(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2017 年 10 月 26 日 (26.10.2017)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2017/181924 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 401/04 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/080762

(22) 国际申请日: 2017 年 4 月 17 日 (17.04.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610248713.9 2016年4月20日 (20.04.2016) CN

(71) 申请人: 深圳市塔吉瑞生物医药有限公司 (SHENZHEN TARGETRX, INC.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区科苑路15号科兴科学园A1栋301, Guangdong 5180057 (CN)。

(72) 发明人: 王义汉 (WANG, Yihan); 中国广东省深圳市南山区科苑路15号科兴科学园A1栋301, Guangdong 518057 (CN)。 赵九洋 (ZHAO, Jiuyang); 中国广东省深圳市南山区科苑路15号科兴科学园A1栋301, Guangdong 518057 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

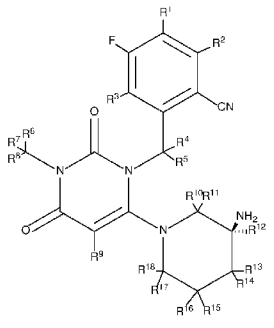
(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:
— 关于发明人身份(细则4.17(i))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** SUBSTITUTED PYRIMIDINEDIONE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION THEREOF

(54) 发明名称: 一种取代的嘧啶二酮化合物及其药物组合物



(I)

(57) **Abstract:** The present invention discloses a substituted pyrimidinedione and a pharmaceutical composition thereof. The substituted pyrimidinedione is a compound represented by formula (I), or a crystalline form, pharmaceutically acceptable salt, prodrug, tautomer, stereoisomer, isotopic isomer, hydrate, or solvate thereof. The compound disclosed by the invention has improved inhibition against a dipeptidyl peptidase, improved pharmacodynamics/pharmacokinetics, good compound usability, and high levels of safety. The compound can be used to prepare a drug for treating a disease related to the dipeptidyl peptidase.

(57) 摘要: 本发明提供了一种取代的嘧啶二酮化合物及其药物组合物，所述取代的嘧啶二酮化合物如为式（I）所示的化合物，或其晶型、药学上可接受的盐、前药、互变异构体、立体异构体、同位素变体、水合物或溶剂化合物。本发明的化合物具有更好的二肽基肽酶抑制活性，具有更好药效学/药代动力学性能，化合物的适用性好、安全性高，可用于制备治疗与二肽基肽酶相关的疾病。

WO 2017/181924 A1

一种取代的嘧啶二酮化合物及其药物组合物

技术领域

本发明属于医药技术领域，尤其涉及一种取代的嘧啶二酮化合物及其药物组合物，其可用于治疗二肽基肽酶介导的相关疾病。

背景技术

二肽基肽酶 IV（DPP-IV）是一种 II 型膜蛋白，作为一种非经典丝氨酸氨基二肽酶，它从多肽和蛋白质的氨基末端（N-末端）除去 Xaa-Pro 二肽。有些天然存在的肽也已报道有 X-Gly 或 X-Ser 型二肽的 DPP-IV 依赖性缓慢释放。

DPP-IV 在多种不同组织（肠、肝、肾和胎盘）的上皮与内皮细胞上被组成型表达，也见于体液中。DPP-IV 也在循环中的 T-淋巴细胞上被表达，已经显示与细胞-表面抗原 CD-26 是同义的。DPP-IV 负责体内某些内源性肽（GLP-1(7-36)，高血糖素）的代谢性裂解，并且已经证明有体外对抗多种其他肽（GHRH，NPY，GLP-2，VIP）的蛋白分解活性。

GLP-1（7-36）是一种 29 个氨基酸的肽，由前高血糖素在小肠中的翻译后加工衍生而来。GLP-1（7-36）具有多种体内作用，包括胰岛素分泌的刺激、高血糖素分泌的抑制、饱满感的促进和胃排空的延缓。基于它的生理学行为，相信 GLP-1（7-36）的作用有益于预防和治疗 II 型糖尿病，可能还有肥胖。例如，已经发现 GLP-1（7-36）在糖尿病患者中的外源性给药（连续输注）对这种患者群是有效的。不幸地，GLP-1(7-36) 体内迅速降解，已经显示 具有很短的体内半衰期（$t_{1/2}$）。

基于遗传培育 DPP-IV 剔除小鼠的研究和选择性 DPP-IV 抑制剂的体内 / 体外研究，已经显示 DPP-IV 是体内 GLP-1（7-36）的主要降解酶。GLP-1（7-36）被 DPP-IV 高效降解为 GLP-1（9-36），后者被推测充当 GLP-1(7-36)的生理拮抗剂。因此相信体内抑制 DPP-IV 可用于加强内源性 GLP-1(7-36)水平和减弱其拮抗剂 GLP-1(9-36)的生成。因而，相信 DPP-IV 抑制剂是可用于预防、延迟其进展和 / 或治疗由 DPP-IV 介导的病症的药物，具体的说是糖尿病，更具体的说是 II 型糖尿病、糖尿病性脂血异常、葡萄糖耐量减低 (IGT) 症、禁食血浆葡萄糖减低（IFG）症、代谢性酸中毒、酮症、食欲调节和肥胖。

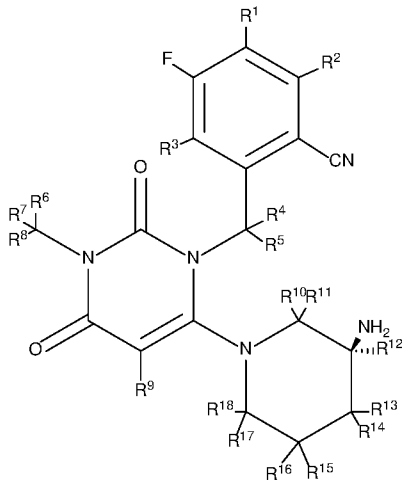
因此，本领域仍需要开发对二肽基肽酶有抑制活性或更好药效学性能的 DPP-IV 抑制剂。

发明内容

针对以上技术问题，本发明公开了一种二肽基肽酶抑制剂、药物组合物及其应用，其具有更好的二肽基肽酶抑制活性和/或具有更好药效学/药代动力学性能。

对此，本发明采用的技术方案为：

一种二肽基肽酶抑制剂，如式（I）所示取代的嘧啶二酮化合物，或其晶型、药学上可接受的盐、前药、互变异构体、立体异构体、同位素变体、水合物或溶剂化合物，



式（1）

其中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17}、R^{18} 各自独立地为氢、氘、卤素或三氟甲基；

附加条件是 R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17}、R^{18} 中至少一个是氘代的或氘。

采用此技术方案，氘在药物分子中的形状和体积与氢基本上相同，如果药物分子中氢被选择性替换为氘，氘代药物一般还会保留原来的生物活性和选择性。同时发明人经过实验证实，碳氘键的结合比碳氢键的结合更稳定，可直接影响一些药物的吸收、分布、代谢和排泄等属性，从而提高药物的疗效、安全性和耐受性。

优选的，氘在氘代位置的氘同位素含量至少是大于天然氘同位素含量（0.015%），较佳地大于 30%，更佳地大于 50%，更佳地大于 75%，更佳地大于 95%，更佳地大于 99%。

具体地说，在本发明中 R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17} 和 R^{18} 各氘代位置中氘同位素含量至少是 5%，较佳地大于 10%，

更佳地大于 15%，更佳地大于 20%，更佳地大于 25%，更佳地大于 30%，更佳地大于 35%，更佳地大于 40%，更佳地大于 45%，更佳地大于 50%，更佳地大于 55%，更佳地大于 60%，更佳地大于 65%，更佳地大于 70%，更佳地大于 75%，更佳地大于 80%，更佳地大于 85%，更佳地大于 90%，更佳地大于 95%，更佳地大于 99%。

优选的，式（I）中化合物的 R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17} 和 R^{18}，至少其中一个 R 含氘，更佳地两个 R 含氘，更佳地三个 R 含氘，更佳地四个 R 含氘，更佳地五个 R 含氘，更佳地六个 R 含氘，更佳地七个 R 含氘，更佳地八个 R 含氘，更佳地九个 R 含氘，更佳地十个 R 含氘，更佳地十一个 R 含氘，更佳地十二个 R 含氘，更佳地十三个 R 含氘，更佳地十四个 R 含氘，更佳地十五个 R 含氘，更佳地十六个 R 含氘，更佳地十七个 R 含氘，更佳地十八个 R 含氘。

作为本发明的进一步改进，R^1、R^2、和 R^3 各自独立地为氘或氢。

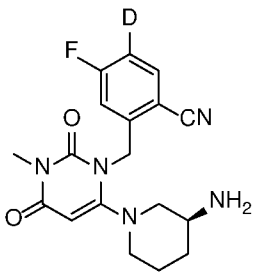
作为本发明的进一步改进，R^4 和 R^5 各自独立地为氘或氢。

作为本发明的进一步改进， R^6、R^7 和 R^8 各自独立地为氘或氢。

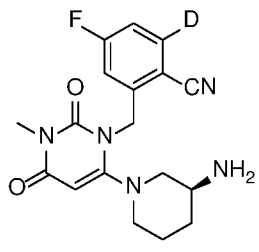
作为本发明的进一步改进，R^9 为氘。

作为本发明的进一步改进，R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17} 和 R^{18} 各自独立地为氘或氢。

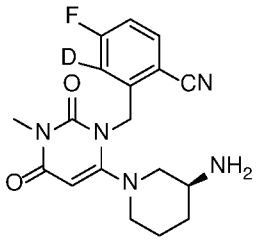
作为本发明的进一步改进，所述化合物可选自下述化合物或其药学上可接受的盐，但不局限于下列化合物：



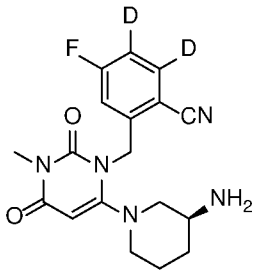
式（2）



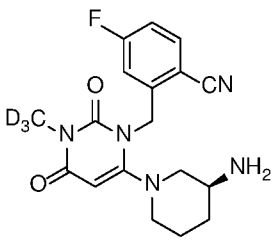
式（3）

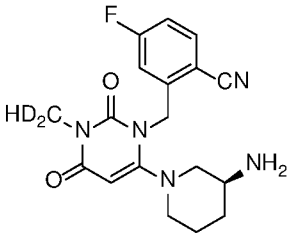


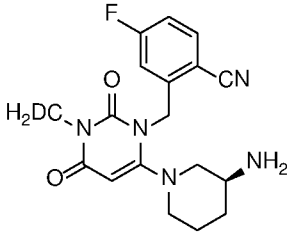
式（4）

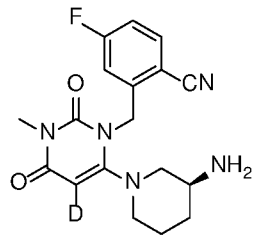


式（5）

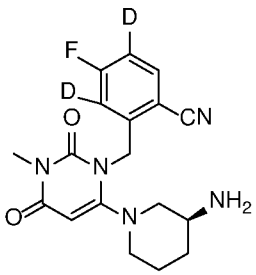




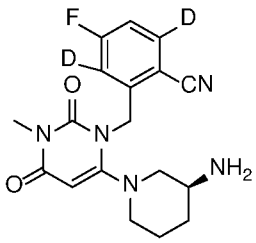




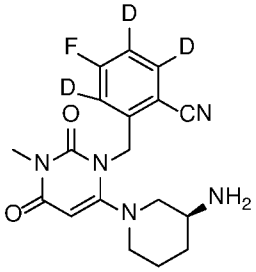
式（6）



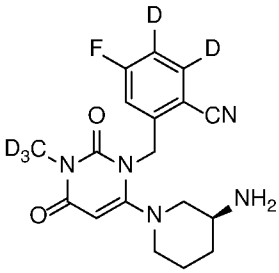
式（7）



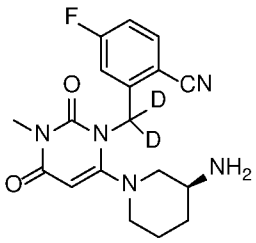
式（8）



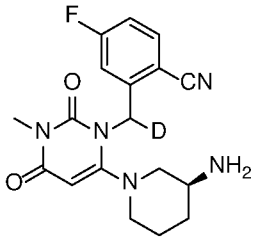
式（9）



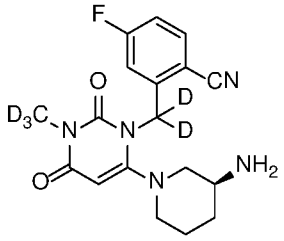
式（10）



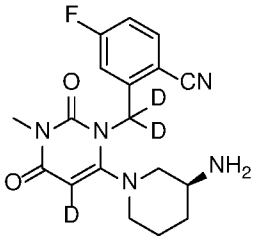
式（11）



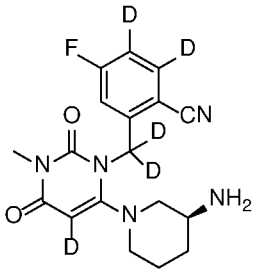
式（12）



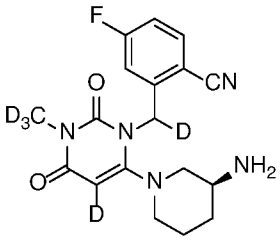
式（13）



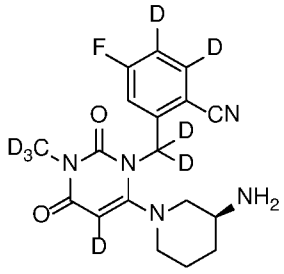
式（14）



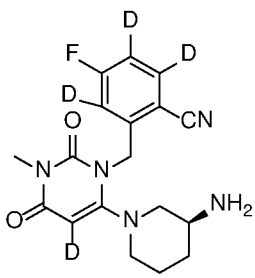
式（15）



式（16）



式（17）



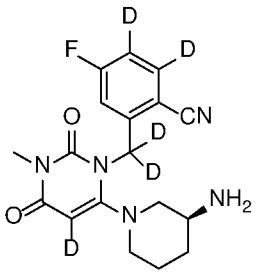
式（18）

式（19）

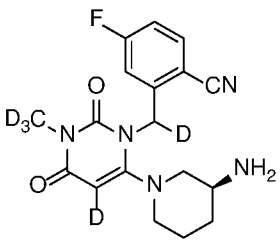
式（20）

式（21）

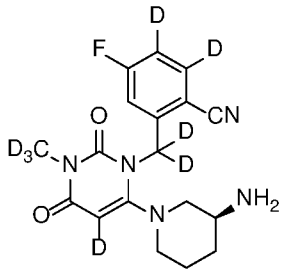
式（22）



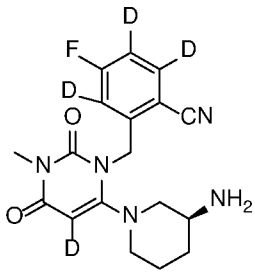
式（23）



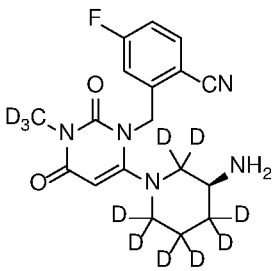
式（24）



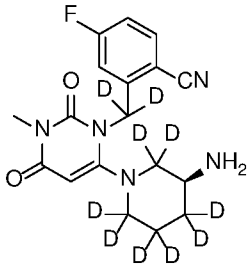
式（25）



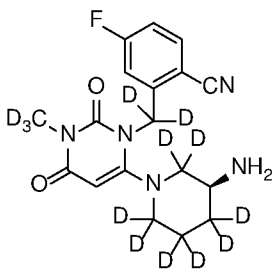
式（26）



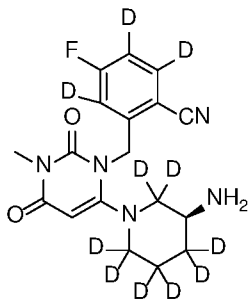
式（27）

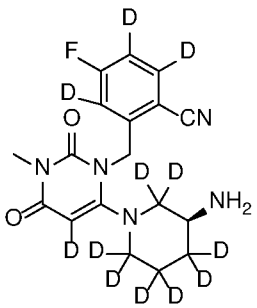


式（28）

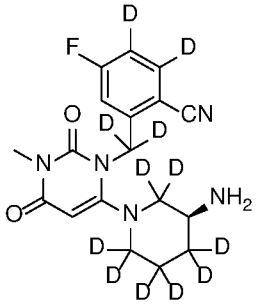


式（29）

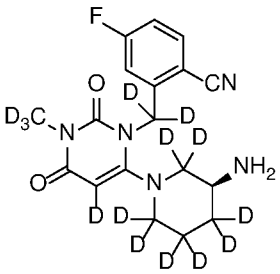




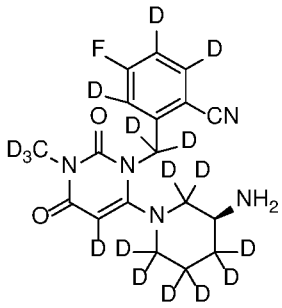
式（30）



式（31）



式（32）



式（33）

在另一优选例中，所述化合物不包括非氘代化合物。

本发明还公开了一种药物组合物，其含有药学上可接受的载体和如上所述的所述的二肽基肽酶抑制剂，或其晶型、药学上可接受的盐、水合物或溶剂合物、立体异构体、前药或同位素变体的药物组合物。

作为本发明的进一步改进，所述药学上可接受的载体包括助流剂、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、溶剂或乳化剂中的至少一种。

作为本发明的进一步改进，所述药物组合物为片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球或气溶胶。

给予本发明药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、透黏膜、经肠给药，或者局部、经皮、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。优选口服给药或注射给药。

本发明的药物组合物可以采用本领域周知的方法制造，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。

本发明还提供了一种制备药物组合物的方法，包括步骤：将药学上可接受的载体与如上所述的二肽基肽酶抑制剂，或其晶型、药学上可接受的盐、水合物或溶剂合物进行混合，形成药物组合物。

本发明化合物具有二肽基肽酶酶抑制活性，因此预期其适用作治疗罹患通过抑制二肽基肽酶或通过增加其肽底物含量而得以治疗的疾病或病症的患者的治疗剂。因此，本发明的一个方面涉及一种治疗罹患通过抑制二肽基肽酶而得以治疗的疾病或病症的患者的方法，其包含向患者投与治疗有效量的本发明化合物。本发明的另一方面涉及一种治疗心血管疾病的方法，其包含向患者投与治疗有效量的本发明化合物。本发明的另

一方面涉及一种治疗高血方面涉及一种抑制哺乳动物中的二肽基肽酶的方法，其包含向所述哺乳动物投与二肽基肽酶抑制量的本发明化合物。

本发明还公开了一种如上所述的取代的嘧啶二酮化合物作为二肽基肽酶抑制剂的用途，即本发明化合物可有利地适用作治疗如 II 型糖尿病的病状的治疗剂。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

本文中，如无特别说明，“卤素”指 F、Cl、Br、和 I。更佳地，卤原子选自 F、Cl 和 Br。

本文中，如无特别说明，“氘代”指化合物或基团中的一个或多个氢被氘所取代；氘代可以是一取代、二取代、多取代或全取代。术语“一个或多个氘代的”与“一次或多次氘代”可互换使用。

本文中，如无特别说明，“非氘代的化合物”是指含氘原子比例不高于天然氘同位素含量(0.015%) 的化合物。

本发明还包括同位素标记的化合物，等同于原始化合物在此公开。可以列为本发明的化合物同位素的例子包括氢，碳，氮，氧，磷， 硫，氟和氯同位素，分别如 ^{2}H，^{3}H，^{13}C，^{14}C，^{15}N，^{17}O，^{18}O， ^{18}F 以及 ^{36}Cl。本发明中的化合物，或对映体，非对映体，异构体，或药学上可接受的盐或溶剂化物，其中含有上述化合物的同位素或其他其他同位素原子都在本发明的范围之内。本发明中某些同位素标记化合物，例如 ^{3}H 和 ^{14}C 的放射性同位素也在其中，在药物和底物的组织分布实验中是有用的。氚，即 ^{3}H 和碳-14，即 ^{14}C，它们的制备和检测比较容易，是同位素中的首选。同位素标记的化合物可以用一般的方法，通过用易得的同位素标记试剂替换为非同位素的试剂，用示例中的方案可以制备。

药学上可接受的盐包括无机盐和有机盐。一类优选的盐是本发明化合物与酸形成的盐。适合形成盐的酸包括但并不限于：盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸；甲酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苦味酸、苯甲酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸、萘磺酸等有机酸；以及脯氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等氨基酸。另一类优选的盐是本发明化合物与碱形成的盐，例如碱金属盐(例如钠盐或钾盐)、碱土金属盐(例如

镁盐或钙盐)、铵盐(如低级的烷醇铵盐以及其它药学上可接受的胺盐)，例如甲胺盐、乙胺盐、丙胺盐、二甲基胺盐、三甲基胺盐、二乙基胺盐、三乙基胺盐、叔丁基胺盐、乙二胺盐、羟乙胺盐、二羟乙胺盐、三羟乙胺盐，以及分别由吗啉、哌嗪、赖氨酸形成的胺盐。

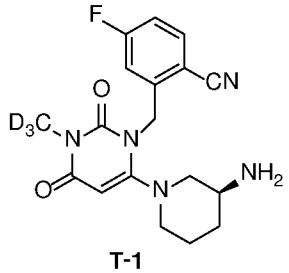
术语“溶剂合物”指本发明化合物与溶剂分子配位形成特定比例的配合物。“水合物”是指本发明化合物与水进行配位形成的配合物。

与现有技术相比，本发明的有益效果为：本发明的化合物对二肽基肽酶具有优异的抑制性；通过氘化这一技术改变化合物在生物体中的代谢，使化合物具有更好的药代动力学参数特性。在这种情况下，可以改变剂量并形成长效制剂，改善适用性；用氘取代化合物中的氢原子，由于其氘同位素效应，提高化合物在动物体内的药物浓度，提高了药物疗效；用氘取代化合物中的氢原子，可以抑制某些代谢产物，提高了化合物的安全性。

具体实施方式

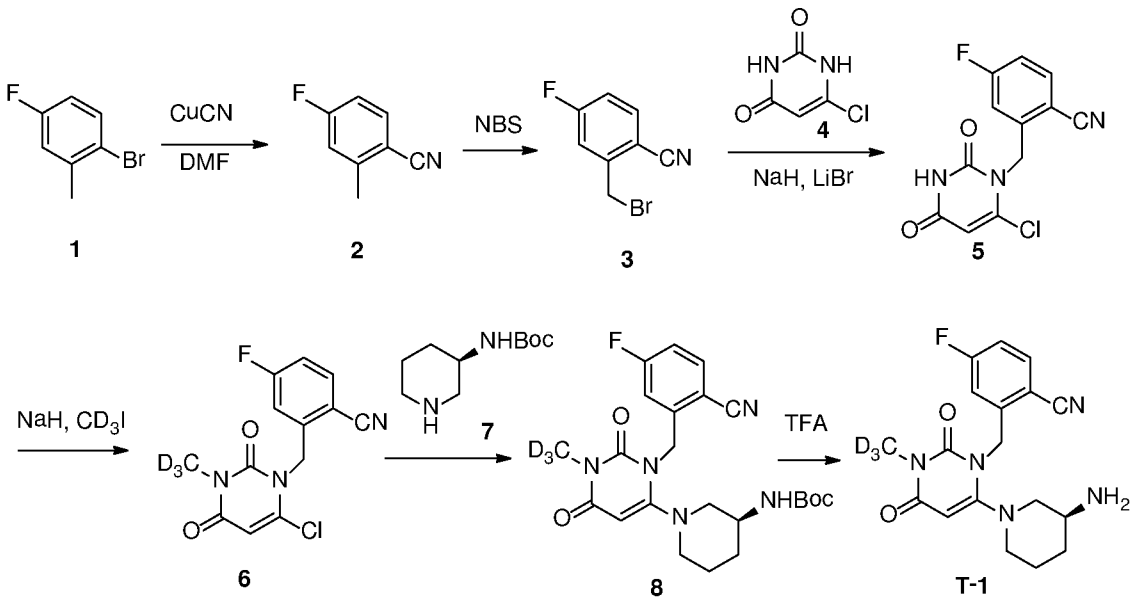
下面更具体地描述本发明式（I）结构化合物的制备方法，但这些具体方法不对本发明构成任何限制。本发明化合物还可以任选将在本说明书中描述的或本领域已知的各种合成方法组合起来而方便地制得，这样的组合可由本发明所属领域的技术人员容易地进行。

实施例 1 制备 2-{(6-[(3R)-3-氨基哌啶-1-基]-3-d3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二嘧啶-1(2H)-基)甲基}-4-氟苯腈（化合物 T-1 ）



T-1

具体合成步骤如下：



步骤一：4-氟-2-甲基苯腈（化合物 2）的合成。

向反应瓶中加入化合物 1（3.5 g，18.5 mmol），氰化亚铜（2 g，22 mmol），加入 DMF 100 mL，升温至 140℃，搅拌反应 24 小时，TLC 检测原料反应完全，加入水 60 mL 淬灭反应，用甲基叔丁基醚萃取三次，合并有机相，用饱和氯化钠洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩，柱层析纯化后得到 1.16 g 化合物 2，收率 46.4%，^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.62-7.59 (m, 1H), 7.04-7.02 (m, 1H), 7.00-6.96 (m,1H)。

步骤二：2-溴甲基-4-氟苯腈（化合物 3）的合成。

向反应瓶中加入化合物 2（100 mg，0.74 mmol），N-溴代丁二酰亚胺(NBS，131 g，0.74 mmol)，偶氮二异丁腈（AIBN，5 mg，0.029 mmol），加入四氯化碳 5 mL，回流反应 3 小时，TLC 检测原料反应完全，冷却至室温，过滤除去固体杂质，浓缩滤液得到 260 mg 黄色固体化合物 3，直接用于下一步反应。

步骤三：2-{(2,4-二氧代-3,4-二嘧啶-1(2H)-基)甲基}-4-氟苯腈（化合物 5）的合成。

氮气保护下向反应瓶中加入化合物 4（600 mg，4.08 mmol）加入 DMF：DMSO = 6:1 20 mL，降温至 0℃，加入钠氢（165 mg，4.08 mmol），搅拌 0.5 小时，加入溴化锂（240 mg，0.276 mmol），搅拌 0.5 小时，向反应液中加入化合物 3（750 mg，4.08 mmol）的 DMF 溶液 3 mL，0℃下反应 1 小时后，室温搅拌过夜，TLC 检测原料反应完全，加入水淬灭，用乙酸乙酯取三次，合并有机相，用饱和氯化钠洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩，柱层析纯化后得到 120 mg 化合物 5，收率 12.2%。

步骤四：2-{(3-d3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二嘧啶-1(2H)-基)甲基}-4-氟苯腈（化合物 6）

的合成。

向反应瓶中加入化合物 5（120 mg，0.429 mmol），加入 DFM: THF = 1: 1 （7 mL），降温至 0℃，加入钠氢（18 mg，0.45 mmol），加入溴化锂（22 mg，0.253 mmol），室温搅拌 20 分钟，加入 d3-碘甲烷（120 mg，0.83 mmol），室温搅拌反应 2 小时，35℃反应过夜，TLC 检测原料反应完全，加入水淬灭，用乙酸乙酯取三次，合并有机相，用饱和氯化钠洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩，柱层析纯化后得到 170 mg 化合物 6，收率 ~100%，LC-MS(APCI): m/z = 297$(M+1)^+$。

步骤五： 2-{(6-[(3R)-3-叔丁氧羰基氨基哌啶-1-基]- 3-d3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二嘧啶-1(2H)-基)甲基}-4-氟苯腈（化合物 8）的合成。

向反应瓶中加入化合物 6（170 mg，0.572 mmol），化合物 7（275 mg，1.38mmol），碳酸氢钠（134 mg，1.6 mmol）加入乙醇 16 mL，升温至 100℃， 反应 2 小时，TLC 检测 TLC 检测原料反应完全，浓缩除去乙醇，加入水和乙酸乙酯，用乙酸乙酯萃取三次，合并有机相，用饱和氯化钠洗涤，用无水硫酸钠干燥，浓缩，柱层析纯化后得到 160 mg 化合物 8，收率 60.8%。

步骤六：2-{(6-[(3R)-3-氨基哌啶-1-基]- 3-d3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二嘧啶-1(2H)-基}甲基)-4-氟苯腈（化合物 T-1）的合成。

向反应瓶中加入化合物 8（160 mg，0.347mmol），加入 5 mL 乙醇溶解，向反应瓶中加入盐酸二氧六环 5 mL，室温反应 5 小时，TLC 检测原料反应完全，柱层析纯化后得到 62 mg 化合物 10，收率 49.6%，LC-MS(APCI): m/z = 361$(M+1)^+$，^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.97-7.94 (m, 1H), 7.73-7.33 (m, 1H), 7.19-7.16 (m,1H), 5.32 (s, 1H), 5.17 (s,2H), 3.32 (s, 2H), 2.99(d, 2H), 2.90 (d, 2H), 2.69 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.33(m, 1H), 1.77-1.75(m,1H), 1.67-1.64 (m, 1H)。

化合物生物活性测试

借助本领域普通技术人员已知的方法可以容易地测定 DPP-IV 抑制剂的蛋白酶抑制活性，因为适合于测量蛋白酶活性和供试化合物的抑制作用的体外测定法是已知的。可以用于测量蛋白酶抑制活性和选择性的测定法实例如下所述。

1. 蛋白酶抑制活性测试

（1）DPP-IV 测定法

在二甲基亚砜中制备不同浓度（最终浓度≤10mM）的供试化合物溶液， 然后稀释

在测定缓冲液中，其中包含：20mM Tris，pH 7.4、20mM KCl 和 0.1mg/mL BSA。 向稀释液加入人 DPP-IV（最终浓度 0.1nM），在环境温度下预温育 10 分钟，然后用 A-P-7-羧酰氨基-4-三氟甲基香豆素（AP-AFC；最终浓度 10μM）引发反应。反应混合物的总体积为 10-100μL，这依赖于所使用的测定格式（384 或 96 孔平板）。动态监测反应（激发 λ=400nm；发射 λ=505nm）达 5-10 分钟，或者 10 分钟后测量终点。利用标准数学模型，从酶过程曲线计算抑制常数。

（2）FAPα 测定法

在二甲基亚砜中制备不同浓度（最终浓度≤10mM）的供试化合物溶液，然后稀释在测定缓冲液中，其中包含：20mM Tris， pH 7.4；20mM KCl 和 0.1mg/mL BSA。向稀释液加入人 FAPα（最终浓度 2nM），在环境温度下预温育 10 分钟，然后用 A-P-7-羧酰氨基-4-三氟甲基香豆素（AP-AFC；最终浓度 40μM）引发反应。反应混合物的总体积为 10-100μL，这依赖于所使用的测定格式（384 或 96 孔平板）。动态监测反应（激发 λ=400nm；发射 λ=505nm）达 5-10 分钟，或者 10 分钟后测量终点。利用标准数学模型，从酶过程曲线计算抑制常数。

（3）PREP 测定法

在二甲基亚砜中制备不同浓度（最终浓度≤10mM）的供试化合物溶液，然后稀释在测定缓冲液中，其中包含：20mM 磷酸钠， pH7.4、0.5mM EDTA、0.5mM DTT 和 0.1mg/ mL BSA。 向稀释液加入 PREP（EC 3.4.21.26，来自脑膜脓毒性金黄杆菌，最终浓度 0.2nM）。将 PRE 和化合物在环境温度下预温育 10 分钟，然后用 Z-G-P-AMC（最终浓度 10μM）引发反应。反应混合物的总体积为 10-100μL，这依赖于所使用的测定格式（384 或 96 孔平板）。 动态监测反应（激发 λ=375 发射 λ=460 达 5-10 分钟，或者 10 分钟后测量终点。用标准数学模型，从酶过程曲线计算抑制常数。

（4）类胰蛋白酶测定法

在二甲基亚砜中制备不同浓度（最终浓度≤10mM）的供试化合物溶液，然后稀释在测定缓冲液中，其中包含：100mM Hepes，pH7.4、0.01％ Brij35 和 10％甘油。向稀释液加入类胰蛋白酶 (rhLung β，最终浓度 0.1nM)，与化合物在环境温度下预温育 10 分钟。用 25μMZ-lys-SBzl 和 400μM DTNB 引发酶反应。反应混合物的总体积为 100μL，在 Costar A/296 孔平板中进行。比色监测反应（λ=405nm）达 10 分钟。用标准数学模型，从酶过程曲线计算抑制常数。

按照上述测定法测试本发明化合物的蛋白酶抑制作用，观察到表现出选择性DPP-IV 抑制活性。本发明化合物对 DPP-IV 的表观抑制常数(Ki)在约 10^{-9}M 至约 10^{-5}M 的范围内。

2. 代谢稳定性评价

微粒体实验：人肝微粒体：0.5mg/mL，Xenotech；大鼠肝微粒体：0.5mg/mL，Xenotech；辅酶(NADPH/NADH)：1mM，Sigma Life Science；氯化镁：5mM，100 mM 磷酸盐缓冲剂（pH 为 7.4）。

储备液的配制：精密称取一定量的实施例 1 的粉末，并用 DMSO 分别溶解至 5mM。

磷酸盐缓冲液（100mM，pH7.4）的配制：取预先配好的 0.5M 磷酸二氢钾 150 mL 和 700mL 的 0.5M 磷酸氢二钾溶液混合，再用 0.5M 磷酸氢二钾溶液调节混合液 pH 值至 7.4，使用前用超纯水稀释 5 倍，加入氯化镁，得到磷酸盐缓冲液（100 mM），其中含 100 mM 磷酸钾，3.3 mM 氯化镁，pH 为 7.4。

配制 NADPH 再生系统溶液（含有 6.5mM NADP，16.5mM G-6-P，3U/mL G-6-P D，3.3mM 氯化镁），使用前置于湿冰上。

配制终止液：含有 50ng/mL 盐酸普萘洛尔和 200ng/mL 甲苯磺丁脲（内标）的乙腈溶液。取 25057.5 μL 磷酸盐缓冲液(pH7.4)至 50 mL 离心管中，分别加入 812.5 μL 人肝微粒体，混匀，得到蛋白浓度为 0.625 mg/mL 的肝微粒体稀释液。取 25057.5 μL 磷酸盐缓冲液(pH7.4)至 50 mL 离心管中，分别加入 812.5 μL SD 大鼠肝微粒体，混匀，得到蛋白浓度为 0.625 mg/mL 的肝微粒体稀释液。

样品的孵育：用含 70%乙腈的水溶液将相应化合物的储备液分别稀释至 0.25 mM，作为工作液，备用。分别取 398 μL 的人肝微粒体或者大鼠肝微粒体稀释液加入 96 孔孵育板中（N=2），分别加入 2 μL 0.25 mM 的的工作液中，混匀。

代谢稳定性的测定：在 96 孔深孔板的每孔中加入 300 μL 预冷的终止液，并置于冰上，作为终止板。将 96 孔孵育板和 NADPH 再生系统置于 37℃水浴箱中，100 转/分钟震荡，预孵 5 min。从孵育板每孔取出 80 μL 孵育液加入终止板，混匀，补充 20 μL NADPH 再生系统溶液，作为 0 min 样品。再向孵育板每孔加入 80 μL 的 NADPH 再生系统溶液，启动反应，开始计时。相应化合物的反应浓度为 1 μM，蛋白浓度为 0.5 mg/mL。分别于反应 10、30、90 min 时，各取 100 μL 反应液，加入终止板中，涡旋 3 min 终止反应。将终止板于 5000×g ，4 ℃条件下离心 10 min。取 100 μL 上清液至预先加入 100 μL 蒸

馏水的 96 孔板中，混匀，采用 LC-MS/MS 进行样品分析。

数据分析：通过 LC-MS/MS 系统检测相应化合物及内标的峰面积，计算化合物与内标峰面积比值。通过化合物剩余量的百分率的自然对数与时间作图测得斜率，并根据以下公式计算 $t_{1/2}$ 和 CL_{int}，其中 V/M 即等于 1/蛋白浓度。

$$t_{1/2} = -\frac{0.693}{\text{峰面积}}, \quad CL_{int} = \frac{0.693}{t_{1/2}} \bullet \frac{V}{M}$$

对实施例 1 的化合物按照上述步骤进行分析，结果如表 2 所示。

表 1 实施例 1 的化合物代谢稳定性的测定结果表

编号	人肝微粒体实验		大鼠肝微粒体实验	
	$t_{1/2}$(min)	CL_{int}（μL/min/mg）	$t_{1/2}$(min)	CL_{int}（μL/min/mg）
实施例 1	>1000	<10	>100	<10

如表 1 所示，本发明化合物在人肝微粒体与大鼠肝微粒体实验中都表现出优异的代谢稳定性。

3. 大鼠药代动力学实验

实验目的 ：研究大鼠给予 Trelagliptin、实施例化合物后，考察本发明化合物的药代动力学行为。

实验动物 ：

种类及品系 ：SD 大鼠等级 ：SPF 级

性别及数量 ：雄性，6 只

体重范围 ：180 ～ 220g(实际体重范围为 187 ～ 197g)

来源 ：上海西普尔必凯实验动物有限公司

实验及动物合格证号 ：SCXK(沪)2013-0016

实验过程 ：

在血样采集之前，预先在 EDTA-K2 抗凝管中加入 20 L 的 2M 氟化钠溶液 (酯酶抑制剂)，于 80 度烘箱内烘干后，置于 4 度冰箱存放。

大鼠，雄性，体重 187 ～ 197 g，随机分为 2 组，于实验前一天下午开始禁食过夜但可自由饮水，给药后 4 h 给食物。 A 组给予 Trelagliptin 3mg/kg，B 组给予实施例化合物 3mg/kg，分别于给药后 15 min、30 min、1、2、3、5、8、10 h 从大鼠眼眶

静脉取血 100-200 L 左右，置于经 EDTA-K2 抗凝的 0.5 mL 的 Eppendorf 管中，立即混匀，抗凝后，尽快将试管轻轻颠倒混匀 5-6 次后, 血取好后放置在冰盒中，30 min 内把血样本在 4000 rpm，10 min，4 ℃条件下离心分离血浆，收集全部血浆后立即于 -20 ℃保存。所有时间点样品采集后测定每个时间点的血浆中的血药浓度。

根据上述所得的给药后平均血药浓度 - 时间数据，采用 Winnonin 软件，按非房室统计矩理论求算雄性 SD 大鼠分别 i.g 给予 Trelagliptin (3mg/kg)、实施例化合物 (3mg/kg) 后的药代动力学相关参数。

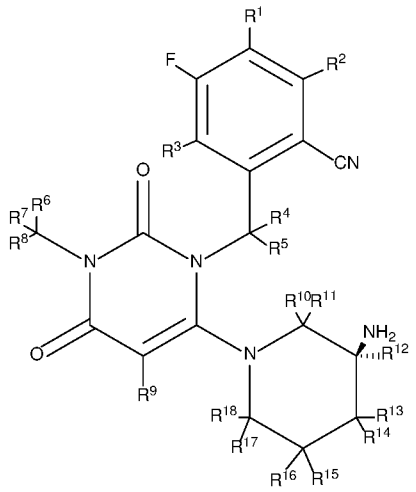
实验表明，与 Trelagliptin 相比，本发明化合物具有比 Trelagliptin 更优的活性，并且具有优异的药代动力学性质，因此更适合作为抑制二肽基肽酶的化合物，进而适合制备治疗 II 型糖尿病的药物。

应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围，实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则份数和百分比为重量份和重量百分比。

以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种二肽基肽酶抑制剂，其特征在于：如式（I）所示的嘧啶二酮化合物，或其晶型、药学上可接受的盐、前药、互变异构体、立体异构体、同位素变体、水合物或溶剂化合物，



式（1）

其中，R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17}、R^{18} 各自独立地为氢、氘、卤素或三氟甲基；

附加条件是 R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17}、R^{18} 中至少一个是氘代的或氘。

2. 根据权利要求 1 所述的二肽基肽酶抑制剂，其特征在于：R^1、R^2 和 R^3 各自独立地为氘或氢。

3. 根据权利要求 1 所述的二肽基肽酶抑制剂，其特征在于：R^4 和 R^5 各自独立地为氘或氢。

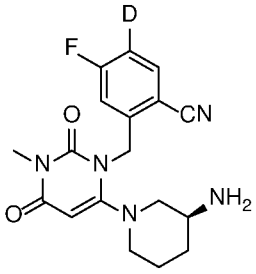
4. 根据权利要求 1 所述的二肽基肽酶抑制剂，其特征在于： R^6、R^7 和 R^8 各自独立地为氘或氢。

5. 根据权利要求 1 所述的二肽基肽酶抑制剂，其特征在于：R^9 为氘。

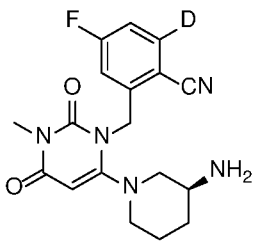
6. 根据权利要求 1 所述的二肽基肽酶抑制剂，其特征在于：R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、R^{14}、R^{15}、R^{16}、R^{17} 和 R^{18} 各自独立地为氘或氢。

7. 根据权利要求 1 所述的二肽基肽酶抑制剂，其特征在于：所述化合物可选自下述化

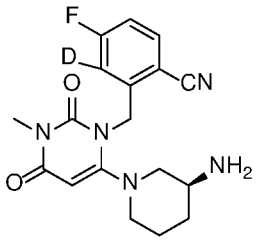
合物或其药学上可接受的盐：



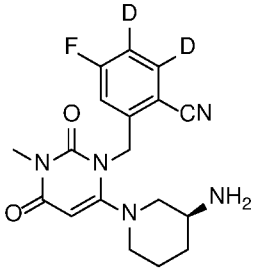
式（2）



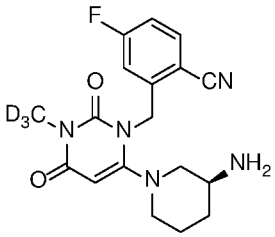
式（3）



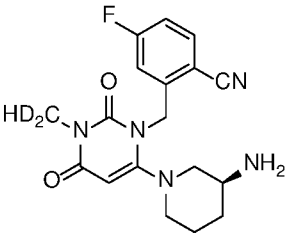
式（4）



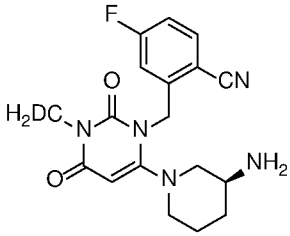
式（5）



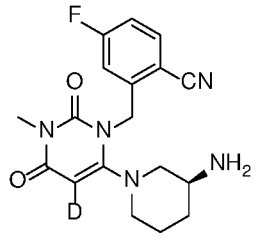
式（6）



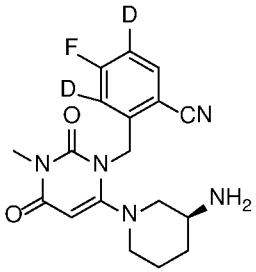
式（7）



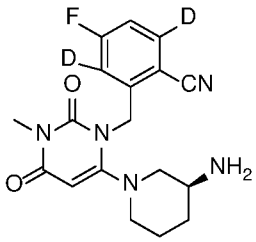
式（8）



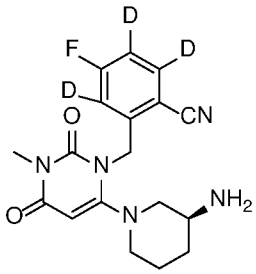
式（9）



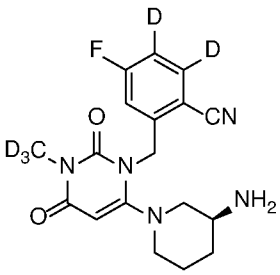
式（10）



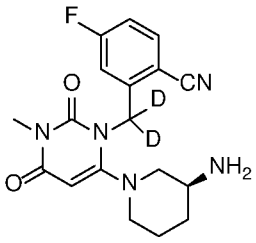
式（11）



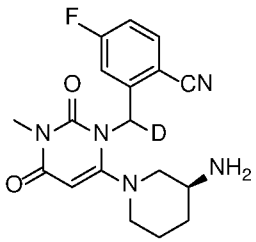
式（12）



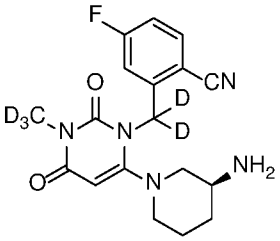
式（13）



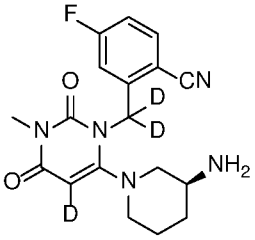
式（14）



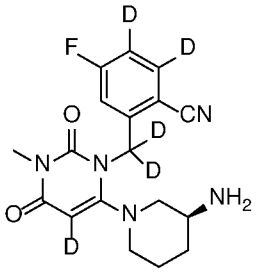
式（15）



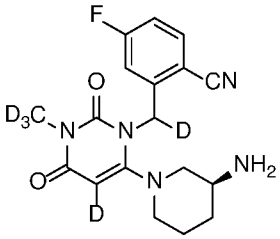
式（16）



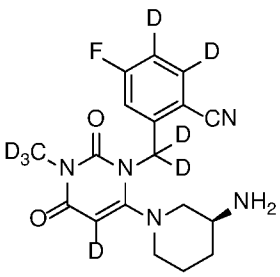
式（17）



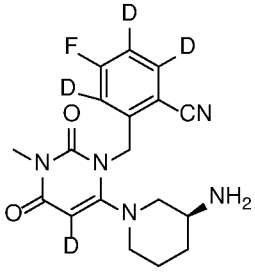
式（18）



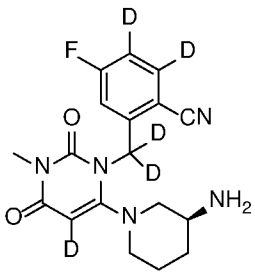
式（19）



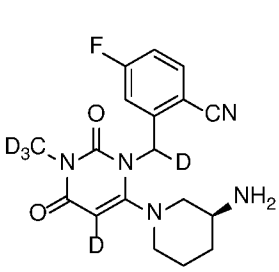
式（20）



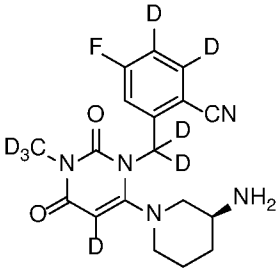
式（21）



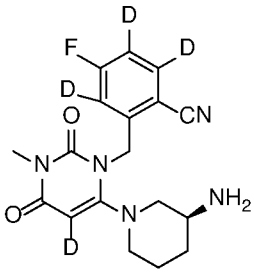
式（22）



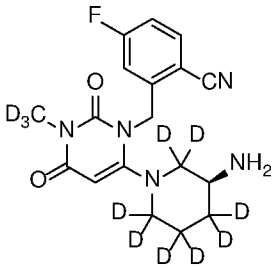
式（23）



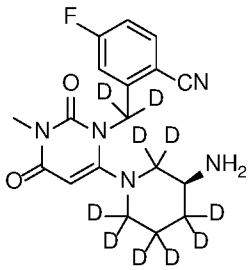
式（24）



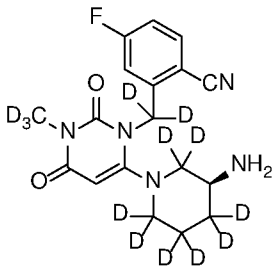
式（25）



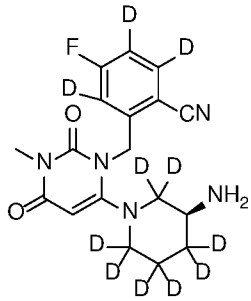
式（26）



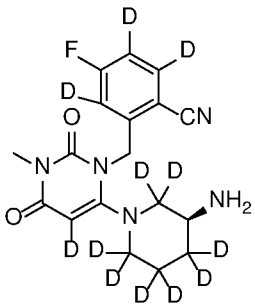
式（27）



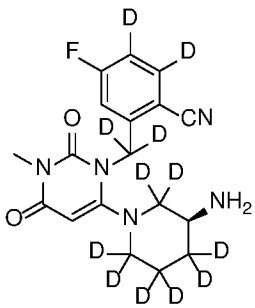
式（28）



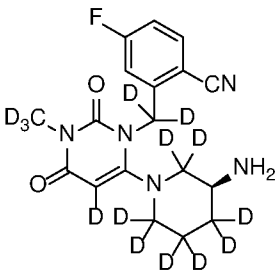
式（29）



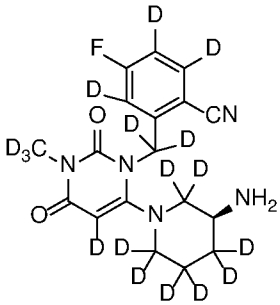
式（30）



式（31）



式（32）



式（33）

8. 一种药物组合物，其特征在于：其含有药学上可接受的载体和如权利要求 1~7 任意一项所述的二肽基肽酶抑制剂，或其晶型、药学上可接受的盐、水合物或溶剂合物、互变异构体、立体异构体、前药或同位素变体的药物组合物。

9. 一种如权利要求 1~8 任意一项所述的二肽基肽酶抑制剂的用途，其特征在于：用于制备治疗二肽基肽酶介导的疾病的药物，如 II 型糖尿病。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/080762

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 401/04 (2006.01) i; A61K 31/513 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 401/-; A61K 31/-; A61P 3/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, DWPI, VEN, CNABS, STN (REG, CAPLUS): dipeptidyl peptidase, deuterium; TAJIRUI; WANG, Yihan; ZHAO, Jiuyang; pyrimidinedion+, dipeptidy+, peptidase, diabet+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1926128 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED), 07 March 2007 (07.03.2007), claims 1-96, 101 and 118, and description, pages 51, 67 and 68	1-9
Y	CN 105272963 A (CHENGDU BEISIKAIRUIBIO-TECH CO., LTD.), 27 January 2016 (27.01.2016), claims 6 and 9, description, page 3, and embodiment 1	1-9
Y	CN 102127057 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED), 20 July 2011 (20.07.2011), claim 1, and description, pages 11-34	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 June 2017 (13.06.2017)	**20 June 2017 (20.06.2017)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **MA, Liangxiao** Telephone No.: (86-10) **62086312**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/080762

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1926128 A	07 March 2007	ZA 200607252 B	28 May 2008
		ZA 200607252 A	28 May 2008
CN 105272963 A	27 January 2016	None	
CN 102127057 A	20 July 2011	JP 4068118 B2	26 March 2008
		US 7906523 B2	15 March 2011
		SI 1586571 T1	31 December 2008
		MA 28469 B1	01 March 2007
		US 7795428 B2	14 September 2010
		US 2005261271 A1	24 November 2005
		US 8173663 B2	08 May 2012
		US 2008161562 A1	03 July 2008
		AR 048055 A1	29 March 2006
		KR 20070008620 A	17 January 2007
		CN 102140090 A	03 August 2011
		CN 102134231 A	27 July 2011
		US 8329900 B2	11 December 2012
		MX PA06010571 A	16 February 2007
		LU 92374 12	02 November 2015
		IL 220480 D0	31 July 2012
		EP 1586571 B1	16 July 2008
		US 2008108807 A1	08 May 2008
		US 7781584 B2	24 August 2010
		JP 4948298 B2	06 June 2012
		AU 2004318013 B2	08 September 2011
		KR 101071390 B1	07 October 2011
		TW I344962 B	11 July 2011
		EA 200601701 A1	27 February 2007
		US 8288539 B2	16 October 2012
		CA 2559302 C	19 June 2012
		EP 1586571 B3	24 June 2015
		CN 102079743 A	01 June 2011
		MY 146290 A	31 July 2012
		HK 1083338 A1	31 October 2008
		IL 177629 D0	31 December 2006
		CN 102127053 A	20 July 2011
		US 2008108808 A1	08 May 2008
		JP 2005263780 A	29 September 2005
		CY 1108393 T1	12 February 2014
		PT 1586571 E	08 September 2008
		ES 2310704 T3	16 January 2009
		CA 2559302 A1	13 October 2005
		WO 2005095381 A1	13 October 2005
		NO 2014004 12	25 April 2016
		CR 8595 A	18 March 2008
		DE 602004015067 D1	28 August 2008
		EP 1586571 A1	19 October 2005
		NO 2014004 11	02 June 2014
		IL 177629 A	28 June 2012
		CN 102134229 A	27 July 2011
		AU 2004318013 A1	13 October 2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/080762

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 2008003283 A1	03 January 2008
		RS 50621 B	30 June 2010
		JP 2007314551 A	06 December 2007

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2017/080762

A. 主题的分类

C07D 401/04(2006.01)i; A61K 31/513(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07D401/-; A61K31/-; A61P3/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNKI,DWPI,VEN,CNABS,STN(REG,CAPLUS):嘧啶二酮，二肽基肽酶，糖尿病，氘，塔吉瑞，王义汉，赵九洋，pyrimidinedion+,dipeptidy+,peptidase,diabet+

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 1926128 A (武田药品工业株式会社) 2007年 3月 7日 (2007-03-07) 权利要求1-96、101、118，说明书第51、67-68页	1-9
Y	CN 105272963 A (成都贝斯凯瑞生物科技有限公司) 2016年 1月 27日 (2016-01-27) 权利要求6、9；说明书第3页；实施例1	1-9
Y	CN 102127057 A (武田药品工业株式会社) 2011年 7月 20日 (2011-07-20) 权利要求1，说明书第11-34页	1-9

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 6月 13日	2017年 6月 20日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 马良晓 电话号码 (86-10)62086312

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/080762

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1926128	A	2007年 3月 7日	ZA	200607252	B	2008年 5月 28日
				ZA	200607252	A	2008年 5月 28日
CN	105272963	A	2016年 1月 27日		无		
CN	102127057	A	2011年 7月 20日	JP	4068118	B2	2008年 3月 26日
				US	7906523	B2	2011年 3月 15日
				SI	1586571	T1	2008年 12月 31日
				MA	28469	B1	2007年 3月 1日
				US	7795428	B2	2010年 9月 14日
				US	2005261271	A1	2005年 11月 24日
				US	8173663	B2	2012年 5月 8日
				US	2008161562	A1	2008年 7月 3日
				AR	048055	A1	2006年 3月 29日
				KR	20070008620	A	2007年 1月 17日
				CN	102140090	A	2011年 8月 3日
				CN	102134231	A	2011年 7月 27日
				US	8329900	B2	2012年 12月 11日
				MX	PA06010571	A	2007年 2月 16日
				LU	92374	I2	2015年 11月 2日
				IL	220480	D0	2012年 7月 31日
				EP	1586571	B1	2008年 7月 16日
				US	2008108807	A1	2008年 5月 8日
				US	7781584	B2	2010年 8月 24日
				JP	4948298	B2	2012年 6月 6日
				AU	2004318013	B2	2011年 9月 8日
				KR	101071390	B1	2011年 10月 7日
				TW	I344962	B	2011年 7月 11日
				EA	200601701	A1	2007年 2月 27日
				US	8288539	B2	2012年 10月 16日
				CA	2559302	C	2012年 6月 19日
				EP	1586571	B3	2015年 6月 24日
				CN	102079743	A	2011年 6月 1日
				MY	146290	A	2012年 7月 31日
				HK	1083338	A1	2008年 10月 31日
				IL	177629	D0	2006年 12月 31日
				CN	102127053	A	2011年 7月 20日
				US	2008108808	A1	2008年 5月 8日
				JP	2005263780	A	2005年 9月 29日
				CY	1108393	T1	2014年 2月 12日
				PT	1586571	E	2008年 9月 8日
				ES	2310704	T3	2009年 1月 16日
				CA	2559302	A1	2005年 10月 13日
				WO	2005095381	A1	2005年 10月 13日
				NO	2014004	I2	2016年 4月 25日
				CR	8595	A	2008年 3月 18日
				DE	602004015067	D1	2008年 8月 28日
				EP	1586571	A1	2005年 10月 19日
				NO	2014004	I1	2014年 6月 2日
				IL	177629	A	2012年 6月 28日
				CN	102134229	A	2011年 7月 27日
				AU	2004318013	A1	2005年 10月 13日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/080762

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		US	2008003283	A1	2008年 1月 3日
		RS	50621	B	2010年 6月 30日
		JP	2007314551	A	2007年 12月 6日