201718587

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201718587 A

(43)公開日： 中華民國 106 (2017) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105135041 (22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 10 月 28 日

(51)Int. Cl.： *C07D473/06 (2006.01)* *A61K31/52 (2006.01)*
A61P1/16 (2006.01)

(30)優先權：2015/10/29 中國大陸 201510719196.4

(71)申請人：南京明德新藥研發股份有限公司 (中國大陸) MEDSHINE DISCOVERY INC. (CN)
中國大陸

(72)發明人：吳凌云 WU, LINGYUN (CN) ；張鵬 ZHANG, PENG (CN) ；張麗 ZHANG, LI (CN) ；王崢 WANG, ZHENG (CN) ；陳 曙輝 CHEN, SHUHUI (US)

(74)代理人：洪蘭心

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：3 共 21 頁

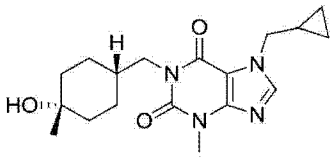
(54)名稱

4H-吡唑並[1,5-α]苯並咪唑類化合物晶型及其製備方法和中間體

4H-PYRAZOLO [1,5-α] BENZIMIDAZOLES AND THEIR PREPARATION METHOD AND INTERMEDIATES

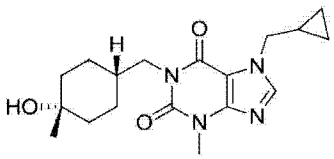
(57)摘要

本發明公開了化合物(Ⅰ)的晶型 A 及其製備方法，本發明還公開了晶型 A 作為 PDE2 或 TNF-α 抑制劑的應用。



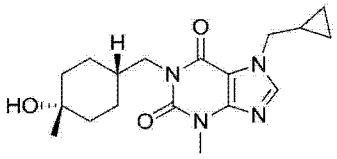
(Ⅰ)

The present invention discloses the crystal form A of the compound (I) and the preparation method thereof. The invention also discloses the application of the crystalline form A as the PDE2 or TNF-α inhibitor.



(Ⅰ)

特徵化學式：



(Ⅰ)

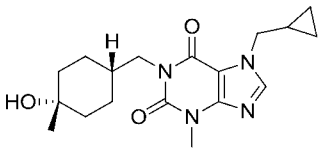
201718587
專利案號：105135041
申請日：105/10/28
IPC分類：C07D 473/06 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

【發明摘要】

【中文發明名稱】 4H-吡唑並[1,5-α]苯並咪唑類化合物晶型及其製備方法和中間體

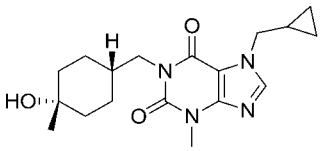
【英文發明名稱】 4H-PYRAZOLO [1,5-A] BENZIMIDAZOLES AND THEIR PREPARATION METHOD AND INTERMEDIATES

【中文】本發明公開了化合物(Ⅰ)的晶型A及其製備方法，本發明還公開了晶型A作為PDE2或TNF-α抑制劑的應用。



(Ⅰ)

【英文】The present invention discloses the crystal form A of the compound (I) and the preparation method thereof. The invention also discloses the application of the crystalline form A as the PDE2 or TNF-α inhibitor.

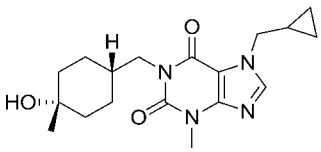


(Ⅰ)

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】



(Ⅰ)

【發明說明書】

【中文發明名稱】　4H-吡唑並[1,5-α]苯並咪唑類化合物晶型及其製備方法和中間體

【英文發明名稱】

4H-PYRAZOLO [1,5-A] BENZIMIDAZOLES AND THEIR PREPARATION METHOD AND INTERMEDIATES

【技術領域】

【0001】本發明涉及化合物(I)的晶型A及其製備方法，以及晶型A作為PDE2或TNF-α抑制劑的應用。

【先前技術】

【0002】磷酸二酯酶(PDE)催化水解環化核苷酸cGMP和cAMP，通過控制這兩個重要的二級信號因子的分子內濃度調控各種生理反應。環化核苷酸cGMP和cAMP分子內的調控異常是導致許多疾病的原因，現在已經有多個藥物通過抑制PDE活性來改善和治療疾病，如PDE5抑制劑用於肺動脈高壓,PDE4抑制劑用於銀屑病引起的關節炎。目前已知的磷酸二酯酶基因共有十一個大類，每一類又可以表達若干亞型，總共有超過100 種PDE亞型。不同的亞型具有不同的結構，不同的組織分佈，對環化核苷酸cGMP和cAMP的活性也有很大的不同，調控的生理功能也是千差萬別。

【0003】PDE2磷酸二酯酶可以催化水解環化核苷酸cGMP和cAMP，同時cAMP活性受cGMP調控，對於細胞內的cGMP 和cAMP功能平衡起關鍵作用。PDE2在人體組織中廣泛表達，分佈主要是心臟，中樞神經系統，肝臟，腎上腺，內皮細胞，和血小板等。PDE2參與調節各項生理活性，如中樞的學習、記憶和認知等過程，維持心臟平滑肌和內皮細胞的基本節律，內皮細胞的通透性，調

節炎症反應。PDE2基因敲初小鼠直接導致胚胎死亡。通過抑制PDE2活性可能用於各種中樞，心血管疾病，和控制炎症反應。

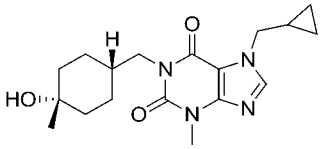
【0004】多種天然和合成的嘌呤類化合物的非選擇性PDE抑制活性很早就被發現，如咖啡因，茶鹼，己酮可可鹼等。 己酮可可鹼（PDE2活性）臨床上批准用於周邊血管諸塞造成的下肢跛行，主要作用是降低血液粘度，提高紅細胞變形，抑制血小板凝聚等。新型的高選擇性PDE2抑制劑也有報道用於控制內皮細胞的分裂和血管再生，和改善中樞認知障礙。但總體新型的選擇性PDE2抑制劑的開發和應用還非常有限， 發現和應用新型PDE2抑制劑具有廣闊的前景。

【0005】腫瘤壞死因子α（tumor necrosis factor alpha，TNF-α）是一種具有多種生物學活性的細胞因子，對多種疾病特別是免疫和炎症相關的疾病的發生、發展及治療具有重要影響。TNF-α主要由單核細胞和巨噬細胞系產生，參與機體的免疫調節和細胞因子網絡協調。正常情況下，TNF-α對免疫防禦和免疫監督起著重要作用，但在某些情況下卻有不良作用。研究顯示，TNF-α過量表達可誘導促炎細胞因子如白介素1（interleukon-1，IL-1）、IL-6等的表達、增加內皮細胞通透性、上調粘附分子表達、激活中性白細胞和嗜酸細胞，並且誘導骨滑膜細胞和軟骨細胞分泌急性期物質和組織降解酶等促進炎症的發生。這些病理反應在許多免疫介導的炎症性疾病（Immune-mediated inflammatory diseases，IMID）的發生發展中起著非常重要的作用，如風濕性關節炎（rheumatoid arthritis，RA）、牛皮癬關節炎(psoriatic arthritis，PsA)、僵直性脊椎炎(ankylosing spondylitis，AS)、炎症性腸炎(inflammatory bowel disease，IBD)、幼年型慢性關節炎（juvenile chronic arthritis，JCA）以及脈管炎(vasculitis)等。研究表明，TNF-α是以上多種IMID的理想靶標。同時對於一些由於長期損傷慢性炎症造成的疾病,如脂肪肝炎,慢性阻塞性肺炎等，使用TNF-α拮抗藥物（TNF-αinhibitors）來中和過量的TNF-α，也是有效的防治和治療途徑，TNF-α單抗藥物在臨床上已經證明

抑制TNF-α是非常有效的治療上述炎症相關疾病的手段。PDE2從機理上可以調控TNF-α的表達，因此可以通過調節PDE2活性了控制TNF-α的水平，從而可以實現控制炎症反應。

【發明內容】

【0006】本發明提供了化合物（ Ⅰ ）的晶型A，其XRPD圖譜如圖1所示，



(Ⅰ)　　。

【0007】本發明的一些方案中，晶型A的XRPD圖譜解析數據如表1所示。

表 1：晶型 A 的 XRPD 圖譜解析數據

NO.	2-Theta	I%	NO.	2-Theta	I%
1	9.578	100	16	22.141	31.1
2	10.43	40.1	17	22.928	6.4
3	12.502	18.2	18	23.387	4.4
4	13.996	4	19	24.27	4.6
5	15.086	7.7	20	24.548	39.8
6	15.38	16.5	21	25.116	3
7	16.287	7.4	22	25.834	9.5
8	16.661	6.3	23	26.719	5.3
9	17.428	85.8	24	27.665	3.6
10	17.646	29.8	25	29.477	16
11	18.298	11.3	26	30.956	5.6
12	19.977	10.2	27	32.416	3.4
13	20.427	10.2	28	34.623	3.4
14	20.879	29.7	29	37.243	3.5
15	21.314	8.6	30	39.237	3.6

【0008】本發明的一些方案中，上述晶型A的製備方法，包括將任意一種形式的式化合物（Ⅰ）加入到脂類溶劑、醇類溶劑、乙腈、丙酮、或醇類溶劑與水的混合溶劑中加熱溶解，然後降溫析晶制得。

【0009】本發明的一些方案中，上述加熱溶解後還包括濃縮步驟，將溶劑濃縮至原體積的1/30~1/2。

【0010】本發明的一些方案中，上述加熱溶解後還包括濃縮步驟，將溶劑濃縮至原體積的1/20~1/5。

【0011】本發明的一些方案中，上述化合物（Ⅰ）與溶劑的重量比選自10~1:1。

【0012】本發明的一些方案中，上述化合物(Ⅰ)與溶劑的重量比選自6~3:1。

【0013】本發明的一些方案中，上述化合物(Ⅰ)與溶劑的重量比選自5~4:1。

【0014】本發明的一些方案中，上述加熱溫度選自40℃~回流溫度。

【0015】本發明的一些方案中，上述加熱溫度選自50℃~60℃。

【0016】本發明的一些方案中，上述降溫析晶溫度選自0℃~30℃。

【0017】本發明的一些方案中，上述降溫析晶溫度選自20℃~30℃。

【0018】本發明的一些方案中，上述脂類溶劑選自乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙酸丙酯。

【0019】本發明的一些方案中，上述脂類溶劑選自乙酸乙酯。

【0020】本發明的一些方案中，上述醇類溶劑選自甲醇、乙醇、異丙醇或三級丁醇。

【0021】本發明的一些方案中，上述醇類溶劑與水的混合溶劑選自甲醇/水、乙醇/水、異丙醇/水。

【0022】本發明的一些方案中，上述醇與水的體積比選自1:0.5~1。

【0023】本發明的一些方案中，上述醇與水的體積比選自1:1

【0024】本發明還提供了一種藥物組合物，其含有治療有效量的上述晶型A或其藥學上可接受的載體。

【0025】本發明還提供了上述晶型A及其組合物在製備治療PDE2抑制劑和TNF-α抑制劑相關疾病藥物中的應用。

【0026】本發明還提供了上述晶型A及其組合物在製備治療肝類疾病藥物中的應用。

【0027】本發明的一些方案中，上述肝類疾病選自脂肪性肝炎和肝纖維化。

【0028】本發明的晶型穩定性好，易於成藥。

定義和說明：

【0029】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，旨在指代其對應的商品或其活性成分。

【0030】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上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。

【0031】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。

【0032】本領域任何合成路線規劃中的一個重要考量因素是為反應性官能團（如本發明中的氨基）選擇合適的保護基。對於經過訓練的從業者來說，Greene

and Wuts 的(Protective Groups In Organic Synthesis, Wiley and Sons, 1991)是這方面的權威。本發明引用的所有參考文獻整體上併入本發明。

【0033】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。

【0034】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。反應一般是在惰性氮氣下、無水溶劑中進行的。質子核磁共振數據記錄在Bruker Avance III 400 (400 MHz)分光儀上，化學位移以四甲基矽烷低場處的 (ppm)表示。質譜是在安捷倫1200系列加6110（&1956A）上測定。LC/ MS或Shimadzu MS包含一個DAD：SPD-M20A（LC）和Shimadzu Micromass 2020檢測器。質譜儀配備有一個正或負模式下操作的電噴霧離子源（ESI）。

【0035】本發明採用下述縮略詞：DCM代表二氯甲烷；PE代表石油醚；EA代表乙酸乙酯； DMF 代表N,N-二甲基甲醯胺；DMAC代表N,N-二甲基乙醯胺；DMSO代表二甲亞碸；EtOAc代表乙酸乙酯；tol代表甲苯；THF代表四氫呋喃；EtOH代表乙醇；MeOH代表甲醇；NMP代表N-甲基吡咯烷酮；2-METHF代表2-甲基四氫呋喃；***i***-PrOH代表2-丙醇；Bn代表苄基；Cbz代表苄氧羰基，是一種胺保護基團；Boc代表三級丁基羰基是一種胺保護基團；Fmoc代表芴甲氧羰基，是一種胺保護基團；Alloc代表烯丙氧羰基，是一種胺保護基團；Teoc代表三甲基矽乙氧羰基，是一種胺保護基團；Boc_2O代表二-三級丁基二碳酸酯；HCl（g）代表氯化氫氣體；H_2SO_4代表硫酸；HOAc代表乙酸；TFA代表三氟乙酸；DIPEA代表二異丙基乙基胺；DIEA代表二異丙基乙基胺；NMM代表N-甲基嗎啡啉；DBU代表1,8-二氮雜二環十一碳-7-烯；Et_3N代表三乙胺；LDA代表二異丙基胺鋰；NaHMDS代表雙(三甲基矽基)氨基鈉；KHMDS代表雙(三甲基矽基)氨基鉀；$LiAlH_4$代表四氫鋁鋰；***t***-BuOK代表三級丁醇鉀；H_2O_2代表過氧化氫；NH_4Cl代表氯化銨；$BaSO_4$代表硫酸鋇；$CaCO_3$代表碳酸鈣；$SnCl_2$代表氯化亞錫；$Zn(BH_4)_2$

代表硼氫化鋅；PPh_3代表三苯基膦；HMDS代表六甲基二矽胺烷；Pd/C代表鈀碳；PtO_2代表二氧化鉑；$Pd(OH)_2$代表氫氧化鈀；$Pd_2(dba)_3$代表三(二亞苄基丙酮)二鈀；$Pd(PPh_3)_4$代表四三苯基膦鈀；$Pd(dppf)Cl_2$代表1,1'-雙(二苯基磷)二茂鐵氯化鈀；$Pd(PPh_3)_2Cl_2$代表二氯雙(三苯基膦)鈀(II)；$Pd(OAc)_2$代表醋酸鈀；$PdCl_2$代表氯化鈀；CuI代表碘化亞銅；CuBr代表溴化亞銅；CuCl代表氯化亞銅；Cu代表銅粉；Cu_2O代表氧化亞銅；Xantphos代表4,5-雙(二苯基磷)-9,9-二甲基氧雜蒽；Sphos代表2-二環己基亞膦基-2',6'-二甲氧基聯苯；Xphos代表2-二環己基磷-2',4',6'-三異丙基聯苯；Ruphos代表2-雙環己基膦-2',6'-二異丙氧基-,1,1'-聯苯；Brettphos代表2-(二環己基膦基)-3,6-二甲氧基-2'-4'-6'-三異丙基-1,1'-聯苯。

【0036】化合物經手工或者ChemDraw®軟件命名，市售化合物採用供應商目錄名稱。

【0037】

本發明粉末 **X-**射線衍射（**X-ray powder diffractometer, XRPD**）方法

儀器：Bruker D8 ADVANCE X-射線衍射儀；

方法：靶: Cu: K- Alpha；

波長 λ=1.54179Å；

管壓 Voltage: 40 kV；

管流 Current: 40 mA；掃描範圍： 4～40°；

樣品旋轉速度： 15 rpm；

掃描速度： 10°/分鐘。

【0038】

本發明差熱分析（**Differential Scanning Calorimeter, DSC**）方法

儀器：TA Q2000 差示掃描量熱儀；

方法：取樣品（～1 mg）置於 DSC 鋁鍋內進行測試，方法為： RT - 300°C，升溫速率 10 °C/min。

【0039】

本發明熱重分析（**Thermal Gravimetric Analyzer, TGA**）方法

儀器：TA Q5000熱重分析儀；

方法：取樣品（2～5 mg）置於TGA鉑金鍋內進行測試，方法為：RT - 300°C，升溫速率10 °C/min。

【圖式簡單說明】

【0040】

圖 1 為晶型 A 的 Cu-Kα 輻射的 XRPD 譜圖。

圖 2 為晶型 A 的 DSC 圖譜。

圖 3 為晶型 A 的 TGA 圖譜。

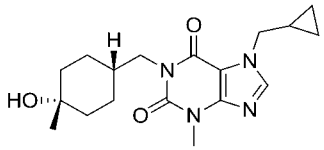
【實施方式】

【0041】為了更好的理解本發明的內容，下面結合具體實施例來做進一步的說明，但具體的實施方式並不是對本發明的內容所做的限制。

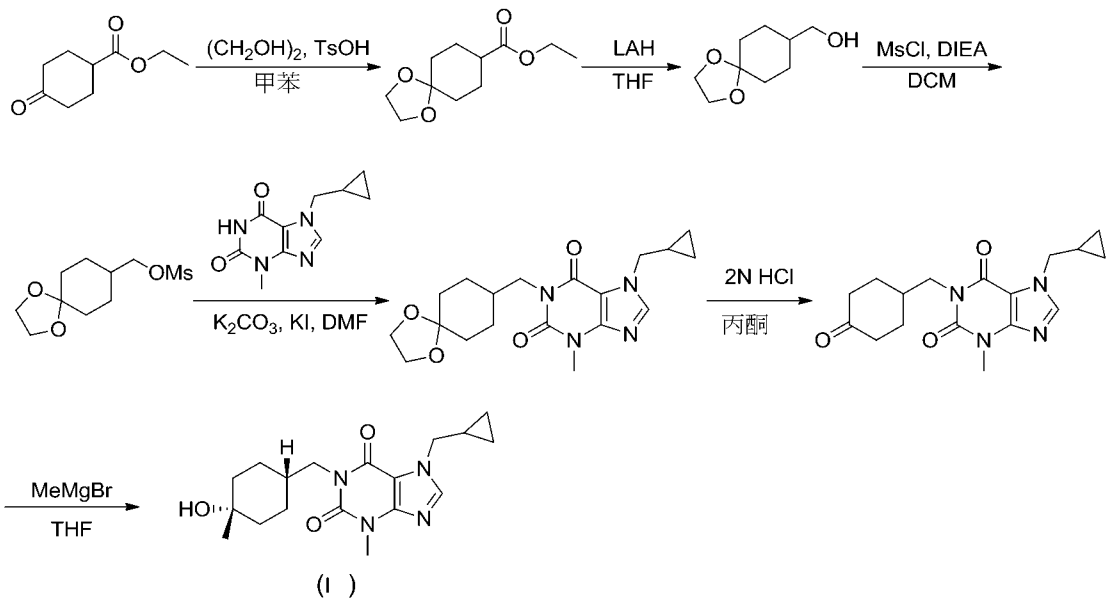
【0042】

實施例 1

7-(環丙基甲基)-1-(((順式)-4-羥基-4-甲基環己基)甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***，7***H***)-二酮



(I)



【0043】

第一步：乙基 1，4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-羧酸乙酯

將乙基4-氧代環己烷羧酸（30.0 g，176 mmol），乙二醇（22.0 g，353 mmol）和對甲苯磺酸（304 mg，1.70 mmol）溶於甲苯（315 mL）中，加分水器後加熱回流反應過夜。反應液冷卻至室溫，依次用水（300 mL x 2）、飽和碳酸氫鈉（500 mL x 2）洗滌，有機相用無水硫酸鎂乾燥，過濾，濾液減壓濃縮，用矽膠柱色譜法分離純化（1：1 石油醚/乙酸乙酯，Rf＝0.3）得到產物乙基1，4-二氧雜螺[4，5]癸烷-8-羧酸乙酯（37.2 g，黃色液體），產率：99%。MS-ESI計算值$[M+H]^+$ 215，實測值215。

【0044】

第二步：1,4-二氧雜螺[4，5]癸烷-8-基甲醇

在氮氣保護，0℃時下將四氫鋁鋰（2.30 g，61.0 mmol）緩慢加入四氫呋喃（60 mL）中，滴加乙基1，4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-羧酸乙酯（10.0 g，42.0 mmol）的四氫呋喃（40 mL）溶液。反應緩慢升至25℃，攪拌3.5小時。反應液冷卻至0℃，依次緩慢加入水（2.30g，127 mmol），15% 氫氧化鈉（2.30 g，8.60 mmol）及水（6.9 g，383 mmol）。過濾，濾餅用四氫呋喃（50 mL x 3）洗滌，合併有機

相，用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮得到產品1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲醇（6.22 g，黃色液體），產率：89%。MS-ESI計算值$[M + H]^+$ 173，實測值173。

【0045】

第三步：1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲基甲磺酸酯

將1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲醇（2.00 g，12.0 mmol）及二異丙基乙基胺（3.10 g，24.0 mmol）溶於二氯甲烷（40 mL）中，在0℃下緩慢加入甲烷磺醯氯（3.90 g，30.0 mmol）。反應液升至25℃，攪拌過夜。加入飽和氯化銨水溶液（100 mL）淬滅反應，用乙酸乙酯萃取（200 mL x 3）。合併有機相，用無水硫酸鎂乾燥，過濾，濾液減壓濃縮用矽膠柱色譜法分離純化（3：1 石油醚/乙酸乙酯，Rf = 0.4），得到產物1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲基甲磺酸酯（1.80 g，黃色液體），產率：60%。MS-ESI計算值$[M + H]^+$ 251，實測值251。

【0046】

第四步：1-(1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲基-7-(環丙基甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮

將1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲基甲磺酸酯（682 mg，2.72 mmol），7-(環丙基甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮（500 mg，2.27 mmol）及碘化鉀（37.7 mg，0.227 mmol）溶於***N***,***N***-二甲基甲醯胺（10 mL）中，加入碳酸鉀（627 mg，4.54 mmol），反應130℃加熱回流4小時。反應液冷卻至室溫，過濾，濾液減壓濃縮，得到的粗產品1-(1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲基-7-(環丙基甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮（1.10 g，黃色油狀）。MS-ESI計算值$[M + H]^+$ 375，實測值375。

【0047】

第五步：7-(環丙基甲基)-3-甲基-1-((4-氧環己基)甲基)-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮

將1-(1,4-二氧雜螺[4,5]癸烷-8-基甲基-7-(環丙基甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮（1.20 g，2.09 mmol）溶於丙酮（12 mL）中，加入4N 鹽酸水溶液（3 mL）。反應室溫攪拌過夜，加入水（20 mL），用乙酸乙酯（30 mL x 3）萃取，有機相用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮，得到的產品用矽膠柱色譜法純化（1：1 石油醚/乙酸乙酯，Rf = 0.3）得到產物7-(環丙基甲基)-3-甲基-1-((4-氧環己基)甲基)-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮（52.0 mg，黃色固體），產率：8%。MS-ESI計算值$[M + H]^+$ 331，實測值331。

【0048】

第六步：7-(環丙基甲基)-1-(((順式)-4-羥基-4-甲基環己基)甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮

將7-(環丙基甲基)-3-甲基-1-((4-氧環己基)甲基)-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮（100 mg，0.303 mmol）溶於四氫呋喃（5 mL），-78℃時在氮氣保護下緩慢加入甲基格氏試劑（3 M乙醚溶液，0.60mL，1.8 mmol），-78℃攪拌半小時，接著0℃反應2小時。緩慢滴加加水（10 mL）淬滅反應，反應液用乙酸乙酯（30 mL x 3）萃取，合併有機相用無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮，得到粗產品用製備高效液相色譜純化得產物7-(環丙基甲基)-1-(((順式)-4-羥基-4-甲基環己基)甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮（42.0 mg，白色固體）即為化合物（Ⅰ），產率：40%。^{1}H NMR：（400 MHz，Methonal-d_4）δ 7.99（s，1H），4.19（d，***J*** = 8.0 Hz，2H），3.89（d，***J*** = 8.0 Hz，2H），3.54（s，3H），1.81-1.70（m，1H），1.69-1.62（m，2H），1.51-1.41（m，4H），1.39-1.25（m，3H），1.15（s，3H），0.63-0.56（m，2H），0.48-0.42（m，2H）。
MS-ESI 計算值$[M + H - H_2O]^+$ 329，實測值 329。

【0049】

第七步：晶型 A 製備

將7-(環丙基甲基)-1-(((順式)-4-羥基-4-甲基環己基)甲基)-3-甲基-1***H***-嘌呤-2,6-(3***H***,7***H***)-二酮（42.0 mg）加入乙酸乙酯（10 mL）,加熱至50℃溶解。將溶液減壓濃縮至0.5 mL，析出固體，混合物室溫攪拌過夜。將混合物過濾，收集濾餅。將濾餅乾真空燥後得晶型A。

【0050】

實驗例 **1**：體外評價 **PDE2** 磷酸二酯酶抑制活性

實驗目的：通過螢光偏振分析法檢測 AMP/GMP 抗體上取代的 AlexaFluor 633 螢光染料來檢測反應體系中產生的 AMP/GMP 濃度， 計算待測化合物的 PDE2 磷酸二酯酶抑制 IC_{50} 值。

實驗材料：

測定緩沖溶液： 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 0.01% Brij 35, 1 mM DTT, and 1% DMSO.

酶： 使用 N 端 GST 標簽用杆狀病毒在昆蟲 Sf9 細胞中表達重組全長人 PDE2A 蛋白

底物： 1 μM cGMP

檢測方法：

Transcreener® AMP^2/GMP^2 抗體，AMP2/GMP2 AlexaFluor 633 螢光染料

實驗操作：

將新鮮製備的緩衝溶液配置酶溶液，然後加入到反應孔穴中，通過 Echo550 非接觸式納升級聲波移液系統加入待測化合物的 DMSO 溶液，然後室溫下預溫育 10 分鐘，加入底物 (1 μM cGMP)引發反應，室溫反應一小時。然後加入檢測系統（Transcreener® AMP^2/GMP^2 抗體，AMP2/GMP2 AlexaFluor 633 螢光染料），室溫下反應 90 分鐘， 然後使用 Ex/Em 620/688 檢測螢光偏振。

螢光偏振強度通過 AMP/GMP 標準曲線換算成 nM 濃度，然後計算相對 DMSO 空白的相對酶活性抑制，利用 Prism 軟件包 (GraphPad Software, San Diego California, USA)計算 IC50 值和曲線

實驗結果：

表 2：PDE2 磷酸二酯酶抑制活性測試結果

供試品	**PDE2** 磷酸二酯酶抑制活性
化合物（Ⅰ）	＋＋

註：1μM ≦“＋＋” ＜ 10 μM。

結論：化合物（Ⅰ）具有顯著甚至意料不到的 PDE2A 蛋白酶抑制活性。

【0051】

實驗例 **2**：體外評價化合物對 **LPS** 誘導大鼠血液中 **TNF-α**的影響

實驗目的：在體外檢測化合物對 LPS 誘導大鼠血液中 TNF-α的影響，評估化合物對大鼠血液中 LPS 誘導 TNF-α的抑制作用。

實驗材料：

Sprague Dawley 大鼠 (雄性，210~260g, 8~10 周齡，上海斯萊克)

Rat TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D, #SRTA00)

實驗操作：

配製濃度為 1mM 的待測化合物溶液，分別在 48 孔細胞培養板中加入 40μL (化合物終濃度為 100uM)。大鼠用異氟烷麻醉後，於心臟採血（肝素抗凝）。將血液加入已經加好待測化合物的 48 孔板中，每孔 320μL。將 48 孔板放置于細胞培養箱中，孵育 30 分鐘後取出，加入 40μL LPS 溶液(100ug/ml)，混勻後放置于培養箱中繼續孵育。5 小時後取出 48 孔板，血樣轉移至 1.5ml 離心管中，置於離心機中離心（4,500 rpm, 4°C, 5 minutes），分離上層得血漿，分裝後速凍，保存在-80 度冰箱。第二天按照試劑盒說明書操作用 R&D ELISA 試劑盒進行血漿樣品中 TNF-α水平檢測。

實驗結果：

表 3：TNF-α抑制活性測試結果

供試品	**TNF-α抑制比率**
化合物（ I ）	＋＋

註：80% ≦ “＋＋” ＜ 100%。

結論：本發明化合物具有顯著甚至意料不到的 TNF-α抑制活性。

【0052】

實驗例 **3**：化合物藥代動力學評價

實驗目的：測試化合物在 SD 大鼠體內藥代動力學

實驗材料：Sprague Dawley 大鼠 (雄性，200-300g, 7~9 周齡，上海斯萊克)

實驗操作：

以標準方案測試化合物靜脈注射及口服給藥後的齧齒類動物藥代特徵，實驗中候選化合物配成澄清溶液，給予大鼠單次靜脈注射及口服給藥。靜注及口服溶媒為一定比例的羥丙基 β 環糊精水溶液或生理鹽水溶液。收集 24 小時內的全血樣品，3000g 離心 15 分鐘，分離上清得血漿樣品，加入 4 倍體積含內標的乙腈溶液沉澱蛋白，離心取上清液加入等倍體積的水再離心取上清進樣，以 LC-MS/MS 分析方法定量分析血藥濃度，並計算藥代參數，如達峰濃度，達峰時間，清除率，半衰期，藥時曲線下面積，生物利用度等。

實驗結果：

表 4：藥代動力學測試結果

供試品	清除率 (mL/min/kg)	半衰期 $T_{1/2}$ (h)	濃度積分 AUC (nM.hr)	生物利用度 F (%)
己酮可可鹼	74.1	0.191	6622	
化合物（ I ）	54.4	0.793	4390	47.9

結論：化合物（ I ）可以顯著提高大鼠藥代動力學單項或部分指標。

【0053】

實驗例 **4**：晶型 **A** 在不同溶劑中的溶解度

稱取約 2 mg 晶型 A 到 1.5 mL 的液相小瓶中，分別用移液槍逐級加入如下溶劑，手動振搖溶解。該測試是在室溫下進行，通過肉眼來判斷溶解情況，結果見表 5。

表 5：晶型 A 在不同溶劑中的溶解度

編號	溶劑	溶解度 (mg/mL)	編號	溶劑	溶解度 (mg/mL)
1	甲醇	~28.7	14	甲苯	<1.0
2	乙醇	~11.2	15	正庚烷	<1.0
3	異丙醇	~10.1	16	環己烷	<1.0
4	正丁醇	~20.5	17	二氧六環	>57.0
5	乙腈	~13.0	18	水	<1.0
6	丙酮	~17.2	19	甲醇-水 (1:1)	~7.8
7	丁酮	~37.2	20	甲醇-水 (3:1)	~19.0
8	甲基異丁基酮	~10.9	21	乙醇-水 (1:1)	~16.3
9	乙酸乙酯	~15.2	22	乙醇-水 (3:1)	~24.5
10	醋酸異丙酯	~12.0	23	乙腈-水 (1:1)	~22.2
11	甲基三級丁基醚	~2.6	24	丙酮-水 (1:2)	~1.0
12	四氫呋喃	>67.0	25	異丙醇-水 (1:1)	~17.3
13	2-甲基四氫呋喃	~24.2	-	-	-

【0054】

實驗例 **5**：晶型 **A** 固體穩定性試驗

將結晶 A 開口置於恒溫恒濕容器中進行加速試驗，條件分別為 40°C/75%濕度（敞口），於第 1、2、3 個月取樣檢測，檢測結果與第 0 天的初始檢測結果進行比較，試驗結果見下表 6 所示：

表 6：晶型 A 固體穩定性實驗

測試條件	取樣時間點（月）	外觀	含量(%)	總雜質(%)
初始	0	白色粉末	101.6	0.33
40°C/75%濕度（敞口）	1	白色粉末	101.4	0.31
40°C/75%濕度（敞口）	2	白色粉末	98.8	0.34
40°C/75%濕度（敞口）	3	白色粉末	101.8	0.32

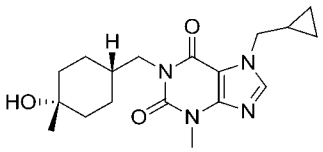
【符號說明】

【0055】

(無)

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】化合物（ Ⅰ ）的晶型 A，其 XRPD 圖譜如圖 1 所示，



(Ⅰ) 。

【第 2 項】根據請求項 1 所述晶型 A 的製備方法，包括將任意一種形式的式化合物（ Ⅰ ）加入到脂類溶劑、醇類溶劑、乙腈、丙酮、或醇類溶劑與水的混合溶劑中加熱溶解，然後降溫析晶製得。

【第 3 項】根據請求項 2 所述晶型 A 的製備方法，加熱溶解後還包括濃縮步驟，將溶劑濃縮至原體積的 1/30~1/2，優選自 1/20~1/5。

【第 4 項】根據請求項 2 所述晶型 A 的製備方法，其中，化合物（ Ⅰ ）與溶劑的重量比選自 10~1:1，優選自 6~3:1，更優選自 5~4:1。

【第 5 項】根據請求項 2 所述晶型 A 的製備方法，其中所述加熱溫度選自 40℃~回流溫度，優選自 50℃~60℃。

【第 6 項】根據請求項 2 所述晶型 A 的製備方法，其中所述降溫析晶溫度選自 0℃~30℃，優選自 20℃~30℃。

【第 7 項】根據請求項 2 所述晶型 A 的製備方法，其中脂類溶劑選自乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙酸丙酯，優選自乙酸乙酯；或

醇類溶劑選自甲醇、乙醇、異丙醇或三級丁醇；

醇類溶劑與水的混合溶劑選自甲醇/水、乙醇/水、異丙醇/水，其中，醇與水的體積比選自 1:0.5~1，優選自 1:1。

【第 8 項】一種藥物組合物，其含有治療有效量的根據請求項 1～7 任意一項所述的晶型 A 或其藥學上可接受的載體。

【第 9 項】根據請求項 1~7 任意一項所述晶型 A 或請求項 8 所述組合物在製備治療 PDE2 抑制劑和 TNF-α 抑制劑相關疾病藥物中的應用。

【第 10 項】根據請求項 1~7 任意一項所述晶型 A 或請求項 8 所述組合物在在製備治療肝類疾病藥物中的應用，其中所述肝類疾病選自脂肪肝性肝炎和肝纖維化。

【發明圖式】

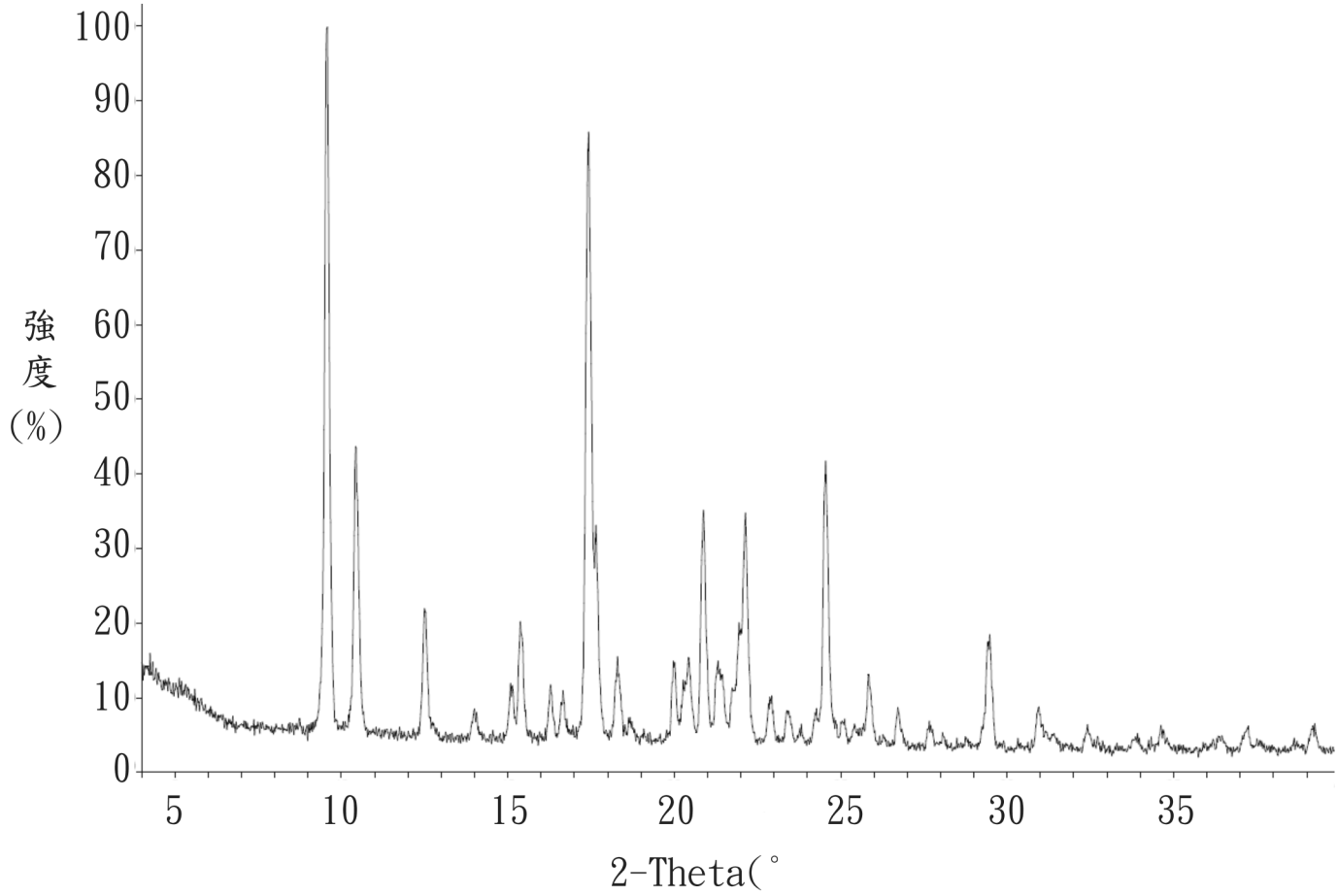

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
強度(%)
5
10
15
20
25
30
35
2-Theta(°

圖1

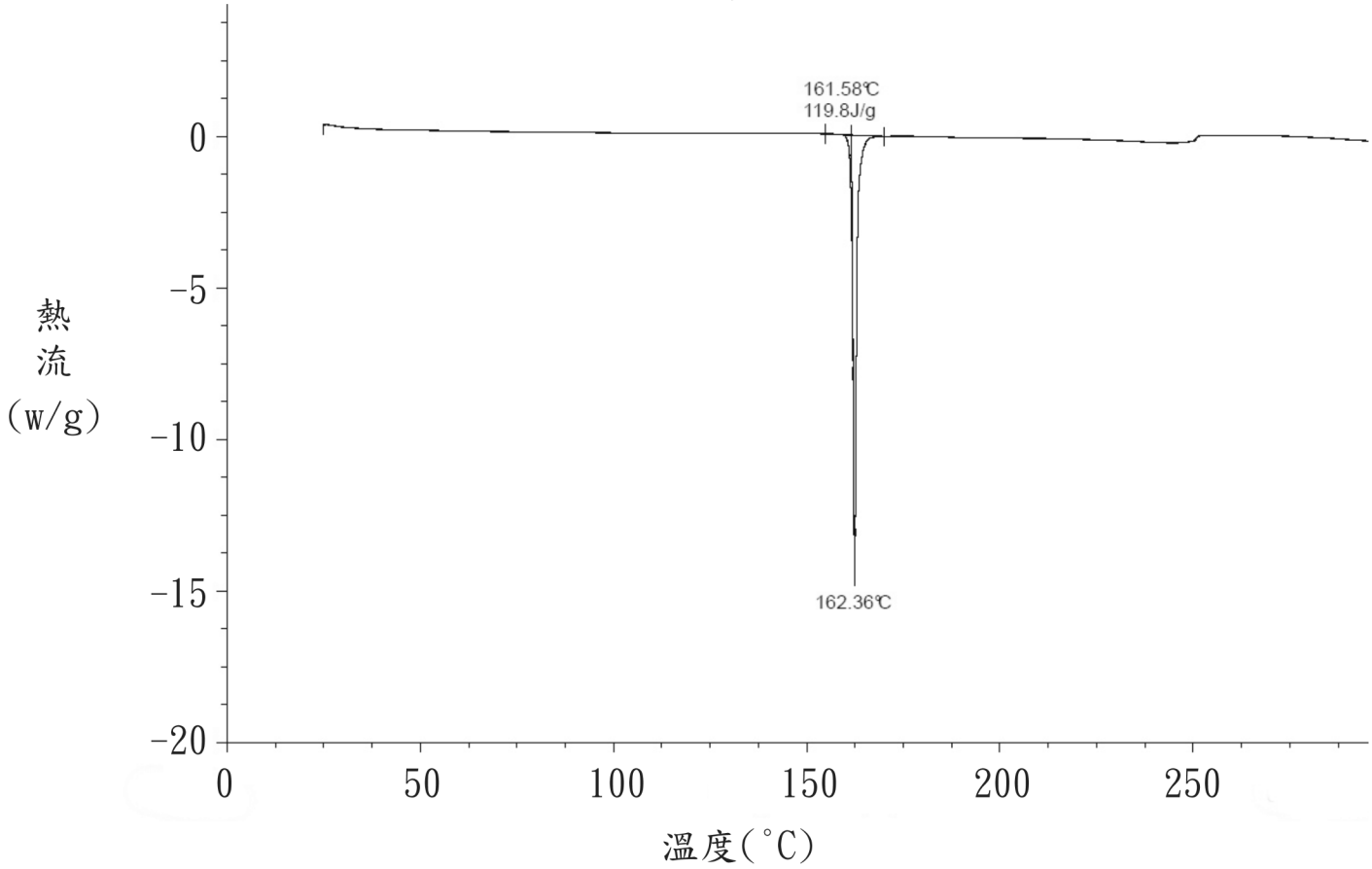

161.58℃
119.8J/g
0
-5
-10
-15
-20
熱流(w/g)
0
50
100
150
200
250
溫度(°C)

圖2

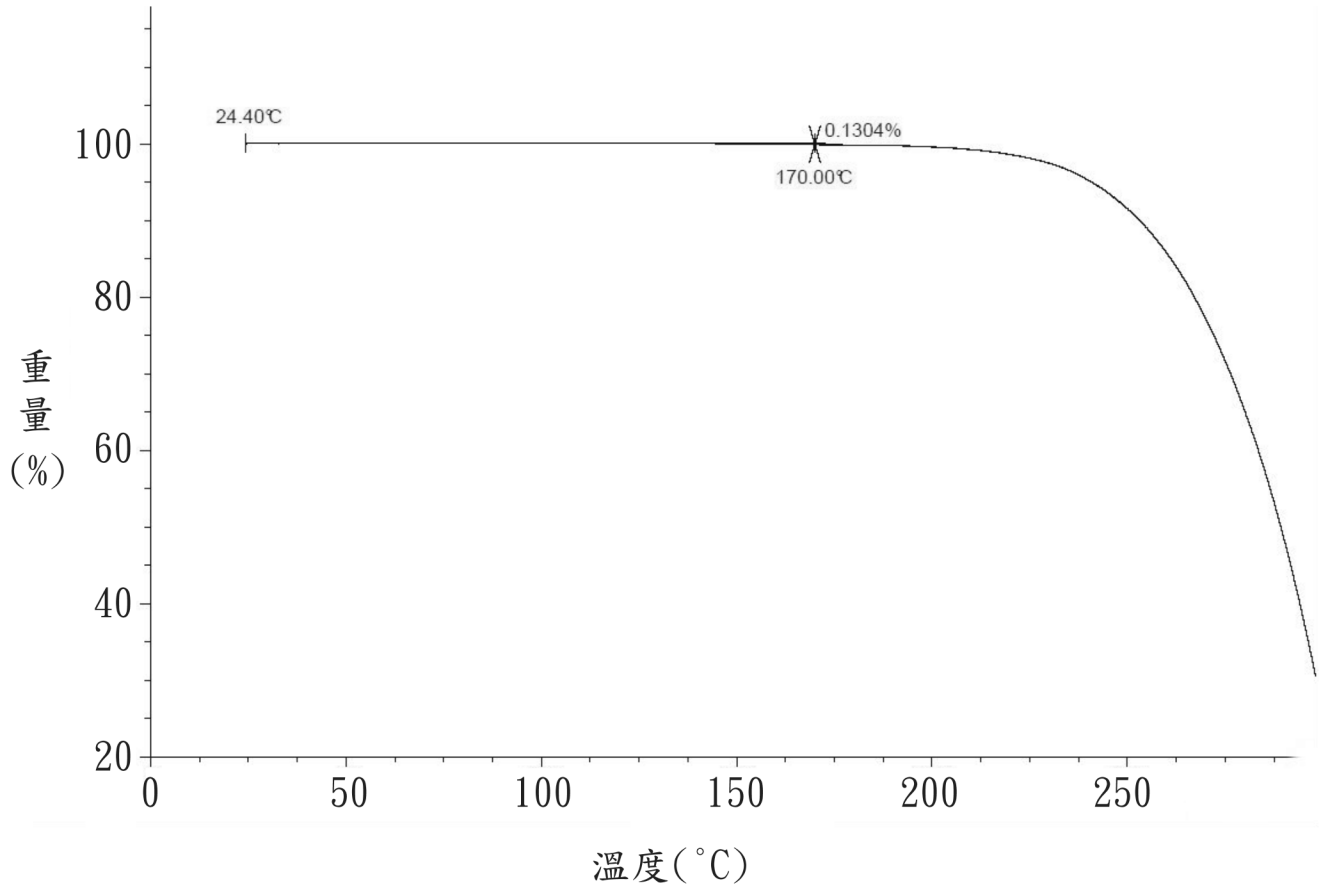


圖3