



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107531701 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680023291.3

(22)申请日 2016.04.22

(30)优先权数据

1507036.0 2015.04.24 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2016/051120 2016.04.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/170352 EN 2016.10.27

(71)申请人 普罗克斯马根有限公司

地址 英国剑桥郡

(72)发明人 爱德华·萨沃里

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 刘振佳

(51)Int.Cl.

G07D 471/04(2006.01)

A61K 31/437(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

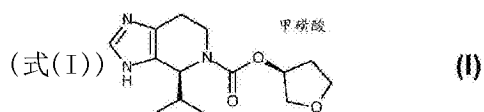
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

作为氨基脒敏感性胺氧化酶(SSAO)酶抑制剂的结晶化合物

(57)摘要

(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯的特定结晶甲磺酸盐形式,及其在医学中的用途。



1. 结晶 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐,其具有空间群 $P2(1)2(1)2(1)$ 以及基本如下的单胞尺寸:

<i>a</i>	8.75780(10)Å	α	90°
<i>b</i>	9.70830(10)Å	β	90°
<i>c</i>	20.6736(2)Å	γ	90°

2. 结晶 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐,其XRPD图谱含有使用CuK α 辐射测量的以下 2θ 值:21.948。

3. 根据权利要求2所述的盐,其XRPD图谱含有使用CuK α 辐射测量的以下 2θ 值:17.744和21.948。

4. 根据权利要求2或权利要求3所述的盐,其XRPD图谱含有使用CuK α 辐射测量的以下 2θ 值:17.744、20.886、21.948。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的盐,其XRPD图谱含有使用CuK α 辐射测量的以下 2θ 值:17.744、20.886、21.948和9.851。

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的盐,其XRPD图谱含有使用CuK α 辐射测量的以下 2θ 值:17.744、20.886、21.948、9.851和16.280。

7. 根据权利要求2至6中任一项所述的盐,其XRPD图谱含有使用CuK α 辐射测量的以下 2θ 值:9.851、16.280、17.097、17.744、19.694、20.443、20.886、21.948、22.112、23.194、23.653、24.144、27.084、27.283和29.912。

8. 根据权利要求2至7中任一项所述的盐,其具有如表4和/或图2中所示的XRPD图谱。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的盐,其纯度大于95%。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的盐,其纯度大于99%。

11. 根据权利要求1至8中任一项所述的盐,其纯度大于99.5%。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的盐,其对映体纯度大于95%。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的盐,其对映体纯度大于99%。

14. 根据权利要求1至11中任一项所述的盐,其对映体纯度大于99.5%。

15. 药物组合物,其包含一种或更多种合适的赋形剂和根据权利要求1至14中任一项所述的盐。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的盐或根据权利要求15所述的药物组合物,其用于治疗炎症、炎性疾病、免疫或自身免疫病或抑制肿瘤生长,或者用于制备用于治疗炎症、炎性疾病、免疫或自身免疫病或抑制肿瘤生长的药物。

17. 用于治疗炎症、炎性疾病、免疫或自身免疫病或抑制肿瘤生长的方法,其包括向患有这样疾病的对象施用有效量的如权利要求1至14中任一项所要求的盐或如权利要求15中所要求的药物组合物。

18. 根据权利要求16所述的盐或根据权利要求17所述的方法,其中所述炎症或炎性疾病或免疫或自身免疫病是关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎和银屑病关节炎),滑膜炎,血管炎,舍格伦病,与肠的炎症有关的病症(包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠病和肠易激综合征),动脉粥样硬化,多发性硬化,阿尔茨海默病,血管性

痴呆,帕金森病,脑淀粉样血管病,伴有皮层下梗死和脑白质病的常染色体显性脑动脉病,肺部炎性疾病(包括哮喘、慢性阻塞性肺病和急性呼吸窘迫综合征),纤维化疾病(包括特发性肺纤维化、心脏纤维化、肝纤维化和系统性硬化病(硬皮病)),皮肤炎性疾病(包括接触性皮炎、特应性皮炎和银屑病),眼的炎性疾病(包括年龄相关性黄斑变性、葡萄膜炎和糖尿病性视网膜病),全身炎症反应综合征,败血症,肝的炎性和/或自身免疫疾病(包括自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、酒精性肝病、硬化性胆管炎和自身免疫性胆管炎),糖尿病(I型或II型)和/或其并发症,慢性心力衰竭,充血性心力衰竭,缺血性疾病(包括卒中和缺血再灌注损伤)或心肌梗死和/或其并发症,或癫痫。

19. 根据权利要求16所述的盐或根据权利要求17所述的方法,其用于治疗选自以下的疾病:类风湿性关节炎、骨关节炎、肝纤维化、慢性阻塞性肺病、多发性硬化、舍格伦病、阿尔茨海默病、帕金森病、炎性肠病、或血管性痴呆。

20. 通过由(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯的游离碱形成甲磺酸盐来制备结晶(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐的方法。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述甲磺酸盐通过向所述游离碱添加甲磺酸来形成。

22. 通过根据权利要求20或权利要求21所述的方法获得的结晶(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐。

作为氨基脲敏感性胺氧化酶 (SSAO) 酶抑制剂的结晶化合物

技术领域

[0001] 本发明涉及(S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯的结晶甲磺酸盐形式、生产和分离的方法、包含该化合物和可药用载体的药物组合物,以及药物治疗方法。

背景技术

[0002] 氨基脲敏感性胺氧化酶(Semicarbazide-sensitive amine oxidase,SSAO)活性是由血管黏附蛋白-1(Vascular Adhesion Protein-1,VAP-1)或含铜胺氧化酶3(Amine Oxidase,Copper Containing 3,AOC3)(属于含铜胺氧化酶家族酶(EC.1.4.3.6))表达的酶活性。因此,SSAO酶的抑制剂也可以调节VAP-1蛋白的生物学功能。

[0003] 已经在多种组织(包括血管和非血管平滑肌组织、内皮和脂肪组织)中发现了SSAO活性[Lewinsohn,Braz.J.Med.Biol.Res.1984,17,223-256;Nakos&Gossrau,Folia Histochem.Cytobiol.1994,32,3-10;Yu等,Biochem.Pharmacol.1994,47,1055-1059;Castillo等,Neurochem.Int.1998,33,415-423;Lyles&Pino,J.Neural.Transm.Suppl.1998,52,239-250;Jaakkola等,Am.J.Pathol.1999,155,1953-1965;Morin等,J.Pharmacol.Exp.Ther.2001,297,563-572;Salmi&Jalkanen,Trends Immunol.2001,22,211-216]。此外,在血浆中发现了SSAO蛋白,并且这种可溶性形式看来与组织结合形式具有相似的性质[Yu等,Biochem.Pharmacol.1994,47,1055-1059;Kurkijärvi等,J.Immunol.1998,161,1549-1557]。

[0004] 这种丰富的酶的精确生理作用尚未完全确定,但看来SSAO及其反应产物在细胞信号传导和调控中可能具有若干功能。例如,最近的研究结果表明SSAO在GLUT4介导的葡萄糖摄取[Enrique-Tarancon等,J.Biol.Chem.1998,273,8025-8032;Morin等,J.Pharmacol.Exp.Ther.2001,297,563-572]和脂肪细胞分化[Fontana等,Biochem.J.2001,356,769-777;Mercier等,Biochem.J.2001,358,335-342]二者中发挥作用。此外,已证明SSAO参与炎症过程,其中它作为白细胞的黏附蛋白起作用[Salmi&Jalkanen,Trends Immunol.2001,22,211-216;Salmi&Jalkanen,in“AdhesionMolecules: Functions and Inhibition”K.Ley(编辑),2007,第237-251页],并且还可在结缔组织基质发育和维持中发挥作用[Langford等,Cardiovasc.Toxicol.2002,2(2),141-150;Göktürk等,Am.J.Pathol.2003,163(5),1921-1928]。此外,最近已经发现了SSAO和血管生成之间的联系[Noda等,FASEB J.2008,22(8),2928-2935],并且基于该联系,预期SSAO的抑制剂具有抗血管生成作用。

[0005] 人中的几项研究已经证明血浆中的SSAO活性在例如充血性心力衰竭、糖尿病、阿尔茨海默病和炎症的病症中升高[Lewinsohn,Braz.J.Med.Biol.Res.1984,17,223-256;Boomsma等,Cardiovasc.Res.1997,33,387-391;Ekblom,Pharmacol.Res.1998,37,87-92;Kurkijärvi等,J.Immunol.1998,161,1549-1557;Boomsma等,Diabetologia 1999,42,233-237;Meszaros等,Eur.J Drug Metab.Pharmacokinet.1999,24,299-302;Yu等,

Biochim.Biophys.Acta 2003,1647 (1-2) ,193-199; Mátyus等,Curr.Med.Chem.2004,11 (10) ,1285-1298;O'Sullivan等,Neurotoxicology 2004,25 (1-2) ,303-315;del Mar Hernandez等,Neurosci.Lett.2005,384 (1-2) ,183-187]。已经表明,由内源性胺氧化酶产生的活性醛和过氧化氢有助于心血管疾病、糖尿病并发症和阿尔茨海默病的进展[Callingham等,Prog.BrainRes.1995,106,305-321;Ekblom,Pharmacol.Res.1998,37,87-92;Yu等,Biochim.Biophys.Acta 2003,1647 (1-2) ,193-199;Jiang等,Neuropathol Appl Neurobiol.2008,34 (2) ,194-204]。此外,SSAO的酶活性参与炎症部位的白细胞外渗过程,其中SSAO已经显示出在血管内皮上强烈表达[Salmi等,Immunity 2001,14 (3) ,265-276; Salmi&Jalkanen,in“Adhesion Molecules:Functions and Inhibition”K.Ley (编辑),2007,第237-251页]。因此,已经表明SSAO的抑制在预防糖尿病并发症和炎症性疾病中具有治疗价值[Ekblom,Pharmacol.Res.1998,37,87-92;Salmi等,Immunity2001,14 (3) ,265-276; Salter-Cid等,J.Pharmacol.Exp.Ther.2005,315 (2) ,553-562]。

[0006] W02007/146188教导了阻断SSAO活性抑制白细胞募集,降低炎症反应,并预期在预防和治疗癫痫发作(例如在癫痫中)中有益。

[0007] O'Rourke等(J Neural Transm.2007;114 (6) :845-9) 检验了SSAO抑制剂在神经系统疾病中的潜力,其先前已经在大鼠卒中模型中证实了SSAO抑制的效力。对复发缓解型实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)(一种与人多发性硬化共有很多特征的小鼠模型)进行SSAO抑制剂的检测。数据证明了该模型中小分子抗SSAO治疗的潜在临床益处,因此证明了在治疗人多发性硬化中的潜在临床益处。

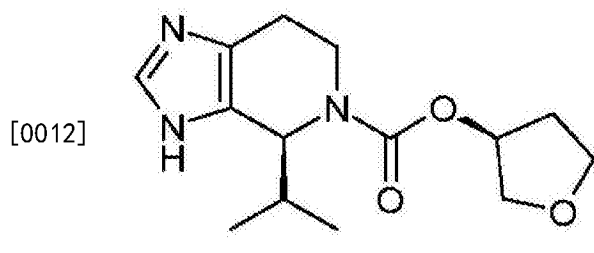
[0008] SSAO敲除动物表型明显正常,但是表现出响应于多种炎性刺激引起的炎症反应的显著降低[Stolen等,Immunity 2005,22 (1) ,105-115]。另外,已经示出在人疾病的多种动物模型(例如角叉菜胶诱导的爪炎症、噁唑酮诱导的结肠炎、脂多糖诱导的肺炎、胶原诱导的关节炎、内毒素诱导的葡萄膜炎)中,通过使用抗体和/或小分子在野生型动物中对其功能的拮抗作用在降低白细胞浸润、降低疾病表型的严重性并且降低炎性细胞因子和趋化因子的水平中起保护作用[Kirton等,Eur.J.Immunol.2005,35 (11) ,3119-3130;Salter-Cid等,J.Pharmacol.Exp.Ther.2005,315 (2) ,553-562;McDonald等,Annual Reports in Medicinal Chemistry 2007,42,229-243;Salmi&Jalkanen.in“Adhesion Molecules:Functions and Inhibition”K.Ley (编辑),2007,第237-251页;Noda等,FASEB J.200822 (4) ,1094-1103;Noda等,FASEBJ.2008,22 (8) ,2928-2935]。这种抗炎保护看来在广泛的具有独立致病机制的炎性模型中都有所提供,而不仅限于一种特定的疾病或疾病模型。这将表明SSAO可以是调节炎性反应的关键节点,因此SSAO抑制剂很可能是广泛的人和动物疾病中的有效抗炎药物。VAP-1还涉及纤维化疾病(包括肝和肺的纤维化疾病)的进展和维持。Weston和Adams(J Neural Transm.2011,118 (7) ,1055-64)总结了在肝纤维化中涉及VAP-1的实验数据,Weston等(EASL Poster 2010)报道了VAP-1的阻断加速了对四氯化碳诱导的纤维化的消退。此外,VAP-1已经涉及肺炎(例如Singh等,2003,Virchows Arch 442:491-495),表明VAP-1阻断剂可降低肺炎,因此其通过对疾病的促纤维化和促炎两方面的治疗对囊性纤维化的治疗有益。

[0009] SSAO(VAP-1)在胃癌中上调,并且已经在人黑素瘤、肝癌和头颈部肿瘤的肿瘤血管中被鉴定(Yoong KF,McNab G,Hubscher SG,Adams DH.(1998),J Immunol 160,3978-88.;

Irjala H, Salmi M, Alanen K, Gre'nman R, Jalkanen S (2001), *Immunol.* 166, 6937-6943; Forster-Horvath C, Dome B, Paku S, 等. (2004), *Melanoma Res.* 14, 135-40.)。一项报告 (Marttila-Ichihara F, Castermans K, Auvinen K, Oude Egbrink MG, Jalkanen S, Griffioen AW, Salmi M. (2010), *J Immunol.* 184, 3164-3173.) 已经显示, 携带无酶活性的 VAP-1 的小鼠发生黑素瘤较慢, 并具有降低的肿瘤血管数目和直径。这些肿瘤的生长降低也反映在骨髓抑制细胞的浸润降低 (降低 60-70%) 中。令人鼓舞的是, VAP-1 缺乏对正常组织中的血管或淋巴形成没有影响。

[0010] 由于上述原因, 预期 SSAO 的抑制将降低促炎性酶产物 (pro-inflammatory enzyme product) (醛、过氧化氢和氨) 的水平, 同时还降低免疫细胞的黏附能力, 并相应地降低其活化和最终的外渗 (extra-vasation)。预期这样的活性在其中具有治疗益处的疾病包括其中免疫细胞在病理的起始、维持或消退中发挥重要作用的所有疾病, 例如炎症性疾病和免疫/自身免疫病。这样的疾病的实例包括多发性硬化、关节炎和血管炎。

[0011] 存在对于新的和改进的 SSAO 抑制剂的未满足的医疗需求。WO2010/031789 (其内容通过引用并入本文) 公开了一类有前景的 SSAO 抑制剂化合物, 尤其有前景的是实施例 16, 其为 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的游离碱, 并且其具有以下结构:



[0013] (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的游离碱是吸湿性无定形玻璃状物/胶状物。需要生产纯的和结晶形式的 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯以使制剂能够满足严格的药物需求和规范。期望以适合大规模生产的形式生产活性成分。期望产品是易于过滤和容易干燥的形式。还期望产品是长时间稳定的, 而不需要专门的储存条件。

发明内容

[0014] 申请人已经发现 (S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的甲磺酸盐的结晶形式相对于已知的游离碱具有出人意料的改进的性质。改进的性质包括高热稳定性、易于过滤、易于干燥和降低的吸湿性。

[0015] 通过 X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 和偏振光显微术 (polarized light microscopy, PLM) 已经示出了 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的甲磺酸盐 (即甲磺酸的盐) 高度结晶。189 °C 的高熔点证明了改进的热稳定性。通过在相对湿度为 75% 的环境中在 40 °C 的温度下储存长达 3 天的结晶盐的稳定性证明了降低的吸湿性。本发明包括包含 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的结晶甲磺酸盐和一种或更多种可药用赋形剂的组合物。

[0016] 预期 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的结晶甲磺酸盐可用于治疗炎症、炎性疾病、免疫或自身免疫病或抑制肿瘤生长。在一个实施方案中,炎症或炎性疾病或免疫或自身免疫病是关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎和银屑病关节炎),滑膜炎,血管炎,舍格伦病,与肠的炎症有关的病症(包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、炎性肠病和肠易激综合征),动脉粥样硬化,多发性硬化,阿尔茨海默病,血管性痴呆,帕金森病,脑淀粉样血管病,伴有皮层下梗死和脑白质病的常染色体显性脑动脉病,肺部炎性疾病(包括哮喘、慢性阻塞性肺病和急性呼吸窘迫综合征),纤维化疾病(包括特发性肺纤维化、心脏纤维化、肝纤维化和系统性硬化(硬皮病)),皮肤炎性疾病(包括接触性皮炎、特应性皮炎和银屑病),眼的炎性疾病(包括年龄相关性黄斑变性、葡萄膜炎和糖尿病性视网膜病),全身炎症反应综合征,败血症,肝的炎性和/或自身免疫病症(包括自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、酒精性肝病、硬化性胆管炎和自身免疫性胆管炎),糖尿病(I型或II型)和/或其并发症,慢性心力衰竭,充血性心力衰竭,缺血性疾病(包括卒中和缺血再灌注损伤)或心肌梗死和/或其并发症,或癫痫。

[0017] 本发明包括所述 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的结晶甲磺酸盐在制备用于治疗或预防上述病症和疾病的药物中的用途。本发明还包括用于治疗或预防这样的病症和疾病的方法,其包括向需要这样的治疗的哺乳动物(包括人)施用有效量的上述化合物。

[0018] 附图简述

[0019] 图1示出了 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯游离碱的XRPD。

[0020] 图2示出了 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐的结晶的XRPD。XRPD一式两份进行。

[0021] 发明详述

[0022] 定义

[0023] 本文使用的“治疗”包括一旦其建立,则预防所述障碍或病症,或改善或消除病症。

[0024] “有效量”是指对所治疗的对象赋予治疗效果的化合物的量。治疗效果可以是客观的(即,通过一些测试或标志物可测量的)或主观的(即,对象产生了指征或感觉到作用)。

[0025] “可药用的”意指可用于制备一般是安全的、无毒的,在生物学以及其他方面均是适宜的药物组合物并且包括可用于兽医用途以及人的药用。

[0026] 除非有相反的说明,与本文所述的结晶盐形式关联使用的术语“(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯”包括 (3S,4S) 和 (3R,4R) 对映异构体的混合物。在一个实施方案中,(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯及其盐的绝对纯度>95%,优选>99%,更优选>99.5%。在一个实施方案中,(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯意指 (3S,4S) 对映异构体,其对映体纯度>95%,优选>99%,更优选>99.5%。在一个实施方案中,(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯的非对映异构体纯度>95%,优选>99%,更优选>99.5%。

[0027] 组合物

[0028] 对于临床应用,将本发明的结晶化合物配制成用于多种施用方式的药物制剂。应认识到本发明的化合物可与生理上可接受的载体、赋形剂或稀释剂一起施用。本发明的药物组合物可以通过任何合适的途径施用,优选通过经口、经直肠、经鼻、局部(包括含和舌下)、舌下、经皮、鞘内、经黏膜或胃肠外(包括皮下、肌内、静脉内和皮内)施用。

[0029] 另一些制剂可以方便地以单位剂量形式(例如片剂和缓释胶囊剂,以及以脂质体形式)存在,并且可通过制药领域中公知的任何方法来制备。药物制剂通常通过将活性物质或其可药用盐与常规可药用载体、稀释剂或赋形剂混合来制备。赋形剂的实例是水、明胶、阿拉伯胶、乳糖、微晶纤维素、淀粉、淀粉羟乙酸钠、磷酸氢钙、硬脂酸镁、滑石、胶体二氧化硅等。这样的制剂还可含有其他药理学活性剂和常规添加剂,例如稳定剂、润湿剂、乳化剂、矫味剂、缓冲剂等。通常,活性化合物的量为制剂按重量计的0.1-95%,对于肠胃外使用,优选在制剂中按重量计为0.2-20%,对于经口施用,更优选为在制剂中按重量计为1-50重量%。

[0030] 制剂可通过已知的方法进一步制备,例如造粒、压制、微胶囊化、喷涂等。制剂可通过常规方法以片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、糖浆剂、混悬剂、栓剂或注射剂的剂量形式制备。液体制剂可通过将活性物质溶解或悬浮在水或其他合适的载体中来制备。片剂和颗粒剂可以以常规方式包衣。为了长期维持治疗有效的血浆浓度,可以将本发明的化合物并入缓释制剂中。

[0031] 具体化合物的剂量水平和剂量频率将根据多种因素而变化,包括所用具体化合物的效力、该化合物的代谢稳定性和作用时间、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、施用的方式和时间、排泄率、药物组合、待治疗病症的严重程度以及接受治疗的患者。每日剂量可以是例如每千克体重约0.001mg至约100mg,其以例如每次约0.01mg至约25mg的剂量单次或多次施用。对于人而言,通常的总的每日剂量为1至2000mg/天,优选为200至2000mg/天,更优选为500至2000mg/天。通常,经口给予这样的剂量,但也可以选择肠胃外施用。

[0032] 实验方法

[0033] 分析方法

[0034] X射线粉末衍射(XRPD)

[0035] 使用Cu K α 辐射(40kV,40mA),自动化XYZ平台,用于自动样品定位的激光视频显微镜和HiStar二维区域检测器在Bruker AXS C2 GADDS衍射仪上收集X射线粉末衍射图案。X射线光学元件由与0.3mm的针孔准直器相联接的单个**Göbel**多层镜组成。使用经认证的标准NIST 1976刚玉(平板)进行每周性能检查。光束发散度,即样品上的X射线束的有效尺寸为约4mm。采用 θ - θ 连续扫描模式,样品到检测器距离为20cm,得到3.2°至29.7°的有效2 θ 范围。通常,将样品暴露于X射线束120秒。用于数据收集的软件是WNT 4.1.16的GADDS,并使用Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2或v 13.0.0.2对数据进行分析 and 呈现。使用收到的未经研磨的粉末将在环境条件下运行的样品制备作为平板试样。将约1至2mg样品轻轻地压在载玻片上以获得平坦表面。将在非环境条件下运行的样品安装在具有导热化合物的硅晶片上。然后将样品以约10°C/分钟加热到合适的温度,随后在开始数据收集之前等温保持约1分钟。

[0036] 或者,使用Cu K α 辐射(40kV,40mA), θ -2 θ 测角仪和V4的发散度和接收狭缝,Ge单色仪和Lynxeye检测器在Bruker D8衍射仪上收集X射线粉末衍射图案。使用经认证的刚玉标准(NIST 1976)对仪器进行性能检查。用于数据采集的软件是Diffrac Plus XRD

Commander v2.5.0,并使用Diffraction Plus EVA v11.0.0.2或v 13.0.0.2对数据进行了分析和呈现。使用收到的粉末将样品在环境条件下作为平板试样运行。将约20mg的样品轻轻地包装到切割成抛光的零背景(510)硅晶片的腔中。分析过程中样品在自身的平面中旋转。数据采集的详情是:角度范围:2至42°2 θ ;步长:0.05°2 θ ;收集时间:0.5秒/步。

[0037] 核磁共振(NMR)

[0038] 在配备有自动采样器并由DRX400操纵台控制的Bruker 400MHz仪器上收集¹H NMR谱。使用标准布鲁克加载实验,使用运行Topspin v 1.3(补丁等级10)的ICONNMR v4.0.4(build 1)获得自动化实验。对于非常规光谱学,通过单独使用Topspin获得数据。除非另有说明,否则在d6-DMSO中制备样品。使用ACD SpecManager v 12.00(build 29094)进行离线分析。或者,在Bruker Avance III 400MHz QNP Ultrashield Plus Cryo上收集¹H NMR谱。

[0039] 液相色谱-质谱(LCMS)

[0040] 使用Phenomenex Synergi色谱柱(RP-Hydro,150×4.6mm,4 μ m,1.5mL/分钟,30℃,在水(+0.1%TFA)中梯度5-100%MeCN(+0.085%TFA)经过7分钟,保持0.5分钟,200-300nm)的Waters ZQ质谱仪在Agilent 1100HPLC系统上进行分析型LCMS。

[0041] 差示扫描量热法(DSC)

[0042] 在配备有50位自动采样器的TA Instruments Q2000上收集DSC数据。使用蓝宝石进行热容量的校准,使用经认证的铟进行能量和温度的校准。通常将0.5至3mg的各样品在针孔铝盘中以10℃/分钟从25℃加热至350℃。在样品上方保持以50mL/分钟吹扫干燥氮气。使用2℃/分钟的基础加热速率和±1.27℃/分钟和60秒的温度调制参数进行调制温度DSC。仪器控制软件是Advantage for Q Series v2.8.0.392和Thermal Advantage v4.8.3,并采用Universal Analysis v4.3A分析数据。

[0043] 热重分析(TGA)

[0044] 在配备有16位自动采样器的TA Instruments Q500 TGA上收集TGA数据。使用经认证的铝和镍对仪器进行温度校准。通常将5至30mg的各样品加载到预去皮重的(pre-tared)的铂坩埚和铝DSC盘上,并以10℃/分钟从环境温度加热至350℃。在样品上方保持60mL/分钟的氮气吹扫。仪器控制软件是Advantage for Q Series v2.8.0.392和Thermal Advantage v4.8.3。

[0045] 偏光显微术(PLM)

[0046] 在具有用于图像捕获的数字摄像机的Leica LM/DM偏振光显微镜上研究样品。将少量的各样品放在玻璃载玻片上,在浸油中固定并用玻璃片覆盖,尽可能分离单个颗粒。用适当的放大倍数和与 λ 伪色彩滤光器(false-colour filter)联接的部分偏振光观察样品。

[0047] 热台显微术(HSM) [熔点]

[0048] 使用与Mettler-Toledo MTFP82HT热台组合的Leica LM/DM偏光学显微镜和用于图像捕获的数字摄像机进行热台显微术。将少量的各样品放置在玻璃载片上,并且尽可能分离单个颗粒。以适当的放大倍数和与伪色彩滤光器联接的部分偏振光观察样品,同时通常以10-20℃/分钟从环境温度加热。

[0049] 通过HPLC的化学纯度测定

[0050] 使用下面详述的方法,使用ChemStation软件vB.02.01-SR1在配备有二极管阵列检测器的Agilent HP1100系列系统上进行纯度分析(表1)。

[0051] 表1

[0052]

样品制备	在乙腈: 水1: 1中, 0.5 mg/ml		
柱	Supelco Ascentis Express C18, 100 x 4.6mm, 2.7µm		
柱温度 (°C)	25		
注射 (µl)	5		
波长, 带宽 (nm)	255, 90 nm		
流速 (mL/分钟 ⁻¹)	2.0		
A相	在水中的0.1% TFA		
B相	在乙腈中0.085% TFA		
时间表:	时间 (分钟)	A相%	B相%
	0	95	5
	6	5	95
	6.2	95	5
	8	95	5

[0053] 通过手性HPLC的手性纯度确定

[0054] 使用Astec Chirobiotic T 100×4.6mm 5nm柱, 极性反相, 150×4.6mm, 5µm, 等度 85% MeOH 15% 20mM乙酸铵, 经10分钟, 1.0mL/分钟, 220nm, 在Agilent 1200系统上进行手性HPLC。

[0055] 通过卡尔费谢尔 (Karl Fisher, KF) 滴定法的水分测定

[0056] 使用Hydranal Coulomat AG试剂和氦气吹扫在Mettler Toledo DL39电量计上测量每个样品的水含量。将称重的固体样品引入容器中的铂TGA盘上, 铂TGA盘连接到subaseal以避免水进入。每次滴定使用约10mg的样品, 并进行重复测定。

[0057] 重量蒸汽吸附 (GVS)

[0058] 使用由DVS内在控制软件v1.0.0.30控制的SMS DVS内在湿度吸附分析仪 (Intrinsic moisture sorption analyser) 获得吸附等温线。通过仪器控制将样品温度保持在25°C。通过混合干湿氮流控制湿度, 总流速为200mL/分钟。通过位于样品附近的经校准的Rotronic探针 (动态范围为1.0-100% RH) 测量相对湿度。通过微量天平 (准确度±0.005mg) 不断监测作为RH%函数的样品的重量变化 (质量松弛 (mass relaxation))。通常将5至20mg的样品在环境条件下放置在去皮重的网格不锈钢篮中。样品在40% RH和25°C (通常的室内条件) 下加载和卸载。如下所述完成吸湿等温线 (2次扫描, 产生1次完整循环)。标准等温线在25°C下在0.5至90% RH范围内以10% RH间隔进行。使用DVS Analysis Suite v6.0.0.7在Microsoft Excel中进行数据分析。SMS DVS内在实验是方法参数: 吸附扫描140-90; 解吸/吸附扫描290-0, 0-40; 间隔 (%RH) 10; 扫描次数4; 流速 (mL/分钟) 200; 温度 (°C) 25; 稳定性 (°C/分钟) 0.2; 吸附时间 (h) 6h超时 (time out)。在等温线完成后回收样品, 并通过XRPD重新分析。

[0059] 离子色谱 (IC)

[0060] 使用IC Net软件v2.3在Metrohm 761Compact IC (用于阳离子) 和Metrohm 861 Advanced Compact IC (用于阴离子) 上收集数据。将准确称重的样品制备为在合适的溶解溶液中的原液, 并在测试前以1:9稀释。通过与正在分析的已知离子浓度的标准溶液进行比较来实现定量。阴离子色谱的IC方法参数: 方法类型-阴离子交换; 柱-Metrosep A Supp 5-

250 (4.0×250mm);柱温度(℃)环境;进样(μl) 20;检测-电导检测器;流速 (mL/分钟) 0.7;洗脱剂-在5%丙酮水溶液中的3.2mM碳酸钠,1.0mM碳酸氢钠。

[0061] 结果

[0062] 分离结晶甲磺酸盐,并使用XRPD、¹H NMR、DSC、TGA、GVS、IC、PLM、HSM、HPLC和KF中的一些或全部对其进行表征(参见表2)。

[0063] 表2: (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯游离碱和结晶甲磺酸盐的性质汇总

	样品	形式	MP	吸湿性
[0064]	游离碱	无定形胶	-	在25℃/60%RH下在 <24小时内潮解
	结晶甲磺酸盐	结晶固体	189℃	在40℃/75%RH下3 天后潮解

[0065] 长期储存期间的稳定性/吸湿性

[0066] 还评估了结晶 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐的稳定性和吸湿性,当以3g等分试样分配在双层LDPE衬垫中时,用扎线带密封并放置,并将干燥剂袋放入箔袋中,随后将其热封。然后将箔袋放入装有HDPE盖的HDPE小桶中。这些条件反映了通常的GMP级存储条件。通过HPLC评估稳定性,通过卡尔费舍尔(KF)滴定法评估吸湿性。结晶 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐在25℃/60%RH下在3年内仅降解0.1%、不吸水,在40℃/75%RH下在6个月仅降解0.1%、仅吸收0.1%的水。

[0067] 单晶X射线衍射 (SXRPD)

[0068] 在配备有Oxford Cryosystems Cobra冷却装置的牛津衍射超新星双源 (Oxford Diffraction Supernova Dual Source), Cu为零, Atlas CCD衍射仪上收集数据。使用CuKα辐射收集数据。通常使用SHELXS或SHELXD程序来解析结构,并使用作为Bruker AXS SHELXL套件的一部分的SHELXL程序进行精修。除非另有说明,否则与碳连接的氢原子几何地放置,并允许用引导各向同性位移参数进行精修。与杂原子连接的氢原子位于差异傅立叶合成(difference Fourier synthesis)中,并允许用各向同性位移因子进行精修。

[0069] 单晶结构测定

[0070] 使 (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸 (3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐的单晶通过由乙酸乙酯/甲醇缓慢蒸发而生长。

[0071] 通过直接的方法获得结构解析,用加权 $W^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0490P)^2 + (0.3000P)$ 对 F^2 进行全矩阵最小二乘方修正(full-matrix least-squares refinement),其中 $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$,各向异性位移参数。在SCALE3 ABSPACK缩放算法中实现使用球面调和函数的经验吸收校正。

[0072] 绝对结构参数=0.002(13)。对于所有数据,最终 $wR^2 = \{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0.0657$,对于在 $F_o > 4\sigma(F_o)$ 情况下的2651个反映(reflection)的F值,常规的 $R_1 =$

0.024, 对于所有数据和234个参数, $S=1.007$ 。最终 Δ/σ (max) 0.000, Δ/σ (平均), 0.000。

[0073] 最终差异图谱在+0.24和**-0.288 eÅ⁻³**之间。

[0074] 解析的晶体结构参数如下(表3):

[0075] 表3

分子式	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₆ S					
分子量	375.44					
晶体系统	正交晶					
空间群	P2(1)2(1)2(1)	a	8.75780(10)Å,	α	90°,	
		b	9.70830(10)Å,	β	90°,	
		c	20.6736(2)Å,	γ	90°	
V	1757.74(3)Å ³					
Z	4					
D _c	1.419g.cm ⁻³					
μ	1.975mm ⁻¹					
源, λ	Cu-Kα, 1.5418Å					
F(000)	800					
T	100(2)K					
晶体	无色块, 0.09 x 0.05 x 0.02mm					
数据截断至	0.80 Å					
θ _{最大}	62.35°					
完整性	99.2%					
反映	13291					
独特的反映	2736					
R _{int}	0.0256					

[0076] 原子坐标如下:

	x	y	z
S1	-0.953688	-0.131935	-0.071370
O1	-0.020659	-0.149398	-0.484602
O2	-0.234768	-0.155566	-0.365860
O3	-0.474652	-0.066100	-0.365092
O4	-0.912055	-0.134194	-0.140238
O5	-1.110792	-0.173740	-0.060477
O6	-0.844708	-0.208722	-0.032208
N1	-0.412770	-0.253710	-0.303870
N2	-0.617297	-0.224842	-0.147335
[0078] H2A	-0.722228	-0.196131	-0.146105
N3	-0.392648	-0.259773	-0.107928
H3A	-0.324241	-0.261543	-0.081273
C1	0.073273	-0.055487	-0.449929
H1A	0.096656	0.026304	-0.476759
H1B	0.170449	-0.099983	-0.437205
C2	-0.017615	-0.014548	-0.390676
H2B	-0.004410	0.084643	-0.381074
H2C	0.014557	-0.068772	-0.352479
C3	-0.183226	-0.046385	-0.408629
H3B	-0.249376	0.037232	-0.405075
C4	-0.171565	-0.096071	-0.477738
H4B	-0.248192	-0.168773	-0.486334
H4C	-0.188739	-0.019057	-0.508271
C5	-0.383218	-0.150898	-0.346637
C6	-0.560166	-0.254872	-0.270030
H6B	-0.616936	-0.169106	-0.281832
C7	-0.521333	-0.248342	-0.198878
C8	-0.536619	-0.232888	-0.092882
H8A	-0.575742	-0.221293	-0.050370
C9	-0.379700	-0.269963	-0.174418
C10	-0.240769	-0.305362	-0.212417
H10A	-0.184330	-0.381585	-0.191434
H10B	-0.172218	-0.224586	-0.215739
C11	-0.296381	-0.348962	-0.279498
[0079] H11A	-0.208892	-0.350915	-0.309809
H11B	-0.339647	-0.443040	-0.277151
C12	-0.659963	-0.380274	-0.288449
H12A	-0.612652	-0.464685	-0.269297
C13	-0.664766	-0.397753	-0.361667
H13A	-0.560447	-0.406134	-0.378360
H13B	-0.714279	-0.317374	-0.381222
H13C	-0.722663	-0.480993	-0.372510
C14	-0.821261	-0.366359	-0.261740
H14A	-0.816850	-0.355260	-0.214661
H14B	-0.880046	-0.449226	-0.272353
H14C	-0.870697	-0.285637	-0.281016
C15	-0.939731	0.041434	-0.046714
H15A	-0.966523	0.048834	-0.000821
H15C	-1.009980	0.097844	-0.072401
H15B	-0.834933	0.074003	-0.053214

[0080] X射线粉末衍射

[0081] (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯的甲磺酸盐的粉末X射线衍射图谱具有在以下的峰值:

[0082] 8.549, 9.851, 10.899, 12.295, 13.198, 13.393, 14.083, 15.897, 16.280, 17.097, 17.744, 18.289, 19.694, 20.180, 20.443, 20.597, 20.886, 21.948, 22.112, 22.444, 23.194, 23.653, 24.144, 24.714, 25.292, 25.590, 25.810, 26.526, 26.765, 27.084, 27.283, 27.662, 28.159, 28.996, 29.135, 29.912和30.868度 2θ 。

[0083] 为了考虑到正常的实验变量,上述鉴定的峰应被认为具有高达 ± 0.2 度 2θ 的精确度,例如 ± 0.1 、 ± 0.05 、 ± 0.01 、 ± 0.005 和 ± 0.001 。这些峰的相对强度如下(表4):

[0084] 表4

[0085]

角度 ($2-\theta^\circ$)	强度 (%)	角度 ($2-\theta^\circ$)	强度 (%)
8.549	3.7	22.112	22.5
9.851	24.2	22.444	4.5
10.899	7.2	23.194	14.5
12.295	2.3	23.653	21.9
13.198	6.9	24.144	11.8
13.393	4.9	24.714	3.3
14.083	4.2	25.292	4.1
15.897	3.2	25.590	5.3
16.280	23.7	25.810	4.3
17.097	13.7	26.526	4.0
17.744	47.0	26.765	4.0
18.289	7.4	27.084	17.2
19.694	21.5	27.283	10.5
20.180	4.2	27.662	3.4
20.443	18.1	28.159	9.8
20.597	7.3	28.996	5.3
20.886	42.8	29.135	4.1
21.948	100.0	29.912	10.5
		30.868	5.0

[0086] 合成

[0087] 使用以下缩写:

[0088] Aq 水性

[0089] DCM 二氯甲烷

[0090] DIPEA 二异丙基乙胺

[0091] ee 对映体过量

[0092] ES⁺ 电喷雾

[0093] EtOAc 乙酸乙酯

[0094] h 小时

[0095] HPLC 高效液相色谱

[0096] HRMS 高分辨率质谱

[0097] LCMS 液相色谱-质谱

[0098] M 摩尔每升 (Molar)

[0099] MeOH 甲醇

[0100] [MH⁺] 质子化分子离子

[0101] min 分钟

- [0102] RP 反相
 [0103] MS 质谱
 [0104] R_T 保留时间
 [0105] sat 饱和的
 [0106] THF 四氢呋喃
 [0107] TFA 三氟乙酸
 [0108] 实验方法

[0109] 除非另有说明,否则所有试剂均为商业级,收到后即可使用而无需进一步纯化。在所有情况下均使用试剂级溶剂。

[0110] 用与Agilent 1100 HPLC系统联接的Waters ZQ质谱仪进行分析型LCMS。在Agilent 1100系统上进行分析型HPLC。用与Agilent 1100 HPLC系统联接的Agilent MSD-TOF获得高分辨率质谱(HRMS)。在分析过程中,通过两个质量检查校准,并在需要时自动校正。光谱以正电喷雾模式获得。获得的质量范围为 m/z 100-1100。使用质量峰的分布检测(Profile detection)。在配备有RediSep二氧化硅的CombiFlash配套系统或配备有Strata SI-1二氧化硅gigatube的Flash Master Personal系统上进行快速色谱法。在配备有Phenomenex Synergi Hydro RP 150×10mm, YMC ODS-A 100/150×20mm或Chirobiotic T 250×10mm柱的Gilson系统(具有Gilson 321平衡泵和Gilson 215自动进样器的Gilson 322泵)上进行反相HPLC。在配备有Merck**LiChroprep**[®] RP-18 (40-63 μ m) 二氧化硅柱的Gilson系统(Gilson 321泵和Gilson FC204级分收集器)上进行反相柱色谱法。使用ACD 6.0自动命名化合物。所有化合物在真空烘箱中干燥过夜。

[0111] 用以下获得分析型HPLC和LCMS数据:

[0112] 体系A:Phenomenex Synergi Hydro RP (C18, 30×4.6mm, 4 μ m), 在水(+0.1% TFA)中梯度5-100%CH₃CN(+0.085% TFA), 1.5mL/分钟, 梯度时间1.75分钟, 200nm, 30℃; 或者

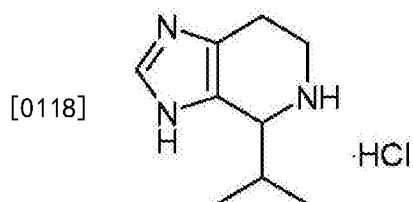
[0113] 体系B:Phenomenex Synergi Hydro RP (C18, 150×4.6mm, 4 μ m), 在水(+0.1% TFA)中梯度5-100%CH₃CN(+0.085% TFA), 1.5mL/分钟, 梯度时间为7分钟, 200nm, 30℃。

[0114] 用以下获得手性HPLC数据:

[0115] 体系C:Chirobiotic V极性离子模式(150×4.6mm), 在10mM水性甲酸铵缓冲液中70%MeOH, 1.0mL/分钟, 超过10分钟, 200nm, 30℃。

[0116] 中间体1

[0117] 4-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶盐酸盐



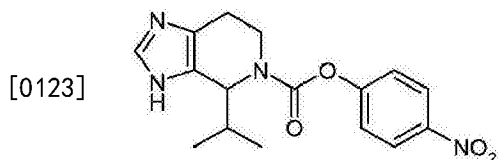
[0119] 将组胺二盐酸盐(61.9g, 336mmol)溶于在水(125mL)和MeOH(500mL)中的NaOH(33.6g, 841mmol)溶液中,并添加异丁醛(61.4mL, 672mmol)。将反应混合物在80℃下回流加热24小时,冷却至室温,用1M HCl水溶液(250mL)将pH调节至7,并真空除去溶剂。将残余物溶于温热的MeOH(300mL)中,使其静置1小时,过滤并真空除去溶剂。将残余物在MeOH(50mL)

和丙酮(400mL)中搅拌2小时,并冷却至4℃保持2小时。将所得沉淀物过滤并用丙酮(100mL)洗涤以得到作为白色固体的4-异丙基-4,5,6,7-四氢-1H-咪唑并[4,5-c]吡啶盐酸盐(33.0g,48.7%)。

[0120] 分析型LCMS:纯度>90%(体系A, R_T =0.51分钟), ES^+ :166.4[MH]⁺。

[0121] 中间体2

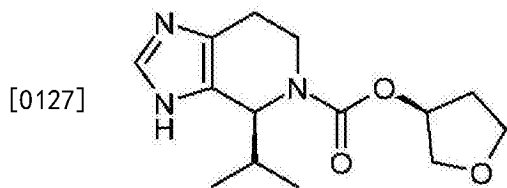
[0122] 4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸4-硝基苯基酯



[0124] 将中间体1(2.78g,8.28mmol,60%纯)和DIPEA(5.27mL,30.3mmol)溶于DCM(100mL)中。将反应混合物冷却至0℃,并添加4-硝基苯基氯甲酸酯(4.07g,20.2mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时。将反应混合物用饱和NaHCO₃水溶液(5×100mL)洗涤、干燥(MgSO₄),并真空除去溶剂以得到作为黄色胶状物的4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸4-硝基苯基酯(5.28g,粗制品)。

[0125] 分析型HPLC:纯度41%(体系B, R_T =4.70分钟);分析型LCMS:纯度86%(体系A, R_T =1.70分钟), ES^+ :331.0[MH]⁺。

[0126] (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯



[0128] 将NaH(0.40g,10.0mmol,在矿物油中60%分散体)悬浮于无水THF(20mL)中,冷却至0℃,并添加(S)-3-羟基四氢呋喃(0.88g,0.68mL,10.0mmol)。将混悬液在0℃下搅拌30分钟,然后添加到中间体2(3.30g,10.0mmol,70%纯)在THF(60mL)的溶液中,并在室温下搅拌反应混合物。在5小时和29小时后分别添加另外两份这样的NaH和(S)-3-羟基四氢呋喃的THF溶液。2天后,将反应混合物用水(10mL)淬灭并真空除去溶剂。将残余物溶于EtOAc(100mL)中,用1M Na₂CO₃水溶液(4×100mL)洗涤,干燥(MgSO₄),并真空除去溶剂。残余物通过柱色谱法纯化(正相,20g,Strata SI-1,二氧化硅gigatube,DCM(200mL),随后是在DCM(200mL)中的2%、4%和5%MeOH和反相HPLC(YMC ODS-A 100×20mm,5μm,25mL/分钟,梯度30%至60%(超过7分钟),然后100%(3分钟)在10%MeOH/水中的MeOH)以得到为白色固体的4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯(34.8mg,1.1%)。

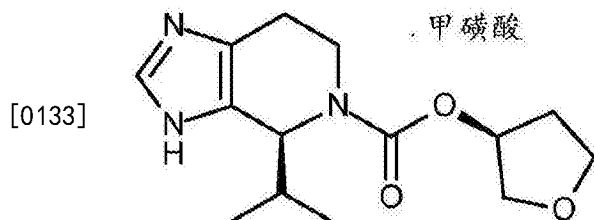
[0129] 分析型HPLC:纯度100%(体系B, R_T =3.63分钟);分析型LCMS:纯度100%(体系B, R_T =4.01分钟), ES^+ :280.1[MH]⁺。

[0130] 4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯(39.91mg)溶于10mM甲酸铵缓冲液和MeOH(2mL,1:1)中,并通过反相手性HPLC纯化两次(Chirobiotic T 250×10mm,3mL/分钟,以在10mM甲酸铵缓冲液(40分钟,pH 7.4)中70%

MeOH中等度运行)以得到单一非对映异构体(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯(6.90mg,99% ee)。

[0131] 分析型HPLC:纯度100% (体系B, R_t =3.63分钟);手性HPLC:纯度99.5% (体系C, R_t =2.22分钟);分析型LCMS:纯度100% (体系B, R_t =3.90分钟), ES^+ :280.1 $[MH]^+$; $C_{27}H_{21}N_3O_3$ 的HRMS计算值:279.1583,实测值279.1571。

[0132] (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯,甲磺酸盐



[0134] (4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯游离碱(460mg,1.65mmol)在室温下溶于EtOAc(10mL)中以得到澄清无色溶液。在温和加热下逐份添加甲磺酸(107 μ L)。将溶液冷却至室温过夜。通过过滤收集所得晶体,用EtOAc(2 $\times$ 10mL)洗涤,并在40 $^{\circ}$ C下真空干燥过夜。获得作为白色结晶固体的99%产率的(4S)-4-异丙基-1,4,6,7-四氢-5H-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-羧酸(3S)-四氢呋喃-3-基酯甲磺酸盐(615mg)。HPLC:保留时间2.27分钟,纯度99.5%。熔点:189 $^{\circ}$ C。LCMS:保留时间4.19分钟, ES^+ 280.0 $[MH]^+$,100%纯度。手性HPLC:保留时间3.70分钟,>99.5% de。

[0135] 1H NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ_H 8.72(1H, m, $NHCHNH^+$), 5.29(1H, m, OCH), 5.05(0.5H, d, J 8.4Hz, $CCHN$), 4.89(0.5H, d, J 7.6Hz, $CCHN$), 4.59(0.5H, m, $NCHACH_B$), 4.39(0.5H, m, $NCHACH_B$), 3.97-3.85(4H, m, CH_2OCH_2), 3.20(1H, m, $NCHACH_B$), 2.89(3H, s, $CH_3SO_3^-$), 2.89-2.72(2H, m, CCH_2CH_2N), 2.23-2.07(3H, m, $CH(CH_3)_2, OCH_2CH_2$), 1.16(3H, d, J 6.4Hz, CH_3)和1.06-0.96(3H, m, CH_3)。

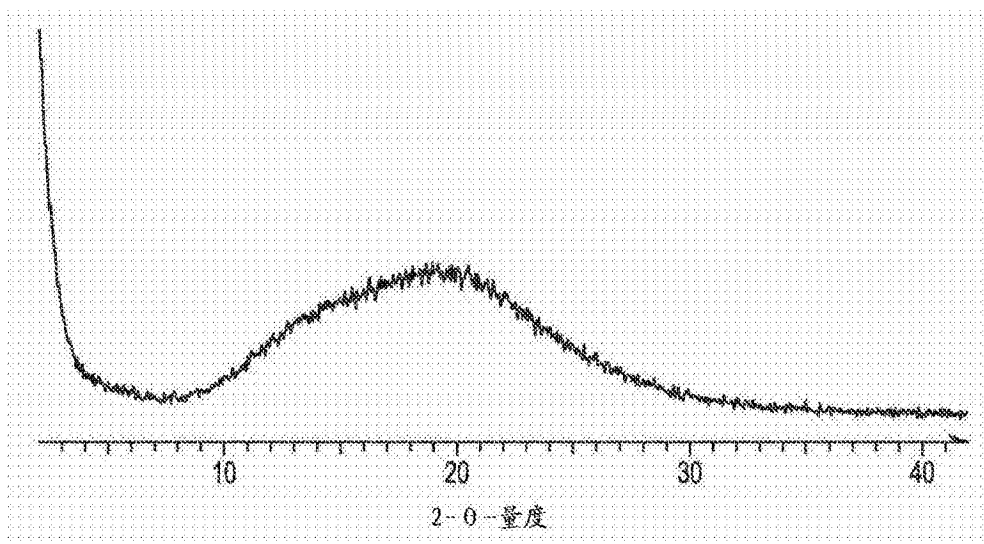


图1

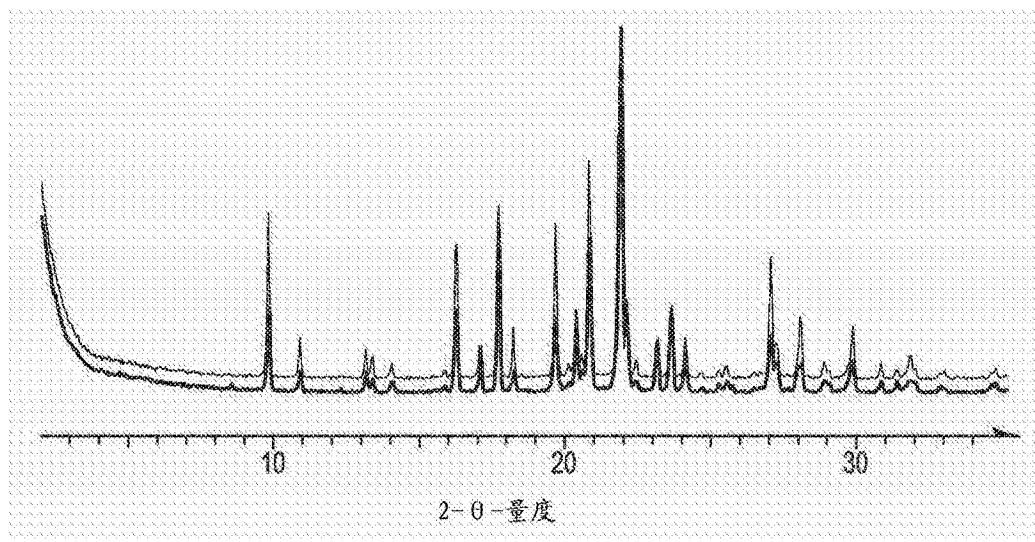


图2