



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I884890 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 05 月 21 日

(21)申請案號：113147712

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 15 日

(51)Int. Cl.：

*C07D487/04 (2006.01)**A61K31/519 (2006.01)**A61P35/02 (2006.01)*

(30)優先權：2016/08/16

世界智慧財產權組織

PCT/CN2016/095510

(71)申請人：瑞士商百濟神州瑞士有限責任公司 (瑞士) BEIGENE SWITZERLAND GMBH
(CH)

瑞士

(72)發明人：王 志偉 WANG, ZHIWEI (US)；郭運行 GUO, YUNHANG (CN)；史公銀 SHI,
GONGYIN (CN)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：8 共 73 頁

(54)名稱

(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-A]嘧啶-3-甲醯胺的晶型、其製備和用途

(57)摘要

本發明涉及用於抑制 Btk 的(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺的晶型、其製備方法和醫藥組合物，以及上述晶型在治療疾病中的用途或在製備用於治療疾病的藥物中的用途。

The present invention relates to a crystalline form of (S)-7-(1-acryloylpiperidin-4-yl)-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetra-hydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide for inhibiting Btk, methods of preparation thereof and pharmaceutical compositions, and use of the crystalline form above in the treatment of a disease, or in the manufacturing of a medicament for the treatment of a disease.



I884890

【發明摘要】

【中文發明名稱】 (S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-A]嘧啶-3-甲醯胺的晶型、其製備和用途

【英文發明名稱】 CRYSTALLINE FORM OF (S)-7-(1-ACRYLOYLPYPERIDIN-4-YL)-2-(4-PHENOXYPHENYL)-4,5,6,7-TETRAHYDROPYRAZOLO[1,5-A]PYRIMIDINE-3-CARBOXAMIDE, PREPARATION, AND USES THEREOF

【中文】

本發明涉及用於抑制Btk的(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺的晶型、其製備方法和醫藥組合物，以及上述晶型在治療疾病中的用途或在製備用於治療疾病的藥物中的用途。

【英文】

The present invention relates to a crystalline form of (S)-7-(1-acryloylpiperidin-4-yl)-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetra-hydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide for inhibiting Btk, methods of preparation thereof and pharmaceutical compositions, and use of the crystalline form above in the treatment of a disease, or in the manufacturing of a medicament for the treatment of a disease.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 (S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-A]嘓啶-3-甲醯胺的晶型、其製備和用途

【英文發明名稱】 CRYSTALLINE FORM OF (S)-7-(1-ACRYLOYLPYPERIDIN-4-YL)-2-(4-PHENOXYPHENYL)-4,5,6,7-TETRAHYDROPYRAZOLO[1,5-A]PYRIMIDINE-3-CARBOXAMIDE, PREPARATION, AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明涉及(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘓啶-3-甲醯胺的晶型。本發明還涉及製備該晶型的方法以及使用該晶型作為Btk抑制劑的方法。

【先前技術】

【0002】 布魯頓氏酪氨酸激酶(Bruton's酪氨酸激酶, Btk)屬Tec酪氨酸激酶家族(Vetrie et al., Nature 361: 226-233, 1993 ; Bradshaw, Cell Signal. 22: 1175-84, 2010)。Btk主要表現在大部分造血細胞諸如B細胞、肥大細胞和巨噬細胞中(Smith et al., J. Immunol. 152: 557-565, 1994)並位於骨髓、脾和淋巴結組織中。Btk在B-細胞受體(BCR)和FcR信號傳導路徑中發揮重要作用，涉及B-細胞發育、分化(Khan, Immunol. Res. 23: 147, 2001)。Btk由上游Src-家族激酶來激活。一旦激活，Btk轉而將PLC γ 磷醯化，導致對B-細胞功能和存活的作用

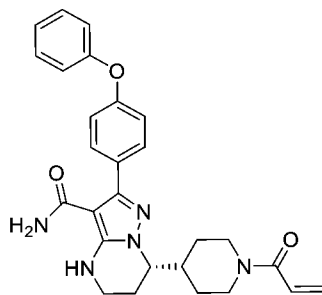
(Humphries et al., *J. Biol.Chem.* 279: 37651, 2004)。

【0003】 此等信號傳導路徑受到精確的調節。編碼Btk的基因中的突變造成成人中的遺傳性B-細胞特異性免疫缺陷疾病，稱為X連鎖無 γ 球蛋白血症(XLA) (Conley et al., *Annu. Rev. Immunol.* 27: 199-227, 2009)。異常的BCR-介導的信號傳導會導致失調的B-細胞活化，導致大量的自體免疫和炎性疾病。臨床前研究顯示Btk缺失的小鼠對發展膠原誘導的關節炎具有抗性。此外，Rituxan，一種消除成熟B-細胞的CD20抗體，其臨床研究揭示了B-細胞在大量炎性疾病諸如類風濕性關節炎、系統性紅斑狼瘡和多發性硬化中的關鍵作用(Gurcan et al., *Int. Immunopharmacol.* 9: 10-25, 2009)。因此，Btk抑制劑可以用來治療自體免疫和及/或炎性疾病。

【0004】 此外，Btk的異常活化在B-細胞淋巴瘤的病因學中發揮重要作用，表明抑制Btk可用於治療惡性血液腫瘤(Davis et al., *Nature* 463: 88-92, 2010)。初步的臨床試驗結果顯示Btk抑制劑PCI-32765有效治療若干種類型的B-細胞淋巴瘤(例如，54th American Society of Hematology (ASH) annual meeting abstract, Dec. 2012: 686 The Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell lymphoma (DLBCL): Interim results of a Multicenter, Open-Label, Phase I Study)。由於Btk在多個信號轉導路徑中作為調節子發揮中心作用，Btk的抑制劑作為抗炎藥及/或抗癌藥受到巨大關注(Mohamed et al., *Immunol. Rev.* 228: 58-73, 2009；Pan, *Drug News perspect* 21: 357-362, 2008；Rokosz et al., *Expert Opin. Ther. Targets* 12: 883-903, 2008；Uckun et al., *Anti-cancer Agents Med. Chem.* 7: 624-632, 2007；Lou et al, *J. Med. Chem.* 55(10): 4539-4550, 2012)。

【0005】 國際申請WO2014173289A披露了一系列的作為Btk抑制劑的稠

合雜環化合物。具體而言，WO2014173289A披露了(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(在下文稱為**化合物1**)



化合物1。

【0006】 **化合物1**是有效的、特異性的和不可逆的BTK激酶抑制劑。在臨床前研究中使用生物化學研究、基於細胞的研究和動物研究生成的資料表明**化合物1**可能在抑制B-細胞惡性腫瘤中的腫瘤生長中提供顯著的益處。由於對於抑制BTK對EGFR、FGR、FRK、HER2、HER4、ITK、JAK3、LCK和TEC，**化合物1**顯示比依魯替尼(ibrutinib)選擇性更大，預期在臨床上比依魯替尼產生更少的副作用。此外，**化合物1**由於其較弱的ITK抑制顯示出對利妥昔單抗誘導的抗原依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)顯著小於依魯替尼，並且因此可在與利妥昔單抗或其他ADCC依賴性抗體組合用於治療B-細胞惡性腫瘤時提供更好的功效。

【0007】 臨床前安全評價證實，在大鼠和犬這兩者高達28天的單劑量和重複劑量毒性研究中，**化合物1**在整體耐受性和嚴重毒性方面比依魯替尼更安全。此外，與依魯替尼所觀察到的相比，**化合物1**具有更好的生物利用度，沒有積累問題。此等獨特的特性保障了在臨床研究中進一步評價**化合物1**。

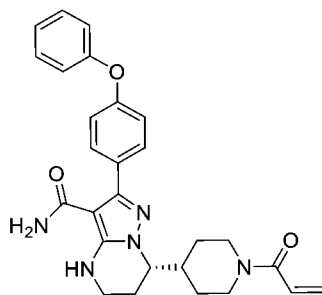
【0008】 然而，根據WO 2014173289A中**化合物27**的製備方法，發現**化合物1**為無定形，這進一步得到了**圖7A**的X射線粉末衍射圖的證實。無定形形式顯示具有低的玻璃轉化為溫度，如**圖7B**所示，表明在以無定形形式進行藥物

配製中存在一些困難，諸如低穩定性和難以純化。因此，有必要開發新形式的**化合物1**，其具有諸如高熔點和更好穩定性的特性，適於藥物配製。

【發明內容】

【0009】 本發明人出人意料地發現**化合物1**的晶型，其具有高熔點並顯示極其穩定的曲線，即使儲存在25°C/60%RH高達24個月或者儲存在40°C/75%RH條件高達6個月也如此。

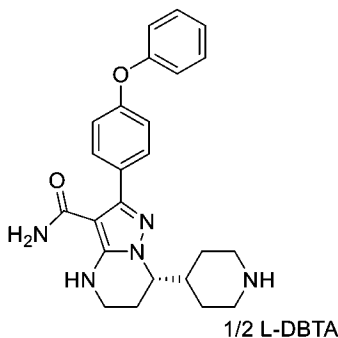
【0010】 在第一態樣，本申請公開了**化合物1**的晶型，



化合物1。

【0011】 在一些實施例中，**化合物1**的晶型為結晶無水物(下文稱為“晶型A”)。

【0012】 在第二態樣，本申請公開了**化合物BG-13**的晶型，其X射線粉末衍射圖與**圖11**基本上一致。

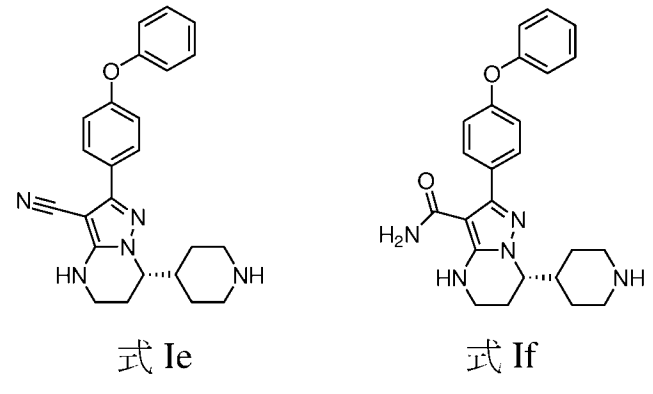


化合物BG-13

【0013】 在第三態樣，本申請公開了**化合物1**的製備方法。

【0014】 本申請還公開了用於製備**化合物1**的式Ie或其鹽、或式If或其鹽

的中間物化合物，



【0015】 在第四態樣，本申請公開了本申請公開的晶型A的製備方法。

【0016】 在第五態樣，本申請公開了醫藥組合物，其包含治療有效量的本申請公開的晶型A。

【0017】 在第六態樣，本申請公開了藉由向受試者給予本申請公開的晶型A在受試者中治療與不期望Btk活性相關的疾病的方法。

【0018】 在第七態樣，本申請公開了藉由向受試者給予本申請公開的晶型A在受試者中治療選自以下的疾病的方法：變應性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其兩種或更多種的組合。

【0019】 在第八態樣，本申請公開了藉由向受試者給予本申請公開的晶型A在受試者中治療選自B-細胞惡性腫瘤或復發性/難治性B-細胞惡性腫瘤的B-細胞增殖性疾病的方法。在該態樣的一些實施例中，本申請公開了藉由向受試者給予本申請公開的晶型A在受試者中治療選自以下的B-細胞增殖性疾病的方法：慢性淋巴細胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、彌散性大B細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病、小淋巴細胞性淋巴瘤、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症、邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病、伯基特樣白血病，或其兩種或更多種的組合。

【0020】 在第九態樣，本申請公開了本申請公開的晶型A在製備治療受試者中與不期望Btk活性相關的至少一種疾病的藥物中的用途。

【0021】 在第十態樣，本申請公開了本申請公開的晶型A在製備治療受試者中選自以下的疾病的藥物中的用途：變應性疾病、自身免疫性疾病、炎症疾病、癌症或其兩種或更多種的組合。

【0022】 在第十一態樣，本申請公開了本申請公開的晶型A在製備治療受試者中選自以下的B-細胞增殖性疾病的藥物中的用途：B-細胞惡性腫瘤或復發性/難治性B-細胞惡性腫瘤。在該態樣的一些實施例中，本申請公開了本申請公開的晶型A在製備治療受試者中選自以下的B-細胞增殖性疾病的藥物中的用途：慢性淋巴細胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤、彌散性大B細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病、小淋巴細胞性淋巴瘤、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症、邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病、伯基特樣白血病，或其兩種或更多種的組合。

【0023】 在第十二態樣，本申請公開了化合物1的晶型A的製備方法，包括將化合物1的無定形形式與以下溶劑體系混合，以形成澄清溶液；將該溶液保持在室溫，或者伴隨或不伴隨攪拌加熱一段時間，以使晶型A析出，其中所述溶劑體系為：

乙酸乙酯:己烷 = 1:0.6-0.7體積比；

乙酸乙酯:庚烷 = 1:0.6-0.7體積比；

乙酸乙酯:環己烷 = 1:0.6-1.2體積比；

乙酸甲酯:己烷 = 1:0.6-1.2體積比；

甲苯:己烷 = 1.0:0.2-0.4體積比；

甲苯:環己烷 = 1.0:0.1-0.2體積比；

乙酸甲酯:環己烷 = 0.6-0.8:1.0體積比；

IPAC:環己烷 = 1.0:0.2-1.0體積比；或

乙酸異丁酯:環己烷 = 1.0:0.2-1.0體積比。

【0024】 在一個實施例中，化合物1的無定形形式的ee值大於90%。在另一實施例中。化合物1的無定形形式的ee值為97%。

【圖式簡單說明】

【0025】 [圖1]示出晶型A的XRPD圖。

【0026】 [圖2]示出晶型A的DSC曲線。

【0027】 [圖3]示出晶型A的TGA曲線。

【0028】 [圖4]示出晶型A的¹H-NMR。

【0029】 [圖5]示出晶型A的¹³C-NMR。

【0030】 [圖6]示出結晶A的DVS圖。

【0031】 [圖7A]示出化合物1的無定形形式的XRPD的圖。

【0032】 [圖7B]示出化合物1的無定形形式的mDSC曲線，示出無定形形式的玻璃轉化溫度為79.7°C (中間點溫度)。

【0033】 [圖8]示出BG-13的單晶的絕對結構。

【0034】 [圖9]圖示說明BG-13的單晶的氫鍵。

【0035】 [圖10]示出BG-13的單晶的晶體堆積。

【0036】 [圖11]示出BG-13的單晶的XRPD圖。

【實施方式】

【0037】 本發明人出人意料地發現晶體形式的化合物1，即晶型A，僅能在特定的條件下獲得，取決於起始物質的ee值和共溶劑的比例，等等。還藉由以下方法實施多晶型物研究：緩慢蒸發、反溶劑添加、緩慢冷卻、蒸發擴散和聚合物誘導的結晶。大部分實驗不能得到晶型，這表明晶型A的獲得不是簡單直接的。

【0038】 進一步表徵結果揭示晶型A為熔點 $139.4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (起始溫度)的無水物。為了評價穩定性，晶型A的樣品於 80°C 儲存2天， $25^{\circ}\text{C}/60\%\text{RH}$ 儲存多達24個月或 $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$ 條件多達6個月，並且以穩定性測試之前、期間和之後藉由XRPD表徵。結果顯示對於上述所有時段沒有觀察到晶型變化，表明晶型A於 80°C 或儲存於 $25^{\circ}\text{C}/60\%\text{RH}$ 多達24個月並於 $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$ 條件多達6個月的物理穩定性好。

【0039】 在一些實施例中，晶型A的X射線粉末衍射圖包含具有獨立選自以下 2θ 角度值的衍射峰：約 $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.4 \pm 0.2^{\circ}$ 和 $21.4 \pm 0.2^{\circ}$ 。

【0040】 在一些實施例中，晶型A的X射線粉末衍射圖包含具有獨立選自以下 2θ 角度值的衍射峰：約 $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.6 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.4 \pm 0.2^{\circ}$ 和 $21.4 \pm 0.2^{\circ}$ 。

【0041】 在一些實施例中，晶型A的X射線粉末衍射圖包含具有獨立選自以下 2θ 角度值的衍射峰：約 $12.2 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $12.9 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.6 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.4 \pm 0.2^{\circ}$ 和 $21.4 \pm 0.2^{\circ}$ 。

【0042】 在一些實施例中，晶型A的X射線粉末衍射圖包含具有獨立選自以下 2θ 角度值的衍射峰：約 $12.2 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $12.9 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.6 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.4 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $17.7 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $18.5 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $20.7 \pm 0.2^{\circ}$ 和 $21.4 \pm 0.2^{\circ}$ 。

【0043】 在一些實施例中，晶型A的X射線粉末衍射圖基本上與圖1一致。

【0044】 在一些實施例中，晶型A的X射線粉末衍射圖總結在表1中。

【0045】 表1 晶型A的X射線衍射圖

峰#	衍射角(2-θ)	間距	相對強度
1	5.432	16.26908	7.37
2	10.799	8.19295	2.40
3	12.188	7.26191	13.19
4	12.942	6.84040	13.51
5	14.820	5.97780	28.09
6	15.587	5.68534	19.63
7	16.350	5.42177	29.30
8	17.662	5.02158	13.62
9	18.452	4.80853	11.39
10	18.689	4.74791	8.26
11	20.729	4.28515	11.07
12	21.420	4.14847	100.00
13	22.035	4.03409	7.59
14	22.864	3.88958	6.70
15	23.684	3.75673	5.24
16	25.111	3.54646	2.43
17	26.525	3.36044	5.13
18	26.906	3.31381	6.41
19	27.126	3.28741	6.92
20	29.641	3.01393	4.61
21	30.755	2.90724	2.58
22	36.421	2.46692	1.29

【0046】 在一些優選的實施例中，晶型A的熔點為139 ±2℃ (起始溫度)。

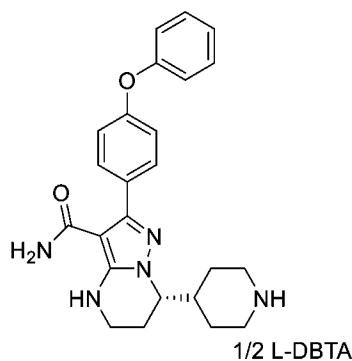
【0047】 在一些優選的實施例中，晶型A的DSC基本上與圖2一致。

【0048】 在一些優選的實施例中，晶型A的TGA基本上與圖3一致。

【0049】 在一些實施例中，晶型A是難吸濕的(slightly hygroscopic)。在一些實施例中，晶型A是未溶劑化的。

【0050】 在一些實施例中，晶型A在於40℃ 和75% RH儲存多達6個月後具有基本上相同的X射線粉末衍射(XRPD)圖。在一些實施例中，晶型A在於25℃ 和60% RH儲存多達24個月後具有基本上相同的X射線粉末衍射(XRPD)圖。

【0051】 本申請還公開了化合物BG-13的晶型，其X射線粉末衍射圖基本上與圖11一致，



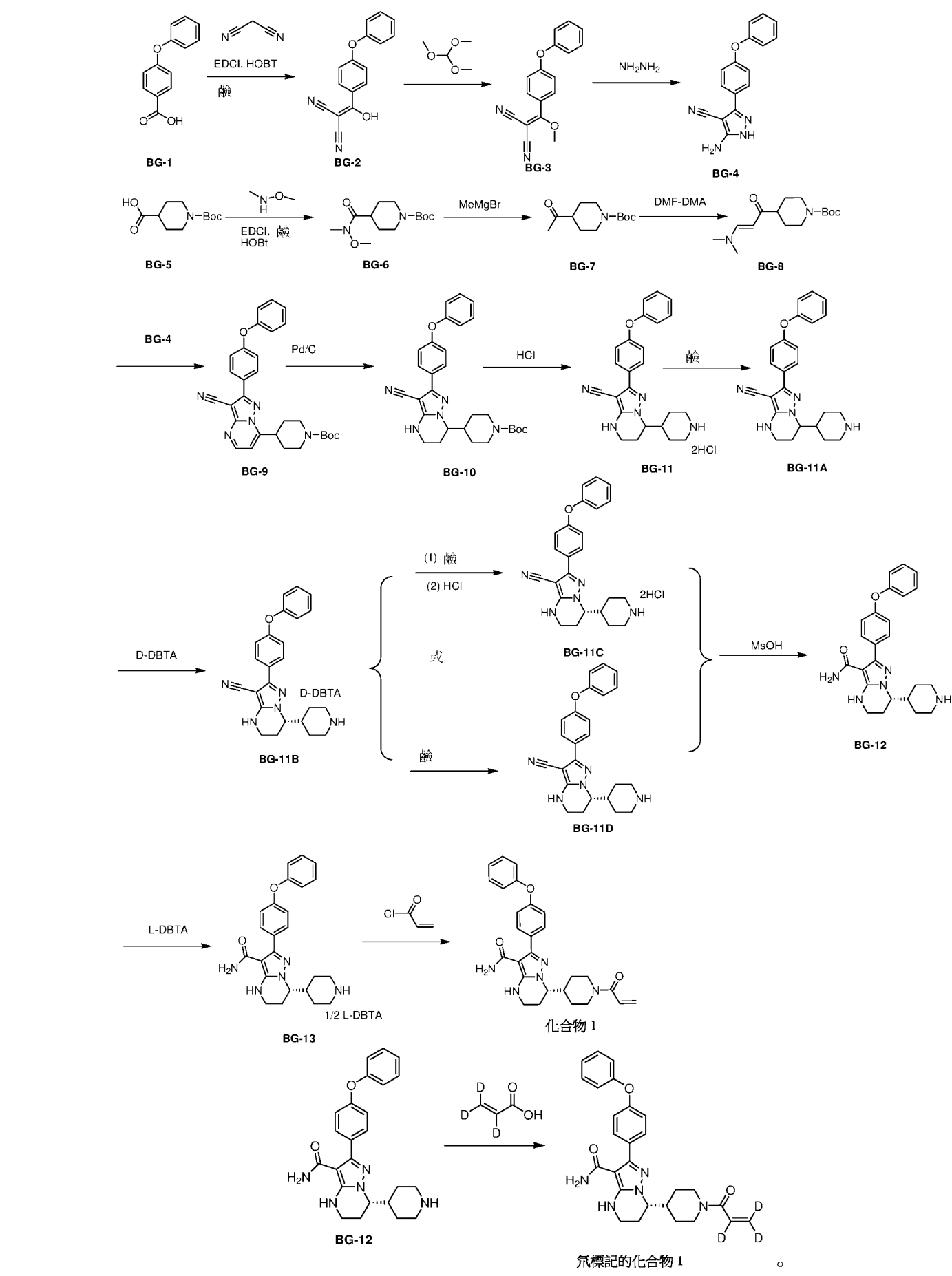
化合物BG-13。

【0052】 在一些實施例中，**BG-13**的晶型為單晶，其晶胞尺寸(unit cell dimension)包括 $a = 16.7939(4)\text{\AA}$ ， $b = 7.9871(2)\text{\AA}$ ， $c = 23.5438(5)\text{\AA}$ ， $\alpha = 90.00^\circ$ ， $\beta = 108.0460(10)^\circ$ ， $\gamma = 90.00^\circ$ 。

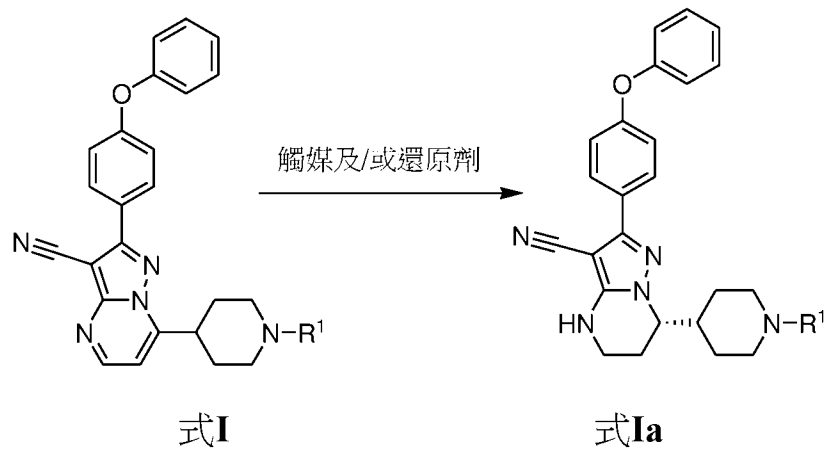
【0053】 本發明人從中間物**BG-13**的單晶X射線結構分析推斷**化合物1**的絕對組態為S。

【0054】 本申請還公開了**化合物1**和氬標記的**化合物1**的製備方法，諸如在**方案1**中描述的操作。**化合物1**經由本申請公開的晶型A的新合成方法和結晶/重結晶操作克服了许多與前述報道的�方法相關的許多問題，諸如製備光學純度 $>98\%$ 的關鍵對掌性中間物，改善**化合物1**的純度以達到說明書中的驗收標準，控制**化合物1**中的雜質並提供相對於現有方法的許多優勢。值得注意的是，本申請公開的方法尤其適於以高品質和高收率可重複地以商業規模製備**化合物1**。在備選方法中，方案1中的BG-9或其類似物能夠被以低至出色的對映選擇性不對稱地還原(5% ee.至95% ee)。其他步驟的方法類似於方案1中所列的彼等。

【0055】 **方案1: 製備化合物1和氬標記的化合物1**



【0056】 本申請還公開了製備式**Ia**化合物的方法，包括在觸媒及/或還原劑的存在下不對稱還原式**I**化合物以製備式**Ia**化合物，



其中R¹為氫或者胺基保護基團。

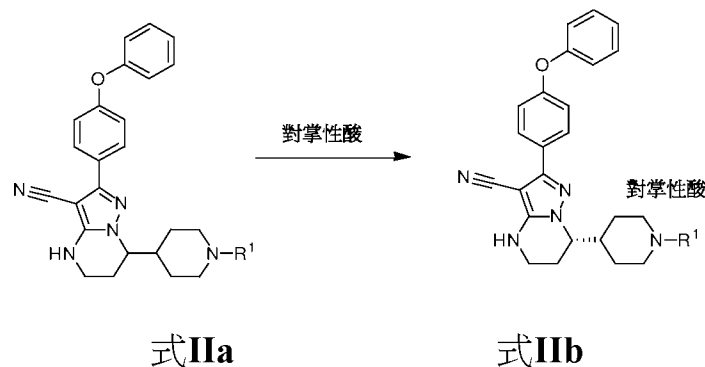
【0057】 在一些實施例中，胺基保護基團包括但不限於乙醯基、丙醯基、丁醯基、苯基乙醯基、苯甲醯基、甲苯醯基、苯氧基乙醯基(POA)、甲氧基羰基、乙氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、叔丁基氧基羰基(BOC)、2-碘乙氧基羰基、苄氧羰基(CBZ)、4-甲氧基苄基氧基羰基、(苈-9-基甲氧基)羰基(Fmoc)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺醯基(Mtr)、苄基、甲基或4-甲氧基苄基。

【0058】 在一些實施例中，所述觸媒為中性觸媒體系或陽離子型觸媒體系。在一些優選的實施例中，所述觸媒為銱觸媒體系，包括但不限於 [Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-MeO-Biphep、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Binap、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Tol-Binap、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-xyl-Binap、[Ir(COD)Cl]₂/(S,S或R,R)-Diop、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-P-Phos、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Tol-P-Phos、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-Xyl-P-Phos、[Ir(COD)Cl]₂/(R,R或S,S)-Me-DuPhos、[Ir(COD)Cl]₂/(R或S)-SegPhos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Ship、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Siphos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Siphos-PE、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-MonoPhos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-tol-SDP、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(S,S或R,R)-Diop、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(S,R或R,S)-Josiphos、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Binap、[Ir(μ-

Cl)(cod)]₂/(R或S)-MeO-Biphep、[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Synphos或[Ir(μ-Cl)(cod)]₂/(R或S)-Difluorophosor [Ir(cod)₂]⁺X⁻ (X: 例如BF₄、NO₃、OTf、PF₆、SbF₆和BarF)加如上所述的相關配位體(Wen-Bo et al., *J. AM. CHEM. SOC.* 125, 10536-10537 2003. Damien et al., *J. Org. Chem.* 77, 4544-4556, 2012. Milos et al., *Org. Process Res. Dev.* 16, 1293-1300, 2012.)；銦觸媒體系，包括但不限於[Rh(COD)₂][BF₄]加如上所述的配位體(Xiang-Ping et al., *Top Organomet Chem* 36, 313-354, 2011)；或鈦觸媒體系包括但不限於RuCl₂(R或S)-BINAP/(R或S)-DAIPEN、RuCl₂(R或S)-BINAP/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(S或R)-BINAP (S,S或R,R)-DACH、RuCl₂[(R或S)-Tol-BINAP][(S,S或R,R)-DPEN]、RuCl₂(R,R或S,S)-Me-DuPHOS/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R,R或S,S)-Et-DuPHOS/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R,R或S,S)-Et-DuPHOS/(R,R或S,S)-DACH、RuCl₂(S,S或R,R)-i-Pr-DuPHOS/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R或S)-HexaPHEMP/(R,R或S,S)-DPEN、RuCl₂(R或S)-MeO-BIPHEP/(R,R或S,S)-DPEN (Christopher et al., *Adv. Synth. Catal.* 345, 195-201, 2003. Julian et al., *Adv. Synth. Catal.* 345, 300-307, 2003.)。

【0059】 發現上述方法藉由使用上述觸媒、尤其是中性或陽離子型銦觸媒體系產生了出色的高達95% ee的對映選擇性。

【0060】 本申請還公開了拆分式IIa化合物以製備式IIb化合物或改善式IIb化合物的對掌性純度的方法，包括以對掌性酸處理外消旋的式IIa化合物，

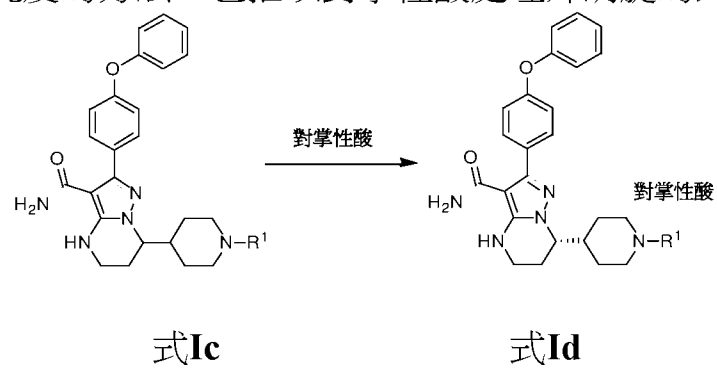


其中R¹為氫、甲基、苄基、4-甲氧基苄基或其他如上所述的習知胺基保護基

團。

【0061】 在一些實施例中，對掌性酸包括但不限於L-蘋果酸、D-蘋果酸、L-扁桃酸、D-扁桃酸、L-樟腦磺酸、D-樟腦磺酸、L-酒石酸、D-酒石酸、L-DBTA、D-DBTA、L-DTTA或D-DTTA。

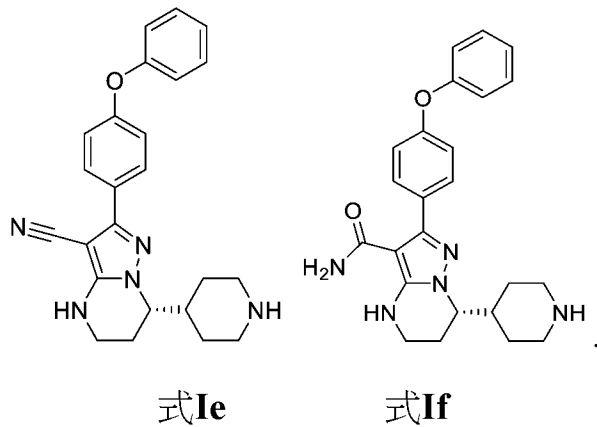
【0062】 本申請還公開了拆分式**1c**化合物以製備式**1d**化合物或改善式**1d**化合物的對掌性純度的方法，包括以對掌性酸處理外消旋的式**1c**化合物，



其中R¹為氫、甲基、苄基、4-甲氧基苄基或其他如上所述的習知胺基保護基團。

【0063】 在一些實施例中，對掌性酸包括但不限於L-蘋果酸、D-蘋果酸、L-扁桃酸、D-扁桃酸、L-樟腦磺酸、D-樟腦磺酸、L-酒石酸、D-酒石酸、L-DBTA、D-DBTA、L-DTTA或D-DTTA。

【0064】 本申請還公開了用於製備**化合物1**的式**1e**化合物或其鹽或者式**1f**化合物或其鹽，



【0065】 此外，本申請還提供了晶型A的製備方法。本申請公開的晶型

可藉由從包含至少一種溶劑的合適溶劑體系中結晶本申請公開的化合物來製備，這可藉由自發性析出(蒸發)、冷卻及/或添加反溶劑(其中本申請公開的化合物具有相對較低的溶解度)以實現溶劑體系中的過飽和來實現。結晶還可藉由使用或不使用適於結晶本申請公開的晶型的晶種來實現。

【0066】 在一些實施例中，晶型A的製備方法包括以下步驟：將(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡啶並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(化合物1)溶解在DCM中，交換為溶劑EA，從EA/MTBE中重結晶，得到目標晶型。

【0067】 在一些實施例中，晶型A的製備方法包括以下步驟：將化合物1溶解在EA中，添加己烷，得到目標晶型。

【0068】 在一些實施例中，晶型A的製備方法藉由將反溶劑添加至固體化合物1或粗制晶型A在用於溶解該固體的溶劑中的溶液來實現，其中所述反溶劑包括但不限於H₂O和正庚烷，並且用於溶解固體的溶劑包括但不限於丙酮、DMAc、EtOAc、DCM、甲苯和2-MeTHF。

【0069】 在一些實施例中，晶型A的製備方法藉由將化合物1或粗制晶型A在溶劑中的溶液添加至反溶劑，並允許足夠的時間使得有機物蒸發從而與密封反應器中的溶液相互作用來實現，其中所述溶劑包括但不限於丙酮和EtOAc，並且所述反溶劑包括但不限於正庚烷。

【0070】 本申請還公開了一種醫藥組合物，其包含治療有效量的晶型A和醫藥上可接受之賦形劑。在一些實施例中，醫藥組合物用於口服給予。在一些優選的實施例中，醫藥組合物包含1 wt%至99 wt%的晶型A。在一些更優選的實施例中，醫藥組合物包含1 wt%至70 wt%的晶型A。在一些最優選的實施例中，醫藥組合物包含10 wt%至30 wt%的晶型A。

【0071】 本發明還提供了藉由向受試者給予晶型A在受試者中治療或預

防與不期望Btk活性相關的疾病的方法。

【0072】 本發明還提供了藉由向受試者給予晶型A在受試者中治療或預防選自以下疾病的方法：變應性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其兩種或更多種的組合。

【0073】 本發明還提供了藉由向受試者給予晶型A在受試者中治療或預防B-細胞增殖性疾病的方法。

【0074】 在一些實施例中，所述B-細胞增殖性疾病為B-細胞惡性腫瘤，包括但不限於淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、彌散大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、濾泡型淋巴瘤(FL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(WM)、邊緣區淋巴瘤(MZL)、毛細胞白血病(HCL)、伯基特樣白血病(BL)。

【0075】 在一些實施例中，所述B-細胞增殖性疾病為復發性/難治性(R/R) B-細胞惡性腫瘤，包括但不限於R/ R MCL、R/R CLL、R/R SLL、R/R WM。

【0076】 本申請公開的晶型A可用於製備在受試者中治療至少一種與不期望Btk活性相關的疾病的藥物。

【0077】 本申請公開的晶型A可用於製備在受試者中治療選自以下的疾病的藥物：變應性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、癌症或其兩種或更多種的組合。

【0078】 本申請公開的晶型A可用於製備在受試者中治療選自以下的B-細胞增殖性疾病的藥物：B-細胞惡性腫瘤或復發性/難治性B-細胞惡性腫瘤。

【0079】 最新的臨床試驗持續證實化合物1在未經治療(TN)和復發性/難治性(R/R) B-細胞惡性腫瘤中(例如在WM中)耐受性良好，在可評價的42名患者群體中具有超過40%的非常好的部分響應(VGPR)率並且以12.3個月的平均隨訪時間在42名功效可評價患者中具有90%的總響應率(ORR)，並且在CLL/SLL

中，在功效評價的10.5個月的平均隨訪時，總響應率高(94%)且治療中斷率非常低(3%)。

定義

【0080】 除非在本文件中另外具體指定，否則本申請所使用的所有其他技術和科學術語具有本發明所屬領域的技術人員通常理解的含義。

【0081】 本申請包括請求項使用的，單數形式的詞語諸如“一”、“一種”和“所述”，包括它們對應的複數指代，除非上下文清楚地表明相反情況。因此，例如，提及“晶型”包括一個或多個這樣不同的晶型並且提及“所述方法”包括提及本領域普通技術人員已知的等同步驟和方法，其可經改良或代替本申請所述的方法。

【0082】 本申請公開的晶型為大致純的結晶。本申請使用的術語“大致純的”是指至少85 wt%、優選至少95 wt%、更優選至少99 wt%的本申請公開的晶型A。

【0083】 對於本申請公開的晶型，僅總結了**主峰**(即，最具有特徵性的、顯著的、獨特的及/或可重複的峰)；其他峰可藉由習知方法從衍射圖譜獲得。上述主峰可在誤差界限的範圍內重複(在最後給出的小數位 ± 2 ，或者在所給值 ± 0.2)。

【0084】 本申請公開的“**X射線粉末衍射圖與圖1基本上一致**”是指示出如**圖1**中主峰的X射線粉末衍射圖，其中主峰是指彼等相對強度大於10%、優選大於20%的峰，相對於**圖1**中的最高峰(其相對強度標記為100%)而言。

【0085】 在以下整個說明書和申請專利範圍中，除非上下文有其他要求，否則術語“**包含**”及變體諸如“含有”和“包括”，將會被理解為隱含包括所述整數或步驟或者整數或步驟的集合，但是不排除任何其他整數或步驟或者整數或步驟的集合。當本申請使用時，術語“包含”可替換為術語“含有”，或有時在

使用時可替換為術語"具有"。

【0086】 本申請使用的術語“**治療有效量**”是指在給予受試者治療疾病或者疾病或病症的至少一種臨床症狀時，足以影響該疾病、病狀或症狀的治療的化合物的量。“治療有效量”可隨化合物，疾病，病症，及/或疾病或病症的症狀，疾病或病症的嚴重程度，及/或疾病或病症的症狀，待治療受試者的年齡，及/或待治療受試者的重量而變化。在任何給定情況中的適當量對於本領域技術人員是顯而易見的或者可藉由習知實驗確定。在聯合療法的情況中，“**治療有效量**”是指有效治療疾病、病症或病況的組合對象的總量。

【0087】 包含本申請公開的化合物的醫藥組合物可經口服、吸入、直腸、腸胃外或局部給予有此需要的受試者。對於口服給予，醫藥組合物可為規則固體製劑諸如片劑、粉劑、顆粒劑、膠囊等，液體製劑諸如水或油懸浮液或其他液體製劑諸如糖漿、溶液、懸浮液等；對於腸胃外給予，醫藥組合物可為溶液、水溶液、油懸浮液濃縮物、凍乾粉末等。優選地，醫藥組合物的製劑選自片劑、包衣片劑、膠囊、栓劑、鼻噴霧或注射劑，更優選片劑或膠囊。醫藥組合物可為具有精確劑量的單個單元給予。此外，醫藥組合物可進一步包含額外的活性成分。

【0088】 本申請公開的醫藥組合物的所有制劑都可藉由製藥領域的習知方法製備。例如，活性成份可與一種或多種賦形劑混合然後製備所需的製劑。“**醫藥上可接受之賦形劑**”是指適於所需藥物製劑的習知藥物載體，例如：稀釋劑，媒劑諸如水、各種有機溶劑等，填充劑諸如澱粉、蔗糖等，粘合劑諸如纖維素衍生物、藻酸鹽、明膠和聚乙烯吡咯啉酮(PVP)；潤濕劑諸如甘油；崩解劑諸如瓊脂、碳酸鈣和碳酸氫鈉；吸收增強劑諸如季銨化合物；界面活性劑諸如十六醇；吸收載體諸如高嶺土和皂粘土；潤滑劑諸如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、聚乙二醇等。此外，醫藥組合物進一步包含其他醫藥上可接受之賦形劑

諸如分散劑(decentralized agent)、穩定劑、增稠劑、絡合劑、緩衝劑、滲透促進劑、聚合物、芳香化合物、增甜劑和染料。

【0089】 術語“**疾病**”是指任何病、不適、恙、症狀或適應症，並且可與術語“**病症**”或“**病況**”互換使用。

【0090】 縮寫：

AcOH	乙酸
AEs	不利事件
BID	一天兩次
CLL	慢性淋巴細胞性白血病
Con.	濃的
D-DBTA	(2S, 3S)-二苯甲醯基酒石酸
DDQ	2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌
DCM	二氯甲烷
DIEA	<i>N,N</i> -二異丙基乙胺
DLBCL	彌散性大 B 細胞淋巴瘤
DMAc	<i>N,N</i> -二甲基乙醯胺
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲醯胺
DMF-DMA	<i>N,N</i> -二甲基甲醯胺二甲基乙縮醛
DMSO	二甲基亞砷
DSC	差示掃描量熱法
DVS	動態蒸氣吸附
EA	乙酸乙酯, EtOAc
EDCI	1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺
EtOH	乙醇
FL	濾泡性淋巴瘤
GC	氣相層析
GCMS	氣相層析-質譜
HOAc	乙酸
HOBt	羥基苯並三唑
HPLC	高效液相層析
IPA	異丙醇
IPAc	乙酸異丙酯
IPC	過程控制
KF	Karl-Fischer
L-DBTA	(2R, 3R)-二苯甲醯基酒石酸
LOQ	偵測限
MCL	套細胞淋巴瘤
MeCN 或 ACN	乙腈

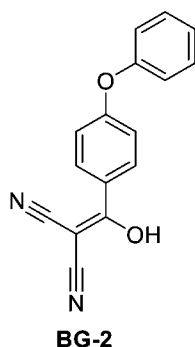
MeMgBr	甲基溴化鎂
MeOH	甲醇
2-MeTHF	2-甲基四氫呋喃
MIBE	4-甲基-2-戊酮
MsOH	甲磺酸
MTBE	甲基叔丁基醚
NHL	非霍奇金淋巴瘤
NLT	不少於
NMP	1-甲基-2-吡咯啉酮
NMR	核磁共振
NMT	不超過
ORR	總響應率
Pd	鈀
pH	氫離子濃度
POA	苯氧基乙醯基
QD	一天一次
RH	相對濕度
SLL	小淋巴細胞性淋巴瘤
RT	室溫
TEA	三乙胺
TGA	熱重分析
THF	四氫呋喃
TN	未經治療
VGPR	非常好的部分響應
XRPD	X 射線粉末衍射
WM	瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症

實例

【0091】 本發明進一步由說明本發明的以下實例進行示例性說明，但是並不受其限制。

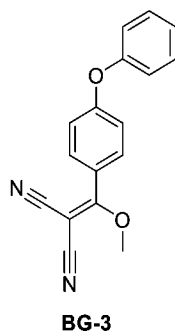
實例1 製備(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡啶並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(化合物1)及其晶型A

步驟1：合成BG-2



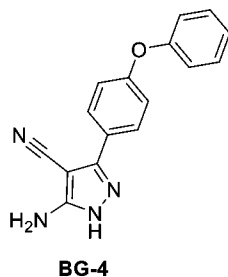
【0092】 在氮氣氣氛下，于10℃向EA (5 v)、HOBT (1.2當量)、EDCI (1.2當量)、4-苯氧基苯甲酸(BG-1, 80 Kg, 1.0當量)和丙二腈(1.2當量)的溶液添加TEA (2.4當量)。然後混合物於室溫攪拌直到反應完成。混合物然後離心且濾餅以EA洗滌。濾液以NaHCO₃水溶液洗滌兩次並以NH₄Cl洗滌。有機相以1.5 N H₂SO₄洗滌兩次並攪拌。從甲醇和純化水濃縮，析出。固體藉由離心收集並經真空乾燥。如此得到79.9 Kg的BG-2。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.46-7.38 (m, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H)。

步驟2：合成BG-3



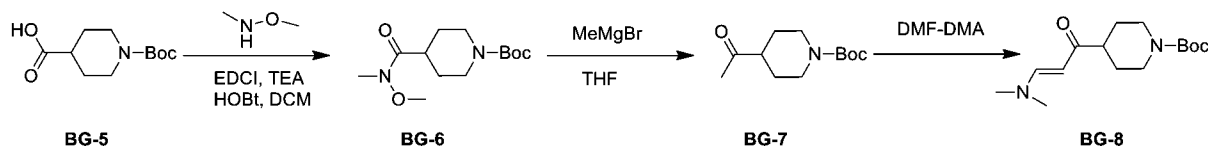
【0093】 在氮氣氣氛下，於85℃將BG-2 (79.9 kg, 1.0當量)在MeCN (5.0 v)中的溶液添加至三甲氧基甲烷(12.0 v)。攪拌所得混合物直到反應完成。取樣用於HPLC分析。真空濃縮。殘餘物從*i*-PrOH和己烷中析出。混合物經離心，且濾餅以己烷洗滌並經真空乾燥。如此得到71.7 Kg的產物。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.52-7.45 (m, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.22-7.06 (m, 4H), 3.93 (s, 3H)。

步驟3：合成BG-4



【0094】 在氮氣氣氛下，於低於15°C向反應器中，向BG-3 (71.6 kg, 1.0當量)在乙醇(2.5 v)中的溶液滴加氫氧化胂(1.0當量)在乙醇(0.6 v)中的溶液。將溶液加熱至室溫並攪拌直到反應完成。將水(4.0 v)添加至反應器。溶液然後冷卻至5°C，離心且濾餅以水(1.0 v)洗滌。濾餅真空乾燥。如此得到66.9 Kg的產物。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12.11 (br s, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.46-7.39 (m, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.12-7.04 (m, 4H), 6.43 (br s, 2H)。

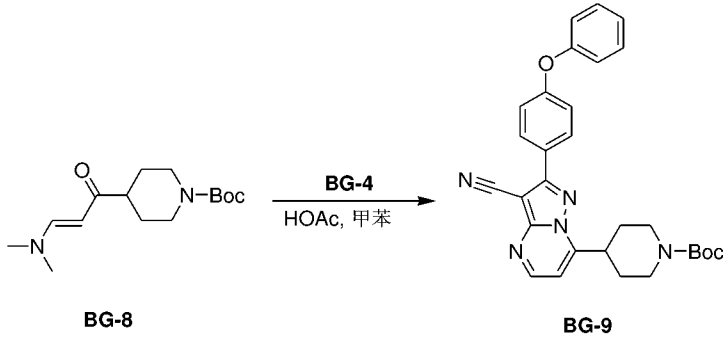
步驟4至6：合成BG-8



【0095】 于低於15°C，向DCM (8.0 v)、BG-5 (80.0 Kg, 1.0當量)、*N,O*-二甲基羥基胺鹽酸鹽(1.2當量)、HOBt (1.2當量)和EDCI (1.2當量)的混合物中滴加TEA (2.6當量)。混合物於室溫攪拌直到反應完成，離心且濾餅以DCM (1.0 v)洗滌兩次。濾液以20% NH₄Cl水溶液(3 × 4.0 v)洗滌。濾液經真空濃縮得到粗產物BG-6，其不經進一步純化用於後續步驟。殘餘物溶解在甲苯(5.0 v)和THF (1.0 v)中，冷卻至10°C，於10°C滴加MeMgBr (1.4當量)且然後於室溫攪拌直到反應完成。溶液冷卻至低於10°C。於低於10°C滴加飽和NH₄Cl水溶液。混合物經離心、分離、過濾，且有機相以NaCl水溶液洗滌兩次。有機相經濃縮得到粗產物，其不經進一步純化用於後續步驟。在DMF (2.5 v)和DMF-DMA (2.5 v)中的殘餘物於110°C攪拌直到反應完成。反應混合物經冷卻，濃縮且然後添加

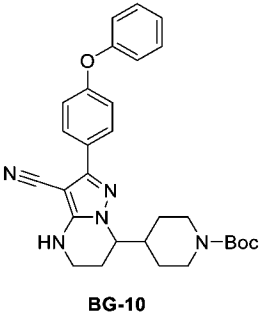
DCM。最終混合物以飽和NH₄Cl水溶液洗滌。有機層經濃縮並藉由添加己烷而析出。混合物經離心且收集濾餅。濾餅經真空乾燥。如此得到82.2 Kg的期望產物。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7.49 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 5.01 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.99-3.82 (m, 2H), 3.14-2.94 (m, 2H), 2.89-2.61 (m, 6H), 2.49-2.37 (m, 1H), 1.66-1.56 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.39-1.20 (m, 2H)。

步驟7：合成BG-9



【0096】 在氮氣氣氛下，將甲苯(8.0 v)、AcOH (0.5 v)、BG-8 (1.2當量)和BG-4 (66.9 Kg 1.0當量)的混合物加熱至95°C並攪拌直到反應完成。混合物經冷卻，濃縮並從甲醇中析出。混合物經離心且濾餅以甲醇洗滌。濾餅經真空乾燥。如此得到107.8 Kg的產物。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8.78 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 8.15-8.07 (m, 2H), 7.51-7.41 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.27-7.19 (m, 3H), 7.17-7.10 (m, 2H), 4.24-4.02 (m, 2H), 3.81-3.69 (m, 1H), 3.12-3.82 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.76-1.60 (m, 2H), 1.43 (s, 9H)。

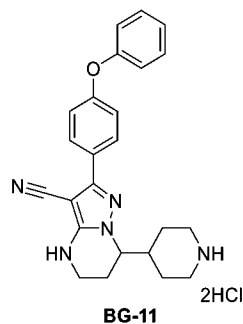
步驟8：合成BG-10



【0097】 在N₂下，向THF (10.0 v)、BG-9 (13.0 Kg, 1.0當量)和D-DBTA (1.0當量)的混合物添加Pd/C (10% w/w)，將氫氣引入反應器且將氫氣壓力保持至1.8

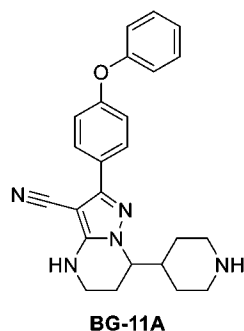
MPa。反應器緩慢地加熱至40℃並攪拌直到反應完成。混合物然後經冷卻，過濾，且濾餅以THF洗滌。濾液經收集並真空濃縮。添加DCM。殘餘物經NaHCO₃水溶液洗滌，濃縮並從MTBE和己烷中析出，然後離心。收集濾餅並真空乾燥，得到期望化合物(收率：94.8%和純度：98.5%)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.82-7.76 (m, 2H), 7.56-7.51 (m, 1H), 7.45-7.37 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 4.09-3.91 (m, 3H), 3.30-3.22 (m, 2H), 2.82-2.55 (m, 2H), 2.18-1.99 (m, 2H), 1.98-1.86 (m, 1H), 1.69-1.58 (m, 1H), 1.56-1.45 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.32-1.13 (m, 2H)。

步驟9：合成BG-11



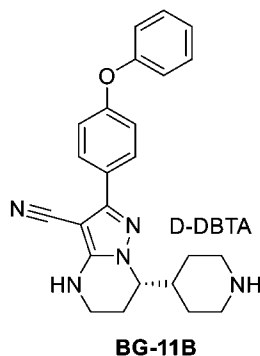
【0098】 在氮氣氣氛下，向BG-10 (100.0 Kg 1.0當量)在DCM (6.0 v)中的溶液中滴加HCl/EtOH (20.9% w/w, 2.0 v)。攪拌混合物直到反應完成。將MTBE (4.0 v)添加至溶液，冷卻。各濾餅藉由離心收集並以己烷(2.0 V)洗滌，然後濾餅在己烷(5 v)中漿料化，並再次離心。濾餅以己烷(2.0 V)洗滌並經真空乾燥。如此得到85.2 Kg的產物。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 9.25-8.85 (m, 2H), 7.84-7.70 (m, 2H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 5.73 (br s, 2H), 4.12-4.03 (m, 1H), 3.25-3.19 (m, 4H), 2.90-2.73 (m, 2H), 2.28-2.12 (m, 1H), 2.10-2.00 (m, 1H), 1.99-1.86 (m, 1H), 1.84-1.52 (m, 4H)。

步驟10：合成BG-11A



【0099】 BG-11 (85.0 Kg, 1.0當量)在水(6.0 v)和NaOH (3.0當量)中的混合物在室溫攪拌直到反應完成。收集濾餅並在MTBE (6.0 v)漿料化。混合物然後離心以收集濾餅。濾餅經真空乾燥。如此得到71.3 Kg產物。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.82-7.74 (m, 2H), 7.54-7.49 (m, 1H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.12-7.04 (m, 4H), 4.03-3.95 (m, 1H), 3.29-3.21 (m, 2H), 3.00-2.87 (m, 2H), 2.46-2.31 (m, 2H), 2.11-1.83 (m, 3H), 1.58-1.12 (m, 4H)。

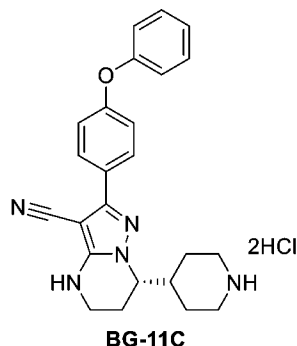
步驟11：合成BG-11B



【0100】 在氮氣氣氛下，將乙醇/水/乙酸(7:3:1, 46 v)和BG-11A (30 kg, 1.0當量)在反應器中的混合物加熱至70±5℃，然後伴隨不小於65℃的溫度滴加D-DBTA (1.20當量)在乙醇/水/乙酸(7:3:1, 4 v)中的溶液。所得溶液於60-65℃攪拌16小時，然後冷卻至室溫。藉由離心收集固體並且以乙醇(2.0 v)洗滌。濾餅在乙醇/水/AcOH (7:3:1, 20 v)的混合溶劑中於55℃漿料化16小時並冷卻至室溫。固體藉由離心收集，並以乙醇(2.0 v)洗滌。濾餅經真空乾燥(收率：37.9%)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.76 (br s, 2H), 7.99-7.89 (m, 4H), 7.83-7.75 (m, 2H), 7.66-7.57 (m, 3H), 7.52-7.45 (m, 4H), 7.45-7.39 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.13-7.03 (m, 4H),

5.64 (s, 2H), 4.08-4.00 (m, 1H), 3.29-3.19 (m, 4H), 2.85-2.72 (m, 2H), 2.21-1.40 (m, 7H)。

步驟12：合成BG-11C

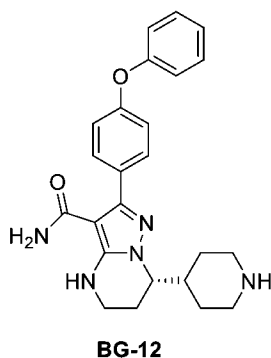


【0101】 在氮氣氣氛下，于室溫向二氯甲烷(15.0 v)和20.0% KOH水溶液(3.0 v)的混合物分批添加BG-11B (48.0 kg, 1.0當量)。反應完成後，有機層經收集並且水層以二氯甲烷(5.0 v)萃取。合併各有機層。於室溫將濃HCl (0.36 v)添加至上述有機層。攪拌所得混合物直到反應完成。固體藉由離心收集並以二氯甲烷(1.0 v)洗滌。收集的固體以MTBE (6.0 v)漿料化。固體藉由離心收集並以MTBE (1.0 v)洗滌，然後真空乾燥。如此得到31.5 Kg的產物(收率：100 %)。

步驟12：合成BG-11D (備選中間物)

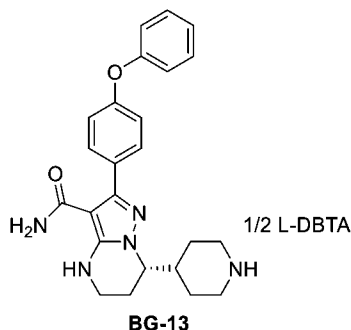
【0102】 將ACN (5.0 v)、軟水(10.0 v)、KOH (5.0當量)添加至反應器並攪拌至少15 min。將BG-11B (1.0當量)分份添加至反應器。攪拌混合物直到反應完成。濾餅藉由離心收集，在ACN (1.0 v)和軟水(5.0 v)中漿料化，並真空乾燥得到產物。

步驟13：合成BG-12



【0103】 在氮氣氣氛下，BG-11C (15.0 Kg 1.0當量)在MsOH (2.5 v)中的溶液於85°C攪拌直到反應完成。冷卻至5°C後，將純化水(4.0 v)滴加至體系中並保持溫度不超過35°C (溫度增加明顯)。所得溶液於30°C攪拌16小時，且然後以DCM (2×3.0 v)洗滌。水相經收集。將DCM (6.0 v)添加至水相，混合物冷卻至5°C。以20% NaOH水溶液將pH值調節至11~12 (溫度增加明顯)，伴隨攪拌，溫度不超過30°C。分開並收集有機相。水相以DCM (3.0 v)萃取。合併各有機層並濃縮。MTBE (4.0 v)添加至該殘餘物。混合物然後經濃縮並從正庚烷中析出。固體藉由離心收集並且在真空烘箱中乾燥。由此得到12.55 Kg產物(收率：94.9%)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.52-7.46 (m, 2H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.21-7.13 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 3.99-3.90 (m, 1H), 3.29-3.22 (m, 2H), 3.03-2.90 (m, 2H), 2.48-2.36 (m, 2H), 2.03 (dd, *J* = 13.9, 5.6 Hz, 2H), 2.14-1.99 (m, 1H), 1.97-1.85 (m, 1H), 1.65-1.15 (m, 3H)。

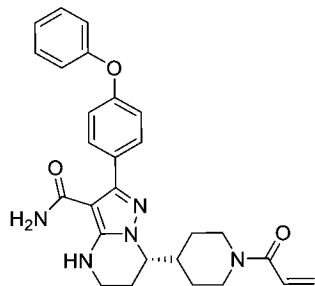
步驟14：合成BG-13



【0104】 在N₂氣氛下，將MeOH (13.5 v)、純化水(4.5 v)和BG-12 (8.5 Kg, 1.0當量)在反應器中的混合物加熱至50°C。向混合物中滴加L-DBTA (0.7當量)在MeOH/純化水(1.5 v/0.5 v)中的溶液，同時將溫度保持在50°C。添加後，混合物於50°C攪拌至少2小時，且然後冷卻至室溫並於室溫攪拌至少16小時。濾餅藉由離心收集並以MeOH (2.0 v)洗滌。濾餅在真空烘箱中乾燥。如此得到9.08 Kg的產物(收率：74.8%, ee值>98%)。

步驟15：合成(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四

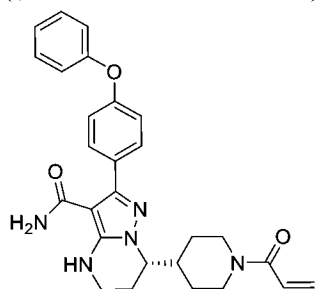
氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(化合物1)



【0105】 在N₂氣氛下，將ACN (12.0 v)、水(12.5 v)、BG-13 (8.0 Kg, 1.0當量)和NaHCO₃ (2.5當量)添加至反應器。然後將混合物冷卻至-5~0℃。向混合物中滴加丙烯醯氯(1.1當量)在MeCN (0.5 v)中的溶液並攪拌直到反應完成。然後將EA (6.0 v)添加至反應器中並攪拌。收集有機相。水層以EA (3.0 v)進一步萃取。合併有機相並以鹽水洗滌。收集有機層並濃縮。

【0106】 殘餘物藉由以3% w/w甲醇/DCM (21.0 v)溶離的矽膠(2 wt)柱純化。收集化合物1溶液並真空濃縮。殘餘物從EA/MTBE (2.0 v)中析出。濾餅藉由離心收集為產物。

步驟15：合成(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(化合物1, 備選方法)



【0107】 CH₃CN (10.0 v)、純化水(5.0 v)、NaOH (1.5當量)和BG-13 (1.0當量)的混合物經攪拌得到澄清溶液。EtOAc (6.0 v)然後添加至反應中並分離。有機相經收集並以15%鹽水(3.0 v)洗滌。上述製備的有機相經濃縮並且將溶劑交換為CH₃CN (剩餘體積: NMT 5.0 v)。添加CH₃CN (7.5 v)和純化水(12.5 v)並冷卻至15-20℃。將L-(+)-酒石酸(0.5當量)和NaHCO₃ (2.5當量)添加至反應混合物。丙烯醯氯(1.1當量)在CH₃CN (0.5 v)中的溶液滴加至反應混合物中。反應完成

後，將EtOAc (6.0 v)添加至反應混合物並收集有機層。水相進一步以EA (3.0 v)萃取。合併各有機層，以15%鹽水(5.0 v)洗滌並濃縮。溶劑交換為DCM (剩餘體積: 1.5-2.0 v)並藉由矽膠柱純化(矽膠: 100-200目, 2.0 w/ w ; 溶離劑: 3% w/ w MeOH/DCM(約50 v)。收集的溶液經濃縮並交換為EtOAc (4.0 v)。於50°C將MTBE (6.4 v)滴加至殘餘物。然後冷卻混合物至5°C且離心收集濾餅。

步驟16：製備化合物1的晶型A

【0108】 化合物1的上述濾餅溶解在7.0體積的DCM中，且然後交換為溶劑EA。從EA/MTBE中重結晶後，離心收集濾餅，並真空乾燥。如此得到4.44 Kg產物(收率：70.2%)。

【0109】 產物然後由在PANalytical Empyrean X射線粉末衍射儀上產生的X射線粉末衍射(XRPD)圖法表徵，其中XRPD參數如下：X射線波長(Cu, $K\alpha$, $K\alpha_1$ (Å): 1.540598, $K\alpha_2$ (Å): 1.544426 ; $K\alpha_2/K\alpha_1$ 強度比: 0.50)；X射線管設置(45 Kv, 40mA)；發散狹縫(自動)；掃描模式(連續)；掃描範圍($^{\circ}2\theta$) (3° -40)；步長($^{\circ}2\theta$) (0.0131)；掃描速度($^{\circ}/\text{min}$) (約10)。XRPD結果發現所得到的產物為如圖1所示的結晶。

【0110】 如圖2所示的差示掃描量熱(DSC)曲線在來自TA Instruments的TA Q2000 DSC上產生。所用DSC參數包括：溫度(25°C-期望溫度)；加熱速率(10°C/min)；方法(ramp)；樣品盤(鋁，起褶)；沖洗氣體(N₂)。DSC結果顯示139.4°C的明確熔點(起始溫度)。

【0111】 如圖3所示的熱重分析(TGA)曲線在來自TA Instruments的TA Q5000 TGA上產生。所用TGA參數包括：溫度(室溫-期望溫度)；加熱速率(10°C/min)；方法(ramp)；樣品盤(鉑，開放)；沖洗氣體(N₂)。TGA結果顯示為無水的，即使高達110°C也沒有重量損失。

【0112】 如圖4所示的質子核磁共振(¹H-NMR)在Bruker 400M NMR光譜

儀上在DMSO-d₆中收集。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.46-7.38 (m, 2H), 7.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.85-6.72 (m, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.07 (dd, *J* = 16.8, 2.2 Hz, 1H), 5.64 (dd, *J* = 10.4 Hz, 2.2 Hz, 1H), 4.55-4.38 (m, 1H), 4.17-3.94 (m, 2H), 3.33-3.22 (m, 2H), 3.08-2.88 (m, 1H), 2.67-2.51 (m, 1H), 2.36-2.15 (m, 1H), 2.12-1.82 (m, 2H), 1.79-1.65 (m, 1H), 1.63-1.49 (m, 1H), 1.38-1.08 (m, 2H)。

【0113】 如圖5所示的碳核磁共振(¹³C-NMR)在Bruker 400M NMR光譜儀上在DMSO-d₆中收集。化合物1的晶型A的¹³C-NMR光譜。

實例2 製備化合物1的晶型A

【0114】 (S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(化合物1)藉由在WO2014173289A中公開的方法製備，且進一步凍乾得到化合物1的無定形形式。將化合物1 (200mg, ee值 > 97%) 在EA (8 mL)中的溶液加熱至50℃，于50℃向上述溶液中滴加己烷(8 mL)。混合物冷卻至室溫且攪拌16小時，然後過濾得到110 mg，為白色固體。所得到的固體由XRPD表徵為晶型A。

實例3 製備化合物1的晶型A(反溶劑添加)

【0115】 稱重約15 mg的樣品(晶型A)至20-mL玻璃小瓶，接著添加0.4-1.2 mL相應的溶劑(參見表2)以溶解所有的固體。混合物然後在800 rpm的速度磁力攪拌從而在室溫得到澄清溶液。接著，將相關的反溶劑(參見表2)添加至該溶液中誘導析出或直到反溶劑總量達到15.0 mL。如果沒有析出發生，然後轉移溶液以減緩室溫蒸發。所得固體由XRPD表徵為晶型A。

【0116】 表2 反溶劑添加實驗

實驗 ID	溶劑	反溶劑
1	丙酮	H ₂ O
2	DMAc	H ₂ O

3	EtOAc	正庚烷
4	DCM	正庚烷
5	甲苯	正庚烷
6	2-MeTHF	正庚烷

實例4 製備化合物1的晶型A (溶液蒸發擴散)

【0117】 將約15 mg的樣品(晶型A)溶解在0.5-1.5 mL的相應溶劑(丙酮或EtOAc)中以得到在3-mL小瓶中的澄清溶液。接著，將溶液置於含3 mL的相關反溶劑(正庚烷)的20-mL小瓶中。20-mL小瓶以蓋密封並保持在室溫，允許足夠的時間使得有機蒸氣與溶液相互作用。在11天結束時，轉移澄清溶液在室溫蒸發。所得固體由XRPD表徵為晶型A。

實例5 化合物1的晶型A的穩定性測試和化合物1的純度

(1) 物理穩定性測試

【0118】 化合物1的晶型A儲存於80℃兩天進行熱穩定性測試，並且測試前後的XRPD圖顯示沒有晶型變化。

【0119】 化合物1的晶型A的長期穩定性研究顯示在於25℃/60%RH儲存長達24個月(%面積: T0=99.2%和T12=99.2%)和於40℃/75%RH條件儲存長達6個月(%面積: T0=99.1%和T6=99.4%)時沒有顯著的化學純度變化。此外，在於25℃/60%RH儲存長達24個月且於40℃/75%RH條件儲存長達6個月時沒有觀察到晶型和光學純度變化。

(2) 吸濕測試

【0120】 在圖1中示出的動態蒸氣吸附(DVS)曲線在SMS (Surface Measurement Systems) DVS Intrinsic上收集。所用DVS參數包括：溫度(25℃)；dm/dt (0.002%/min)；最小dm/dt穩定性持續時間(10 min)；最大平衡時間(180 min)；RH範圍(0%RH至95%RH)；RH步長(10%RH，從0%RH至90%RH，5%RH，從90%RH至95%RH)。如圖6所示，在80%RH有非常輕微的質量增長，

其為約0.8%的**化合物1**的晶型A。

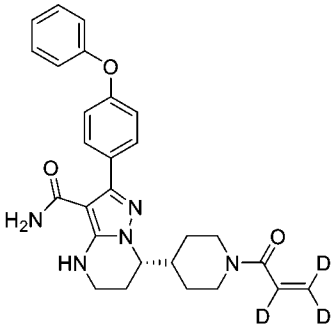
(3) 經由晶型A的結晶/重結晶以改善**化合物1**的純度

【0121】 經由晶型A的結晶/重結晶是改善**化合物1**純度並控制**化合物1**中雜質的有效方式，從而達到說明書中的驗收標準。參見**表3**中所示的實例。

【0122】 **表3** 在經由晶型A結晶/重結晶後的純度變化

條件	化合物 1 的純度
矽膠層析純化後	98.5%面積
第一次重結晶後	99.3%面積
第二次重結晶後	99.5%面積

實例6 製備氘標記的(S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡啶並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(氘標記的化合物1**)**



【0123】 于0~5℃，向丙烯-2,3,3-d3酸(50 mg, 0.67 mmol)和DMF (一滴)在DCM (20 mL)中的溶液中滴加草醯氯(1.6 N, 40.9 mL, 65.5 mmol)，然後於室溫攪拌2小時。混合物減壓濃縮得到粗制的丙烯醯-d3氯。

【0124】 于0~5℃，向(S)-2-(4-苯氧基苯基)-7-(六氫吡啶-4-基)-4,5,6,7-四氫吡啶並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(從BG-13解離，參見步驟15，**化合物1**，備選方法；278 mg, 0.67 mmol)在DCM (20 mL)和NaHCO₃水溶液(10 mL)中的溶液中滴加上述丙烯醯-d3氯在DCM (5 mL)中的溶液並於室溫攪拌2小時。合併的有機層經無水硫酸鈉乾燥，過濾，減壓濃縮並藉由製備型TLC純化，得到55 mg (17.5%)的(S)-7-(1-(丙烯醯基-d3)六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡

唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺，為灰白色固體。¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.50-7.44 (m, 2H), 7.42-7.35 (m, 2H), 7.17-7.10 (m, 1H), 7.09-6.99 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 4.52-4.40 (m, 1H), 4.10-3.95 (m, 2H), 2.29-3.25 (m, 2H), 3.04-2.86 (m, 1H), 2.63-2.50 (m, 1H), 2.32-2.13 (m, 1H), 2.06-1.81 (m, 2H), 1.75-1.45 (m, 2H), 1.35-1.08 (m, 2H). MS (ESI, m/e) [M+1]⁺ 475.2。

實例7 化合物1的多晶型物研究

(1) 無定形形式的多晶型物研究—從化合物1的無定形形式製備晶型A

【0125】 (S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺(化合物1)藉由在WO2014173289A公開的方法製備，並進一步凍乾得到化合物1的無定形形式。

【0126】 對於表4a至4k、表5a至5e和表6中的各實驗，稱量約20 mg的無定形形式的化合物1至玻璃小瓶中，接著添加相應的溶劑。如有需要，將混合物加熱，以得到澄清溶液。然後將混合物保持在室溫而不攪拌1-2天，以觀察是否有固體從該澄清溶液中產生。藉由偏振光顯微鏡檢查來監測固體。

【0127】 表4 化合物1 (ee值=90%)為起始物質

表4a

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	EA (mL)	己烷 (mL)			
1-1	0.5	0.1	Y	----	無固體
1-2	0.5	0.2	Y	----	少量固體
1-3	0.5	0.3	N	Y	油狀物
1-4	0.5	0.4	N	Y	油狀物
1-5	1	0.2	Y	----	無固體
1-6	1	0.3	Y	----	無固體
1-7	1	0.4	Y	----	無固體
1-8	1	0.5	Y	----	無固體
1-9	1	0.6	Y	----	少量固體
1-10	1	0.7	Y	----	少量固體
1-11	1	0.8	N	Y	油狀物
1-12	1	0.9	N	Y	油狀物

表4b

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	EA (mL)	庚烷(mL)			
2-1	0.5	0.1	Y	----	無固體
2-2	0.5	0.2	Y	----	少量固體
2-3	0.5	0.3	N	Y	油狀物
2-4	0.5	0.4	N	N	油狀物
2-5	1	0.2	Y	----	無固體
2-6	1	0.3	Y	----	無固體
2-7	1	0.4	Y	----	無固體
2-8	1	0.5	Y	----	無固體
2-9	1	0.6	Y	----	少量固體
2-10	1	0.7	Y	----	少量固體
2-11	1	0.8	Y	----	油狀物
2-12	1	0.9	N	Y	油狀物

表4c

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	EA (mL)	環己烷(mL)			
3-1	0.5	0.2	Y	----	無固體
3-2	0.5	0.3	Y	----	少量固體
3-3	0.5	0.4	Y	----	油狀物
3-4	0.5	0.5	Y	----	油狀物
3-5	0.5	0.6	N	Y	油狀物
3-6	1	0.6	Y	----	少量固體
3-7	1	0.8	Y	----	少量固體
3-8	1	1.0	Y	----	少量固體
3-9	1	1.2	Y	----	少量固體
3-10	1	1.4	Y	----	油狀物

表4d

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	DCM (mL)	己烷(mL)			
4-1	0.5	0.4	Y	----	無固體
4-2	0.5	0.6	Y	----	無固體
4-3	0.5	0.8	Y	----	無固體
4-4	0.5	1.0	N	Y	油狀物
4-5	1.0	1.4	Y	----	無固體
4-6	1.0	1.6	Y	----	無固體
4-7	1.0	1.8	Y	----	無固體
4-8	1.0	2.0	N	Y	油狀物

表4e

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	1,2-二氯乙烷 (mL)	己烷(mL)			
5-1	0.5	0.6	Y	----	無固體
5-2	0.5	0.8	Y	----	無固體
5-3	0.5	1.0	Y	----	無固體
5-4	0.5	1.1	N	Y	油狀物
5-5	1.0	1.4	Y	----	無固體
5-6	1.0	1.6	Y	----	無固體
5-7	1.0	1.8	Y	----	無固體
5-8	1.0	2.0	Y	----	無固體
5-9	1.0	2.2	N	Y	油狀物

表4f

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	MeOAc (mL)	己烷(mL)			
6-1	0.5	0.3	Y	----	少量固體
6-2	0.5	0.4	Y	----	油狀物
6-3	0.5	0.5	Y	----	油狀物
6-4	0.5	0.6	N	Y	油狀物
6-5	1.0	0.6	Y	----	少量固體
6-6	1.0	0.8	Y	----	少量固體
6-7	1.0	1.0	Y	----	少量固體
6-8	1.0	1.2	Y	----	少量固體
6-9	1.0	1.4	N	Y	油狀物

表4g

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	甲苯(mL)	己烷 (mL)			
7-1	1.0	0.2	Y	----	少量固體
7-2	1.0	0.3	Y	----	少量固體
7-3	1.0	0.4	Y	----	少量固體
7-4	1.0	0.5	N	Y	油狀物
7-5	1.0	0.6	N	Y	油狀物

表4h

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	甲苯(mL)	環己烷 (mL)			
8-1	1.0	0.1	Y	----	少量固體
8-2	1.0	0.2	Y	----	少量固體
8-3	1.0	0.3	Y	----	油狀物
8-4	1.0	0.4	N	Y	油狀物
8-5	1.0	0.5	N	Y	少量固體
8-6	1.5	0.4	Y	----	少量固體
8-7	1.5	0.5	Y	----	少量固體

表4i

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	MeOAc (mL)	環己烷(mL)			
9-1	0.4	1.0	Y	----	少量固體
9-2	0.5	1.0	Y	----	少量固體
9-3	0.6	1.0	Y	----	少量固體
9-4	0.8	1.0	Y	----	少量固體
9-5	1.0	1.0	Y	----	少量固體

表4j

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	IPAC (ml)	環己烷(ml)			
10-1	1.0	0.2	Y	----	少量固體
10-2	1.0	0.4	Y	----	少量固體
10-3	1.0	0.6	Y	----	少量固體
10-4	1.0	0.8	Y	----	少量固體
10-5	1.0	1.0	Y	----	少量固體
10-6	1.0	1.2	N	Y	油狀物

表4k

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	乙酸異丁酯(mL)	環己烷(mL)			
11-1	1.0	0.2	Y	----	少量固體
11-2	1.0	0.4	Y	----	少量固體
11-3	1.0	0.6	Y	----	少量固體
11-4	1.0	0.8	Y	----	少量固體
11-5	1.0	1.0	Y	----	少量固體
11-6	1.0	1.2	N	Y	油狀物

Y=是, 且N=否。

表5 化合物1 (ee值=97%)作為起始物質

表5a

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	EA (mL)	己烷(mL)			
12-1	1	0.2	Y	----	無固體
12-2	1	0.3	Y	----	無固體
12-3	1	0.4	Y	----	無固體
12-4	1	0.5	Y	----	無固體
12-5	1	0.6	Y	----	固體
12-6	1	0.7	Y	----	固體
12-7	1	0.8	N	Y	油狀物
12-8	1	0.9	N	Y	油狀物

表5b

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	EA (mL)	庚烷(mL)			
13-1	1	0.2	Y	----	無固體
13-2	1	0.3	Y	----	無固體
13-3	1	0.4	Y	----	無固體
13-4	1	0.5	Y	----	無固體
13-5	1	0.6	Y	----	固體
13-6	1	0.7	Y	----	固體
13-7	1	0.8	Y	----	油狀物
13-8	1	0.9	N	Y	油狀物

表5c

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	MeOAc (ml)	環己烷(ml)			
14-1	0.4	1.0	Y	----	無固體
14-2	0.5	1.0	Y	----	無固體
14-3	0.6	1.0	Y	----	固體
14-4	0.8	1.0	Y	----	固體
14-5	1.0	1.0	Y	----	無固體
14-6	1.0	1.5	Y	----	固體
14-7	1.0	2.0	Y	----	固體
14-8	1.0	2.2	N	Y	油狀物

表5d

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	EA (ml)	環己烷(ml)			
15-1	0.5	0.2	Y	----	無固體
15-2	0.5	0.3	Y	----	固體
15-3	0.5	0.4	Y	----	油狀物
15-4	0.5	0.5	Y	----	油狀物
15-5	0.5	0.6	N	Y	油狀物
15-6	1	0.6	Y	----	固體
15-7	1	0.8	Y	----	固體
15-8	1	1.0	Y	----	固體
15-9	1	1.2	Y	----	固體
15-10	1	1.4	Y	----	油狀物

表5e

實驗 ID	溶劑		室溫	加熱	結果(1-2d)
	MeOAc (ml)	己烷(ml)			
16-1	0.5	0.3	Y	----	固體
16-2	0.5	0.4	Y	----	無固體
16-3	0.5	0.5	Y	----	無固體
16-4	0.5	0.6	N	Y	無固體
16-5	1.0	0.6	Y	----	固體
16-6	1.0	0.8	Y	----	固體
16-7	1.0	1.0	Y	----	固體
16-8	1.0	1.2	Y	----	固體
16-9	1.0	1.4	N	Y	油狀物

Y=是, 且N=否。

【0128】 表4a至4k和表5a至5e中的實驗以相同規模進行(即，起始物質—無定形化合物1的量為約20 mg)。然而，起始物質的ee值似乎對在每個實驗中要形成的固體的量具有顯著的影響。如表4a至4k中從90% ee的無定形化合物1開始的實驗所示，由此形成的固體是極少量的。表5a至5e中從97% ee的無定形化合物1開始的實驗產生顯著量的固體。此外，在表4a至4k中的實驗中所得到的固體在從具有90% ee的起始物質結晶時顯示低的ee值。表4a至4k中使用EA/己烷作為結晶體系的一個固體樣品僅顯示45% ee值。

【0129】 表5a的結果藉由類似於實例2的放大實驗得到進一步證實，其證

實了所得固體為期望的晶型(晶型A)。

【0130】 如表4a至4k和表5a至5e所示, 結晶固體的形成會根據具體的溶劑、各溶劑比例等變化。

【0131】 表6中的結果進一步證實了結晶固體的形成取決於溶劑的具體比例。

表6

溶劑-2 溶劑-1 (0.5 mL)	己烷		MTBE		庚烷		環己烷		H ₂ O		乙醚	
	V/m L	結果	V/m L	結果	V/m L	結果	V/m L	結果	V/m L	結果	V/m L	結果
THF	0.4	少量固體	2.0	少量固體	0.4	少量固體	0.4	少量固體	----	----	2.0	無固體
Me-THF	0.4	少量固體	1.5	無固體	0.4	無固體	----	----	----	----	----	----
DME	0.6	少量固體	1.5	無固體	0.6	少量固體	0.8	少量固體	----	----	1.5	無固體
EtOH	2.0	無固體	5.0	無固體	2.5	油狀物	2.0	無固體	5.0	無固體	5.0	無固體
i-PrOH	1.5	無固體	2.5	無固體	----	----	2.0	無固體	2.0	少量固體	----	----
吡啶	1.0	無固體	4.0	無固體	----	----	1.0	無固體	2.0	無固體	----	----
乙酸丙酯	0.3	無固體	0.8	無固體	----	----	----	----	----	----	----	----
乙酸異丁酯	0.2	無固體	2.0	無固體	----	----	----	----	----	----	----	----
n-BuOH	0.5	無固體	2.0	無固體	----	----	----	----	0.5	無固體	----	----
1,2-二氯乙烷	1.0	無固體	5.0	無固體	----	----	1.2	無固體	----	----	----	----
DCM	1.0	油狀物	5.0	無固體	----	----	1.2	無固體	----	----	----	----
甲苯	0.2	油狀物和少量固體	0.5	無固體	0.2	無固體	0.2	油狀物和少量固體	----	----	0.5	無固體

(2) 晶型的多晶型物研究—從結晶形式製備晶型A

慢速蒸發

【0132】 稱重約15 mg的樣品(晶型A)至3-mL玻璃小瓶，接著添加相應的溶劑或溶劑混合物(參見表7)得到澄清的溶液。接著，小瓶以具有3~4個針孔的石蠟膜覆蓋，並保持在室溫以允許溶液緩慢地蒸發。分離固體進行XRPD分析。然而如表7所總結的，沒有產生晶體形式。

【0133】 表7 慢速蒸發實驗

實驗 ID	溶劑(v/v)	固體形式
1	MeOH	無定形
2	EtOH	無定形
3	IPA	無定形
4	ACN	無定形
5	丙酮	油狀物
6	EtOAc	油狀物
7	THF	油狀物
8	DCM	無定形
9	甲苯	油狀物
10	乙酸	油狀物
11	EtOH/H2O (4:1)	無定形
12	丙酮/H2O (4:1)	無定形
13	THF/H2O (4:1)	無定形
14	DCM/正庚烷(4:1)	無定形
15	EtOH/正庚烷(4:1)	無定形
16	EtOAc/正庚烷(6.5:1)	油狀物
17	ACN/MTBE(4:1)	油狀物

反溶劑添加

【0134】 稱重約15 mg的樣品(晶型A)至20-mL玻璃小瓶，接著添加0.4-1.2 mL相應的溶劑(參見表8)。混合物然後以800 rpm的速度在室溫磁力攪拌得到澄清的溶液。接著，將相關的反溶劑(參見表8)添加至溶液以誘導析出或直到反溶劑的總量達到15.0 mL。如果沒有發生析出，然後轉移溶液於室溫慢速蒸發。結果總結在表8中。

【0135】 表8 反溶劑添加實驗

實驗 ID	反溶劑	溶劑	固體形式
1	H ₂ O	EtOH	油狀物
2	H ₂ O	THF	油狀物
3	H ₂ O	乙酸	油狀物
4	正庚烷	1,4-二噁烷	油狀物
5	MTBE	ACN	油狀物
6	MTBE	NMP	N/A
7	MTBE	EtOH	油狀物
8	MTBE	DCM	油狀物

N/A：沒有獲得固體。

慢速冷卻

【0136】 在3-mL玻璃小瓶中，於室溫，將約20 mg的樣品(晶型A)懸浮在1.0 mL的相應的溶劑(參見表9)中。於50℃將懸浮液轉移至漿料中，以800 rpm的速度使用磁力攪拌。樣品于50℃平衡2小時並使用0.45 μm尼龍膜過濾。接著，將濾液緩慢地從50℃冷卻至5℃，速率為0.1℃/min。所得固體於5℃保持恒溫，然後分離用於XRPD分析。如表9中所總結，沒有獲得晶體形式。

【0137】 表9 慢速冷卻實驗

實驗 ID	溶劑(v/v)	固體形式
1	IPA	N/A
2	MIBK	N/A
3	IPAc	N/A
4	甲苯	N/A
5	EtOH/H ₂ O (1:2)	凝膠
6	丙酮/H ₂ O (1:2)	凝膠
7	EtOAc/正庚烷(1:2)	無定形
8	CHCl ₃ /正庚烷(1:2)	N/A
9	THF/正庚烷(1:2)	油狀物*
10	ACN/MTBE (1:2)	油狀物*

N/A：沒有獲得固體。

*：轉移澄清溶液於室溫蒸發。

溶液蒸氣擴散

【0138】 在3-mL小瓶中將約15 mg的樣品(晶型A)溶解於0.5-1.5 mL的相應溶劑(參見表10)中，得到澄清溶液。接著將溶液置於具有3 mL的相關反溶劑的20-mL小瓶中。該20-mL小瓶以蓋密封並保持在室溫，允許足夠的時間使有機蒸氣與溶液接觸。在11天結束時，轉移澄清溶液於室溫蒸發。所得固體由XRPD表徵。結果總結在表10中。

【0139】 表10 溶液蒸氣擴散實驗

實驗 ID	溶劑	反溶劑	固體形式
1	EtOH	H ₂ O	無定形*
2	ACN	H ₂ O	N/A
3	丙酮	H ₂ O	無定形*
4	THF	H ₂ O	無定形*
5	乙酸	H ₂ O	油狀物
6	EtOH	正庚烷	N/A
7	THF	正庚烷	無定形*
5	DCM	正庚烷	無定形*
8	DMAc	MTBE	N/A
9	IPA	MTBE	N/A
10	1,4-二噁烷	MTBE	N/A
11	甲苯	MTBE	N/A
12	NMP	MTBE	N/A

N/A：沒有獲得固體。

*：經由慢速蒸發產生固體。

聚合物誘導的結晶實驗

【0140】 在3-mL小瓶中將約15 mg的樣品(晶型A)溶解於1.0 mL的相應的溶劑(參見表11)得到澄清的溶液。溶液然後使用0.45 μm尼龍膜過濾。將約2 mg的聚合物混合物添加至濾液中。混合物於室溫攪拌以誘導析出。分離固體用於XRPD分析。如表11中所總結，沒有獲得晶體。

【0141】 表11 聚合物誘導的結晶實驗

實驗 ID	溶劑(v/v)	聚合物混合物	固體形式
1	EtOH	A	無定形
2	ACN	A	無定形
3	丙酮	A	無定形
4	THF	A	無定形
5	DCM	A	無定形
6	EtOAc	A	無定形
7	EtOH	B	無定形
8	ACN	B	無定形
9	丙酮	B	無定形
10	THF	B	無定形
11	DCM	B	無定形
12	EtOAc	B	無定形

聚合物混合物A：聚乙炔吡咯啉酮(PVP)、聚乙炔醇(PVA)、聚氯乙炔(PVC)、聚乙酸乙炔酯(PVAC)、羥丙甲纖維素(HPMC)、甲基纖維素(MC) (質量比為1:1:1:1:1:1)

聚合物混合物B：聚己內酯(PCL)、聚乙二醇(PEG)、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、藻酸鈉(SA)和羥基乙基纖維素(HEC) (質量比1:1:1:1:1)。

實例8 化合物1的絕對組態的確定

製備BG-13單晶

【0142】 六個單晶生長實驗(參見表12)經由慢速冷卻進行。BG-13的合適的單晶藉由在MeOH/H₂O (1:1, v/v)中慢速冷卻獲得。晶體資料和結構精修列於表13中。

【0143】 表12 單晶生長實驗

實驗 ID	重量 (mg)	溶劑 (1 mL, v/v)	方法	溫度 (°C)	溶解 (Y/N*)	觀察結果
1	5.6	IPA/H ₂ O (3/1)	冷卻	60	N	塊樣晶體
2	5.5	IPA/H ₂ O (3/1)	冷卻	60	N	塊樣晶體
3	5.4	IPA/H ₂ O (3/1)	冷卻	60	N	塊樣晶體
4	5.5	IPA/H ₂ O (3/1)	冷卻	60	N	塊樣晶體
5	4.7	MeOH/H ₂ O (2/1)	冷卻	60	N	晶體
6	5.5	MeOH/H ₂ O (1/1)	冷卻	60	N	晶體

表13 BG-13的單晶資料和結構精修

【0144】 單晶的資料在具有CCD偵測器的Bruker APEX DUO單晶衍射儀 (Cu K α , λ =1.54178 Å, 173.15 K)上產生。

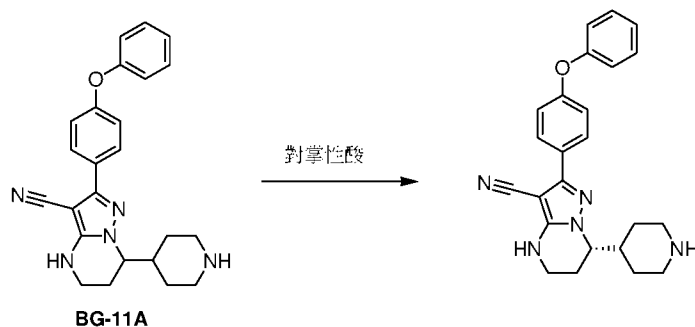
實驗式	C ₃₃ H ₃₄ N ₅ O ₆	-
式量	596.65	
溫度	173.15	-
波長	1.54178 Å	-
晶系，空間群	單斜	C2
晶胞尺寸	a = 16.7939(4) Å b = 7.9871(2) Å c = 23.5438(5)	α = 90.00° β = 108.0460(10)° γ = 90.00°
體積	3002.69(12) Å ³	
Z，計算密度	4	1.320 mg/mm ³
吸收係數	0.756 mm ⁻¹	
F(000)	1260.0	
晶體尺寸	0.3 × 0.21 × 0.08 mm ³	
資料收集的 θ 範圍	1.97 至 64.96°	
極限指標	-19 ≤ h ≤ 17 -7 ≤ k ≤ 9 -27 ≤ l ≤ 24	
收集的反射/獨特性	5073/3756[R(int) = 0.1062]	
完整度	92.8%	
精修方法	F ² 上的全矩陣最小平方	
資料/限制/參數	3756/1/398	
F ² 的擬合優度	1.192	
最終 R 指標[I>2sigma(I)]	R ₁ = 0.0819	wR ₂ = 0.2294
絕對結構 Flack	0.0(3)	
最大衍射峰和洞	0.50 和 -0.57 e.Å ⁻³	

【0145】 BG-13證實為(2R, 3R)-二苯甲醯基酒石酸(L-DBTA)鹽且游離鹼與L-DBTA的摩爾比為2:1。L-DBTA中兩個碳(C32和C32')的組態均證實為R。游離鹼中C6的組態經確定為S，如圖8至圖10所示。粉末X射線衍射圖法也用來表徵單晶的結構，如圖11所示。

化合物1的絕對組態

【0146】 化合物1的絕對組態從中間物BG-13的單晶X射線結構分析推斷為S。

實例9 BG-11A的對掌性拆分

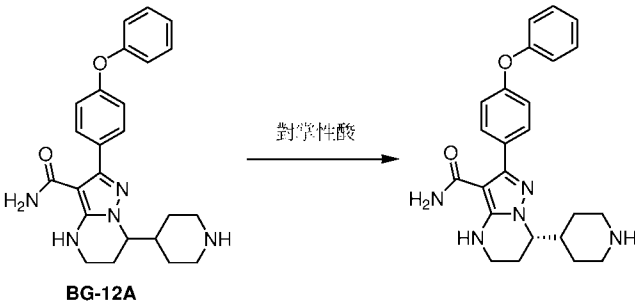


【0147】 一般操作：在升高的溫度，向化合物BG-11A在製備的溶劑體系中的溶液中添加對掌性酸。在該溫度攪拌後，將其冷卻至室溫並於室溫攪拌隔夜。固體經過濾並以製備的溶劑體系洗滌。ee值由對掌性HPLC直接從其相關鹽或其Boc-衍生物測試(參見表14)。其他對掌性酸或溶劑體系不給出ee值、低ee值或不給出期望的對掌性化合物。

【0148】 表14 BG-11A的對掌性拆分

溶劑體系	11A 的量	對掌性酸	溫度	ee 值	收率
EtOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (1.9 L)	40.0 g	D-DBTA (0.5 當量)	70°C 至室溫	>85% ee	42.2%
i-PrOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (1.0 當量)	70°C 至室溫	77% ee	38.5%
i-PrOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 當量)	70°C 至室溫	85% ee	38.9%
EtOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 當量)	70°C 至室溫	86% ee	39.8%
MeOH/H ₂ O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 當量)	70°C 至室溫	82% ee	42.2%
AcOH/H ₂ O 3/1 (40 mL)	1 g	D-DBTA (0.55 當量)	60°C 至室溫	83% ee	27.6%
1,4-二噁烷/H ₂ O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 當量)	60°C 至室溫	無固體	無固體
MeOH/H ₂ O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 當量)	60°C 至室溫	36% ee	未稱重
CH ₃ CN/H ₂ O 9/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 當量)	60°C 至室溫	14% ee	未稱重
CH ₃ CN/H ₂ O 6/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 當量)	60°C 至室溫	89% ee	未稱重
i-PrOH/H ₂ O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 當量)	60°C 至室溫	79% ee	未稱重
CH ₃ CN/H ₂ O 4/1 (1 mL)	50 mg	D-DBTA (1.0 當量)	60°C 至室溫	24% ee	46%
CH ₃ CN/H ₂ O 4/1 (1.5 mL)	50 mg	D-DBTA (1.0 當量)	60°C 至室溫	91% ee	33.7%

實例10 BG-12A的對掌性拆分和對掌性純度的改善



【0149】 一般操作：在升高的溫度，向化合物BG-12A在製備的溶劑體系中的溶液中添加對掌性酸。在該溫度攪拌後，將其冷卻至室溫並於室溫攪拌隔夜。固體經過濾並以製備的溶劑體系洗滌。對掌性純度由對掌性HPLC直接從其相關鹽或游離鹼測試(參見表15)。其他對掌性酸或溶劑體系不給出ee值、低

ee值或不給出期望的對掌性化合物。

【0150】 表15 BG-12A的對掌性拆分

溶劑體系	BG-12A 的量	對掌性酸	溫度	ee 值	收率
MeOH/H ₂ O 3/1 (1500 mL)	50 g	L-DBTA (0.35 當量)	50℃至室溫	85.6% ee	43.1%
EtOH/H ₂ O 6/1 (250 mL)	14.4 g	L-DBTA (0.55 當量)	78℃至室溫	79.1% ee	41.8%
n-BuOH/H ₂ O 6/1 (20 mL)	1 g	L-DBTA (0.8 當量)	80℃至室溫	95% ee	20%
MeOH (4 mL)	500 mg	L-DBTA (1.1 當量)	回流至室溫	無固體	
EtOH (17 mL)	1.0 g	L-DBTA (1.1 當量)	回流至室溫	40%ee	未稱重
EtOH (30 mL)	500 mg	L-DBTA (2.2 當量)	回流至室溫	無 ee	未稱重

【0151】 所得L-DBTA鹽(31 g, 85.6% ee)添加至THF/H₂O (1/1, 1034 mL)，將懸浮液加熱至70℃並攪拌直到所有固體溶解。然後添加517 mL的水。然後溶液緩慢地冷卻至40℃並添加晶種(10 mg)。攪拌約2小時後，溶液緩慢地冷卻至環境溫度並攪拌2天。過濾，固體以THF/H₂O=1/1 (20 mL)洗滌並減壓乾燥，得到產物，為白色固體(22.5 g, 72%收率, >98.5 ee值)。

【0152】 所獲得的游離鹼(6.02 g, 79.1% ee)溶解在(1g/15 mL) EtOH/H₂O (6/1, 90 mL)中，於78℃攪拌，使得所有起始物質都溶解。然後添加L-DBTA (2.84 g, 7.9 mmol, 0.55當量)在EtOH/H₂O (6/1, 7 mL)中的溶液。快速形成固體，混合物在該溫度攪拌1小時，然後移除加熱體系。使混合物冷卻至室溫。過濾，固體以EtOH/H₂O (6/1, 10 mL)洗滌。收集的固體在NaOH水溶液和DCM中轉化為游離鹼，得到產物(4.7 g, 收率：32.6%, 93% ee)，為白色泡沫。

【0153】 所獲得的游離鹼(70.0 g, 90.5% ee)在CH₃CN/H₂O (1/1, 700 mL)中的懸浮液加熱至60℃，得到澄清的溶液。然後向上述溶液中添加L-DBTA (33 g, 0.55當量)。於60℃攪拌約2小時後，混合物緩慢地冷卻至室溫並攪拌隔夜。過濾，固體以CH₃CN/H₂O (1/1, 50 mL)洗滌，減壓乾燥，得到產物，為灰白色固體

(80 g, 收率：80% ee值 > 98%)。

實例11 功效測試

【0154】 (S)-7-(1-丙烯醯基六氫吡啶-4-基)-2-(4-苯氧基苯基)-4,5,6,7-四氫吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺在下文中使用其晶型A進行測試。

測試1：激酶的抑制和選擇性

方法：

(1) BTK激酶測定法

【0155】 在基於時間分辨熒光共振能量轉移(TR-FRET)方法的測定中測試**化合物1**的晶型A對BTK激酶(aa2-659, Carna Biosciences)的抑制。測試在384孔低體積黑板在含有BTK激酶、5 μ M ATP、2 μ M肽底物和0-10 μ M化合物的反應混合物中在含有50 mM Tris pH7.4、10 mM MgCl₂、2 mM MnCl₂、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.005% Tween-20、20 nM SEB和0.01% BSA的緩衝液中進行。激酶與化合物于室溫溫育60分鐘且反應藉由添加ATP和肽底物引發。室溫反應60分鐘後，根據製造商說明書(CisBio Bioassays)添加等體積的終止/偵測液。終止/偵測液在含有50 mM HEPES pH 7.0、800 mM KF、20 mM EDTA和0.1% BSA的緩衝液中含有Eu³⁺穴狀化合物-綴合的單克隆抗體(PT66)抗磷酸酪氨酸和XL665-綴合的鏈黴親和素。將各板密封並在室溫溫育1小時，且在PHERAstar FS板閱讀器(BMG Labtech)上記錄TR-FRET信號(在665 nm發射對在620 nm發射的熒光比例，在337 nm波長激發)。肽底物的磷酸化導致抗磷酸酪氨酸抗體結合至生物素化的肽底物，這將熒光供體(Eu³⁺穴狀物)置於與受體(鏈黴親和素-XL665)非常近的地方，由此導致高度的熒光共振能量從供體熒光團(在620 nm)轉移至受體熒光團(在665 nm)。BTK激酶活性的抑制導致TR-FRET信號的降低。**化合物1**的IC₅₀藉由Graphpad Prism軟件將資料擬合成四參數邏輯斯蒂方程(logistic equation)而得到。

(2) 生化激酶選擇性

【0156】 晶型A的選擇性在Reaction Biology Corp.公司在1 μM 針對一組342種激酶描繪曲線。晶型A對於329種激酶展現小於70%的抑制，且對於包括BTK的13種激酶展現大於70%的抑制。晶型A的 IC_{50} (參見表13)，包括ITK、TEC、JAK3和EGFR測定藉由使用TR-FRET測定和對應的肽作為底物在百濟神州(BeiGene)內部進行。

【0157】 ITK的 IC_{50} 確定：ITK測定的實驗方案類似於BTK測定，除了進行以下改良：3 μM ATP和2 μM TK底物用於該激酶反應中。

【0158】 TEC的 IC_{50} 確定：Tec測定的實驗方案類似於BTK測試，除了進行以下改良：1) 280 μM ATP和2nM Poly-GT底物用於激酶反應中；2)反應緩衝液不含有SEB。

【0159】 JAK3的 IC_{50} 確定：JAK3測定的實驗方案類似於BTK測試，除了進行以下改良：1) 3.4 μM ATP和3 μM 肽底物(B-EE-15, 生物素-EQEDEPEGDYFEWLE)用於激酶反應中；2)反應緩衝液含有50 mM Tris pH7.8、10 mM MgCl_2 、5 mM DTT、0.01% Triton X-100和0.01% BSA。

【0160】 EGFR的 IC_{50} 確定：EGFR測定的實驗方案類似於BTK測試，除了進行以下改良：1) 20 μM ATP、1.44 μM TK底物-生物素(酪氨酸激酶的一種通用底物)和0-1000 nM 化合物(最終濃度為1% DMSO)用於激酶反應；2)反應緩衝液含有50 mM HEPES pH7.5、10 mM MgCl_2 、1 mM EGTA、0.01% Brij-35、2.5 mM DTT和0.1% BSA；3)終止/偵測液含有25 mM HEPES pH7.5、400 mM KF、50 mM EDTA、0.01%Triton-X100和0.1% BSA。

結果：

【0161】 晶型A對於BTK激酶的 IC_{50} 為0.27 nM。晶型A顯示為強效的、特異性的和不可逆的BTK激酶抑制劑。就其選擇性而言，當在1 μM 針對一組342

種人激酶描繪曲線時，晶型A僅抑制13種其他激酶超過70%。

【0162】 表16 晶型A的酶抑制活性

酶	IC ₅₀ (nM)
BTK	0.27
ITK	53
TEC	1.9
JAK3	600
EGFR	3.6
BLK	1.13
BMX/ETK	0.62
BRK	33
ERBB4/HER4	1.58
FGR	155
FRK/PTK5	379
LCK	187
TXK	2.95

注：BTK、EGFR、ITK、TEC和JAK3測試藉由使用TR-FRET測定和相應的肽作為底物進行。在ATP針對5種激酶的K_M並且預溫育1小時量測晶型A的IC₅₀。HER4、BMX、TXK、BLK FGR、LCK、FRK/PTK5測定Reaction Biology Corp.公司使用³³P-ATP和濾膜結合測定進行。在1 μM ATP量測並且預溫育1小時量測晶型A的IC₅₀。

測試2：藉由晶型A的BTKpY223細胞測定

方法：

【0163】 BTKpY223細胞測定是基於HTRF的測定，意在定量確定在BTK Tyr223的磷酸化的內生水準。磷酸化的Tyr223對於BTK的完全活化是必要的。

該測定在拉莫斯(Ramos)細胞(CRL-1596, ATCC)中以BTKpY223測定套組(63IDC000, Cisbio)中進行。

【0164】 簡單來說，拉莫斯細胞在含0.5% FBS的RPMI1640中血清饑餓2小時。饑餓後，細胞與晶型A一起溫育以在不同濃度在CO₂溫育器中偵測1小時。接種後，細胞以1mM 過釩酸鹽(PV)或Na₃VO₄ (OV)刺激20分鐘。然後，細胞減速旋轉並以1x裂解緩衝液於室溫裂解10分鐘(在套組中提供4x裂解緩衝液)。溫育期間，1x抗體混合物藉由在偵測緩衝液(套組中提供)稀釋抗-BTK-d2和抗-pBTK-K而製備。將2 μ L/孔的1x抗體混合物分配至OptiPlate-384測定板(6005620, Perkin Elmer)中。此後，將18 μ L的細胞裂解液轉移至預載抗體溶液的測定板。溫和地混合並簡單旋轉後，將板密封並於暗處在室溫保持18小時。熒光發射在兩個不同的波長(665 nm和620 nm)在相容的HTRF閱讀器(PHERAstar FS, BMG)上量測。化合物1的效力基於在665 nm和620 nm的信號強度之間的比例的抑制來計算。IC₅₀值以GraphPad Prism軟件使用S形劑量-響應函數來計算。

結果：

【0165】 晶型A在B細胞淋巴瘤細胞株拉莫斯細胞中在低至 1.8 ± 0.2 nM (n=3)的濃度抑制BTK的磷酸化。

測試3：晶型A對血液癌細胞株(Rec-1、Mino、JEKO-1和TMD-8)中腫瘤細胞增殖的作用

方法：

【0166】 3種MCL細胞(Rec-1、Mino和JEKO-1)和1種ABC型彌散性大B細胞淋巴瘤細胞株(TMD8)用於該研究中。細胞株保養在補充以10%胎牛血清/FBS(Thermo Scientific)；100單位/ml青黴素(Gibco)和0.1mg/ml鏈黴素(Gibco)的RPMI-1640中並保持於37°C在潤濕化的5% CO₂/空氣中。細胞株從購買的原始細胞中放樣30代以內的冷凍原種中得到恢復。

【0167】 化合物在Rec-1、Mino、JEKO-1和TMD-8細胞中的生長抑制活性使用CellTiter-Glo熒光細胞活力測定(Promega)確定。針對各細胞株優化96孔板的每孔接種的細胞數，以確保6天治療期間的對數生長。細胞以10點稀釋系列處理，一式三份。暴露於化合物6天后，添加體積等於各孔中細胞培養基的體積的CellTiter-Glo試劑。在定軌搖床上混合混合物2分鐘以實現細胞裂解，接著室溫溫育10分鐘以實現熒光信號的發展和穩定化，熒光信號對應於ATP的量且因此對應於代謝活性細胞的量。使用PHERAstar FS閱讀器(BMG Labtech)量測熒光信號。細胞活力的IC₅₀值以GraphPad Prism軟件確定並且為3個獨立測定的平均值。

結果：

【0168】 化合物1的晶型A對3種MCL細胞株和1種ABC型彌散型大B-細胞淋巴瘤細胞株(TMD8)中的細胞增殖展現出特異性和強效抑制作用(表17)。

表17 晶型A對血液腫瘤細胞增殖的抑制

細胞株	細胞類型	效力 IC50(nM)	標準偏差(nM)
Rec-1	MCL	0.36	0.03
Mino	MCL	3.8	1.8
JEKO-1	MCL	20.0	NA
TMD-8	DLBCL(ABC)	0.54	0.3

測試4：小鼠中晶型A的藥物動力學研究

方法：

【0169】 對於時間過程研究，將小鼠隨機分成7組，每組4只小鼠。小鼠以單劑量的化合物1的晶型A治療並且在給藥後的不同時間點(30分鐘，1、2、4、12、24小時)使用二氧化碳實施安樂死。對於劑量依賴性研究，將小鼠隨機分成9組，每組4只小鼠。小鼠以不同劑量水準的化合物1的晶型A治療並且在給

藥4小時後使用二氧化碳實施安樂死。治療以10 ml/kg體重的體積藉由口服管飼(p.o.)給予。在給藥前即時評估體重並相應地調節給藥體積。

【0170】 PK樣品製備：對於時間過程研究，血樣(每8小鼠50 μ L)於給藥後15 min在異氟烷/氧氣麻醉下從眶後靜脈竇進行收集(該組小鼠也用於24小時時間點)或在針對其他時間點的安樂死後心穿刺術進行收集。對於劑量依賴性研究，血樣於給藥後30min在異氟烷/氧氣麻醉下從眶後靜脈竇進行收集。血漿藉由在3,000 g離心10分鐘收集並在-80°C保持冷凍直到分析。

【0171】 PK分析：最大血漿濃度(C_{max})和達到 C_{max} (T_{max})的時間直接從血漿濃度對時間曲線獲取。

結果：

【0172】 晶型A在ICR小鼠中快速吸收並消除。

測試5：TMD-8異種移植模型中晶型A的功效研究

腫瘤移植方法：

【0173】 動物以環磷醯胺(在鹽水中製備，150 mpk腹腔注射(i.p.))和雙硫侖(在0.8% Tween 80/鹽水中製備, 125 mpk口服管飼(p.o.))，每一劑環磷醯胺後1小時)預治療2天，每天一次。然後在第二劑環磷醯胺後24小時向動物接種TMD-8細胞。移植當天，將細胞培養基替換為新鮮培養基。4小時後，移去培養基並且如上所述收集細胞。將細胞重新懸浮于冷的(4°C) PBS中且添加相同體積的基質膠(BD, Cat# 356237)，得到最終濃度為 2.5×10^7 個細胞/ml。接種前，將重懸的細胞置於冰上。細胞接種前，用75%乙醇清潔每個小鼠的右側腋下區域。經由26號針頭在右前脅腹向每只動物皮下注射在200 μ l細胞懸浮液中的 5×10^6 個細胞。

【0174】 對於體內功效研究，從細胞接種後第3天開始，將動物隨機分成期望數量的組，每組10只小鼠。小鼠一天兩次(BID)以煤劑(0.5%羧甲基纖維素

(CMC) + 0.2% Tween 80)和不同劑量水準的**化合物1**的晶型A治療39天。治療藉由以10 ml/kg體重的容量口服管飼(p.o.)。在給藥前即時評估體重並且相應地調整給藥體積。每週兩次在兩個維度上使用卡尺量測腫瘤體積(在該研究中從接種後第11天可量測)。使用下式計算腫瘤體積： $V = 0.5 \times (a \times b^2)$ ，其中a和b分別是腫瘤的長徑和短徑。使用斯氏T-檢驗(student T-test)進行統計學分析。 $P < 0.05$ 被認為是統計學上顯著的。在整個研究持續期間一個人負責腫瘤量測。還每週兩次記錄體重。在研究的持續期間還每天監控小鼠毒性的臨床指征。

結果：

【0175】 晶型A的體內功效在NOD/SCID小鼠中皮下生長的TMD-8 DLBCL異種移植物中進行檢查。在每日兩次(BID)在不同的劑量水準以良好耐受方式每日口服給予之後，**化合物1**的晶型A誘導劑量依賴性抗腫瘤作用。在最低劑量測試的**化合物1**的晶型A已經顯示強的抗腫瘤活性。在整個研究中所有治療組對動物體重沒有顯著影響。

測試6：系統性REC-1異種移植物模型中晶型A的功效研究

腫瘤移植方法：

【0176】 動物以環磷醯胺(在鹽水中製備，150 mpk腹腔注射)和雙硫侖(在0.8% TW-80於鹽水中製備, 125 mpk口服管飼，每一劑環磷醯胺後1小時)預治療2天，每天一次。然後在第二劑環磷醯胺後24小時向動物接種REC-1細胞。移植當天，將細胞培養基替換為新鮮培養基。4小時後，移去培養基並且如上所述收集細胞。將細胞重新懸浮于冷的(4°C) PBS中得到最終濃度為 1×10^8 個細胞/ml。移植前，將重懸的細胞置於冰上。經由尾靜脈向每只動物注射在100 µl的細胞懸浮液中的 1×10^7 個細胞。

【0177】 對於體內功效研究，從細胞接種後第8天開始，將動物隨機分成期望數量的組，每組10只小鼠。小鼠一天兩次(BID)以煤劑(0.5%羧甲基纖維素

(CMC) + 0.2% Tween 80)、不同劑量水準的化合物1的晶型A治療71天。所有劑量在接種後第78天停止。治療藉由以10 ml/kg體重的容量口服管飼(p.o.)。在給藥前即時評估體重並且相應地調整給藥體積。每週兩次記錄體重(從第33天起變為每週三次)。在研究持續期間還每天觀察小鼠的疾病的臨床指征。研究結束時全部存活。在嚴重毒性作用諸如運動喪失的情況下，對小鼠實施安樂死並評定為死亡。

【0178】 對於資料分析：藉由Kaplan-Meier方法進行存活分析。存活時間定義為從腫瘤細胞接種日到動物死亡或被實施安樂死的時間。對於各組，計算平均存活時間(MST)、具有95%置信區間的存活時間的範圍(RST)和壽命的增加(ILS)。平均存活定義為當50%的小鼠已經死亡時的時間。ILS使用下式計算：

$$\%ILS = (MST - MST(\text{媒劑})) / MST(\text{媒劑}) \times 100$$

使用Gehan-Breslow-Wilcoxon監測在各組之間進行統計學分析。 $P < 0.05$ 被認為是統計學上顯著的。

結果：

【0179】 化合物1的晶型A顯示出針對NOD/SCID小鼠中系統性REC-1 MCL嫁接物的劑量依賴性抗腫瘤活性。化合物1的晶型A在該異種移植模型中是顯著有效的。

測試7：晶型A的毒理學

【0180】 實施綜合的非臨床毒性研究項目，包括在大鼠和犬中的28天GLP研究和一些探究性研究來評價化合物1的晶型A在不同劑量的臨床前安全性。此等研究考慮到對於抗癌藥物的臨床前開發可獲得的管理指導。在此等研究中，化合物1展示出有利的毒理學和安全性藥理學特性。在整個研究中，在任何劑量水準上沒有發生測試項目相關的死亡。在整個研究中，在臨床化學或

凝結(coagulation)中沒有記錄毒理學上顯著的變化。在恢復期後沒有記錄此等變化。

測試8：晶型A的藥物動力學

【0181】 經充分驗證的LC-MS/MS方法可很好地用於Sprague-Dawley大鼠和小獵犬中在單劑量給予和多劑量給予後**化合物1**的晶型A的藥物動力學(PK)研究。

【0182】 **化合物1**的晶型A在大鼠中具有良好的口服生物利用度。它在大鼠中很快被吸收並展現出高的血漿清除率(CL)。在雌性大鼠中，動力學相對於劑量範圍上是線性的。雄性大鼠的線性度不足夠好。在雄性和雌性大鼠中，在多次口服給藥後沒有統計學上顯著累計**化合物1**。**化合物1**的晶型A在劑量範圍上展現適度的清除率(CL)、相當好的生物利用度(F%)、相對於劑量範圍的線性PK，且在犬中多次口服給藥後沒有**化合物1**的積累。

測試9：晶型A的ADME

【0183】 **化合物1**廣泛分佈至各種組織，但在腦組織中低，表明該藥物不容易穿過血腦屏障。

【0184】 在人肝微粒體中確定**化合物1**的晶型A對於7種主要藥物代謝CYP同工酶(CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A)的 IC_{50} 值並且還評價了**化合物1**對主要CYP同工酶上的時間依賴抑制潛能。對於CYP2C8 ($IC_{50} = 4.03 \mu M$)、CYP2C9 ($IC_{50} = 5.69 \mu M$)和CYP2C19 ($IC_{50} = 7.58 \mu M$)顯示弱抑制，但是對於其他CYP同工酶抑制較低。**化合物1**對於這7種主要的人CYP上不太可能是時間依賴性CYP抑制劑。CYP3A是人肝微粒體中負責代謝的主要CYP同功異型物。

實例12 臨床試驗研究

(1)在患有晚期B細胞惡性腫瘤的患者中**化合物1**的正在進行的1期臨床試驗

結果

【0185】 化合物1的首先在人中(first-in-human)的多中心、開放標籤的1期試驗在澳大利亞和新西蘭進行，並由兩個部分——涉及25位患者的劑量遞增階段和劑量擴張階段構成，其中吾等計劃招募總計100位患者。招募總計39位患者，包括來自最初遞增增加部分的全部25位患者和來自正在進行的劑量擴張部分的14位患者。基於化合物1在劑量擴張階段中的藥物動力學、藥效學、安全性和功效。在正在進行的劑量擴張試驗中進一步探索320 mg每天一次(QD)和160 mg每天兩次(BID)。

【0186】 2015年10月19日，資料分析的截止日期，已經觀察到29個客觀響應，包括3個完全響應(CR)、1個非常好的部分響應(VGPR)和25個部分響應(PR)。組織學的響應總結在表18中。39位患者中的31位仍然進行研究治療，沒有進展，包括到目前為止所有實現客觀響應的患者。

【0187】 表18 患者的組織學響應

	隨訪天數 中值(範圍)	最佳響應				ORR (CR + PR)
		CR	PR	SD	PD	
慢性淋巴 細胞性白 血病	220 (83- 329)	0/14 (0%)	13/14 ¹ (93%)	1/14 (7%)	0 (0%)	13/14 (93%)
套細胞淋 巴瘤	148 (84- 392)	2/10 (20%)	6/10 (60%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	8/10 (80%)
瓦爾登斯 特倫巨球 蛋白血症	271 (11- 398)	0/7 (0%)	6/7 ² (86%)	0/7 (0%)	1/7 (14%)	6/7 (86%)
DLBCL	29 (20- 236)	1/4 (25%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)
惰性 NHL	233 (215- 250)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
毛細胞白 血病	362	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
伯基特樣 淋巴瘤	84	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)

¹包括五位在最新評估中具有淋巴球增多的患者；²包括一位具有VGPR的

患者

注：CR = 完全響應；PR = 部分響應；SD = 病情穩定(stable disease)；PD = 進行性疾病；ORR = 客觀響應率

【0188】 8位患者中止使用**化合物1**，包括6位由於疾病發展且2位由於與他們潛在的惡性腫瘤相關的不良事件。3位患者在研究期間由於疾病進展或疾病進展的併發症的原因而死亡。沒有藥物相關的嚴重不良事件(SAE)。不良事件的絕大多數，不管與治療的關係，在嚴重性上為1級或2級且不是治療限制性的。在≥ 3級AE的19位中，4位由研究者評估為可能為藥物相關的—所有的均為自限性中性粒細胞減少，不需要治療中止。有一例大出血，定義為3級或更高級出血事件或者任何等級的顱內出血事件：在具有GI道的淋巴瘤參與的套細胞淋巴瘤患者中的GI出血；該出血事件在停藥(drug hold)期間發生，並且在重新開始**化合物1**治療後快速解決，並且因此不被認為是藥物相關的。6位患者具有心房纖顫/顫振(AF)的基線史，並且沒有報道惡化或新的AF事件。

(2)在患瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(WM)的患者中**化合物1**的正在進行的1期臨床試驗結果

【0189】 **化合物1**在B細胞惡性腫瘤中的多中心、開放標籤的1期試驗在澳大利亞、新西蘭、韓國和美國進行，且在由包括治療未經治療和復發性/難治性的瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(R/R WM)的疾病特異性隊列中由劑量遞增階段和劑量擴張階段構成。試驗的劑量遞增階段測試範圍在40 mg至320 mg的每日總劑量，且進行中的劑量擴張部分為160 mg每天兩次(BID)或320 mg每天一次(QD)的測試劑量。在2017年3月31日，48位患者登記參加研究。根據經修正的第六屆WM國際研討會(IWWM)標準確定響應。

【0190】 到目前為止，**化合物1**顯示對於**化合物1**相關的毒性耐受良好，沒有停止。不良事件(AE)在嚴重性和自限性中一般是輕度的。在48位患者中可

評價為安全的任何歸因的最頻發的AE (>10%)為瘀點/紫癍/挫傷(35%)、上呼吸道感染(31%)、便秘(25%)、腹瀉(19%)、鼻出血(19%)、噁心(17%)、咳嗽(15%)、貧血(15%)、頭疼(15%)、中性粒細胞減少(13%)和皮疹(13%)，其中所有在嚴重性均在1級或2級，除了3級或4級的貧血和中性粒細胞減少(各為8%)以及3級或4級的腹瀉和頭疼(各為2%)。5例嚴重的AE被評估為可能與**化合物1**相關；此等包括胸腔積血、心房纖顫、結腸炎、發熱性中性粒細胞減少和頭疼各1例。在受到特別關注的AE中，總計有3例心房纖顫(均為1級或2級)和1例嚴重的出血(胸腔積血)，定義為3級或更高級的出血或任何等級的中央神經系統出血。3個事件導致治療中止：支氣管擴張、前列腺腺癌和幽門腺癌各1例。

【0191】 在資料截止時，42位患者可用于響應的評價。不可評價功效的患者包括2位隨訪時間小於12周的患者，3位基線IgM < 500mg/dl的患者和1位由於冷沉蛋白基線IgM不精確的患者。在12.3個月(4.4–30.5個月)的中值隨訪時，ORR為90% (38/42位患者)且主要響應率為76% (32/42位患者)，其中在43% (18/42)的患者具有VGPR且在33% (14/42)的患者中具有部分響應。

(3)在患慢性淋巴細胞性白血病和小淋巴細胞性淋巴瘤(CLL/SLL)的患者中**化合物1**的正在進行的1期臨床試驗結果

【0192】 **化合物1**在患有B細胞惡性腫瘤的患者中的多中心、開放標籤的1期試驗在澳大利亞、新西蘭、韓國和美國進行，且在由包括治療未經治療(TN)和復發性/難治性(R/R) CLL/SLL的疾病特異性隊列中由劑量遞增階段和劑量擴張階段構成。試驗的劑量遞增階段測試範圍在40 mg至320 mg的每日總劑量，且進行中的劑量擴張部分為160 mg每天兩次(BID)或320 mg每天一次(QD)的測試劑量。在2017年3月31日，69位患有CLL或SLL的患者(18 TN, 51 R/R)登記參加研究。

【0193】 **化合物1**顯示為在CLL/SLL中耐受良好。任何歸因的大多數頻發

不良事件(AE) ($\geq 10\%$)為瘀點/紫癍/挫傷(46%)、疲勞(29%)、上呼吸道感染(28%)、咳嗽(23%)、腹瀉(22%)、頭疼(19%)、血尿(15%)、噁心(13%)、皮疹(13%)、關節痛(12%)、肌肉痙攣(12%)和尿路感染(12%)；所有此等事件為1級或2級，除了1例3級紫癍(皮下出血)，其為僅有的主要出血事件。另外的受關注的不良事件包括2級腹瀉和2級心房纖顫各1例。總計18例嚴重AE (SAE)發生在13位患者中，其中在不止1位患者中沒有SAE發生。僅1位患者由於AE，即2級胸腔積液而中止治療。

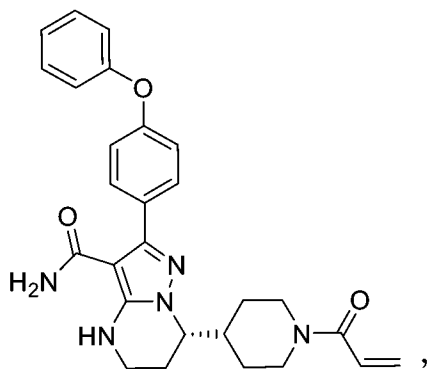
【0194】 在資料截止時，66位患者(16 TN和50 R/R)具有超過12周的隨訪並可評價其功效，並且3位另外的患者具有小於12周的隨訪。在10.5個月(2.2-26.8個月)的中值隨訪時，總響應率(ORR)為94% (62/66)，其中在3% (2/66)的患者中完全響應(CR)，在82% (54/66)的患者中部分響應(PR)且在9% (6/66)的患者中具有淋巴細胞增多的PR (PR-Ls)。在5% (3/66)的患者中觀察到病情穩定(SD)。具有胸腔積液的患者在第12周前中止治療且不可用於響應的評價。有1例霍奇金轉化。在TN CLL/SLL中，在7.6個月(3.7-11.6個月)的中值隨訪時間，ORR為100% (16/16)，其中在6% (1/16)的患者中CR，在81% (13/16)的患者中PR且在13% (2/16)的患者中PR-L。在R/R CLL/SLL中，在14.0個月(2.2-26.8個月)的中值隨訪時間，ORR為92% (46/50)，其中在2% (1/50)的患者中CR，在82% (41/50)的患者中PR且在8% (4/50)的患者中PR-L。在6% (3/50)患者中觀察到病情穩定。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種化合物1的無定形（amorphous）形式，



化合物1

其中所述無定形形式之對映異構體超越值為至少90%。

【請求項2】根據請求項1的無定形形式，其中所述無定形形式的玻璃轉化溫度的中間點溫度為約79.7°C。

【請求項3】根據請求項2的無定形形式，其中所述無定形形式之對映異構體超越值為至少97%。

【請求項4】根據請求項3的無定形形式，其中所述無定形形式之純度為至少99.3%。

【請求項5】根據請求項4的無定形形式，其中所述無定形形式之純度為至少99.5%。

【請求項6】一種醫藥組合物，其包含根據請求項5的無定形形式及醫藥上可接受之賦形劑。

【請求項7】根據請求項6的醫藥組合物，其中所述組合物係呈單個單元形式。

【請求項8】根據請求項7的醫藥組合物，其中所述單個單元形式包含約40 mg或約80 mg的化合物1的無定形形式。

【請求項9】根據請求項6的醫藥組合物，其中所述醫藥組合物包含約160 mg

的化合物1的無定形形式。

【請求項10】一種根據請求項1之無定形形式的用途，其係用於製造供治療個體中之B-細胞增殖性疾病的醫藥品，其中所述B-細胞增殖性疾病係選自由慢性淋巴細胞性白血病、小淋巴細胞性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症（Waldenström's macroglobulinemia）、邊緣區淋巴瘤及濾泡性淋巴瘤所組成之群組。

【請求項11】根據請求項10之用途，其中所述化合物1的無定形形式係以40 mg/天至320 mg/天之劑量投予。

【請求項12】根據請求項10之用途，其中所述化合物1的無定形形式係以每天兩次（BID）160 mg之劑量投予。

【請求項13】根據請求項10之用途，其中所述化合物1的無定形形式係以每天一次（QD）320 mg之劑量投予。

【請求項14】根據請求項10之用途，其中所述B-細胞增殖性疾病是慢性淋巴細胞性白血病。

【請求項15】根據請求項10之用途，其中所述B-細胞增殖性疾病是小淋巴細胞性淋巴瘤。

【請求項16】根據請求項10之用途，其中所述B-細胞增殖性疾病是套細胞淋巴瘤。

【請求項17】根據請求項16之用途，其中所述個體接受過至少一種先前療法。

【請求項18】根據請求項10之用途，其中所述B-細胞增殖性疾病是瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症。

【請求項19】根據請求項10之用途，其中所述B-細胞增殖性疾病是邊緣區淋巴瘤。

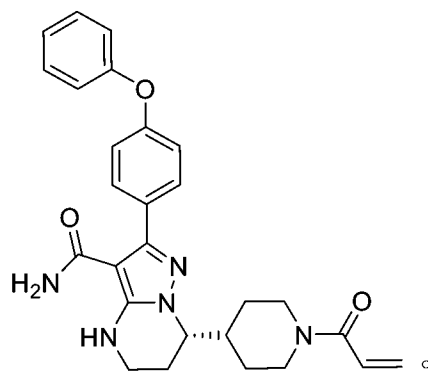
【請求項20】根據請求項19之用途，其中所述個體接受過至少一種先前療法。

【請求項21】根據請求項10之用途，其中所述邊緣區淋巴瘤是復發性或難治性邊緣區淋巴瘤。

【請求項22】根據請求項10之用途，其中所述B-細胞增殖性疾病是濾泡性淋巴瘤。

【請求項23】根據請求項10之用途，其中所述醫藥品是經口投予。

【請求項24】一種凍乾的化合物1的無定形形式，



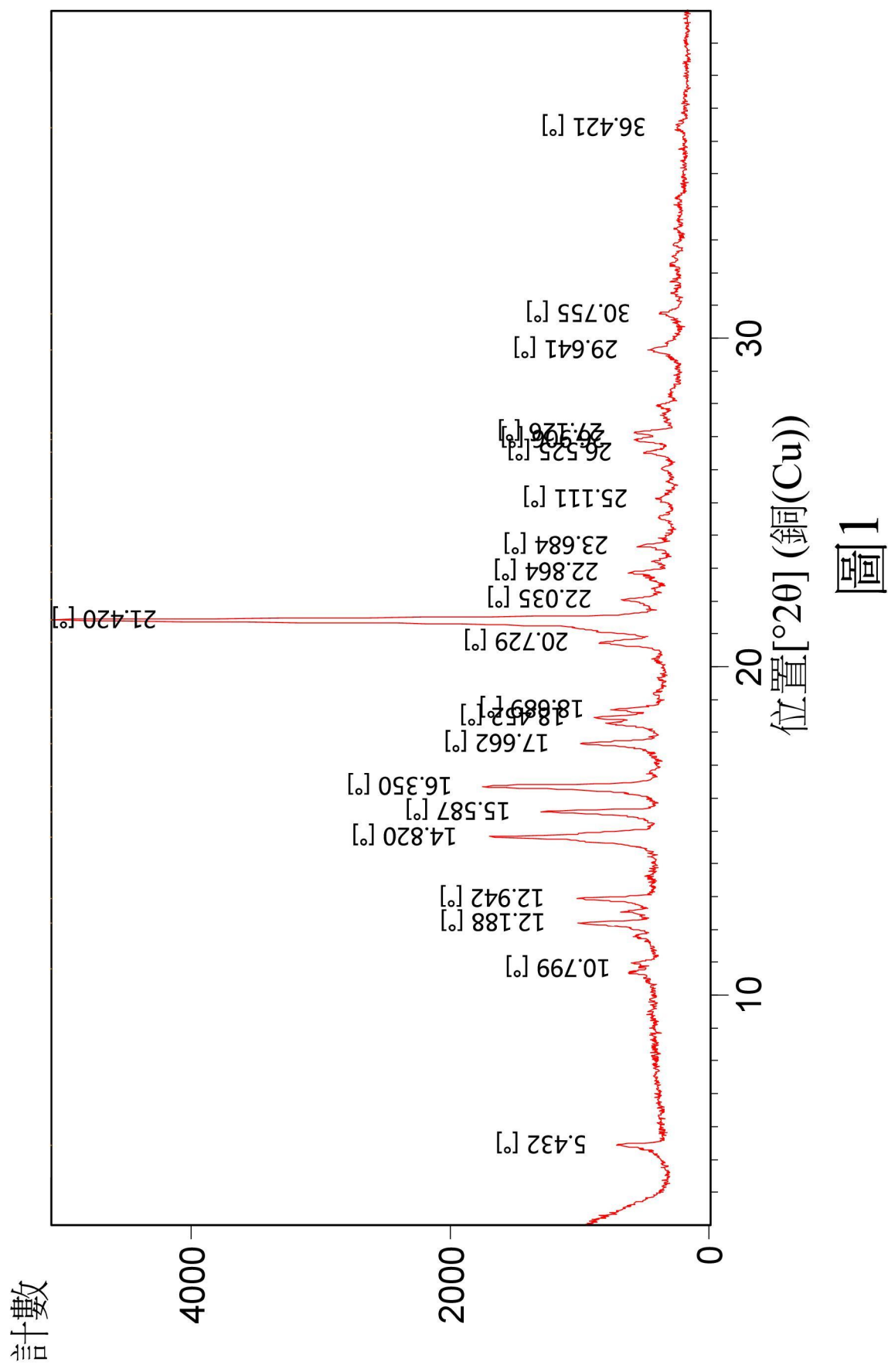
化合物1

【請求項25】根據請求項24的凍乾的無定形形式，其中所述凍乾的無定形形式之對映異構體超越值為至少97%。

【請求項26】根據請求項25的凍乾的無定形形式，其中所述凍乾的無定形形式之純度為至少99.3%。

【請求項27】根據請求項26的凍乾的無定形形式，其中所述凍乾的無定形形式之純度為至少99.5%。

【發明圖式】



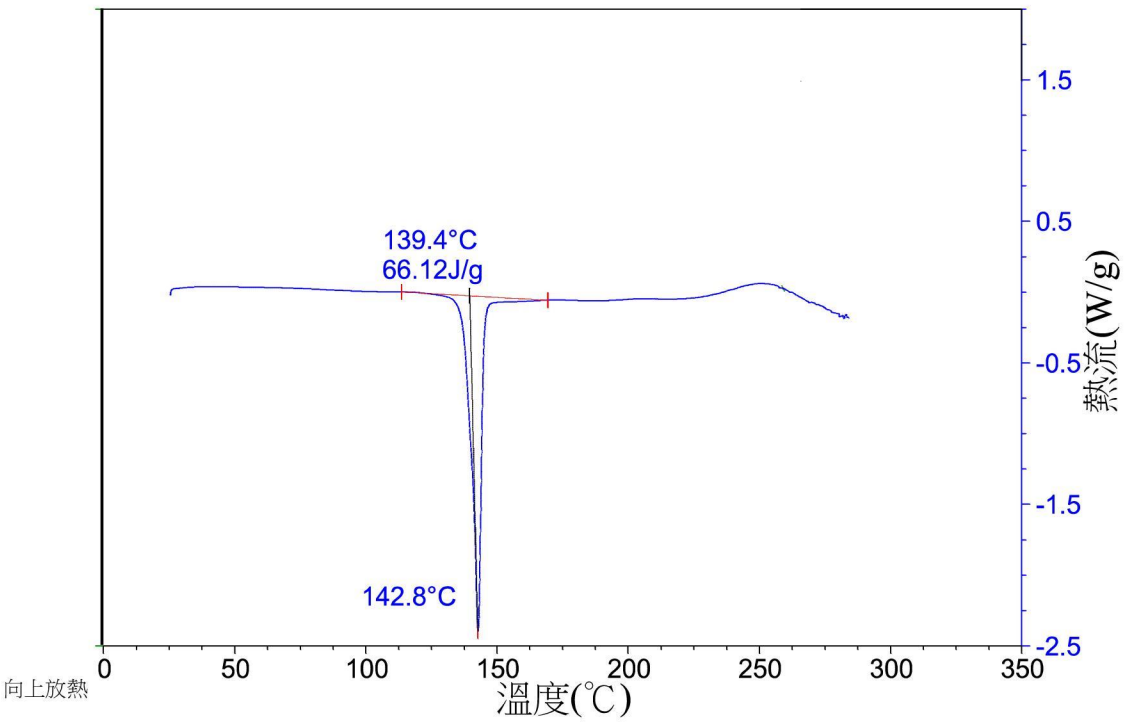


圖2

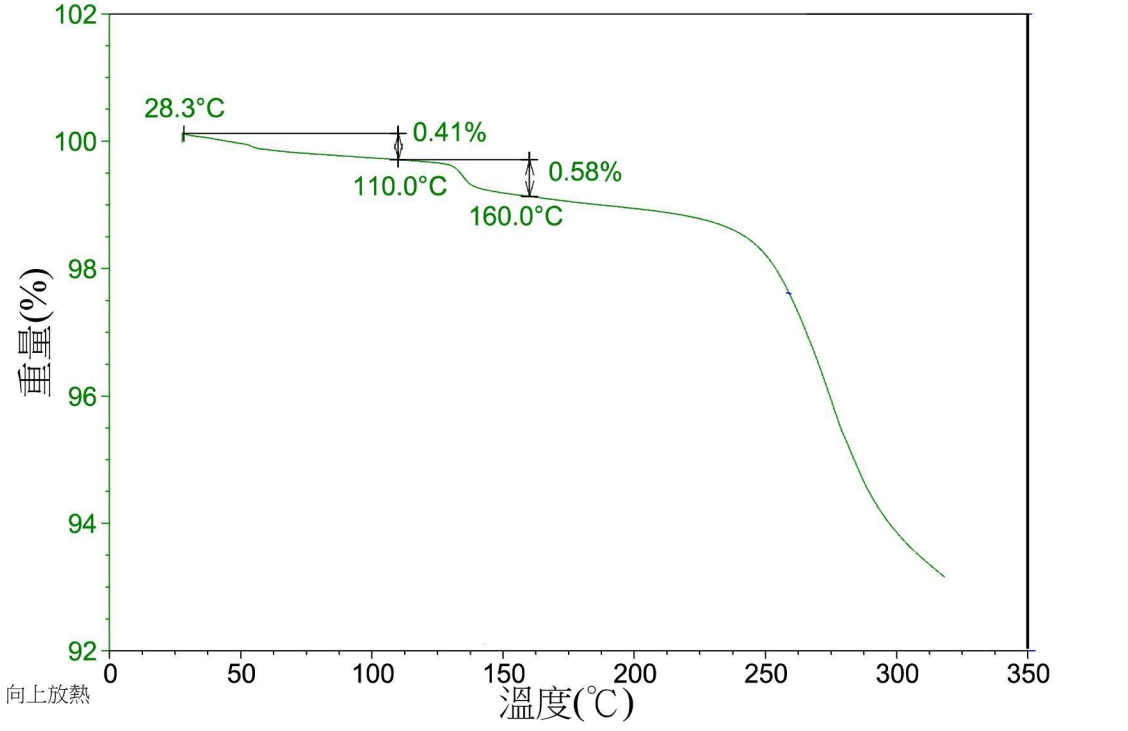
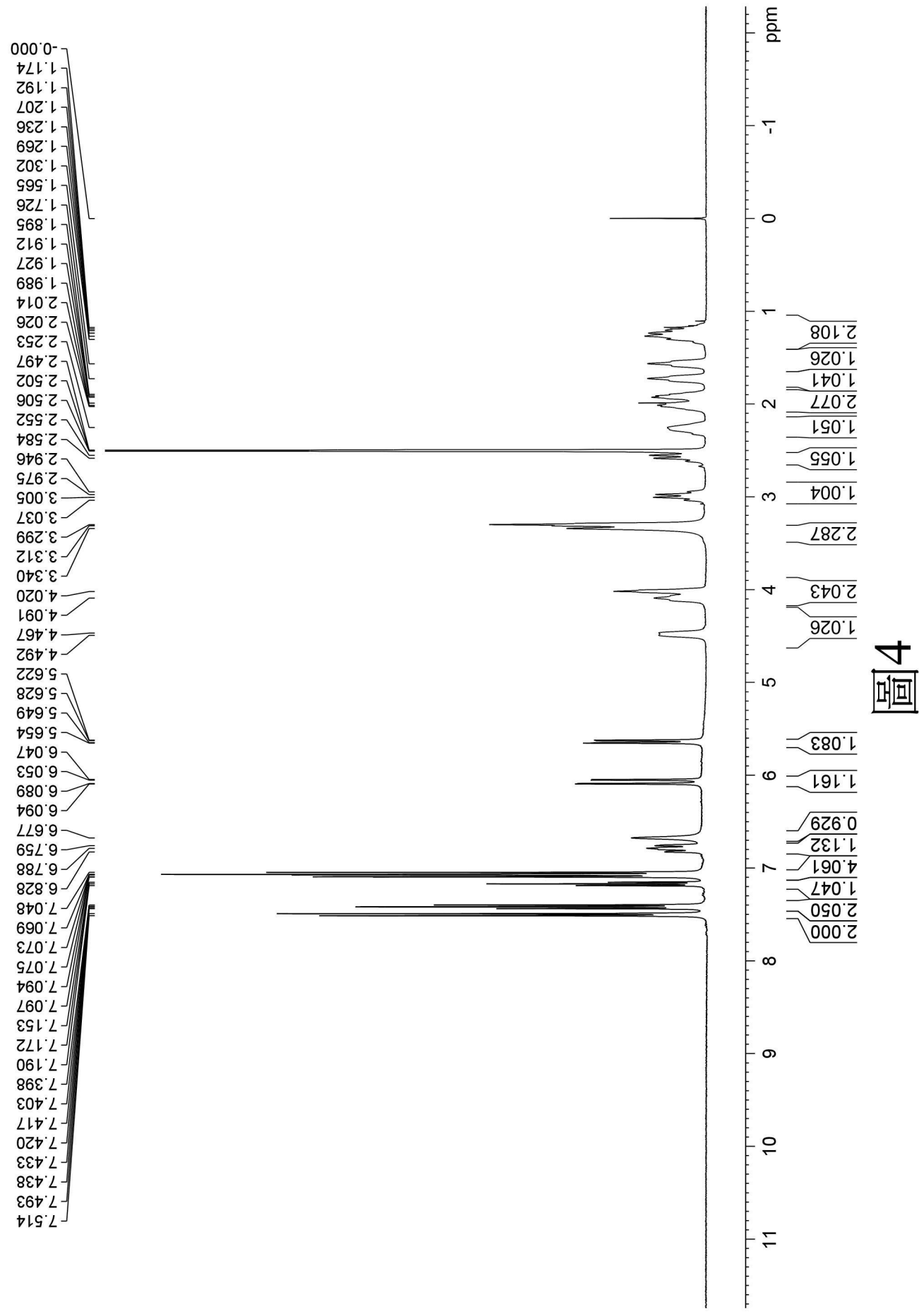


圖3



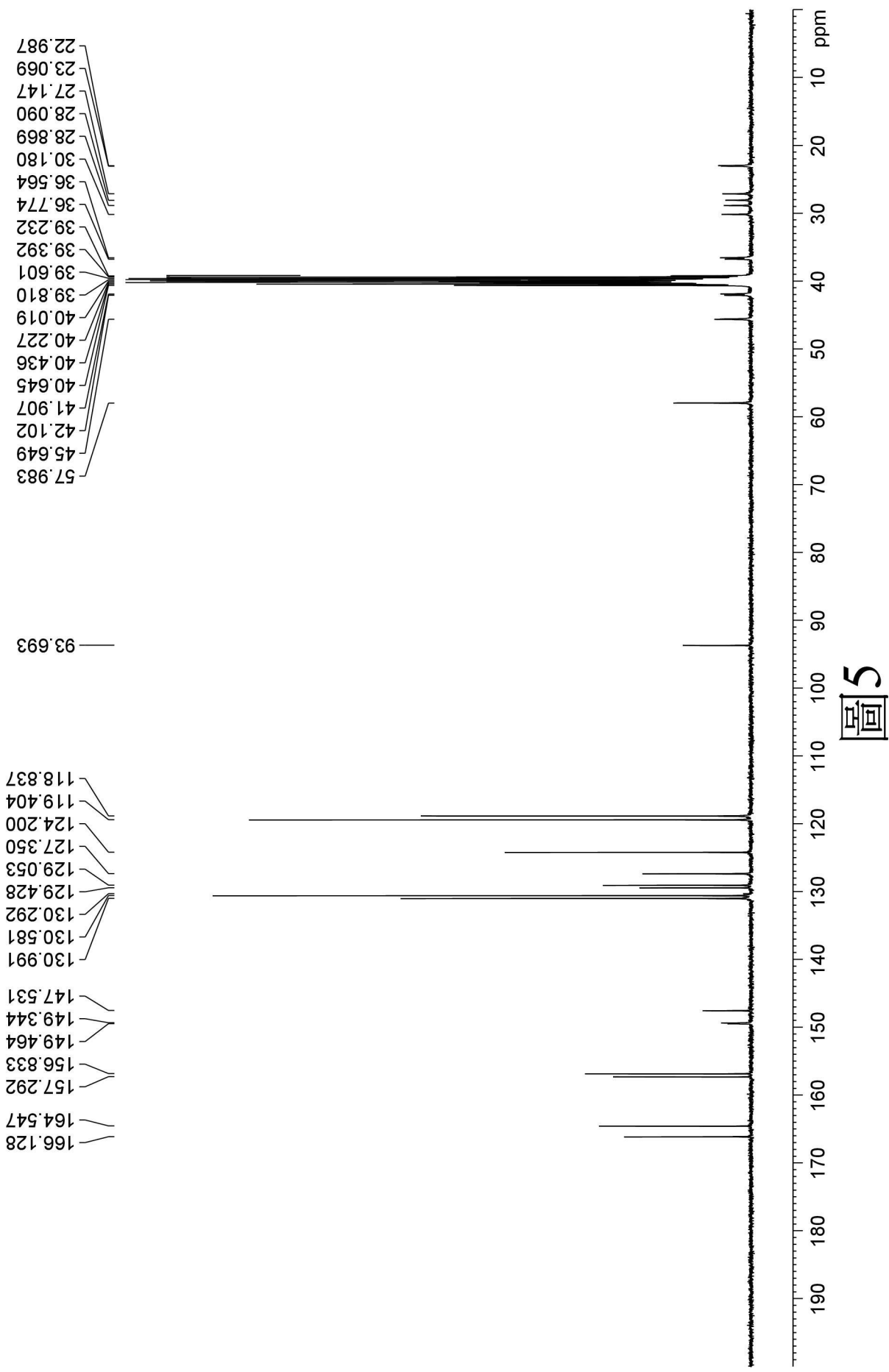


圖5

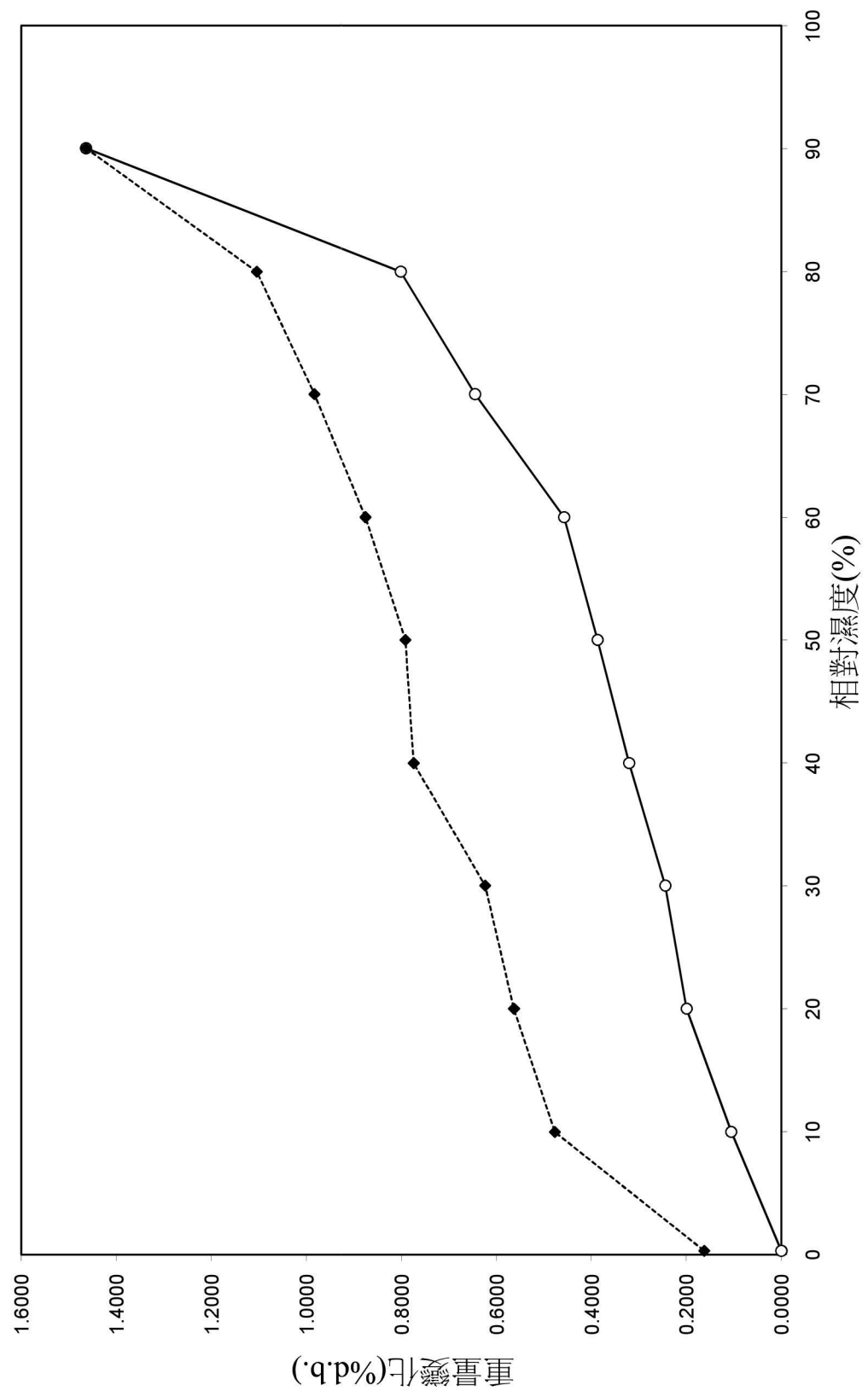


圖6

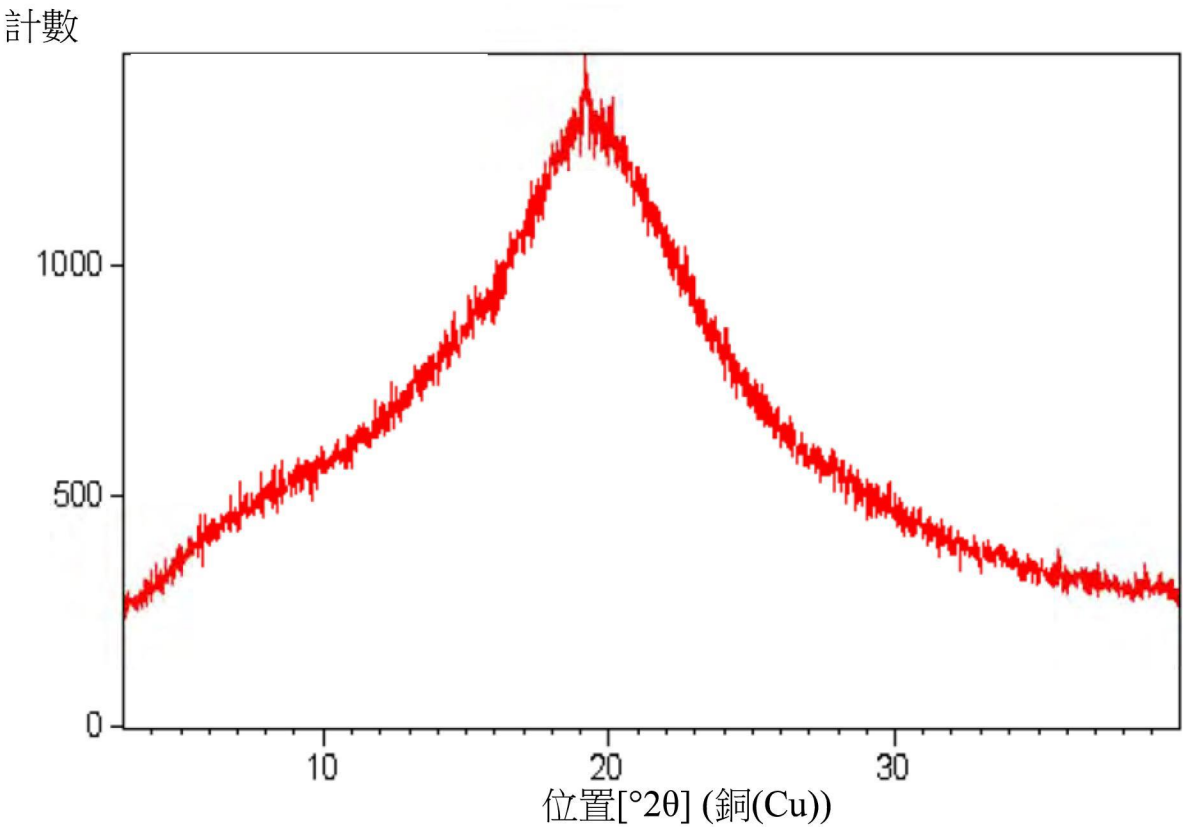


圖7A

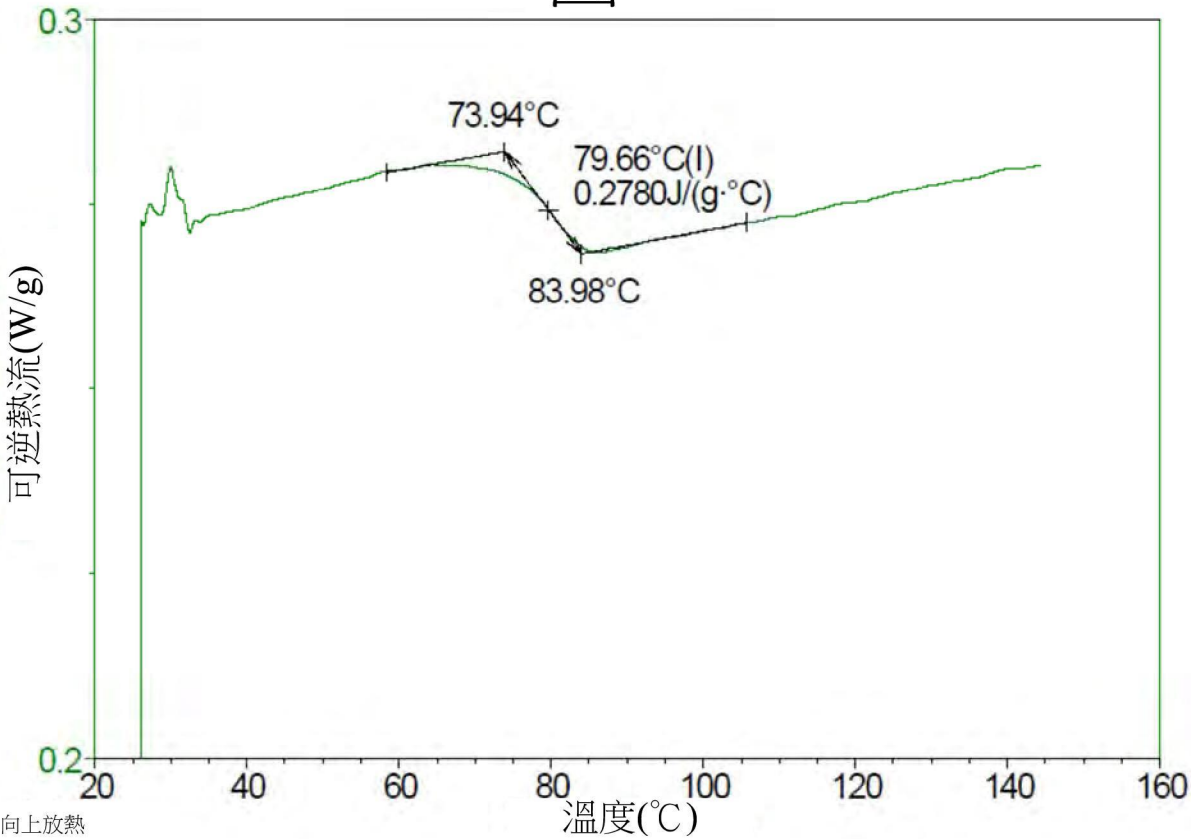


圖7B

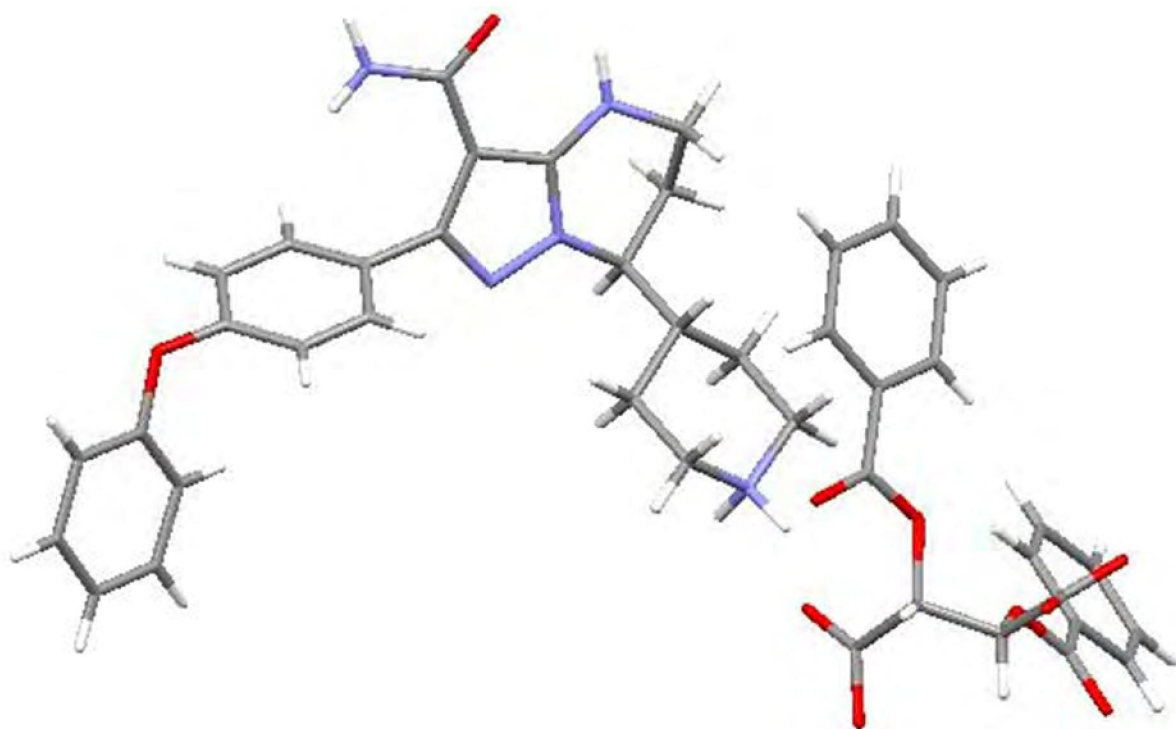


圖8

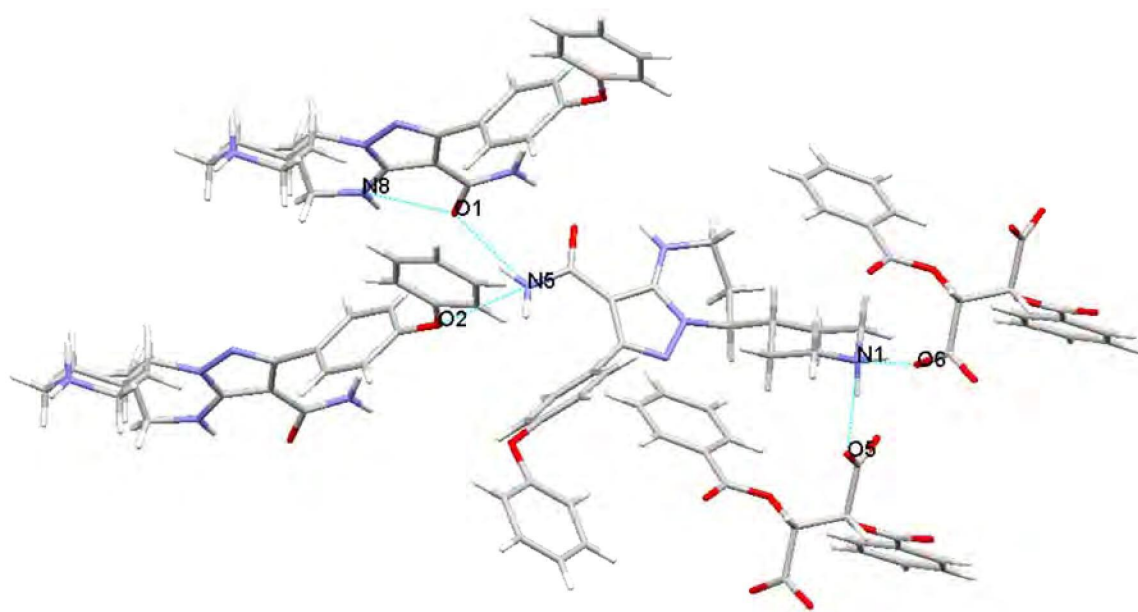


圖9

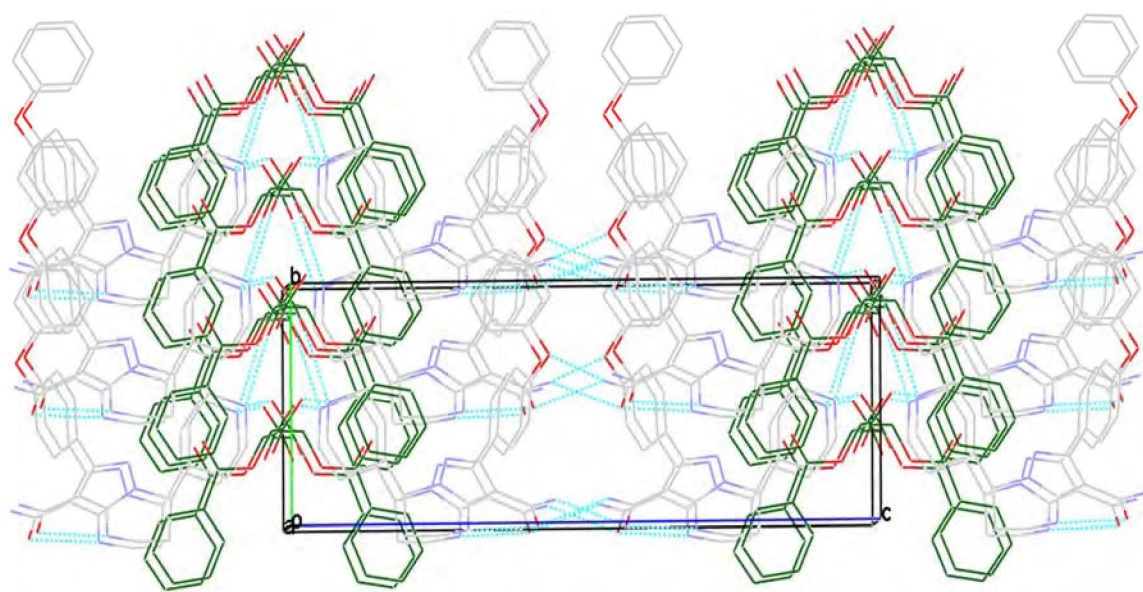


圖10

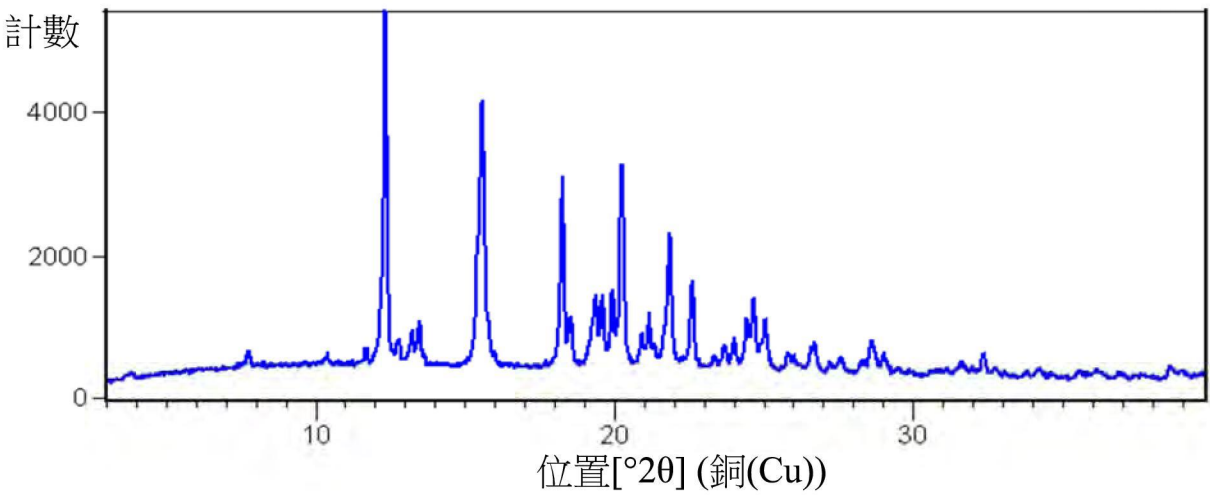


圖11