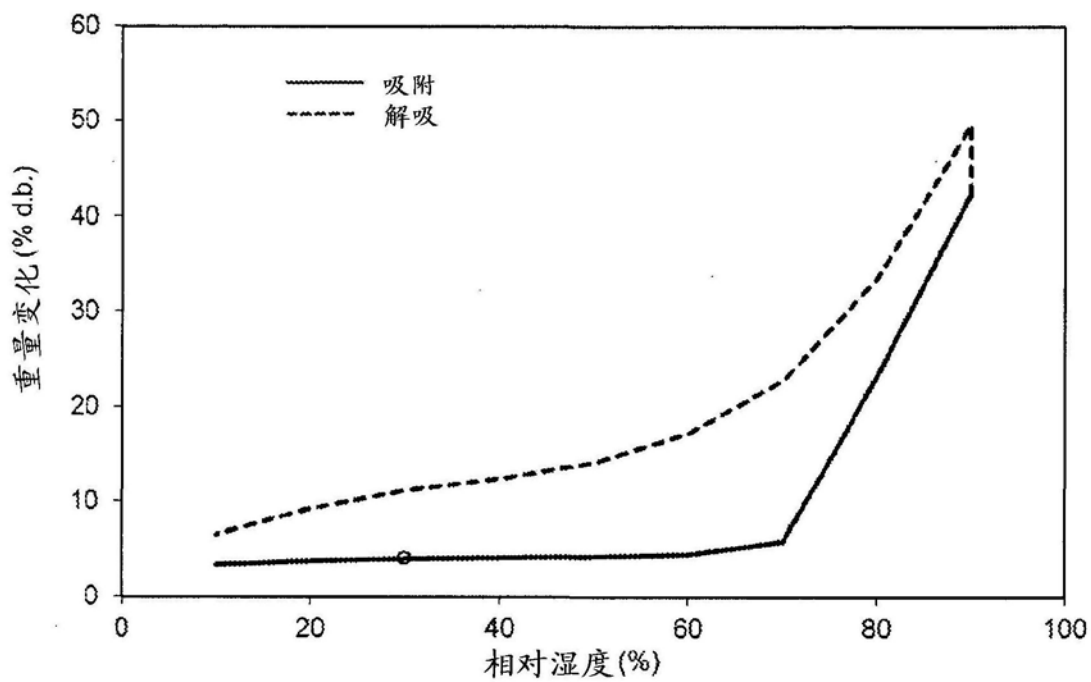


图13

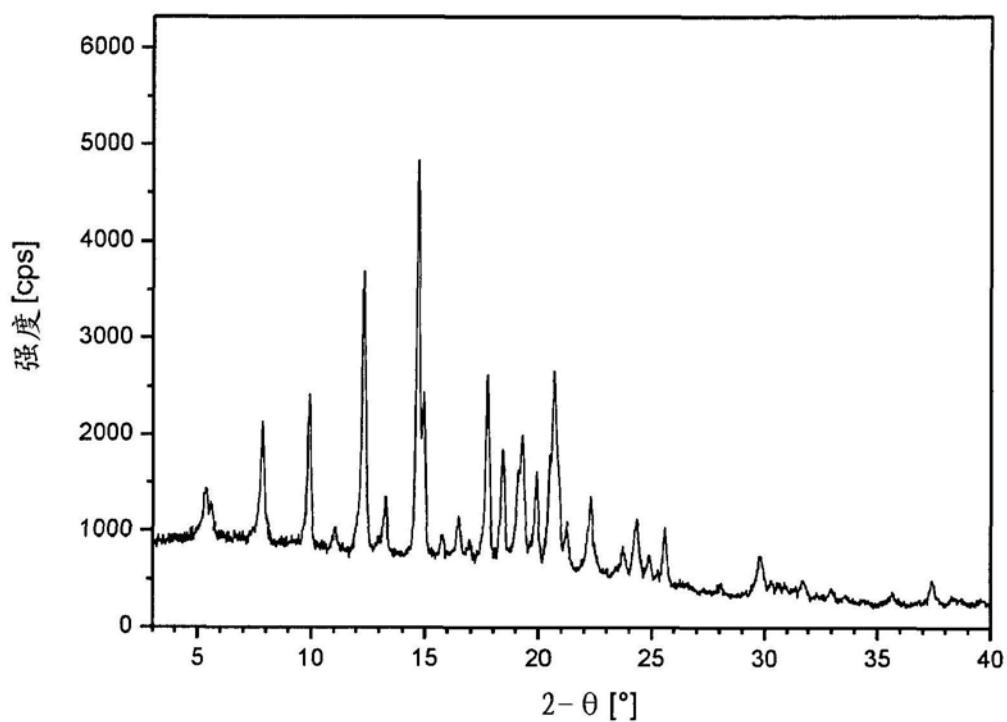


图14

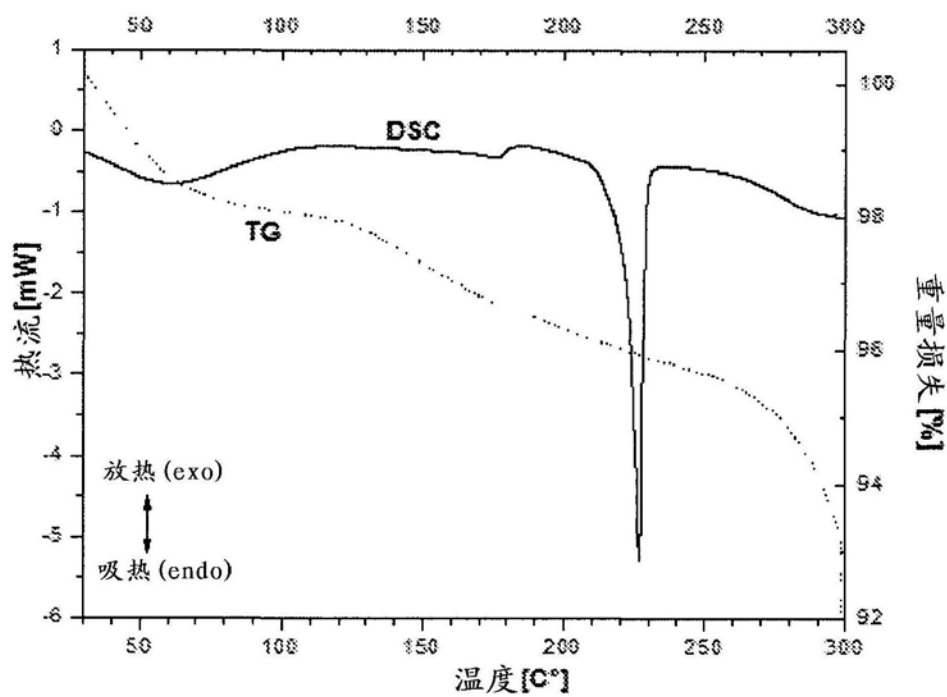


图15

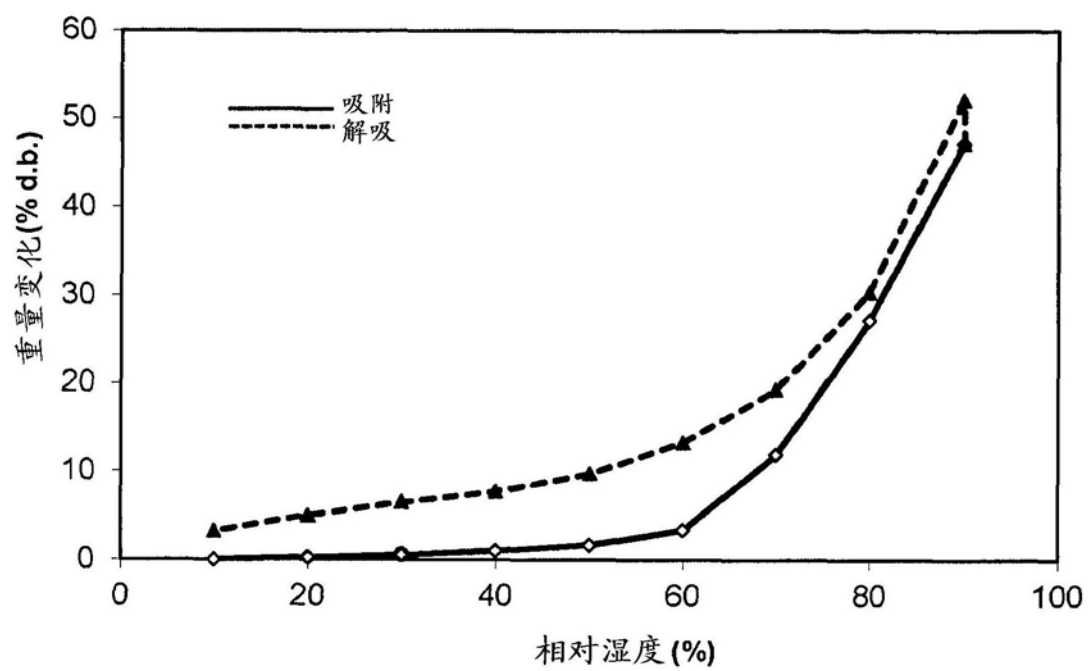


图16

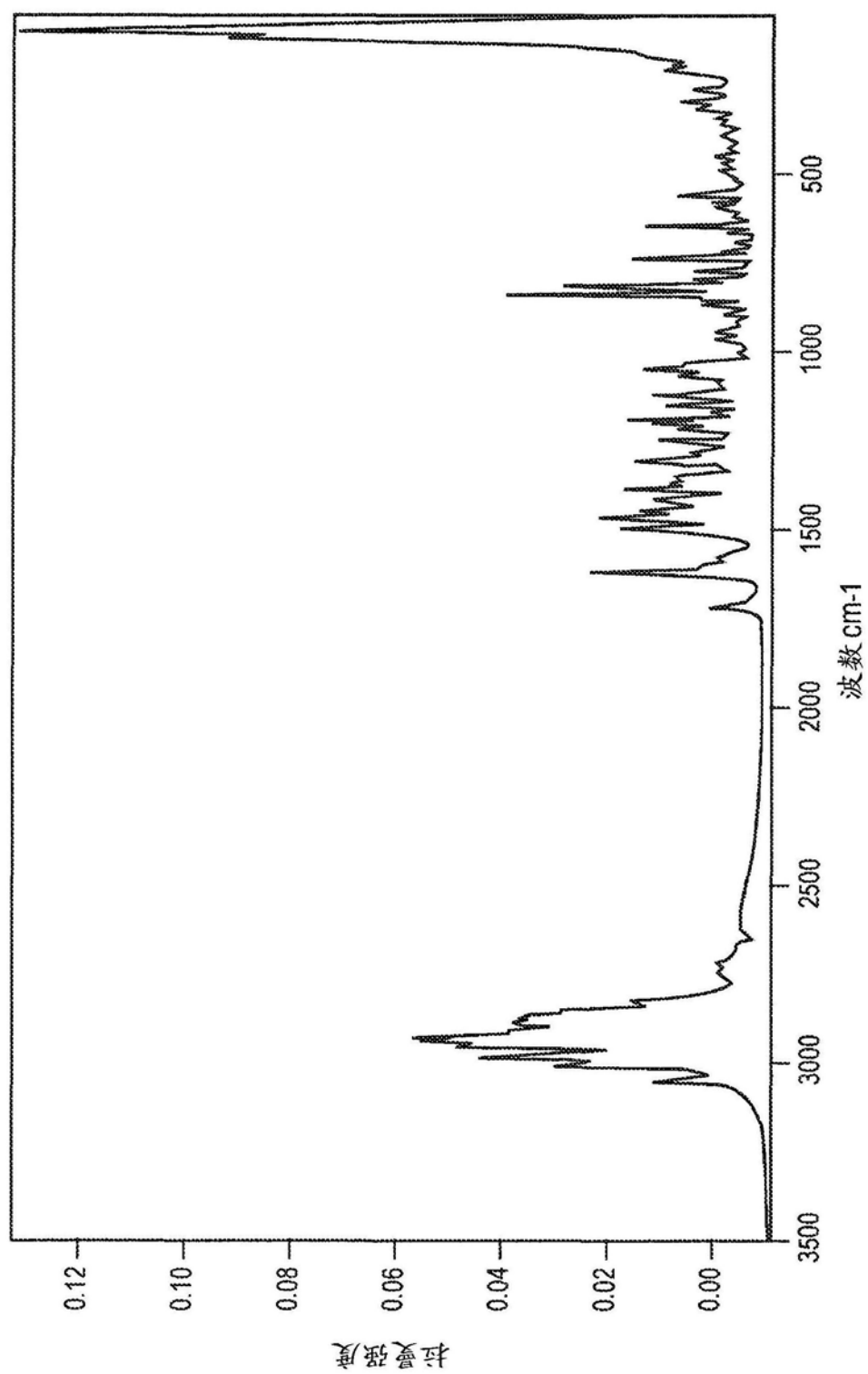


图17



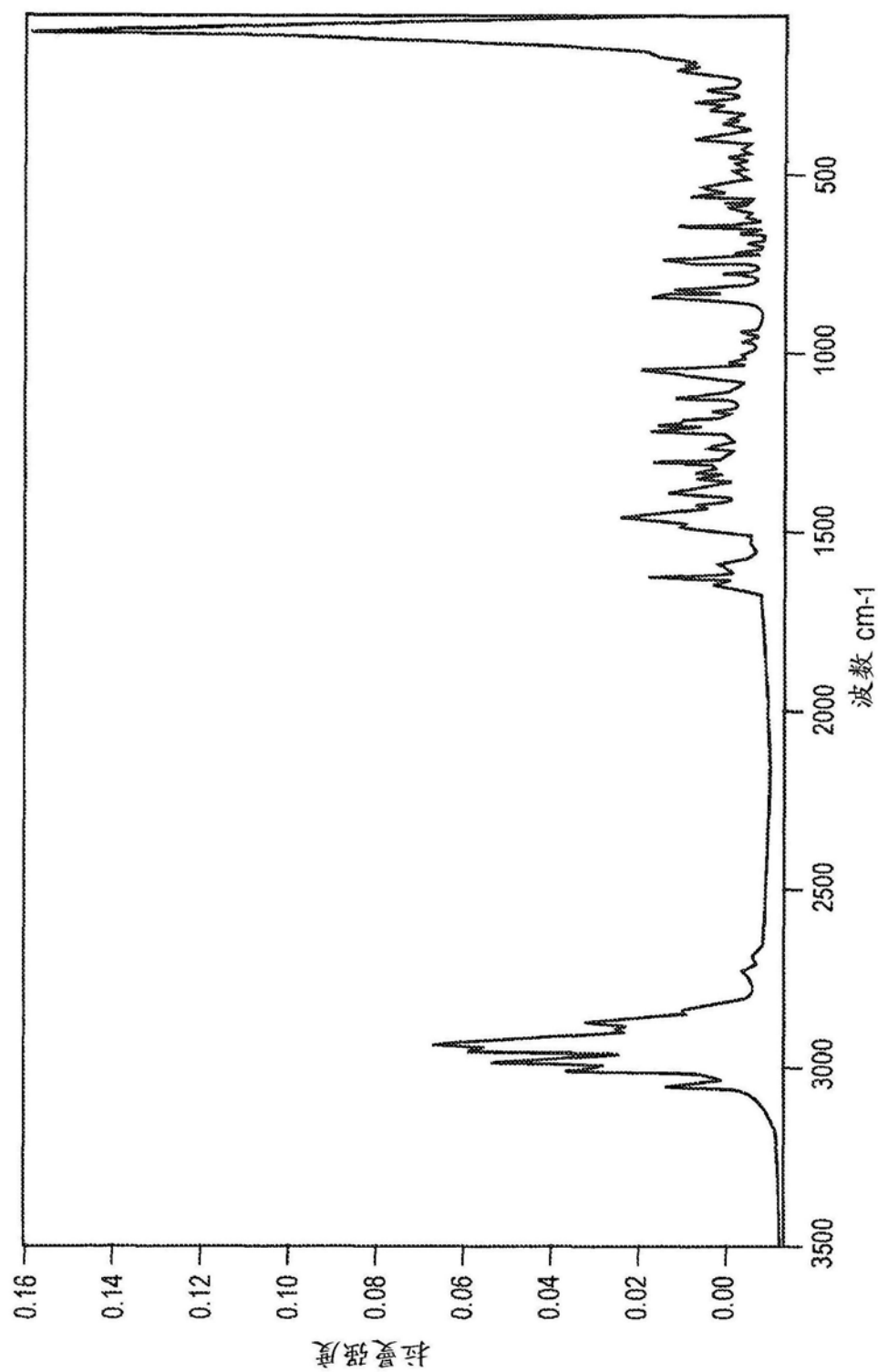


图18