



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111386268 B

(45) 授权公告日 2022.04.19

(21) 申请号 201880076152.6

专利权人 南京明德新药研发有限公司

(22) 申请日 2018.11.20

(72) 发明人 王建非 张杨 朱文元 黎健
陈曙辉

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111386268 A

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

(43) 申请公布日 2020.07.07

代理人 薛琦 王卫彬

(66) 本国优先权数据

201711181960.2 2017.11.23 CN

(51) Int.Cl.

C07D 409/04 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61P 19/06 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.05.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2018/116351 2018.11.20

(56) 对比文件

CN 106032377 A, 2016.10.19

CN 104470898 A, 2015.03.25

CN 107266377 A, 2017.10.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/101058 ZH 2019.05.31

审查员 吴昊

(73) 专利权人 东宝紫星(杭州)生物医药有限公司

地址 310018 浙江省杭州市钱塘新区下沙
街道福城路291号和达药谷中心1-
1008室

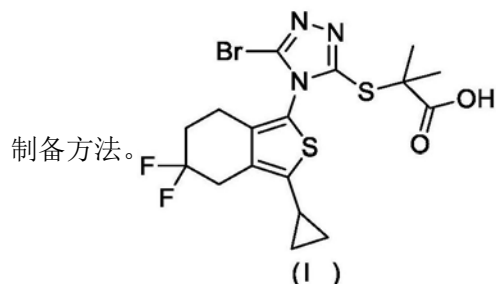
权利要求书1页 说明书14页 附图6页

(54) 发明名称

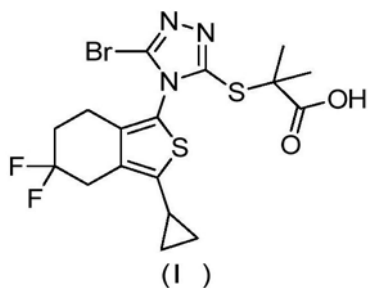
一种URAT1抑制剂的晶型及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种URAT1抑制剂的晶型及其



1. 式 (I) 化合物的A晶型,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $7.50\pm 0.2^\circ$, $9.66\pm 0.2^\circ$, $13.04\pm 0.2^\circ$, $14.42\pm 0.2^\circ$, $17.46\pm 0.2^\circ$, $18.57\pm 0.2^\circ$, $21.43\pm 0.2^\circ$, $26.18\pm 0.2^\circ$



2. 根据权利要求1所述的A晶型,其XRPD图谱如图1所示。

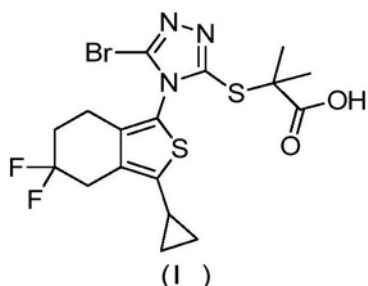
3. 根据权利要求1~2任意一项所述的A晶型,其差示扫描量热曲线在 $169.42\pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点。

4. 根据权利要求3所述的A晶型,其DSC图谱如图2所示。

5. 根据权利要求1~2任意一项所述的A晶型,其热重分析曲线在 $100\pm 3^\circ\text{C}$ 处失重达0.04491%。

6. 根据权利要求5所述的A晶型,其TGA图谱如图3所示。

7. 式 (I) 化合物的B晶型,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $9.88\pm 0.2^\circ$, $10.56\pm 0.2^\circ$, $12.23\pm 0.2^\circ$, $13.04\pm 0.2^\circ$, $14.62\pm 0.2^\circ$, $17.57\pm 0.2^\circ$, $20.38\pm 0.2^\circ$, $26.89\pm 0.2^\circ$



8. 根据权利要求7所述的B晶型,其XRPD图谱如图4所示。

9. 根据权利要求7~8任意一项所述的B晶型,其差示扫描量热曲线在 $163.51\pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点。

10. 根据权利要求9所述的B晶型,其DSC图谱如图5所示。

11. 根据权利要求7~8任意一项所述的B晶型,其热重分析曲线在 $120\pm 3^\circ\text{C}$ 处失重达0.1191%;从 $120\pm 3^\circ\text{C}$ 到 $153.60\pm 3^\circ\text{C}$ 处失重达0.6282%。

12. 根据权利要求11所述的B晶型,其TGA图谱如图6所示。

一种URAT1抑制剂的晶型及其制备方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] CN201711181960.2, 申请日2017.11.23。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种URAT1抑制剂的晶型及其制备方法。

背景技术

[0004] 尿酸是动物体内嘌呤类化合物代谢的产物。对人类而言,由于人体内缺乏将尿酸继续氧化降解的尿酸酶,尿酸在人体内作为嘌呤代谢的最终产物通过肠道和肾脏排出体外,其中肾脏排泄是人体内尿酸排泄的主要途径。人体内正常的尿酸浓度范围的上限是:男性 $400\mu\text{mol/L}$ (6.8mg/dL),女性 $360\mu\text{mol/L}$ (6mg/dL)。人体内尿酸水平异常往往是由于尿酸生成的增加或者尿酸排泄的减少。与尿酸水平异常相关的病症有高尿酸血症,痛风等。

[0005] 高尿酸血症是指人体内嘌呤的物质的新陈代谢发生紊乱,致使人体尿酸的合成增加或排出减少,血液中尿酸水平异常高的病症。痛风性关节炎是指当尿酸在人体血液中浓度超过 7mg/dL 时,尿酸以单钠盐的形式沉积在关节、软骨和肾脏中,导致身体免疫系统过度反应(敏感)而造成痛苦的炎症。一般发作部位为大拇趾关节,踝关节,膝关节等。急性痛风发作部位出现红、肿、热、剧烈疼痛,一般多在子夜发作,可使人从睡眠中惊醒。痛风初期,发作多见于下肢的关节。高尿酸血症是痛风性关节炎的病理基础,使用药物降低血内尿酸浓度是预防痛风性关节炎的常用方法之一。

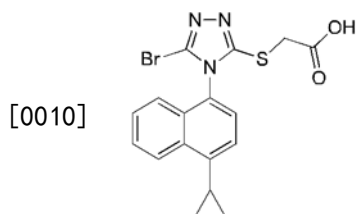
[0006] 在欧美,高尿酸血症和痛风疾病的发作呈现上升态势。流行病学研究表明痛风性关节炎的发病人数占总人口的1-2%,是成年男性最主要的关节炎类型。彭博社预估在2021年将有1770万痛风患者。在中国,调查显示在20至74年龄段人口中,25.3%人口血尿酸含量偏高,0.36%人口患有痛风疾病。目前,临床治疗药物主要包括1)抑制尿酸生成类药物,比如黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇和非布索坦;2)促尿酸排泄类药物,比如丙磺舒和苯溴马隆;3)炎症抑制剂,比如秋水仙碱等。这些药物在治疗上都有一定的缺陷,疗效差,副作用大,花费大是其临床应用的一些主要瓶颈。据报道,40%-70%患者在接受标准流程治疗后,血尿酸的含量没有达到预期治疗目标($<6\text{mg/dL}$)。

[0007] 作为促尿酸排泄剂,其作用机理是通过抑制近曲肾小管刷状边缘膜上的URAT1转运体,减少对尿酸的重吸收。尿酸是体内嘌呤的代谢产物,主要以原形经肾小球滤过,肾小管重吸收和再分泌,最后通过尿液排出体外,极少部分可由肠系膜细胞分泌入肠腔中。近曲肾小管S1段是尿酸重吸收的场所,98%~100%滤过的尿酸在此处通过小管上皮细胞刷状边缘膜上的尿酸转运体URAT1和有机阴离子转运体OAT4进入上皮细胞。进入上皮细胞的尿酸再经肾小管基侧膜被重吸收入小管周围毛细血管。近曲肾小管S2段是尿酸再分泌的场所,分泌的量约为小球滤过量的50%。肾间质中的尿酸首先经过小管上皮细胞基侧膜上阴离子转运体OAT1、OAT3进入上皮细胞内。进入上皮细胞的尿酸再经过刷状缘膜上另一种阴离子转运体MRP4,排入小管腔内。近曲小管的S3段可能是尿酸分泌后的再吸收场所,再吸收的量

约为小球滤过量的40%，而且与第一步重吸收类似，URAT1可能为关键的重吸收转运体。因此，如果能显著抑制尿酸盐转运体URAT1，将会增强体内尿酸的排泄，从而降低血尿酸水平，降低痛风发作的可能性。

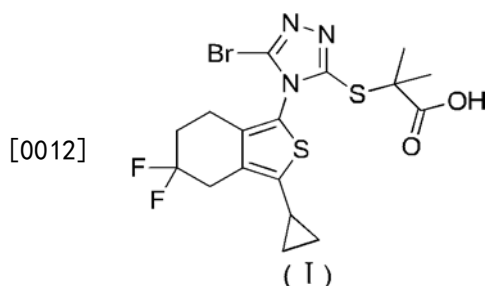
[0008] 2015年12月，美国FDA批准了第一个URAT1抑制剂Zurampic (Leinurad)。批准了其200mg剂量与黄嘌呤氧化酶抑制剂XOI (如Febuxostat等) 联用用于高尿酸血症和痛风性关节炎的治疗，但是联合用药与黄嘌呤氧化酶抑制剂单独用药对比，其附加效应并不十分显著。Zurampic 400mg剂量未获批准，原因在于高剂量下显著的毒副作用(肾相关的不良事件发生率特别是肾结石的发病率)。因此，FDA要求Zurampic标签加注黑框警告，警示医务人员Zurampic引起急性肾衰竭的风险，特别是在不与XOI联用的情况下更常见，如果超批准剂量使用Zurampic，引起肾衰竭的风险更高。同时，FDA要求Zurampic上市后，阿斯利康继续进行对肾脏和心血管安全性的考察。所以，开发一种新型的安全的降血尿酸药物成为该领域的强烈需求。

[0009] WO2009070740公开了Leinurad，其结构如下：



发明内容

[0011] 本发明提供了式(I)化合物的A晶型，其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $7.50 \pm 0.2^\circ$ ， $13.04 \pm 0.2^\circ$ ， $21.43 \pm 0.2^\circ$ 。



[0013] 本发明的一些方案中，上述A晶型的X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $7.50 \pm 0.2^\circ$ ， $9.66 \pm 0.2^\circ$ ， $13.04 \pm 0.2^\circ$ ， $14.42 \pm 0.2^\circ$ ， $17.46 \pm 0.2^\circ$ ， $18.57 \pm 0.2^\circ$ ， $21.43 \pm 0.2^\circ$ ， $26.18 \pm 0.2^\circ$ 。

[0014] 本发明的一些方案中，上述A晶型的XRPD图谱如图1所示。

[0015] 本发明的一些方案中，上述A晶型的XRPD图谱解析数据如表1所示：

[0016] 表1：A晶型的XRPD图谱解析数据

[0017]

编号	2θ 角 ($^\circ$)	面间距 (Å)	相对强度(%)	编号	2θ 角 ($^\circ$)	面间距 (Å)	相对强度(%)
----	-----------------------------	------------	---------	----	-----------------------------	------------	---------

[0018]

1	7.495	11.786	7.0	28	27.320	3.262	0.5
2	9.660	9.148	2.8	29	27.795	3.207	1.1
3	12.208	7.244	0.3	30	28.531	3.126	1.8
4	13.590	6.510	0.5	31	28.809	3.096	6.1
5	13.044	6.782	32.4	32	29.611	3.014	4.2
6	13.751	6.435	0.4	33	29.910	2.985	2.3
7	13.768	6.427	0.5	34	30.611	2.918	4.0
8	14.422	6.136	4.5	35	30.703	2.910	3.5
9	15.524	5.704	7.9	36	31.362	2.850	1.0
10	17.465	5.074	2.8	37	31.517	2.836	5.1
11	18.573	4.773	30.2	38	32.527	2.751	3.5
12	18.551	4.779	28.6	39	33.358	2.684	4.3
13	20.156	4.402	0.5	40	33.795	2.650	6.3
14	20.268	4.378	1.0	41	34.482	2.599	9.7
15	20.417	4.346	1.6	42	35.189	2.548	0.3
16	20.513	4.326	1.6	43	35.441	2.531	0.7
17	21.432	4.143	100.0	44	36.131	2.484	0.6
18	21.765	4.080	7.4	45	36.042	2.490	0.8
19	22.285	3.986	0.7	46	36.418	2.465	0.4
20	22.830	3.892	13.9	47	36.787	2.441	0.7
21	22.978	3.867	16.6	48	37.100	2.421	1.3
22	23.589	3.769	5.2	49	37.326	2.407	1.8
23	24.217	3.672	1.6	50	37.851	2.375	5.2
24	24.820	3.584	2.7	51	38.190	2.355	0.4
25	25.261	3.523	5.4	52	38.572	2.332	1.8
26	25.583	3.479	0.4	53	39.239	2.294	0.5
27	26.183	3.401	9.2				

[0019] 本发明的一些方案中,上述A晶型的差示扫描量热曲线在 $169.42 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点。

[0020] 本发明的一些方案中,上述A晶型的DSC图谱如图2所示。

[0021] 本发明的一些方案中,上述A晶型的热重分析曲线在 $100 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重达0.04491%。

[0022] 本发明的一些方案中,上述A晶型的TGA图谱如图3所示。

[0023] 本发明还提供了式(I)化合物的B晶型,其X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $9.88 \pm 0.2^\circ$, $10.56 \pm 0.2^\circ$, $20.38 \pm 0.2^\circ$ 。

[0024] 本发明的一些方案中,上述B晶型的X射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: $9.88 \pm 0.2^\circ$, $10.56 \pm 0.2^\circ$, $12.23 \pm 0.2^\circ$, $13.04 \pm 0.2^\circ$, $14.62 \pm 0.2^\circ$, $17.57 \pm 0.2^\circ$, $20.38 \pm 0.2^\circ$, $26.89 \pm 0.2^\circ$ 。

[0025] 本发明的一些方案中,上述B晶型的XRPD图谱如图4所示。

[0026] 本发明的一些方案中,上述B晶型的XRPD图谱解析数据如表2所示:

[0027] 表2:B晶型的XRPD图谱解析数据

[0028]

编号	2 θ 角 ($^\circ$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度(%)	编号	2 θ 角 ($^\circ$)	面间距 ($\text{\AA}$)	相对强度(%)
----	------------------------------	-------------------------	---------	----	------------------------------	-------------------------	---------

[0029]

1	3.315	26.6304	52.6	27	23.675	3.7549	9.9
2	3.62	24.3886	25.2	28	24.344	3.6533	3.4
3	9.885	8.9405	31.4	29	25.292	3.5184	15.8
4	10.559	8.3711	75.6	30	25.843	3.4447	27.1
5	12.233	7.2291	9.9	31	26.889	3.313	40.2
6	13.04	6.7839	19.7	32	27.456	3.2458	7.7
7	13.376	6.6139	12.9	33	28.11	3.1717	33.4
8	13.686	6.4646	22	34	28.522	3.1269	10.3
9	14.27	6.2017	3	35	29.04	3.0723	15.9
10	14.62	6.0538	26.8	36	29.294	3.0462	16.9
11	15.46	5.7269	8.6	37	29.554	3.02	6.1
12	15.861	5.583	12.9	38	29.966	2.9794	8.7
13	16.52	5.3616	5.6	39	30.163	2.9604	11.2
14	17.573	5.0427	23.4	40	30.495	2.9289	9.7
15	18.017	4.9195	4.9	41	30.935	2.8883	12.6
16	18.546	4.7801	6.2	42	31.426	2.8443	7.7
17	19.036	4.6582	29.8	43	31.982	2.7961	5.5
18	19.31	4.5929	19.2	44	32.45	2.7568	22.1
19	19.803	4.4794	56.7	45	33.418	2.6792	7.1
20	20.379	4.3541	100	46	34.583	2.5915	4.3
21	20.737	4.2798	16.2	47	36.14	2.4833	6.9
22	21.09	4.209	10.5	48	36.667	2.4488	5
23	21.745	4.0837	14.1	49	37.562	2.3925	2.6
24	22.043	4.0291	9.3	50	38.311	2.3474	4.3
25	22.548	3.94	17.6	51	38.899	2.3133	6.1
26	23.179	3.8342	26.2				

[0030] 本发明的一些方案中,上述B晶型的差示扫描量热曲线在 $163.51 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点。

[0031] 本发明的一些方案中,上述B晶型的DSC图谱如图5所示。

[0032] 本发明的一些方案中,上述B晶型的热重分析曲线在 $120 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重达0.1191%,从 $120 \pm 3^\circ\text{C}$ 到 $153.60 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重达0.6282%。

[0033] 本发明的一些方案中,上述B晶型的TGA图谱如图6所示。

[0034] 技术效果

[0035] 本发明式(I)化合物在稳定转染URAT1(尿酸转运蛋白)基因的HEK293细胞系上,对于URAT1介导的 ^{14}C -尿酸的转运,展现了更优的体外抑制活性;本发明式(I)化合物有较好的药物代谢的稳定性,同时也大大提高了药物的口服吸收生物利用度;其晶型的溶解度、稳定性较好。因此本发明化合物具有良好的成药前景。

[0036] 定义和说明

[0037] 除非另有说明,本文所用的下列术语和短语旨在含有下列含义。一个特定的短语或术语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的,而应该按照普通的含义去理解。当本文出现商品名时,旨在指代其对应的商品或其活性成分。

[0038] 本发明的中间体化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备,包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域

域技术上人员所熟知的等同替换方式,优选的实施方式包括但不限于本发明的实施例。

[0039] 本发明具体实施方式的化学反应是在合适的溶剂中完成的,所述的溶剂须适合于本发明的化学变化及其所需的试剂和物料。为了获得本发明的化合物,有时需要本领域技术人员在已有实施方式的基础上对合成步骤或者反应流程进行修改或选择。

[0040] 下面会通过实施例具体描述本发明,这些实施例并不意味着对本发明的任何限制。

[0041] 本发明所使用的所有溶剂是市售的,无需进一步纯化即可使用。

[0042] 本发明所使用的溶剂可经市售获得。本发明采用下述缩略词:DCM代表二氯甲烷;DMF代表N,N-二甲基甲酰胺;DMSO代表二甲亚砜;EtOH代表乙醇;MeOH代表甲醇;TFA代表三氟乙酸;TsOH代表对甲苯磺酸;mp代表熔点;EtSO₃H代表乙磺酸;MeSO₃H代表甲磺酸;ATP代表三磷酸腺苷;HEPES代表4-羟乙基哌嗪乙磺酸;EGTA代表乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸;MgCl₂代表氯化镁;MnCl₂代表氯化锰;DTT代表二硫苏糖醇。

[0043] 粉末X-射线衍射(X-ray powder diffractometer,XRPD)

[0044] 仪器型号:布鲁克D8 advance X-射线衍射仪

[0045] 测试方法:大约10~20mg样品用于XRPD检测。

[0046] 详细的XRPD参数如下:

[0047] 光管:Cu, $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ 。

[0048] 光管电压:40kV,光管电流:40mA

[0049] 发散狭缝:0.60mm

[0050] 探测器狭缝:10.50mm

[0051] 防散射狭缝:7.10mm

[0052] 扫描范围:4-40deg (或3-40deg)

[0053] 步径:0.02deg

[0054] 步长:0.12秒

[0055] 样品盘转速:15rpm

[0056] 差热分析(Differential Scanning Calorimeter,DSC)

[0057] 仪器型号:TA Q2000差示扫描量热仪

[0058] 测试方法:取样品(~1mg)置于DSC铝锅内进行测试,在50mL/min N₂条件下,以10℃/min的升温速率,加热样品从25℃到300℃。

[0059] 热重分析(Thermal Gravimetric Analyzer,TGA)

[0060] 仪器型号:TA Q5000IR热重分析仪

[0061] 测试方法:取样品(2~5mg)置于TGA铂金锅内进行测试,在25mL/min N₂条件下,以10℃/min的升温速率,加热样品从室温到失重20%。

附图说明

[0062] 图1为A晶型的Cu-K α 辐射的XRPD谱图。

[0063] 图2为A晶型的DSC谱图。

[0064] 图3为A晶型的TGA谱图。

[0065] 图4为B晶型的Cu-K α 辐射的XRPD谱图。

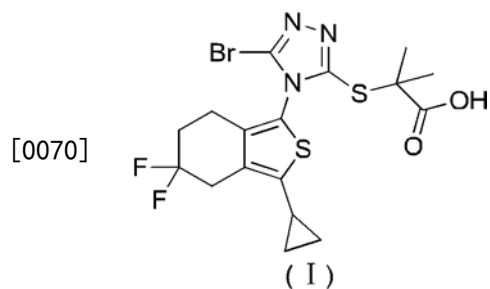
[0066] 图5为B晶型的DSC谱图。

[0067] 图6为B晶型的TGA谱图。

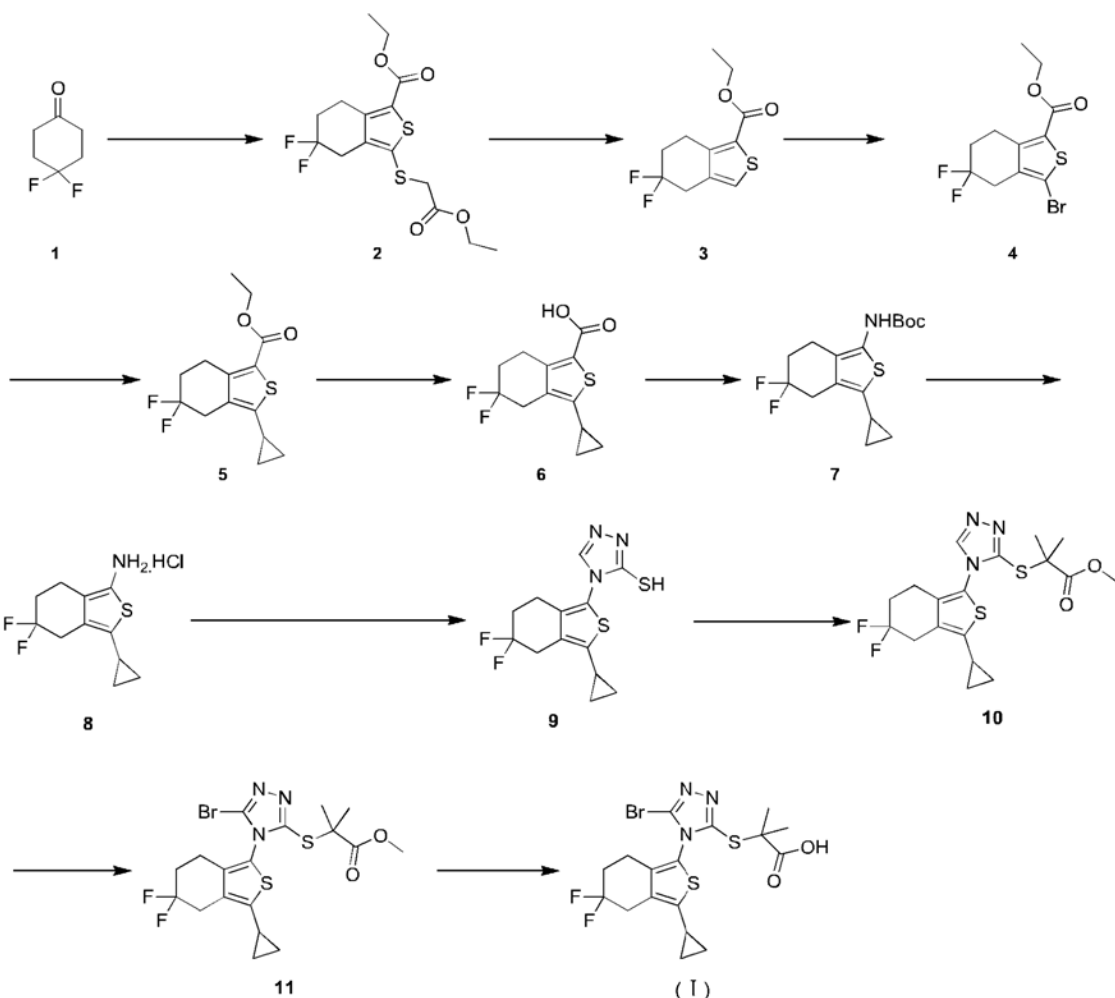
具体实施方式

[0068] 为了更好的理解本发明的内容,下面结合具体实施例来做进一步的说明,但具体的实施方式并不是对本发明的内容所做的限制。

[0069] 实施例1:式(I)化合物的制备



[0071] 合成路线:



[0073] 步骤1:化合物2的合成

[0074] 在三口烧瓶(10L)中加入二甲基亚砜4.5L,在搅拌下加入叔丁醇钾(836.66g, 7.46mol, 2eq),加毕继续搅拌10分钟至溶解澄清,然后用冰水浴冷却到反应液内温20-25℃。向上述溶液中滴加化合物1(500.05g, 3.73mol, 1eq)的二甲基亚砜(500mL)溶液,滴毕,

搅拌反应30分钟,接着向其中滴加二硫化碳(283.86g,3.73mol,1eq),滴毕,继续搅拌反应30分钟。再向其中滴加溴代乙酸乙酯(1250g,7.46mol,2eq),滴毕,继续搅拌反应2小时。最后加入碳酸钾(515.52g,7.46mol,1eq),升至内温65℃继续搅拌反应8小时。反应完毕,将反应液冷却到室温。将反应液用乙酸乙酯(10L)稀释,然后加入1M盐酸(2L)和水(2L)搅拌10分钟,静置分液。分出水层,有机相用水(2L×3)洗涤。合并水层,用乙酸乙酯(3L)萃取。合并所有有机相,用饱和食盐水(2L×2)洗涤。有机相用适量无水硫酸钠干燥,过滤除去干燥剂,滤液减压除去溶剂得粗品。以相同规模,平行投料6批,合并后得黑红色油状粗品。粗品静置72小时后有大量固体析出,向其中加入乙醇(2L),搅拌30分钟,过滤,收集滤饼并真空干燥得化合物2。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ:4.32(q,J=7.2Hz,2H),4.19(q,J=7.2Hz,2H),3.56(s,2H),3.25(t,J=6.8Hz,2H),3.19(t,J=14.4Hz,2H),2.26-2.17(m,2H),1.37(t,J=7.2Hz,3H),1.27(t,J=7.2Hz,3H);MS m/z=364.8[M+H]⁺。

[0075] 步骤2:化合物3的合成

[0076] 将化合物2(241.00g,0.66mol)溶解在乙醇(1L)中并置于高压釜(5L)中,在氩气保护下加入雷尼镍(120g),然后再补加乙醇(2L)。装好高压釜并用氩气置换三次,再用氢气置换三次,充氢气到釜内压力2.0MP,搅拌并加热到釜内温度85℃反应28小时。停止反应,并将反应体系冷却到室温,反应液过滤,滤饼以乙醇冲洗三遍,每次0.5L。合并滤液,然后旋干得到化合物3。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ:7.09(s,1H),4.26(q,J=7.2Hz,2H),3.20(t,J=6.8Hz,2H),3.12(t,J=14.4Hz,2H),2.20-2.10(m,2H),1.30(t,J=6.8Hz,3H);MS m/z=247.0[M+H]⁺。

[0077] 步骤3:化合物4的合成

[0078] 将化合物3(406.2g,1.65mol,1eq)溶解在乙腈(6L)中,然后缓慢加入N-溴代丁二酰亚胺(1484.2g,6.60mol,4eq),所得反应液在23~25℃下搅拌反应12小时。反应结束后,将反应液体浓缩到约1.0L。过滤除去固体,向滤液中加亚硫酸氢钠饱和溶液(1L)并搅拌10分钟。加入酸乙酯,萃取三遍,每次2L。合并有机相,加入适量无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂,将滤液减压浓缩。向残留物中加入石油醚(3L),在30℃下充分搅拌30分钟。过滤,滤饼用石油醚洗5遍,每次200mL,直至滤饼中没有产品残留。合并所有有机相,旋干得粗品。向粗品中加入石油醚(100mL),充分搅拌,过滤,收集滤饼并真空干燥得到化合物4。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ:4.24(q,J=7.2Hz,2H),3.19(t,J=6.8Hz,2H),2.95(t,J=14.4Hz,2H),2.17-2.07(m,2H),1.29(t,J=7.2Hz,3H)。

[0079] 步骤4:化合物5的合成

[0080] 将化合物4(340.21g,1.05mol),环丙基硼酸(108.12g,1.26mol),无水磷酸钾(444.98g,2.10mol),醋酸钨(12.03g,53.58mmol)和2-二环己基磷-2',4',6'-三异丙基联苯(23.86g,50.05mmol)加入到甲苯和水的混合溶剂(10:1,3.4L/340mL)中,反应瓶用氮气置换六次后将其置于油浴锅中。加热反应液在内温80℃,并在此温度下搅拌反应16小时。反应完成后,将反应液冷却到室温,向反应液中加入三聚硫氰酸(6.51g悬浮于乙醇34mL中)搅拌0.5小时。以类似规模(300.00g化合物4),平行投料5批,合并处理。过滤,分出有机相,水相用乙酸乙酯(250mL×2)萃取。合并有机相,加入适量无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂,将滤液减压浓缩得到黑色油状粗品。粗品静置20小时后有黄色固体析出,向其中加入石油醚(3L)搅拌1小时。过滤,滤饼真空干燥得到化合物5。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ:4.29(q,J=

7.2Hz, 2H), 3.23 (t, J=6.4Hz, 2H), 3.16 (t, J=14.8Hz, 2H), 2.24-2.18 (m, 2H), 1.95-1.85 (m, 1H), 1.35 (t, J=6.8Hz, 3H), 1.09-1.07 (m, 2H), 0.77-0.75 (m, 2H)。

[0081] 步骤5: 化合物6的合成

[0082] 将化合物5 (619.27g, 2.16mol) 加入到氢氧化钠 (173.55g, 4.33mol) 的乙醇和水的混合溶液 (3L/3L) 中, 并将反应液加热升至内温60℃搅拌反应3小时。反应完毕, 将反应液冷却到室温。以类似规模 (750.17g 化合物5), 平行投料1批, 合并处理。合并后的反应液用石油醚 (4L) 萃取。分出有机相, 有机相用水 (1.5L×2) 反洗两次。合并水相, 减压浓缩除去乙醇。向水相中加水稀释到13L, 然后缓慢加入稀盐酸 (3M) 调节到pH=2, 有大量淡黄色固体析出。过滤, 滤饼用水淋洗 (3.0L×2)。抽干, 收集滤饼, 经过真空烘箱60℃真空干燥得到化合物6。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ: 12.79 (brs, 1H), 3.23 (t, J=14.8Hz, 2H), 3.07 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.27-2.20 (m, 2H), 2.19-2.02 (m, 1H), 1.09-1.04 (m, 2H), 0.68-0.66 (m, 2H)。

[0083] 步骤6: 化合物7的合成

[0084] 在搅拌下, 将化合物6 (641.27g, 2.48mol), 三乙胺 (754.07g, 7.45mol) 和叠氮磷酸二苯酯 (1025.34g, 3.73mol) 加入到叔丁醇 (6.5L) 中。将反应液置于100℃油浴中加热16小时。反应完成后冷却至室温。以类似规模 (650.00g 化合物6), 平行投料4批, 合并处理。合并反应液, 减压浓缩除去叔丁醇。剩余黑色残留物用乙酸乙酯 (10L) 溶解, 所得乙酸乙酯溶液用氢氧化钠水溶液 (5%, 5.0L×2) 洗涤, 再用饱和食盐水 (5.0L) 洗涤。加入适量无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂, 将滤液减压浓缩得到棕黑色固体粗品, 静置后有固体析出。将石油醚 (8L) 加入到粗品中搅拌2小时。过滤, 滤饼用石油醚 (1L) 分次淋洗, 滤饼经过真空烘箱60℃真空干燥得到化合物7。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 6.31 (brs, 1H), 3.11 (t, J=14.8Hz, 2H), 2.66 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.23-2.15 (m, 2H), 1.82-1.75 (m, 1H), 1.51 (s, 9H), 0.94-0.90 (m, 2H), 0.68-0.65 (m, 2H)。

[0085] 步骤7: 化合物8的合成

[0086] 将化合物7 (1199.17g, 3.64mol) 加入到乙酸乙酯 (2L) 中, 搅拌均匀后再加入氯化氢的乙酸乙酯溶液 (4L, 16.00mol, 4M)。反应液在15℃反应2.5小时, 然后置于40℃温水浴中继续反应2小时。反应完成后, 有大量暗红色固体析出。过滤, 滤饼用乙酸乙酯 (2.0L) 分次淋洗。滤饼经过真空烘箱60℃真空干燥后得到化合物8。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ: 3.17 (t, J=14.8Hz, 2H), 2.82 (t, J=6.8Hz, 2H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.00-1.94 (m, 1H), 0.99-0.95 (m, 2H), 0.58-0.54 (m, 2H); MS m/z=229.8[M+H-HCl]⁺。

[0087] 步骤8: 化合物9的合成

[0088] 在3L三口烧瓶中, 将化合物8 (301.25g) 加入到四氢呋喃 (600mL) 中, 冰水浴冷却下搅拌降至内温0~10℃。滴加二异丙基乙基胺 (635.72g), 滴加完毕后撤去冰水浴, 在内温10~15℃下搅拌约10分钟。过滤, 滤饼用四氢呋喃洗涤 (100mL×2)。合并滤液, 得到溶液A备用。

[0089] 将四氢呋喃 (2L) 加入装有硫光气 (257.48g) 的5L反应瓶中。冰水浴下搅拌冷却至内温0~10℃, 缓慢滴加溶液A, 保温约5.5小时内滴加完毕, 继续搅拌10分钟。反应完成后过滤, 滤饼用四氢呋喃洗涤 (150mL×2)。合并滤液, 减压浓缩除去溶剂。向残余物中加入四氢呋喃 (400mL), 溶解得到溶液B备用。

[0090] 将水合肼 (112.94g) 加入到四氢呋喃 (2.5L) 中, 冰水浴下搅拌冷却至内温5~10

℃。滴加溶液B,保温约2小时滴加完毕,继续搅拌10分钟。反应完成后,停止反应。撤去冰水浴,加入N,N-二甲基甲酰胺二甲缩醛(333.45g),加热至内温60~65℃,保温反应3小时后停止反应。

[0091] 将反应液旋干,向残留物中加入乙酸乙酯(2L)和纯水(1L),搅拌均匀。用10%氢溴酸调节pH至5~6,继续搅拌5分钟,静置10分钟。分液,分出水相。有机相用纯水(500mL×2)洗涤。合并水相,用乙酸乙酯(1L)萃取,合并有机相,加入适量无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂,滤液减压浓缩至干得化合物9粗品。向粗品中加入正庚烷(2.0L)和叔丁基甲基醚(150mL),打浆(搅拌转速550转/分钟)18小时。过滤,滤饼用正庚烷(150mL)洗涤。收集滤饼,滤饼经过真空烘箱60℃真空干燥后得化合物9。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ:7.82(s,1H),3.20(t,J=14.8Hz,2H),2.74(t,J=6.8Hz,2H),2.28-2.10(m,2H),1.98-1.82(m,1H),1.06-1.02(m,2H),0.75-0.71(m,2H);MS m/z=313.9[M+H]⁺。

[0092] 步骤9:化合物10的合成

[0093] 将乙腈(3L)加入5L三口烧瓶中。搅拌下,先加入化合物9(303.25g)和碳酸钾(261.83g)。再加入2-溴代异丁酸甲酯(203.85g),用氮气置换反应体系后,加热至内温60~65℃,保温反应约2小时。反应结束后,停止加热,搅拌下自然冷却至15~20℃。过滤,滤饼用乙酸乙酯(100mL×3)洗涤。合并滤液,减压浓缩至干得粗品。粗品经过柱层析(流动相:乙酸乙酯/正庚烷=1:5~2:1)纯化得化合物10。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ:8.20(s,1H),3.68(s,3H),3.19(t,J=14.4Hz,2H),2.57(t,J=6.8Hz,2H),2.22-2.12(m,2H),1.93-1.83(m,1H),1.67(s,6H),1.08-1.03(m,2H),0.73-0.69(m,2H);MS m/z=414.0[M+H]⁺。

[0094] 步骤10:化合物11的合成

[0095] 在5L三口烧瓶中加入乙腈(3.17L)。搅拌下,加入化合物10(317.22g)和硫羰基二咪唑(26.94g),保温16~20℃搅拌5分钟。加入N-溴代丁二酰亚胺(158.60g),保温搅拌约30分钟。反应结束后,停止反应。过滤,滤液减压浓缩得到黑色粗品。粗品经过柱层析(流动相:乙酸乙酯/正庚烷=0~50%)纯化得黄色固体粗品340.62g。此粗品用乙酸乙酯(3.50L)溶解,再用纯水(700mL×4)洗涤。分出有机相,有机相用适量无水硫酸钠干燥。过滤除去干燥剂,滤液减压浓缩至干得化合物11。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ:3.73(s,3H),3.22(t,J=14.4Hz,2H),2.53(t,J=6.8Hz,2H),2.24-2.14(m,2H),1.95-1.91(m,1H),1.71(d,J=4.4Hz,6H),1.11-1.07(m,2H),0.78-0.74(m,2H);MS m/z=491.7[M+H]⁺,493.7[M+H+2]⁺。

[0096] 步骤11:式(I)化合物的合成

[0097] 在5L反应瓶中加入四氢呋喃(1.2L),搅拌下加入化合物11(243.03g)。溶清后,加入纯水(1.2L),然后加入一水合氢氧化锂(125.46g),保温20~25℃搅拌约2.5小时。反应完成后,停止反应。反应液在40℃减压浓缩除去有机溶剂。残留物中加入纯水(1L),用叔丁基甲基醚(300mL)反萃,分出有机相。将水相置于10L三口瓶中,冰浴降温至5~10℃。用40%氢溴酸溶液调节其pH至2~3,有大量淡黄色固体析出。继续搅拌30分钟,复测pH为2~3不变。继续搅拌20分钟,过滤。滤饼用纯水(150mL×3)洗涤。收集滤饼,加入纯水(1500mL),室温打浆1小时。过滤,滤饼用纯水(150mL×2)洗涤,收集滤饼,在40℃真空干燥3小时,得式(I)化合物。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ:3.27(t,J=15.6Hz,2H),2.60-2.47(m,2H),2.27-2.17(m,2H),2.10-2.03(m,1H),1.68(d,J=1.2Hz,6H),1.15-1.10(m,2H),0.80-0.71(m,2H);MS m/z=477.99[M+H]⁺,480.1[M+H+2]⁺。

[0098] 实施例2:式(I)化合物的A晶型的制备

[0099] 将式(I)化合物(50mg)加入到玻璃瓶中,分别加入甲醇(0.4mL),搅拌成悬浊液或溶液。将上述悬浊液样品置于恒温混匀仪(40℃)中,在40℃下振摇60小时后离心,收集样品。将上述溶清样品在室温下挥发后离心,收集样品。将上述样品置于真空干燥箱中(40℃)干燥过夜,XRPD检测其晶型状态,得到终产物晶型为式(I)化合物的A晶型。

[0100] 将式(I)化合物(50mg)加入到玻璃瓶中,分别加入乙酸乙酯(0.4mL),搅拌成悬浊液或溶液。将上述悬浊液样品置于恒温混匀仪(40℃)中,在40℃下振摇60小时后离心,收集样品。将上述溶清样品在室温下挥发后离心,收集样品。将上述样品置于真空干燥箱中(40℃)干燥过夜,XRPD检测其晶型状态,得到终产物晶型为式(I)化合物的A晶型。

[0101] 实施例3:式(I)化合物的B晶型的制备

[0102] 将式(I)化合物(50mg)加入到玻璃瓶中,加入四氢呋喃(0.4mL),搅拌至溶清。将上述溶清样品在室温下挥发后离心,收集样品。收集样品置于真空干燥箱中(40℃)干燥过夜,XRPD检测其晶型状态,得到终产物晶型为式(I)化合物的B晶型。

[0103] 实施例4:式(I)化合物的A晶型的溶解度试验

[0104] 1. 稀释剂及流动相的制备

[0105] 稀释剂:准确量取300mL纯水和100mL纯乙腈,混合于1L玻璃瓶中,超声脱气10分钟后备用。

[0106] 流动相A:0.1%磷酸水溶液

[0107] 如:移取2.0mL磷酸加入到2000mL水中,超声10分钟,混匀,放冷至室温,作为流动相A。

[0108] 流动相B:乙腈。

[0109] 2. 对照品溶液的制备(以A晶型自身作为对照样品)

[0110] 准确称取5mg的A晶型,置于样品瓶中,加入稀释剂10mL,超声5分钟后,放冷至室温后混合均匀,标记为工作对照品溶液STD-1。

[0111] 准确称取5mg的A晶型,置于样品瓶中,加入稀释剂10mL,超声5分钟后,放冷至室温后混合均匀,标记为工作对照品溶液STD-2。

[0112] 3. 线性溶液的制备

[0113] 将上述工作对照品溶液STD-1逐级稀释1倍,10倍,100倍,1000倍和2000倍,记为线性溶液L1,L2,L3,L4和L5。

[0114] 4. 溶解度测试试验

[0115] 分别准确称取6mg的A晶型加入到8mL的玻璃瓶中,然后准确加入3mL不同溶媒(0.1N盐酸溶液,0.01N盐酸溶液,纯化水,pH3.8缓冲溶液,pH4.5缓冲溶液,pH5.5缓冲溶液,pH6.0缓冲溶液,pH7.4缓冲溶液,pH6.8缓冲溶液),制成混悬液。在上述混悬液中加入搅拌子,在37℃下避光充分搅拌。搅拌后,pH7.4缓冲溶液和pH6.8缓冲溶液中固体全部溶解,分别准确称量6mg的A晶型,补加入缓冲溶液中,并再次充分搅拌制备成混悬液。搅拌4小时和24小时后取样离心,溶液用滤膜过滤后用HPLC测定其浓度,其中,HPLC分析方法如表3所示。

[0116] 表3:HPLC分析方法

[0117]

设备	安捷伦1200高效液相色谱仪		
色谱柱	Ascentis Express C18 (4.6mm×100 mm, 2.7μm)		
流动相 A	A = 0.1% 磷酸水溶液		
流动相 B	乙腈		
流速	1.5mL/min		
进样体积	5.0μL		
检测波长	250nm		
柱温	40℃		
稀释剂	3/1(V/V)纯水/乙腈		
运行时间	18min		
梯度	时间(min)	A (%)	B (%)
	0.00	95	5
	13.00	5	95
	15.00	5	95
	15.01	95	5
	18.00	95	5

[0118] 结果如表4所示：

[0119] 表4:A晶型在9种媒介中的溶解度试验结果

溶媒	溶解度	
	(4 hrs)(mg/mL)	(24 hrs)(mg/mL)
0.1 N HCl	<LOQ	<LOQ
0.01 N HCl	<LOQ	<LOQ
pH 3.8 缓冲液	<LOQ	<LOQ
[0120] pH 4.5 缓冲液	0.001	0.001
pH 5.5 缓冲液	0.066	0.066
pH 6.0 缓冲液	0.214	0.204
pH 6.8 缓冲液	1.961	1.840
pH 7.4 缓冲液	3.820	4.049
纯化水	0.045	0.058

[0121] 注:LOQ表示低于检测限;上述不同PH的缓冲液是指各PH的特定盐溶液。

[0122] 结论:式(I)化合物的A晶型在高pH值缓冲液中具有较好的溶解度。

[0123] 测试例1:式(I)化合物的体外评价

[0124] 1.各工作液的配制

[0125] 1)用DMSO作为200倍工作液的溶媒,将储备液稀释成各给药浓度的200倍工作液。

[0126] 晶型A:0、0.002、0.006、0.02、0.06、0.2和0.6mmol/L;

[0127] lesinurad:0、0.06、0.2、0.6、2、6和20mmol/L。

[0128] 2)用Hanks平衡盐溶液(无Cl⁻)作为转运蛋白URAT12倍工作液的溶媒,将1)中200倍工作液稀释100倍后得到各给药浓度的2倍工作液。

[0129] 3)用Hanks平衡盐溶液(无Cl⁻)配制药转运蛋白URAT1放标底物的2倍工作液,之后同2)中各浓度2倍工作液等体积混合,混合均匀后备用。

[0130] 2.给药方法

[0131] 2.1.摄入型细胞抑制实验

[0132] 摄入抑制实验所用细胞培养基为DMEM培养基添加10%FBS(含青霉素和链霉素)。

[0133] 人药物转运体过表达的细胞株(HEK293A-URAT1)及空载体细胞(HEK293A-pcDNA3.1)经过复苏和传代培养后,选取生长良好的贴壁细胞用胰酶消化使其分散为单细胞悬液,之后用培养基调节细胞密度至 $2.0 \sim 3.0 \times 10^5$ cells/mL,然后将细胞悬液以1mL/孔的量接种至24孔细胞培养板,在37℃、5%CO₂、饱和空气湿度的培养箱内培养2~3天使细胞长满各孔。

[0134] 先移去培养板内培养液,用Hanks缓冲盐溶液(无Cl⁻)清洗一次,之后每孔加入37℃Hanks缓冲盐溶液(无Cl⁻)孵育10min,然后以500μL含放射性标记的探针底物溶液置换24

孔板中Hanks缓冲盐溶液(无Cl⁻)开始给药;给药结束后(2min),用各自预冷的缓冲盐溶液终止反应,并清洗细胞3次;然后每孔添加400μL 0.1mmol/L NaOH裂解细胞;取细胞裂解液于闪烁瓶中,添加3mL的Aquasol-2闪烁液,并用Tri-Carb2910TR液闪仪测定样品中的放射性强度。细胞转运试验中每个浓度及阳性对照、空白对照(mock)设置3孔(n=3)。

[0135] 2.2.数据处理

[0136] 2.2.1.抑制作用计算

[0137] 将仅含放标底物给药组转运体细胞的摄入值(扣除本底background组即空载细胞的摄入值U₀)定义为100%(control,U_c),以此为标准计算加入待测化合物后各给药组扣除本底后的摄入值U与control组的摄入值U_c的百分比(%),并计算各浓度对转运体活性的抑制率(IR),以此表示化合物对转运体抑制作用的强弱,公式如下:

$$[0138] \quad IR = 1 - [100 \times (U - U_0) / (U_c - U_0)] \%$$

[0139] 每一给药浓度设置3个重复(即n=3),Mean±standard error (SD)用Microsoft® Excel 2010软件中统计学公式计算。

[0140] 根据每种转运体各给药浓度抑制率(IR),通过Prism5.0并结合Microsoft® Excel 2010软件中Forecast函数计算化合物对药物转运体转运活性影响的IC₅₀。

[0141] 2.2.2.统计学方法

[0142] 各样本平均数差异分析采用t-test (P<0.05视为差异显著)。

[0143] 3.实验结果

[0144] 式(I)化合物、lesinurad对尿酸转运体URAT1介导的¹⁴C-UA摄入具有较为显著的抑制作用(P<0.001),IC₅₀分别为0.034μmol/L和6.01μmol/L。式(I)化合物对URAT1的抑制作用约为参照化合物lesinurad的177倍,抑制效果更为显著。

[0145] 测试例2:式(I)化合物的药代动力学评价

[0146] 实验目的:式(I)化合物单次静脉注射和灌胃给药,以及8天重复灌胃给药后雌雄SD大鼠体内血浆药代动力学。

[0147] 实验过程:

[0148] 1.本实验中12只SD大鼠,雌雄各半,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。按体重相近分成2组,每组3雌3雄,给药方案及采血方案详分别见表5、表6:

[0149] 表5:给药方案

[0150]

组别	每组动物数		剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/mL)	给药体积 (mL/kg)	溶媒	给药途径	给药频率
	雄	雌						
1	3	3	2.0	1.0	2.0	5% DMSO+95% (10%HP-β-CD)	IV	单次
2	3	3	4.0	1.0	4.0	0.5% (w/v) MC	PO	单次

所有动物在第一天给药前隔夜禁食，并在给药 4 小时后恢复供食。

[0151] 注:DMSO表示二甲基亚砷;HP-β-CD表示羟丙基-β-环糊精;MC表示甲基纤维素;

[0152] IV表示静脉注射给药;PO表示灌胃给药。

[0153] 表6:采血方案

[0154]

组别	动物号		样品时间点(hr)
	雄	雌	
1	R1、R2、R3	R4、R5、R6	给药前及给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24 h
2	R7、R8、R9	R10、R11、R12	给药前及给药后 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24 h
抗凝剂: K ₂ -EDTA			

[0155] 2. 样品收集及分析方法

[0156] 实验动物从颈静脉穿刺采集血液样本0.15mL,立即转移至贴有标签的含K₂-EDTA (0.5M)的离心管中,并于30分钟之内离心分离血浆(离心条件:3000g,4℃,15分钟)。采用已验证的LC/MS/MS分析方法进行测定血浆浓度;采用WinNonlin™Version 6.3(Pharsight, Mountain View,CA)药动学软件的非房室模型处理血浆浓度,使用线性对数梯形法方法计算药动学参数。

[0157] 3. 实验结果及结论

[0158] SD大鼠静脉给药后,式(I)化合物在体内迅速分布并缓慢清除,雄性大鼠的血浆清除率为 $9.76 \pm 2.29 \text{ mL/min/kg}$,稳态表观分布容积($V_{d_{ss}}$)为 $1.65 \pm 0.440 \text{ L/kg}$, $T_{1/2}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $2.52 \pm 0.671 \text{ h}$ 和 $3530 \pm 723 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$;雌性大鼠的血浆清除率为 $6.41 \pm 0.656 \text{ mL/min/kg}$,稳态表观分布容积($V_{d_{ss}}$)为 $1.55 \pm 0.408 \text{ L/kg}$,消除半衰期($T_{1/2}$)和 $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $3.04 \pm 1.12 \text{ h}$ 和 $5240 \pm 544 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 。

[0159] SD大鼠单次灌胃给予式(I)化合物4.0mg/kg后,雄性大鼠的达峰浓度($C_{\max}$)为 $1130 \pm 483 \text{ ng/mL}$, $AUC_{0-\infty}$ 为 $2510 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$,达峰时间($T_{\max}$)为 $0.417 \pm 0.144 \text{ h}$,消除半衰期($T_{1/2}$)为1.72h;雌性大鼠的达峰浓度($C_{\max}$)为 $2110 \pm 1350 \text{ ng/mL}$, $AUC_{0-\infty}$ 为 $9010 \pm 4670 \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$,达峰时间($T_{\max}$)为 $0.667 \pm 0.289 \text{ h}$,消除半衰期($T_{1/2}$)为 $3.48 \pm 0.835 \text{ h}$ 。雄性大鼠的生物利用度为35.6%,雌性大鼠的生物利用度为86.0%。(注: $AUC_{0-\infty}$ 表示从0时间到外推至无穷大时的血浆浓度-时间曲线下面积)。

[0160] 综上,式(I)化合物大大提高了药物代谢的稳定性,同时也大大提高了药物的口服吸收生物利用度。

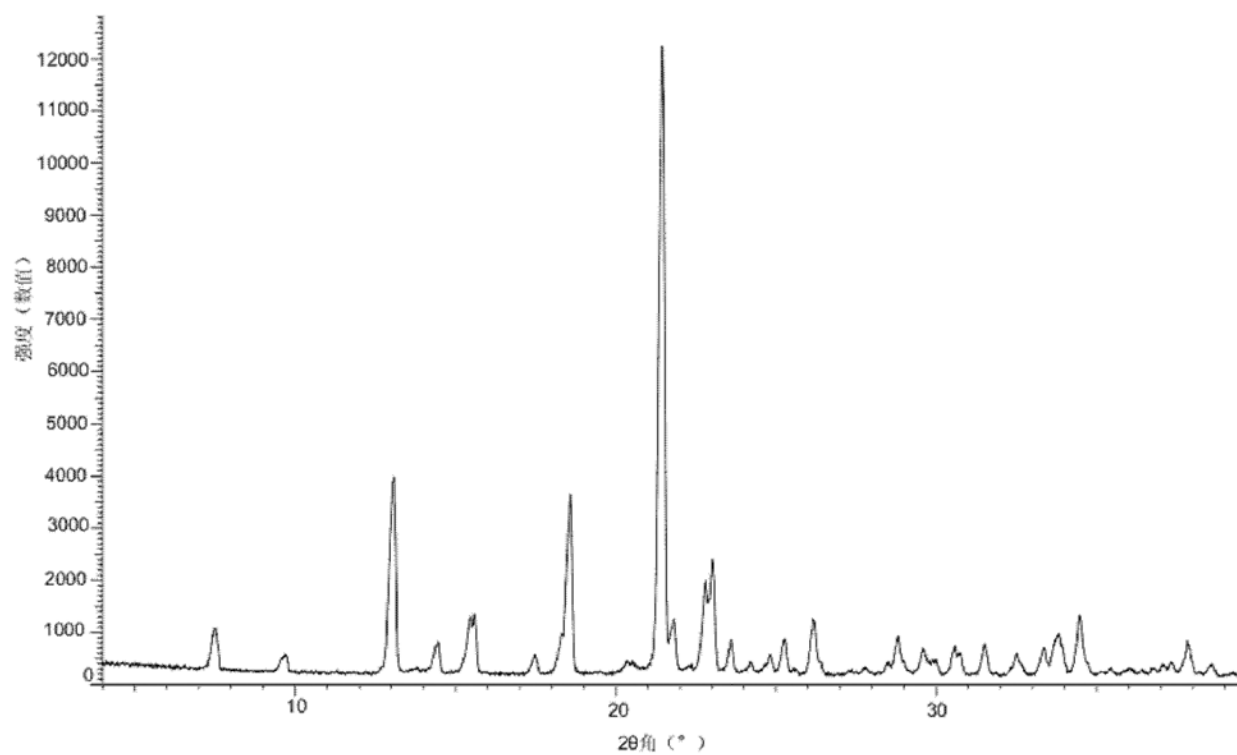


图1

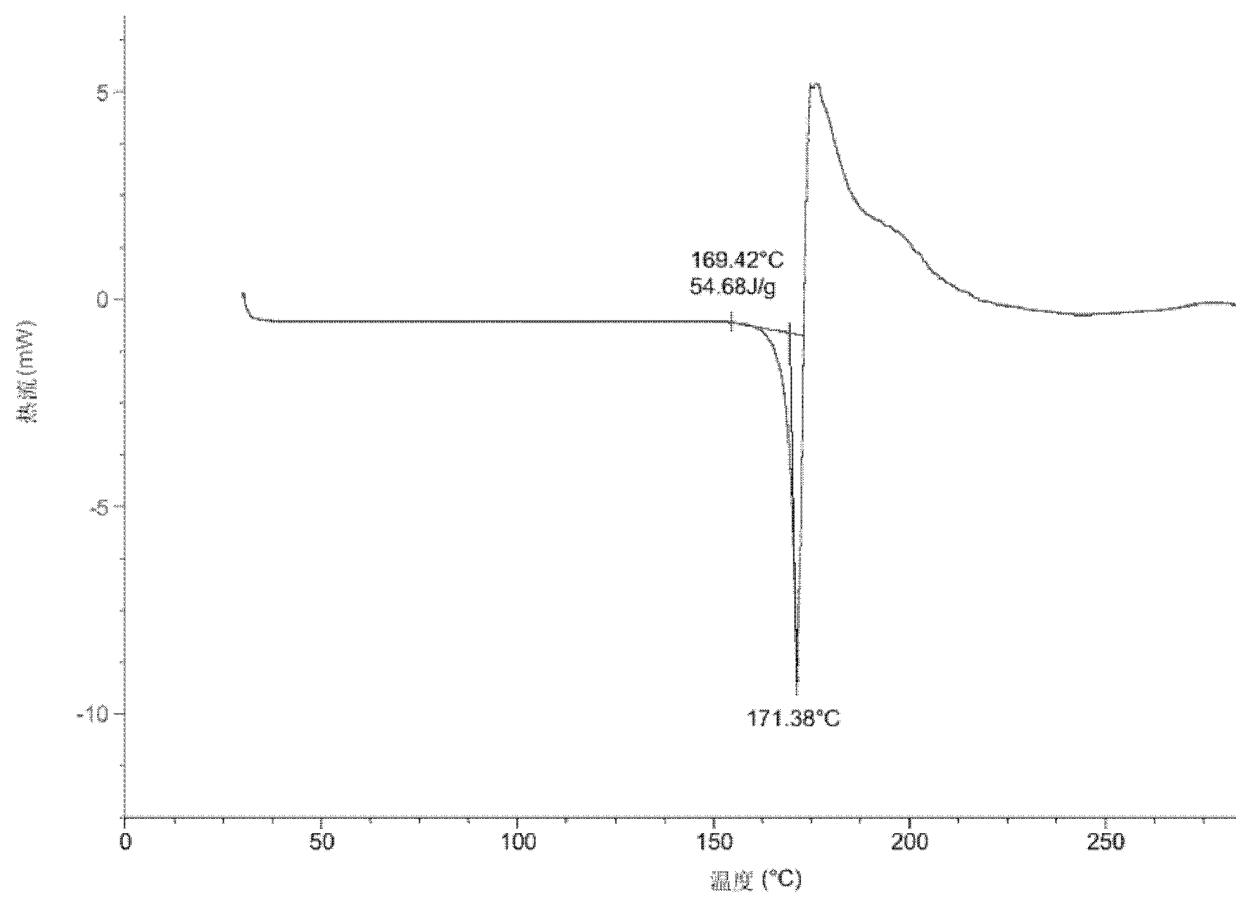


图2

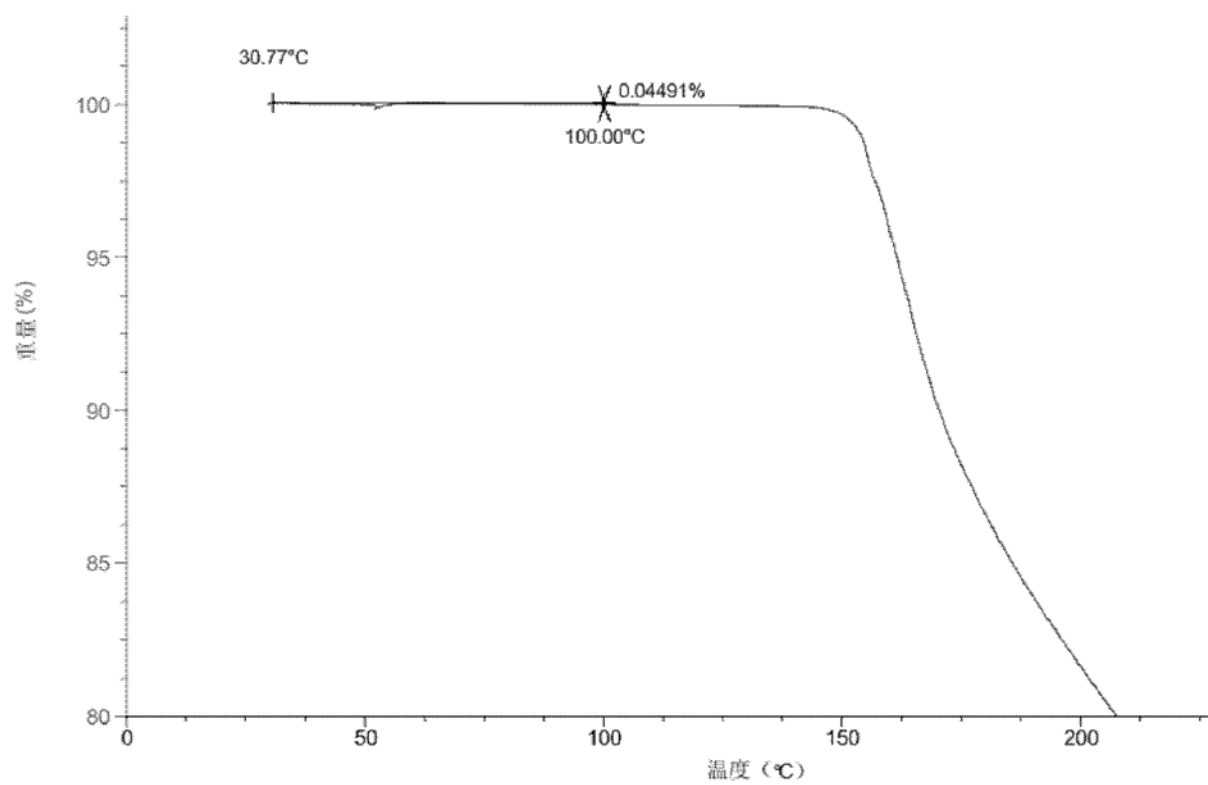


图3

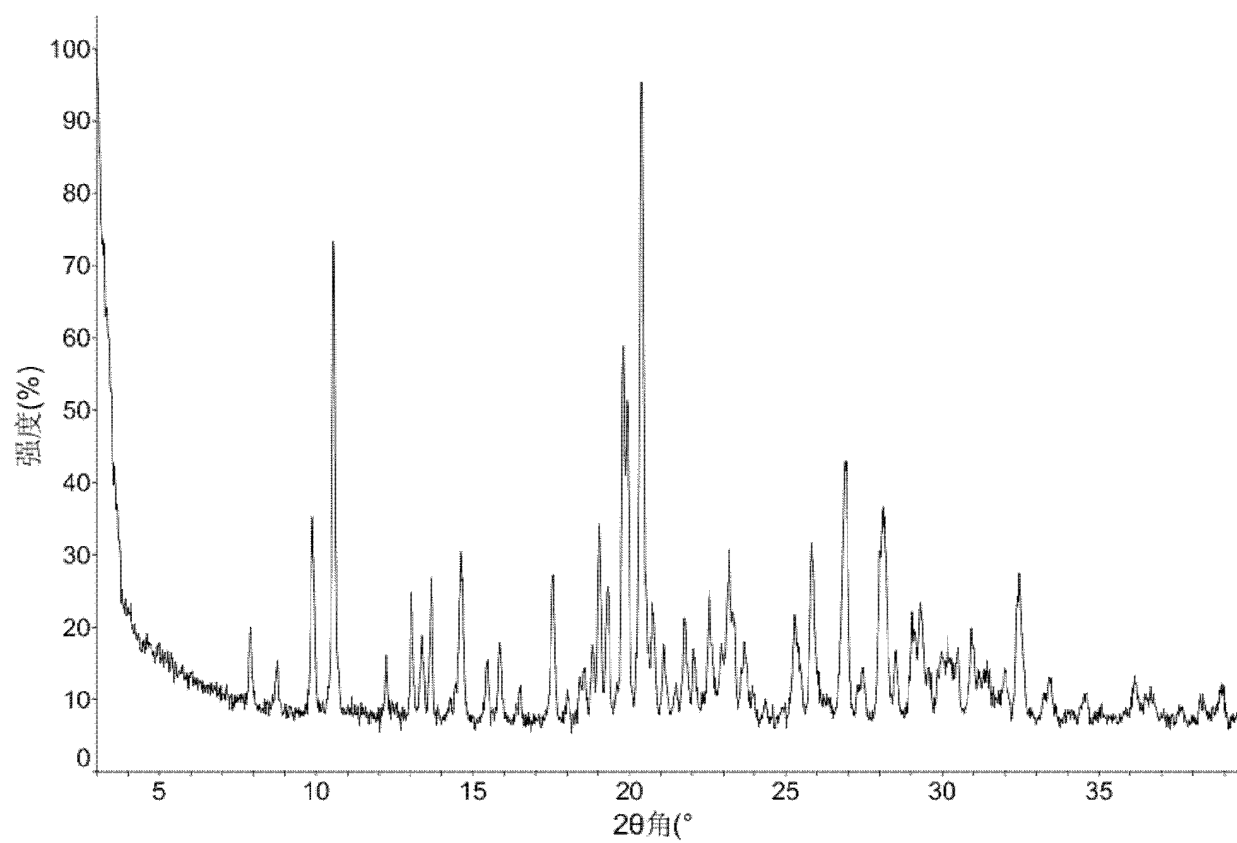


图4

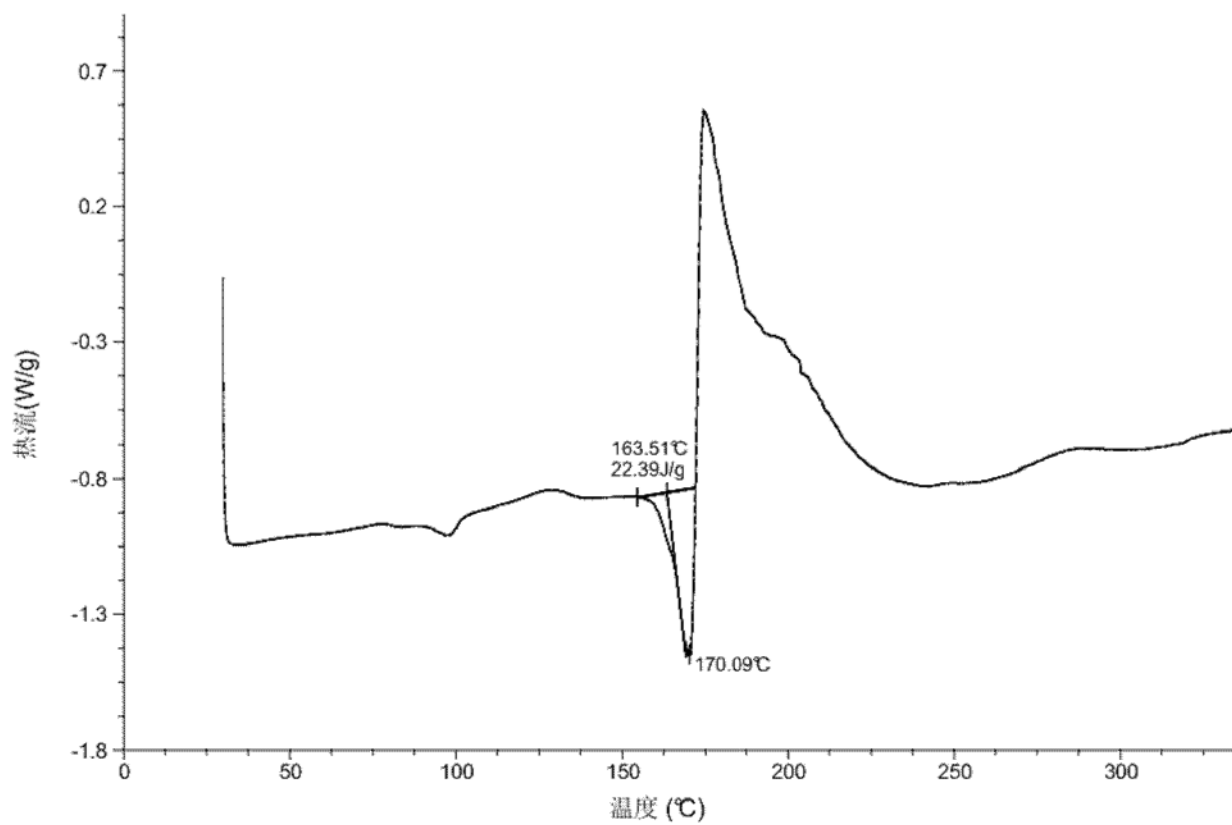


图5

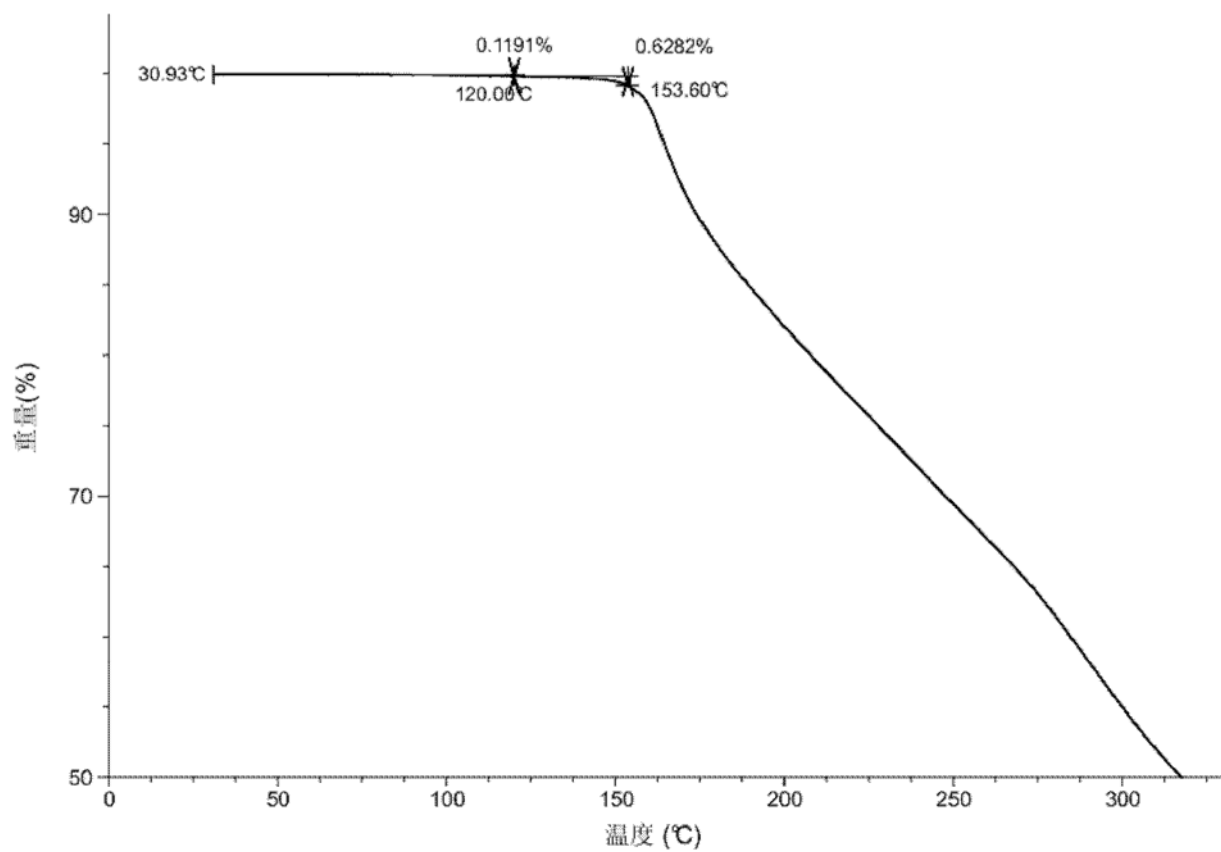


图6