(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105859624 A
(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610172899.4

(22)申请日 2010.11.25

(30)优先权数据
09382261.7 2009.11.25 EP
10382025.4 2010.02.04 EP

(62)分案原申请数据
201080060847.9 2010.11.25

(71)申请人 埃斯特韦实验室有限公司
地址 西班牙巴塞罗那

(72)发明人 玛丽亚罗莎·库韦尔斯-阿尔蒂森特
路易·索拉-卡兰德利
乌尔·加西亚-科塞罗

(74)专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理有限公司 11467
代理人 赵晨宇

(51)Int.Cl.
C07D 231/22(2006.01)
A61K 31/5377(2006.01)
A61P 1/12(2006.01)
A61P 3/04(2006.01)
A61P 9/06(2006.01)
A61P 9/12(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 25/08(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 25/18(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 25/22(2006.01)
A61P 25/24(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/30(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页 附图15页

(54)发明名称

4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐

(57)摘要

本发明涉及4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐，特别是盐酸盐，还涉及包括它们的药物组合物，以及其用于治疗和/或预防σ受体相关疾病的用途。

CN 105859624 A

1．4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉的盐酸盐。

2．一种制备根据权利要求1所述的盐酸盐的方法，包括：

a)混合4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉与包含盐酸的溶液，以及

b)分离获得的盐酸盐。

3.一种包含根据权利要求1所述的盐酸盐的药物组合物。

4.根据权利要求1所述的盐酸盐在制备治疗和/或预防σ受体介导的疾病或症状的药物中的用途。

5.根据权利要求4所述的用途，其中σ受体介导的疾病或症状选自：腹泻；脂蛋白紊乱；偏头痛；肥胖；关节炎；高血压；心律不齐；溃疡；学习、记忆力和注意力不足；认识障碍；神经退行性疾病；脱髓鞘疾病；药物和化学物质成瘾，所述化学物质包括古柯碱、安非他明、酒精和尼古丁；迟发性运动障碍；缺血性中风；癫痫症；中风；紧张；癌症；精神病症状；和自身免疫疾病。

6.根据权利要求4所述的用途，其中所述σ受体介导的疾病或症状是抑郁症、忧虑症或精神分裂症。

4- [2-[[5-甲基-1-(2-萘基)- 1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐

技术领域

[0001] 本发明涉及一些4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐，以及包含所述盐的药物组合物，还涉及其在治疗和/或预防σ受体关联疾病中的用途。

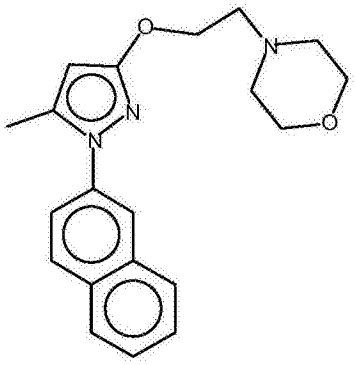
背景技术

[0002] 近年来，通过对与目标疾病相关的蛋白质和其它生物分子的结构的更透彻的理解，为新治疗剂的探索提供极大的帮助。这些蛋白质中的一个重要的种类是西格玛(σ)受体，其是中枢神经系统(CNS)的细胞表面受体，可能与阿片样物质导致烦躁不安、致幻觉效果和强心作用相关。通过对σ受体的生物学及功能的研究，已经证实σ受体配体可以用于精神病和运动障碍(如肌张力障碍和迟发性运动障碍，和与亨廷顿氏舞蹈病或抽动秽语综合征和帕金森病相关的运动障碍)的治疗(Walker,J.M.等,Pharmacological Reviews,1990,42,355)。据报道已知的σ受体配体林卡唑显示了对精神病治疗的临床效果(Snyder,S.H.,Largent,B.L.J.Neuropsychiatry 1989,1,7)。σ结合位点对于某些阿片苯基吗啡类药物的右旋异构体(如(+)SKF 10047、(+)环佐辛和(+)镇痛新)以及一些发作性睡病的药物(如氟哌啶醇)具有优先的亲和性。

[0003] σ受体具有至少两个亚型，这些亚型可能是由这些具有药物活性的药物的立体选择性异构体来区分的。SKF 10047对于sigma 1(σ-1)位点具有纳摩尔亲和力，对于sigma 2(σ-2)位点具有微摩尔亲和力。氟哌啶醇对于两种亚型具有相似的亲和力。内源的σ配体还未知，虽然已经表明黄体酮可能是σ 配体中的一种。可能的σ-位点-介导的药物作用包括谷氨酸受体功能的调节、神经递质应答、神经保护、行为以及认知(Quirion,R.等,Trends Pharmacol.Sci.,1992,13:85-86)。大多数的研究暗示了σ结合位点(受体)是信号转导级联的细胞膜基础。已报道的作为选择性σ配体的药物已经评为抗精神病药(Hanner,M.等,Proc.Natl.Acad.Sci.,1996,93:8072-8077)。CNS、免疫和内分泌系统中σ受体的存在表明它可能充当三个系统的连接。

[0004] 考虑到σ受体的激动剂或拮抗剂的潜在的治疗应用，在寻找选择性配体方面做了巨大的努力。因此，现有技术公开了不同的σ受体配体。4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉是这些已知的σ受体配体中的一种。在WO 2006/021462中公开了该化合物及其合成。

[0005] 4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉是高选择性的sigma-1(σ-1)受体拮抗剂，其在治疗和预防慢性和急性疼痛、特别是神经性疼痛中显示了很强的镇痛活性。该化合物分子量为337.42uma。该化合物的结构式为：

[0006] 

[0007] 为了进行药物研发及实现其潜力，本领域需要研究4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉的其它形式，这些形式将有利于该活性药物组分较优配方的制备。此外，化合物的新形式还可能改进化合物本身的生产、加工、存储特性及其治疗效果，例如药理学性质。

[0008] 就此而言，化合物的可选形式也许具有迥然不同的性质，例如，举例来说，增强的热力学稳定性、较高的纯度或改进的生物利用率(例如，更好的吸收、溶解模式)。特定的化合物形式还会利于化合物制剂的制备(例如增强流动性)、加工和存储(例如不吸潮、贮存期长)或允许治疗剂较低剂量的应用，从而减少其潜在的副作用。因此，提供上述对于药物应用有着所需性质的这些形式是很重要的。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的发明人，在对4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉(本文中称为“化合物63”)的不同形式进行广泛研究之后，出乎意料地发现并证明了其盐类中的一些、特别是其盐酸盐，具有有利的生产、加工、存储和/或治疗的性质。

[0011] 因此，本发明的第一方面涉及4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐，其选自由乙磺酸盐、延胡索酸盐、盐酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐和甲磺酸盐组成的组中。

[0012] 在优选的实施方案中，本发明涉及4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉的盐酸盐(本文中是指“P027”或“实施例1”)。

[0013] P027化合物分子量为373.88uma，pKa为6.73，熔点为194.2℃。该化合物极易溶于水，易溶于甲醇、1N盐酸和二甲基亚砜。难溶于乙醇，微溶于丙酮，并且几乎不溶于乙酸乙酯和1N氢氧化钠。该产物在体内显示了比其相关的基底化合物更好的溶解和吸收特性。

[0014] 另一方面，本发明涉及4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉的盐酸盐的制备方法，其包括：

[0015] a)混合4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉与包含盐酸的溶液，以及

[0016] b)分离获得的盐酸盐。

[0017] 本发明的另一方面包括药物组合物，其包含4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基) -1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐酸盐以及药学上可接受的载体、佐剂或赋形剂。

[0018] 本发明的另一方面涉及4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐酸盐作为药物的用途，优选作为σ配体，即，用于治疗和/或预防σ受体介导的疾病或症状。

[0019] 本发明的另一方面涉及治疗和/或预防σ受体介导的疾病的方法，其包括对需要所述治疗的病人施用治疗有效量的上述限定的化合物或包含该化合物的药物组合物。

[0020] 这些方面及其优选实施方案在权利要求中也进行了进一步的确定。

附图说明

[0021] 图1：实施例1的差示扫描量热法(DSC)

[0022] 图2：实施例1的热重量分析法(TGA)

[0023] 图3：实施例1的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0024] 图4：化合物63的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0025] 图5：实施例2的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0026] 图6：实施例2的差示扫描量热法(DSC)

[0027] 图7：实施例2的热重量分析法(TGA)

[0028] 图8：实施例2的傅里叶转换红外光谱分析

[0029] 图9：实施例3的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0030] 图10：实施例3的差示扫描量热法(DSC)

[0031] 图11：实施例3的热重量分析法(TGA)

[0032] 图12：实施例3的傅里叶转换红外光谱分析

[0033] 图13：实施例4的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0034] 图14：实施例4的差示扫描量热法(DSC)

[0035] 图15：实施例4的热重量分析法(TGA)

[0036] 图16：实施例4的傅里叶转换红外光谱分析

[0037] 图17：实施例5的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0038] 图18：实施例5的差示扫描量热法(DSC)

[0039] 图19：实施例5的热重量分析法(TGA)

[0040] 图20：实施例5的傅里叶转换红外光谱分析

[0041] 图21：实施例6的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0042] 图22：实施例6的差示扫描量热法(DSC)

[0043] 图23：实施例6的热重量分析法(TGA)

[0044] 图24：实施例6的傅里叶转换红外光谱分析

[0045] 图25：实施例7的质子核磁共振(^{1}HNMR)

[0046] 图26：实施例7的差示扫描量热法(DSC)

[0047] 图27：实施例7的热重量分析法(TGA)

[0048] 图28：实施例7的傅里叶转换红外光谱分析

[0049] 图29：实施例1的热力学溶解度校正曲线。

[0050] 图30：实施例1中大鼠的血浆浓度

[0051] 发明详述

[0052] 发明人发现了化合物P027，4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉的盐酸盐具有优点，特别地，由于事实上它是结晶固体，因此简化了分离、提纯和加工。

[0053] 实际上，在对盐类进行广泛筛选后，发明人注意到，当与4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉混合时，许多酸类(例如硫酸或L-酒石酸)没有形成固体，而是形成油状物。此外，在适于获得固态盐的酸中，盐酸是在制备、物理稳定性、放大实验、可溶性等方面提供较好结果的物质。

[0054] 因此，本发明涉及4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐，其选自由乙磺酸盐、延胡索酸盐、盐酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐和甲磺酸盐组成的组中。这些盐类能够提供结晶固体。

[0055] 优选地，本发明涉及4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐酸盐(P027)。

[0056] 4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉的盐酸盐可以通过将盐酸溶液加入溶于适当的溶剂中的其相应的碱中制备。在具体实施方式中，通过将游离碱化合物溶于用HCl饱和的乙醇中，可以很容易地获得P027化合物。

[0057] 如前所述，据报道4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉是一种高选择性的sigma-1(σ-1)受体拮抗剂，在治疗和预防慢性和急性疼痛、特别是神经性疼痛痛中显示了很强的镇痛活性(参见WO 2006/021462)。已经发现了4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉的盐酸盐特别适合用作药物制剂。因此，本发明进一步提供了施用于病人的药物制剂或药物组合物，其包含4-[2-[[5-甲基-1-(2-萘基)-1H-吡唑-3-基]氧基]乙基]吗啉盐酸盐以及药学上可接受的载体、佐剂或赋形剂。

[0058] 更具体地，P027化合物在治疗和/或预防σ受体介导的疾病或症状中是有效的。

[0059] 在更优选的实施方案中，P027化合物用于制备治疗和/或预防疾病的药物制剂，所述疾病选自由以下疾病组成的组中：腹泻；脂蛋白紊乱；偏头痛；肥胖；关节炎；高血压；心律不齐；溃疡；学习、记忆力和注意力不足；认识障碍；神经退行性疾病；脱髓鞘疾病；药物和化学物质(包括古柯碱、安非他明、酒精和尼古丁)成瘾；迟发性运动障碍；缺血性中风；癫痫症；中风；紧张；癌症；精神病症状，特别是抑郁症、忧虑症或精神分裂症；炎症；或自身免疫疾病。

[0060] 根据本发明的药物组合物中的辅料或添加剂可以选自载体、赋形剂、支撑材料、润滑剂、填料、溶剂、稀释剂、着色剂、调味剂(例如糖)、抗氧化剂、结合剂、粘合剂、崩解剂、防粘剂、助流剂和/或粘合剂。对于栓剂，可理解为用于胃肠外应用的蜡或脂肪酸酯或防腐剂、乳化剂和/或载体。辅 料和/或添加剂的选择和用量将依赖于药物组合物的施用形式。

[0061] 根据本发明的药物制剂或药物组合物可以是适于施用于人和/或动物的任意形式，优选施用于人，包括孕妇、儿童和成人，并且本领域技术人员可以通过已知的标准程序制备。因此，根据本发明的制剂配方可能适合于局部的或系统的施用，特别地适用于表皮的、经皮的、皮下的、肌肉的、关节的、腹膜内的、静脉内的、动脉内的、膀胱内的、骨内的、海绵体的、肺的、口腔的、舌下的、眼的、玻璃体内的、鼻内的、经皮的、直肠的、阴道的、口服的、硬膜外的、鞘内的、心室内的、脑内的、脑室内的、脑池内的、脊柱内的、髓周的、颅内的，通过有或没有泵装置的针或导管递送，或其它的给药途径。

[0062] 提到的剂型将使用标准方法制备，例如在西班牙和美国药典以及相似的参考文献中描述或涉及的方法。

[0063] 在本发明的一个实施方式中，优选P027化合物以治疗有效剂量使用。医生确定最

合适的使用的治疗剂的剂量，并且剂量会根据给药的形式和具体选择的化合物而变化，此外，其会随着进行治疗的病人、病人的年龄、治疗的疾病种类或症状而改变。当组合物口服给药时，需要更多量的活性剂才能达到与较小的肠胃外给药剂量相同的效果。与可比较的治疗剂以相同的方式使用该化合物是有效的，并且剂量水平与通常施用的其他的治疗剂为同一数量级。典型地，有效化合物一天施用一次或多次，例如每日1、2、3或4次，典型的每日总剂量为0.1-1000mg/kg/日。

[0064] 以下实施例仅用于说明本发明的特定的具体实施方式而不以任何形式限制本发明。

具体实施方式

[0065] 分析技术

[0066] 以下技术用于本发明鉴定获得的化合物63的不同的盐：

[0067] -差示扫描量热法分析(DSC)

[0068] DSC分析记录在Mettler Toledo DSC822e中。称重1-2mg样品，加入到带针孔盖的40μL铝坩埚中，在氮环境下(50mL/分)，以10℃/分的加热速度，从30℃加热到300℃。使用软件STARe进行数据收集和评估。

[0069] -热重量分析(TGA)

[0070] 热重分析记录在Mettler Toledo SDTA851e中。称重3-4mg样品(使用microscale MX5，Mettler)，加入到敞口的40μL铝坩埚中，在氮环境(80mL/分)下，以10℃/分的加热速度，在30℃到300℃之间加热。使用软件STARe进行数据收集和评估。

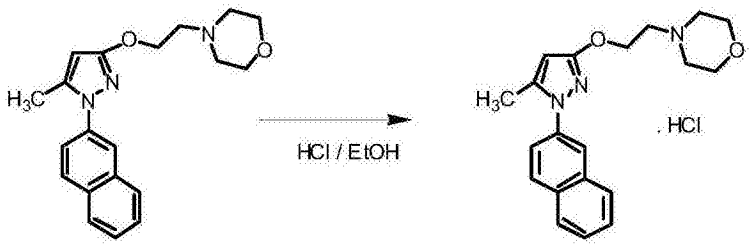
[0071] -质子核磁共振(^{1}H-NMR)

[0072] 质子核磁共振分析在Bruker Avance 400Ultrashield核磁共振波谱仪中的氘代氯仿或甲醇中记录，该核磁共振波谱仪中装备有用ATM标记的z-梯度5mm BBO(宽带观察)探针和自动BACS-120自动进样器。通过在0.7mL的氘化溶剂中溶解2-10mg样品获得光谱。

[0073] -傅里叶转换红外光谱学(FTIR)

[0074] 使用Bruker Tensor 27记录FTIR光谱，该Bruker Tensor 27装有MKII金门单个反射ATR系统、作为激发光源的中红外源和DTGS检波器。光谱在分辨率为4cm^{-1}的32扫描中获得。进行该分析不需要样品制备。

[0075] 实施例1 4-{2-[5-甲基-1-(萘-2-基)-1H-吡唑-3-基氧基]乙基}吗啉(化合物63)及其盐酸盐的合成(例1)

[0076] 

化合物 63 实施例 1

[0077] 化合物63可以按照之前的申请WO2006/021462中公开的内容进行制备。可以通过以下步骤获得其盐酸盐：

[0078] 化合物63(6.39g)溶于HCl饱和的乙醇中，搅拌混合物几分钟，并蒸发直至干燥。残

留物从异丙醇中结晶。来自第一次结晶的母液通过浓缩进行第二次结晶。两次结晶一共产生5.24g(63%)相应的盐酸盐(熔点=197-199℃)。

[0079] ^{1}H-NMR(DMSO-d_6)δppm:10,85(bs,1H),7,95(m,4H),7,7(dd,J=2,2,8,8Hz,1H),7,55(m,2H),5,9(s,1H),4,55(m,2H),3,95(m,2H),3,75(m,2H),3,55-3,4(m,4H),3,2(m,2H),2,35(s,3H)。

[0080] HPLC纯度:99.8%。

[0081] 使用该方法,获得的盐酸盐为结晶固体,且产率很高。此外,其高熔点对于药物是特别方便的,因为其暗示了该产品具有好的物理稳定性。

[0082] 从其盐酸盐(例1)中抽提化合物63

[0083] 本发明中使用的样品是例1。基底(化合物63)使用CH_2Cl_2从例1的碱性水溶液中抽提(pH>10,使用0.5M的NaOH水溶液),提出橙油。

[0084] 化合物63的其它盐类结晶的一般方法

[0085] 盐类的制备最初是将甲醇中的1mL 0.107M化合物63的溶液,即先前获得的橙油(参见例1),与甲醇中的1mL 0.107M相应的平衡离子混合。混合物搅拌1小时,并在真空中蒸发溶剂(Genevac,8mm Hg),获得基于所述盐的油状物或白色固体。

[0086] 将最初制备获得的产品在其沸点温度或最高75℃下溶于最低量的结晶溶剂中。如果添加4ml溶剂后,盐没有完全溶解,则将悬浮液在高温下搅拌30分钟,通过热过滤或离心分离残留物。将母液冷却至室温,保存24小时。

[0087] 当形成固体时,进行分离(过滤或离心)。如果没有形成固体,将溶液在冰箱中(4℃)保存几天。如果形成固体,则从溶液中分离。如果没有形成固体,则将溶液在冷冻室中(-21℃)保存几天。如果形成固体,则从溶液中分离固体。如果在这些操作之后仍然没有获得固体,则将溶液进行蒸发直至干燥。

[0088] 所有获得的固体在真空干燥箱中,40℃(10mm Hg)下,干燥4小时,如果获得足够量的固体,对其进行检测。其最初的特性通过^{1}H-NMR分析来确定盐的合成。本发明中使用的溶剂在表1中列出。

[0089] 表1.本发明使用的溶剂

[0090]

名称	代码	沸点 (°C)	熔点 (°C)	介电常数
丙酮	ACE	56	-94	20,7
乙腈	ACN	81	-46	38,8
乙酸乙酯	AET	77	-84	6
氯仿	CLF	61	-63	4,8
N,N-二甲基甲酰胺	DMF	153	-98	36,7
乙醇	EOH	78	-114	24,6
异丙醇	IPH	82	-90	19,9
甲醇	MOH	65	-98	32,7
四氢呋喃	THF	66	-108	20,4
碳酸二甲酯	CDM	90	3	3,1
水	H2O	100	0	80
2-丁醇	BUL	98	-115	16,6
甲基叔丁基乙醚	MTE	55	-109	2,6
二异丙醚	DIE	68	-86	3,9
醋酸异丁酯	AIB	117	-99	5
氯苯	CLB	132	-45	5,6
环己烷	CHE	81	6	2,2
3-戊酮	POA	102	-40	17
甲苯	TOL	110	-93	7,6

[0091] 用于研究化合物63的结晶盐的酸按照以下标准选择(表2)：

[0092] -酸的pKa比化合物63(pKa 6.7)的至少低3个单位

[0093] -酸为药学上可接受的化合物

[0094] 虽然选择的酸类中的一些具有两个或甚至三个(柠檬酸)酸性位点，原则上，只有硫酸具有第二个质子酸性，足够与化合物63形成双盐。因此总共可能形成11种不同的盐。

[0095] 表2.选作平衡离子的酸.

[0096]

酸	代码	纯度(%)	pKa_1	pKa_2	pK_3
硫酸	SFT	95-97	-3	1.9	–
甲磺酸	MSF	99.5	-1.2	–	–
乙磺酸	ESF	95.0	2.05	–	–
延胡索酸	FMT	99.5	3.03	4.38	–
L-(–) -苹果酸	LML	99.5	3.46	5.10	–
丙二酸	MLO	99.0	2.83	5.70	–
马来酸	MLE	99.0	1.92	6.23	–
柠檬酸	CTR	99.5	3.13	4.76	6.40
羧乙酸	GLY	99.0	3.82	–	–
L-(+)-酒石酸	LTT	99.5	3.02	4.36	–

[0097] 研究化合物63的结晶盐类的一般策略可以分成三个步骤：

[0098] -步骤1：盐结晶筛选；

[0099] -步骤2：盐的优化与表征；

[0100] -步骤3：大规模制备选择的盐。

[0101] 首先，使用表2中所示的平衡离子进行结晶筛选，以寻找想要的结晶盐。使用广泛的结晶溶剂(表1)和不同的结晶方法，筛选以小标度(scale)(40mg化合物63)来进行。在筛选过程中，没有严格监控结晶状态，且使用^{1}H-NMR表征获得的固体。核磁共振谱学对盐的形成提供了很好的观测，因为盐的 ^{1}H-NMR光谱与酸和碱混合物的光谱有着实质上的不同。可以观察到接近于质子化氮的、与氢相关的信号清晰的移动。此外，当酸平衡离子在^{1}H-NMR中有特征信号时，其是可以鉴定的，从而确定盐的化学当量并对盐纯度定性。

[0102] 在第二步中，将所有的结晶盐在溶剂中放大制备到100-500mg标度从而在筛选步骤中提供最好的结果。此外，使用适用于工业生产的结晶方法。获 得的盐使用^{1}H-NMR、DSC、TGA和FTIR进行完全的表征。该步骤的目的是，首先设计可控程序来制备选择出的具有优化产量的盐，其次对其进行完全的表征。

[0103] 最后，从化合物63起始，以2-3g的标度，制备选择出的具有足够的固态特性(结晶度和热稳定性)的结晶盐。

[0104] 从盐结晶筛选到大规模制备(步骤1-3)

[0105] 首先，以40mg标度，使用表2中的10种平衡离子对化合物63的结晶进行筛选，10种溶剂如下：丙酮、乙酸乙酯、氯仿、N,N-二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇、异丙醇、2-丁醇、乙腈和四氢呋喃。制作步骤以从已知浓度的甲醇溶解制备等摩尔的化合物63和不同的酸平衡离子的混合物开始。甲醇蒸发后，形成的粗产物是从前述的热溶剂中结晶出的。根据各种酸和化合物63混合物的溶解度来使用不同的结晶策略，因此，使用不同的方案来获得固体。对于一些酸，混合物不溶于热结晶溶剂，获得的是膏状固体。在另一些情况中，室温下冷却溶液，固体就会结晶，或在4℃或在-18℃几天后就会形成结晶。最后，在一些结晶的尝试中，室温下缓慢蒸发溶剂后形成固体。在一些情况中，尝试每个结晶中获得不止一种固体。

[0106] 从最初的结晶筛选(表3)，可以得出以下的观测结果：

[0107] -化合物63与延胡索酸和马来酸获得的结晶盐在大部分分析溶剂中都可以获得。对于两种酸平衡离子，可以获得一些包含溶剂的结晶固体。所有的固体对应于等分子的盐。

[0108] -等摩尔的化合物63和柠檬酸混合物在大多数分析溶剂中都是易溶的。因此，大部分固体是在溶剂完全蒸发之后才获得的。此外，获得的固体结晶度低或包含明显量的残留溶剂。低结晶固体最有可能来自去溶剂化的溶剂。

[0109] -等摩尔的化合物63和羟基乙酸混合物在大多数分析溶剂中是易溶的。因此，大部分固体以及一些固体混合物是在溶剂完全蒸发之后 才获得的。

[0110] -化合物63与甲磺酸、L-苹果酸和丙二酸的结晶盐仅在一种或两种高度浓缩的分析溶剂中获得。大部分固体在溶剂完全蒸发完之后获得。

[0111] -化合物63与硫酸、甲烷磺酸和L-酒石酸没有获得结晶固体。碱与酸的混合物在所有分析溶剂中都是易溶的，并且在溶剂完全蒸发后，获得油状物或非结晶固体。

[0112]

表 3. 用 10 种酸平衡离子进行最初结晶筛选的结果

酸平衡离子/溶剂	ACE	AET	CLF	DMF	MOH	EOH	IPH	BUL	ACN	THF
硫酸 (SFT)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状
甲磺酸 (MSF)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状
乙磺酸 (ESF)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	S1	油状
延胡索酸(FMT)	S1 (溶剂化物)	S6 (溶剂化物)	混	油状	S3	S5	S3	S3	S3+S5	混
	S2									
L-苹果酸 (LML)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	S1	油状	S1	油状
马来酸 (MLE)	S1	S1	S2	混	S1	S1	S1	S1	混	S3 (溶剂化物)
丙二酸 (MLO)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	S1	油状	油状	油状
柠檬酸 (CTR)	S1	S1	s2 (溶剂化物)	油状	s3	s3	混	油状	s3	油状
羧乙酸(GLY)	S1	S1+S2	S1+S2	S1	S1	S3 (溶剂化物)	S1+S2	S1+S2	S1	S1+S2
L-酒石酸(LTT)	油状	Non-c	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状

*S：结晶固体； s：低结晶固体；Non-c：无结晶

[0113] 考虑到这些结果，在另外9种溶剂中进行第二轮结晶筛选。选择低极性溶剂(醋酸异丁酯、碳酸二甲酯、氯苯、环己烷、3-戊酮、甲苯、甲基叔丁基醚、二异丙醚)和水从而减少

盐的溶解度(表4)。

[0114] 表4 用9种酸平衡离子进行二次结晶筛选的结果

[0115]

目标盐/溶剂	DIE	MTE	H_2O	AIB	CDM	CLB	CHE	POA	TOL
硫酸 (SFT)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状
乙磺酸(ESF)	油状	S2	油状	S2	油状	油状	油状	油状	S2
甲磺酸(MSF)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	S1
L-马来酸(LML)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	S1	油状
丙二酸 (MLO)	油状	S1	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状
柠檬酸 (CTR)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	S1	油状
羧乙酸 (GLY)	S2	S1+S2	油状	S1+S2	S1	S1	S1+S2	S1	S1+S2
L-酒石酸(LTT)	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状	油状

[0116] 从第二次结晶筛选中,可以得出如下观察结果:

[0117] -虽然等摩尔的化合物63和羟基乙酸混合物不易溶于第二组的溶剂中,但其反应与第一组结晶十分类似。可以获得一些对应于固体混合物的固体。固体1仅在溶剂完全蒸发后才能获得,且不能完全表征。

[0118] -化合物63与L-苹果酸、丙二酸和柠檬酸的结晶盐仅可在一种溶剂中获得,获得已知的固体。

[0119] -化合物63与乙磺酸产生的结晶盐可在几种溶剂中获得,在所有情况下,获得与初始结晶筛选不同的新的固体。

[0120] -对应于化合物63与甲磺酸产生的结晶盐的固体可在甲苯中获得。

[0121] -在第二轮溶剂筛选中没有获得化合物63与硫酸和L-酒石酸的结晶固体。

[0122] 考虑已描述的两次结晶筛选过程的结果,我们对最佳表征的化合物63与延胡索酸、马来酸、甲磺酸、乙磺酸、L-马来酸和丙二酸的非溶剂化盐的制备进行优化。优化的放大试验从100mg化合物63开始。放大方案同样对延胡索酸、马来酸、甲磺酸、乙磺酸、L-马来酸和丙二酸盐进行优化。

[0123] 最终,6种选出的平衡离子的盐的制备放大到2-3g,并被完全表征。本发明的整个过程概括如下表所述。

[0124] 表5.化合物63的结晶盐的结晶过程概述.

[0125]

结晶筛选 硫酸、甲磺酸、乙磺酸、延胡索酸、L-（-）-苹果酸、丙二酸、马来酸、柠檬酸、羟基乙酸、L-（+）-酒石酸	**190 结晶** 40 mg 标度
结晶固体的优化与鉴定 甲磺酸、乙磺酸、延胡索酸、L-（-）-苹果酸、丙二酸、马来酸	**23 结晶** 100-500 mg 标度
选择盐的大规模制备 甲磺酸、乙磺酸、延胡索酸、L-（-）-苹果酸、丙二酸、马来酸	**6 结晶** 2.5 g 标度

[0126] 实施例2:化合物63的延胡索酸盐的制备

[0127] 在最初的筛选过程中在10种不同的溶剂中尝试获得延胡索酸盐的结晶。使用不同的结晶技术:膏剂、冷却饱和溶液或在完全蒸发溶剂之后,在除DMF和氯仿外的其他所有溶剂中获得对应于盐的结晶固体。在氯仿中,回收最初的酸,而在DMF中,盐以橙油形式分离获得。获得两种非溶剂化物的固体,第一种在甲醇、异丙醇和丁醇中获得,第二种只在乙醇中获得。最终,在丙酮、乙酸乙酯和THF中获得溶剂化物,并且在乙腈中产生两种固体的混合物。

[0128] 选择不溶结晶固体(原则上是在筛选过程中获得的任意固体)进行放大实验。最初,在乙腈中尝试进行放大,因为乙腈是呈现结晶产物的溶剂,并且在所述结晶产品中,盐是难溶的。虽然盐类的产率很高(83%),但是对于放大试验来说,此过程不是最优的,因为酸不溶于乙腈并且来自于化合物63的混合物的最终盐析出物为油状物,而延胡索酸为固体,两者都悬浮在 溶剂中。随后尝试在乙醇中结晶从而产生纯的固体S5。非常令人失望的是,在乙醇的放大实验中,产生了低产率的新的结晶差的固体。最终,添加溶于醇(乙醇或异丙醇)中的酸,在乙腈中进行结晶。当延胡索酸溶于乙醇并且在室温下进行添加时获得稍好的结果(表6)。另一方面,4℃下保存悬浮液两天获得混合相(表6,条目4)。

[0129] 表6:化合物63的延胡索酸盐的放大实验

[0130]

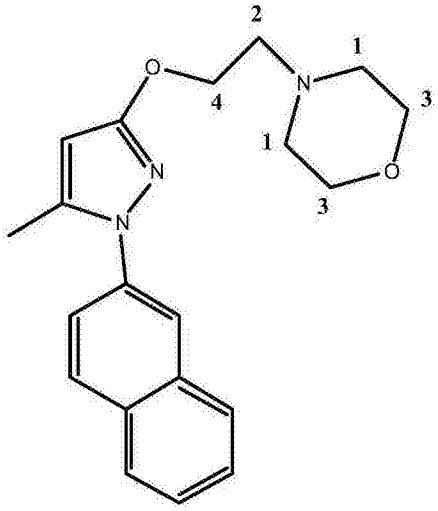
条目	标度[1]	溶剂 1[2]	溶剂 2[3]	T_1 (°C)[4] / T_2 (°C)[5]	产率 (%)[6]
1	200 mg	2 mL ACN	0.8 mL EtOH	70 / 25	49
2	500 mg	5 mL ACN	2 mL EtOH	25 / 25	59
3	200 mg	2 mL ACN	1 mL IPH	25 / 25	55
4	2.5 g	20 mL ACN	10 mL EtOH	25 / 4	58

[0131] 1-)起始例1。2-)溶解化合物63的溶剂。3-)溶解延胡索酸的溶剂;4-)酸和碱混合的温度。5-)获得最终固体的温度。6-)观察所有的实验。

[0132] 用于制备0.5g标度(表6条目2)的延胡索酸盐的实验步骤如下:

[0133] 室温下将2mL乙醇中溶解的延胡索酸(153mg,1.32mmol)溶液缓慢的添加到溶于5mL乙腈的化合物63(456mg,1.35mmol)的溶液中。可以观察到产生的黄色溶液并且在在室温下搅拌15分钟。容易地获得大量的白色固体沉淀物。产生的悬浮液在在室温下搅拌15小时。过滤获得的固体,用1mL乙腈清洗,并在真空环境下(10mm Hg),45℃干燥6小时,从而使延胡索酸盐成为白色固体(350mg,59%)。

[0134] 盐的结构可以很容易地使用^{1}H-NMR光谱进行表征，其与游离碱相比发生了实质上的变化。对于延胡索酸盐，来自靠近碱性氮的氢原子的信号(下述分子式中的氢1和2)清晰地移动到了前场(表7)。能够观察到来自远离氮的氢原子(图C中的氢3和4)的信号的小的移动。另外，来自延胡索酸的信号显示了预期的化学位移(δ:6.72ppm)。对应于阴离子和阳离子的信号积累清楚地证实了形成了等摩尔的盐，而不是二盐(图5)。

[0135] 

[0136] 形成盐之后在^{1}H-NMR光谱中发生移动的氢指示的化合物63的分子式。

[0137] 以10℃/分的热速率的DSC分析显示了一个小的吸热峰，随后有一个小的放热峰和一个强的吸热信号(图6)。强信号出现在142℃，对应于固体S5的熔点。小峰出现在131℃，对应于结晶固体S3的熔点。该峰非常弱，最可能是因为在DSC分析的加热过程中固体S3部分转化成固体S5。因此，对应于剩余的S3的融化的峰离开熔化温度，易于结晶成S5(小的放热峰)。根据具体的样品，基本上纯的固体S3样品的熔融峰有不同的强度。很可能是，根据晶体惯态和结晶大小，S3到S5固-固相转移发生至不同的延展度。因此，纯的S3结晶固体样品将显示如图6所示形状的DSC图。

[0138] 在TG分析中，由于分解作用，可观察到在120和150℃之间发生0.3％的小的重量损失，并且从190℃开始发生大幅的重量损失。

[0139] 延胡索酸盐的特征如下(图5-8)：

[0140] ^{1}H-NMR(400MHz,d4-甲醇)δ:2.35(s,3H),2.92-3.00(m,4H),3.17(t,J＝5Hz,2H),3.80(t,J＝5Hz,4H),4.44(t,J＝5Hz,2H),5.83(s,1H),6.72(s,2H),7.52-7.62(m,3H),7.89-7.96(m,3H),8.00(d,J＝9Hz,1H)。

[0141] ^{1}H-NMR检测残余溶剂:0.2％w/w乙腈。

[0142] FTIR(ATR)υ:3435,3148,3037,2943,2855,1876,1731,1664,1650,1559,1509,1488,1446,1394,1372,1314,1236,1186,1166,1133,1098,1081,1047, 1014,981,932,917,859,816,787,769和748cm^{-1}。

[0143] DSC(10℃/min):两个吸热熔峰发生于131和142℃。

[0144] TGA(10℃/min):120-150℃的0.3％的重量损失。分解过程起始于190℃。

[0145] 实施例3:化合物63的马来酸盐的制备

[0146] 在最初的筛选过程中在10种不同的溶剂中尝试马来酸盐的结晶。盐在所有分析的溶剂中均很是易溶的。观察到溶解度在50至200mg/mL之间，除了在乙酸乙酯中盐具有20mg/

ml的溶解度。在将溶液冷却至室温后的所有的溶剂中，或对于氯仿、甲醇和DMF，在溶剂完全蒸发后，均可获得结晶固体。检测四种不同的固体。在大多数结晶中获得非溶剂化的晶体相。另外，在THF中产生溶剂化物并且在3个实验中获得两种其他的不能被完全表征的固相。

[0147] 考虑到沸点以及结晶所需的溶剂量(66mg/mL)，选择异丙醇进行放大试验和结晶盐的合成。最初尝试冷却马来酸和溶于异丙醇的化合物63的混合物，从60℃至室温，从而获得油状的盐(表7)。该油状物在60℃时再次搅拌几个小时之后结晶。在更稀释的状态下以相似的方法直接获得固体盐。最终，对该过程进行优化，在室温下，在化合物63的异丙醇溶液中添加酸的异丙醇溶液之后，直接产生盐沉淀。

[0148] 表7.化合物63的马来酸盐的放大实验

[0149]

标度[1]	异丙醇体积	添加温度	产率 (%)	观测结果
200 mg	1.5	60 ℃	73	油状的盐分离
200 mg	2.0	70 ℃	77	结晶盐冷却
500 mg	6.0	20-25 ℃	86	-
2.5 g	30.0	20-25 ℃	96	-

[0150] [1]指的是起始实施例1。

[0151] 用于制备2.5g标度的马来酸盐的实验步骤如下：

[0152] 室温下将溶于15ml异丙醇的马来酸溶液(772mg，6.65mmol)缓慢地加入溶于15ml异丙醇的化合物63的溶液(2.26g，6.69mmol)中。很容易地析出大量白色固体沉淀。获得的悬浮液在室温下搅拌2天，然后过滤。获得的固体用异丙醇清洗，并真空干燥(10mm Hg)，45℃下10小时，55℃下6小时，70℃下17小时，从而使马来酸盐成为白色固体(2.82g，96％；^{1}H-NMR分析包含1.1％异丙醇)。

[0153] 马来酸盐的结构可以用^{1}H-NMR光谱很容易地表征(图9)，其以与在延胡索酸盐中已经详细描述过的相同的方式变化。另外，马来酸盐的信号显示预期的6.30ppm的化学位移。对应于阴离子和阳离子的信号积累无疑地证实了形成了等摩尔的盐，而不是二盐。

[0154] DSC分析(图10)，在加热速率为10℃/min条件下，于对应于熔点的139℃显示了强烈的吸热峰(101J/g)。在TGA(图11)中观察到熔点附近有1％的重量损失，可能是由于残留异丙醇的损失。在高于150℃时可观察到清晰的盐分解。

[0155] 马来酸盐的特性如下(图9-12)：

[0156] ^{1}H-NMR(400MHz，d-氯仿)δ:2.35(s，3H)，3.02-3.64(m，6H)，3.99(t，J＝5Hz，4H)，4.61-4.66(m，2H)，5.70(s，1H)，6.30(s，2H)，7.50-7.58(m，3H)，7.79-7.82(m，1H)，7.84-7.95(m，3H)。

[0157] ^{1}H-NMR检测残余溶剂：1.1％w/w异丙醇。

[0158] FTIR(ATR)υ:3043，2853，1707，1619，1599，1557，1487，1445 1374，1357，1340，1302，1237，1163，1135，1096，1041，1022，930，919，861，817，762and750cm^{-1}。

[0159] DSC(10℃/min)：于139℃的吸热融峰。

[0160] TGA(10℃/min)：110-150℃的1.0％的重量损失。分解过程起始于150℃。

[0161] 实施例4：化合物63的甲磺酸盐的制备

[0162] 在最初的用第一组10种溶剂进行的筛选中，甲磺酸盐不能结晶。该盐 易溶于所有

分析的溶剂(>200mg/mL),溶剂完全蒸发后获得油状物。在用第二组9种非极性溶剂中尝试结晶时,在大多数的实验中,或者在溶剂蒸发后,重新获得油状物,或者油状盐没有溶解,仍然获得油状物。然而,对应于盐的结晶固体从分离剩余的油状盐后在-18℃冷却的甲苯溶液中获得。因此,选择甲苯进行该盐的合成的优化以及放大实验。

[0163] 在第一轮放大实验中,甲磺酸直接地添加到化合物63的甲苯溶液中,但是该盐迅速分散变成油状物。室温下该油状物与溶剂共同搅拌几小时后结晶。为了促使固体盐直接结晶,在盐的晶种存在的条件下重复该过程。此外,为了改善盐的颜色,使用之前蒸馏甲磺酸(180℃,1mBar)。

[0164] 用于制备2.5g标度的甲磺酸盐的实验步骤如下:

[0165] 在晶种存在的条件下,室温下将甲磺酸(0.45mL,6.94mmol)缓慢地加入溶于25mL甲苯的化合物63(2.36g,6.98mmol)的溶液中。可以很容易地获得大量白色固体。获得的悬浮液在0℃下搅拌8小时,然后过滤。获得的固体用甲苯洗涤,并真空干燥(10mm Hg),45℃下2天,55℃下6小时,从而使甲磺酸盐成为白色固体(2.85g,98%;^{1}H-NMR检测包含0.6%甲苯)。

[0166] 甲磺酸盐可以使用^{1}H-NMR光谱很容易地进行表征(图13),其以与在延胡索酸盐中已经详细描述过的相同的方式变化。此外,甲磺酸盐的信号显示出2.84ppm的化学位移。

[0167] DSC分析(图14),在加热速率为10℃/min条件下,于对应于熔点的145℃显示了强烈的吸热峰(84J/g)。在TGA(图15)中观察到熔点附近有0.5%的重量损失,可能是由于残留甲苯的损失。在高于250℃可以观察到清晰的盐分解。

[0168] 甲磺酸盐的特征如下(图13-16):

[0169] ^{1}H-NMR(400MHz,d-氯仿)δ:2.36(s,3H),2.84(s,3H),3.03-3.15(m,2H),3.54-3.61(m,2H),3.63-3.71(m,2H),3.97-4.05(m,2H),4.10-4.20(m,2H), 4.71-4.76(m,2H),5.75(s,1H),7.50-7.59(m,3H),7.79-7.82(m,1H),7.84-7.95(m,3H)。

[0170] ^{1}H-NMR检测残余溶剂:0.58%w/w甲苯。

[0171] FTIR(ATR)υ:3018,2957,2920,2865,2693,2627,1634,1602,1562,1509,1485,1435,1392,1376,1265,1221,1164,1131,1098,1049,1033,1007,934,914,862,822,772和759cm^{-1}。

[0172] DSC(10℃/min):于145℃的吸热融峰。

[0173] TGA(10℃/min):120-160℃的0.5%的重量损失。分解过程起始于260℃。

[0174] 实施例5:化合物63的乙磺酸盐的制备

[0175] 在最初的使用第一组10种溶剂的筛选过程中,乙磺酸盐只在乙腈中结晶。但是,由于该盐易溶于所有分析的溶剂中(>200mg/mL),仅在溶剂完全蒸发后才能获得该固体。在其余的实验中,溶剂完全蒸发完后获得油状物。在第二组9种非极性溶剂中尝试结晶时,在与油状盐混合的甲基叔丁基醚,醋酸异丁酯和甲苯中获得三种固体。在这些实验中,油状盐没有完全溶解。选择甲苯进行该盐的合成的优化和放大实验。

[0176] 在最初的乙磺酸盐的放大中,油状盐悬浮在热甲苯中,然后使其冷却。盐没有结晶,仍保持油状。在第二轮尝试中,将乙磺酸缓慢的加入化合物63的甲苯溶液中,冷却时分离获得棕色固体。室温下重复同样的步骤时,油状物与溶剂共同搅拌几天后很容易出现缓慢的结晶。为了促使盐直接结晶,在盐的晶种存在的条件下,室温重复同样的步骤。此外,为

了改善盐的颜色，使用前蒸馏乙磺酸(200℃，1mBar)。

[0177] 用于制备2.5g标度的乙磺酸盐的实验步骤如下：

[0178] 在晶种存在的条件下，室温下，将乙磺酸(0.58mL，6.79mmol)缓慢的加入到溶于40ml甲苯的化合物63(2.29g，6.79mmol)的溶液中。很容易地获得大量白色固体沉淀物。获得的悬浮液在0℃下搅拌12小时，然后过滤。获得的固体使用甲苯清洗并真空干燥(10mm Hg)，45℃下8小时， 55℃下6小时，从而使乙磺酸盐成为白色固体(2.90g，99％)。

[0179] 乙磺酸盐的结构能够由^{1}H-NMR光谱很容易地鉴定(图17)，与起始化合物63相比，乙磺酸盐的结构以在延胡索酸盐中已经详细描述过相同的方式变化。此外，乙磺酸盐的信号显示出1.37和2.93ppm的化学位移。

[0180] DSC分析(图18)，在加热速率为10℃/min条件下，于对应于熔点的133℃显示了强烈的吸热峰(85J/g)。在TGA(图19)中观察到熔点附近有0.3％的重量损失，可能是由于残留甲苯的损失。在高于280℃时可以观察到清晰的盐分解。

[0181] 乙磺酸盐的特性如下(图17-20)：

[0182] ^{1}H-NMR(400MHz，d-氯仿)δ:1.37(t，J＝7Hz，3H)，2.36(s，3H)，2.93(q，J＝7Hz，2H)，3.03-3.15(m，2H)，3.55-3.62(m，2H)，3.64-3.72(m，2H)，3.96-4.04(m，2H)，4.11-4.21(m，2H)，4.71-4.77(m，2H)，5.75(s，1H)，7.50-7.59(m，3H)，7.79-7.83(m，1H)，7.84-7.95(m，3H)。

[0183] ^{1}H-NMR检测残余溶剂:0.35％w/w甲苯。

[0184] FTIR(ATR)υ:3021，2958，2924，2863，2625，2488，1633，1603，1565，1508，1485，1470，1437，1391，1376，1353，1334，1265，1242，1210，1160，1149，1131，1098，1027，1008，978，934，916，856，819，776，and 739cm^{-1}。

[0185] DSC(10℃/min)：于133℃的吸热融峰。

[0186] TGA(10℃/min)：110-160℃的0.3％的重量损失。分解过程起始于280℃。

[0187] 实施例6：化合物63的苹果酸盐的制备

[0188] 在最初的使用第一组10种溶剂的筛选过程中，苹果酸盐在乙腈和异丙醇中发生结晶。然而，该盐在这两种溶剂中都是易溶的(>200mg/mL)，并且两种固体仅在完全蒸发后才能获得。在其余的实验中，溶剂完全蒸发后产生油状物质。在第二组9种非极性溶剂中进行结晶尝试时，虽然盐难溶，但仅在3-戊酮中获得结晶固体。其它实验获得油状物。考虑到这些结果，选择3-戊酮进行该盐的合成的优化和放大实验。

[0189] 盐制备的最初的放大实验在50至70℃将3-戊酮中溶解的L-苹果酸溶液添加到同样溶于3-戊酮的化合物63的溶液中。使用该步骤在冷却时分离的盐有时会成为油状物。在与溶剂共同在50℃下搅拌几小时后该油状物很容易结晶。结晶盐的直接产生可以将通过晶种诱导，其在如下用于制备2.5g标度的苹果酸盐的步骤中进行了描述：

[0190] 在晶种存在的条件下，在50℃温度下，将溶于10mL 3-戊酮的L-苹果酸(933mg，6.95mmol)缓慢的添加至溶于10ml的3-戊酮的化合物63(2.35g，6.95mmol)的溶液中。很容易获得大量白色固体沉淀物，获得的悬浮液用另外10mL的3-戊酮进行稀释，缓慢冷却至室温，搅拌12小时，并过滤。获得的固体用3-戊酮清洗，并在真空干燥(10mm Hg)，45℃下15小时，55℃下6小时，从而使苹果酸盐成为白色固体(3.03g，95％)。

[0191] 苹果酸盐的组成可以由^{1}H-NMR光谱很容易地推断(图21)，其与起始化合物63相比

发生了显著的变化，与在延胡索酸盐中已经详细描述的方法相同。此外，苹果酸盐的信号显示出2.59、2.79和4.31ppm的化学位移。

[0192] DSC分析(图22)，在加热速率为10℃/min条件下，于对应于熔点的125℃观察到强烈的吸热峰(119J/g)。此外，在TGA分析(图23)中观察到在熔点以下时不显示任何重量损失，表明没有挥发。残留溶剂的缺失同样可以由^{1}H-NMR光谱证实。

[0193] 苹果酸盐的特征如下(图21-24)：

[0194] ^{1}H-NMR(400MHz,d4-甲醇)δ:2.35(s,3H),2.59(dd,J^{1}=16Hz,J^{2}=7Hz,1H),2.79(dd,J^{1}=16Hz,J^{3}=5Hz,1H),2.89-2.97(m,4H),3.13(t,J=5Hz,2H),3.80(t,J=5Hz,4H),4.39(dd,J^{2}=7Hz,J^{3}=5Hz,1H),4.43(t,J=5Hz,2H),5.83(s,1H),7.52-7.61(m,3H),7.89-7.96(m,3H),8.00(d,J=9Hz,1H)。

[0195] FTIR(ATR)υ:3171,3003,2874,1718,1597,1556,1487,1468,1440,1360,1268,1142,1126,1097,1050,1022,1010,986,950,920,902,863,822,797,770,746和742cm^{-1}。

[0196] DSC(10℃/min)：于125℃的吸热融峰。

[0197] TGA(10℃/min)：由于分解作用起始于150℃的重量损失。

[0198] 实施例7：化合物63的丙二酸盐的制备

[0199] 在最初的使用第一组10种溶剂进行筛选的过程中，丙二酸盐仅在异丙醇中结晶。然而，该盐易溶于该溶剂(>200mg/mL)，其预示了在放大实验中存在的问题。因此，尝试在第二组非极性溶剂中进行结晶。在第二组实验中，仅从甲基叔丁基醚中获得结晶固体，其通过在高温下分离大量的油状盐后将饱和溶液冷却至-18℃获得。

[0200] 考虑到这些结果，丙二酸盐的放大实验最初在异丙醇中进行第一次尝试。非常令人失望的是，酸和化合物63混合后马上发生了油状物分离。油状物与溶剂共同搅拌几个小时后结晶产率很低。当油状物析出后的结晶过程中添加甲基叔丁基醚时可以提高产率。为了避免产生最初油状的盐并提高产率，对结晶过程进行改进。将溶于异丙醇的丙二酸溶液添加到溶于甲基叔丁基醚的化合物63的溶液中。使用该方案，盐直接产生为固体，但仍可观察到一些游离的油析。最后，盐的直接并完全的结晶可以通过晶种获得，如以下步骤所述：

[0201] 0℃下，溶于10ml异丙醇的丙二酸(736mg,7.07mmol)溶液缓慢地加入溶于15ml具有晶种的甲基叔丁基醚的化合物63(2.38g,7.06mmol)溶液中。很容易获得大量白色固体沉淀物。获得的悬浮液首先在室温下搅拌12小时，随后在0℃下搅拌2小时，然后过滤。获得的固体用甲基叔丁基醚清洗，并真空干燥(10mm Hg)，45℃下7小时，55℃小6小时，从而使丙二酸盐成为白色固体(2.42g,80％)。

[0202] 丙二酸盐的结构可以由^{1}H-NMR光谱很容易地推断(图25)，与起始化合物63相比，其以在延胡索酸盐中进行了详细描述的相同的方式变化，。此外，丙二酸盐的信号显示出3.23ppm的化学位移。

[0203] DSC分析(图26)，在加热速率为10℃/min条件下，于对应于熔点的 90℃观察到强烈的吸热峰(85J/g)。在TGA分析(图27)中，在低于熔点时，未观察到重量损失。然而，残留溶剂(0.2％w/w异丙醇和0.2％甲基叔丁基醚)可以通过^{1}H-NMR光谱检测。

[0204] 丙二酸盐的特征如下(图25-28)：

[0205] ^{1}H-NMR(400MHz,d-氯仿)δ:2.35(s,3H),3.10-3.40(m,4H),3.23(s,2H),3.40-3.46(m,2H),3.97(t,J=5Hz,4H),4.59-4.64(m,2H),5.70(s,1H),7.49-7.58(m,3H),7.79-

7.82(m,1H),7.84-7.95(m,3H)。

[0206] ^{1}H-NMR检测残余溶剂:0.2%w/w异丙醇和0.2%甲基叔丁基醚。

[0207] FTIR(ATR)υ:3148,3027,2942,2857,1718,1621,1599,1561,1488,1443,1374,1343,1308,1260,1165,1135,1097,1080,1046,1022,1011,932,918,863,819和752cm^{-1}。

[0208] DSC(10℃/min):于90℃的吸热融峰。

[0209] TGA(10℃/min):由于分解作用起始于100℃的重量损失。

[0210] 盐结晶筛选总结

[0211] 尝试用化合物63与硫酸和L-酒石酸形成的盐结晶是不成功的,只能获得油状物质。

[0212] 其它的盐,虽然是固态,但与盐酸盐合成的实验部分比较只能通过复杂的合成过程获得,或是在特定的实验条件下才能获得。另外,经常获得非晶体固体,而不是使用盐酸盐时获得的晶体形式。这些弊端暗示了相关的合成过程的放大实验室很复杂的。

[0213] 在下面表8中总结了本发明涉及的大规模的每种固体盐的制备的关键数据:结晶度的等级、结晶溶剂、产率和熔点。

[0214] 表8

[0215]

盐	结晶度	溶剂/产率	熔点
盐酸盐	结晶	异丙醇/63%*	194℃
延胡索酸盐	结晶	乙醇 /乙腈 59 %	131 ℃

[0216]

马来酸盐	结晶	异丙醇 / 96 %	139 ℃
甲磺酸盐	结晶	甲苯 / 98 %	145 ℃
乙磺酸盐	结晶	甲苯/ 99 %	133 ℃
苹果酸盐	结晶	3-戊酮 / 95 %	125 ℃
丙二酸盐	结晶	异丙醇 /甲基叔丁基醚 80 %	90 ℃

[0217] (*)制得两种结晶(参见实施例1)

[0218] 由上表可以观察到,盐酸盐总能获得结晶固体,并且产率很好(包含结晶),并且在其它的盐中具有高于50℃的熔点,其清楚地暗示了与物理稳定性相关的优点。此外,在比较TGA分析时,盐酸盐有着清晰的曲线,并且没有检测到溶剂损失。

[0219] 另外,进行实施例1(p027)的一些附加的实验(热力学溶解度,药物代谢动力学)用于确认该化合物对于药物用途的适性。

[0220] 实施例8:热力学溶解度

[0221] pH 7.4和pH 2时热力学溶解度的一般方案如下所述:

[0222] A)pH 7.4的热力学溶解度

[0223] 缓冲液pH 7.4(50mM)

[0224] pH7.4的磷酸盐缓冲液如下制备：

[0225] -制备25mM的$Na_2HPO_4.12H_2O$溶液(对于1L水，称重8.96g，)

[0226] -制备25mM的KH_2PO_4(对于1L水，称重3.4g)。

[0227] -812ml磷酸二钠溶液与182ml磷酸钾溶液混合，检验pH为7.4。

[0228] 样品平衡

[0229] 样品平衡使用：

[0230] -Eppendorf的搅拌恒温混匀器：25℃1250rpm

[0231] -有pH复合电极的酸度计

[0232] 方案

[0233] 问题化合物

[0234] 在HPLC小瓶中装2mg(一式两份)进行称重，加入1ml缓冲液。小瓶在搅拌恒温混匀器中维持在25℃，持续24小时。然后4000rpm离心15分钟。

[0235] 使用玻璃移液管收集获得的上层，并转移到HPLC瓶中。再次离心，将注射器设置在2.7mm高度。

[0236] 标准样品(一式两份)

[0237] 溶液A：5ml甲醇中2mg(400ug/ml)

[0238] 溶液B：用甲醇将1ml溶液A稀释到10ml(40ug/ml)

[0239] 溶液C：用甲醇将5ml溶液B稀释到50ml(4ug/ml)

[0240] 溶液D：用甲醇将4ml溶液C稀释到10ml(1.6ug/ml)

[0241] 溶液E：用甲醇将5ml溶液D稀释到25ml(0.32ug/ml)

[0242] 注入10μl所有制备的溶液，以更稀释的标准品起始。同样注入空白，来检测是否有污染。

[0243] 绘制了标准校准曲线(参见图29)。Y＝面积y X＝μg注射标准品

[0244] 注入10μl问题化合物溶液，一式两份，并插入在标准曲线(参见表9、10、11以及下述实施例)的平均峰面积(如果可以计量)

[0245] 色谱条件

[0246] -柱体：XBridge C18(或类似的)2.5μm 4.6×50mm

[0247] -温度：35℃

[0248] -流动相：ACN/碳酸氢铵10mM。

[0249] -梯度：0-3.5分钟：从15％ACN到95％ACN

[0250] 3.5-5分钟：95％ACN

[0251] 5-6分钟：95a 15％ACN

[0252] 6-8分钟：15％ACN

[0253] -流速：1.5ml/min

[0254] -检测：在紫外线最大吸收值附近

[0255] B)pH 2的热力学溶解度

[0256] 之前的过程用0.01N HCl完成。

[0257] 实施例1的热力学溶解度

[0258] 根据描述的过程，获得227μg/ml(pH＝7.4)。参见图29的相关图示。

[0259] 表9

[0260] 校准

[0261] 峰:样本

[0262]

样品名称	获得日期	瓶	RT (min)	体积(μl)	检测	Dil.	X值	面积	Res Id	Cal Id	S.重量	高度(μV)
实施例 1 Pat.(50μg/ml) 1	22/07/2010 17:09:51	3	16.1	5	PDA 260.0 nm	100.00	250.000	1235989	40781	40782	5000.000	225760
实施例 1 Pat.(50μg/ml) 1	22/07/2010 17:40:38	3	16.1	5	PDA 260.0nm	100.00	250.000	1237942	40785	40782	5000.000	226564
实施例 1 Pat.(250μg/ml) 1	22/07/2010 18:11:31	4	16.1	5	PDA 260.0nm	20.00	1250.000	6158085	40787	40782	5000.000	1132809
实施例 1 Pat.(250μg/ml) 1	22/07/2010 18:42:21	4	16.1	5	PDA 260.0nm	20.00	1250.000	6135000	40789	40782	5000.000	1129396
实施例 1 Pat.(500μg/ml) 1	22/07/2010 19:13:10	5	16.1	5	PDA 260.0nm	10.00	2500.000	11826040	40791	40782	5000.000	2158910
例 1 Pat.(500μg/ml) 1	22/07/2010 19:44:00	5	16.1	5	PDA 260.0nm	10.00	2500.000	11849583	40793	40782	5000.000	2168579

[0263] 表10

[0264] 样品

[0265] 样本:pH7.4

[0266]

	样品	样本	瓶	RT	获得日期	稀释度	注射体积(μl)	检测	面积	高度
1	实施例 1 PROB 1	pH7.4	13	16.1	23/07/2010 14:30:00	1.00	5	PDA 260.0nm	5520635	1006234
2	实施例 1 PROB 1	pH7.4	13	16.1	23/07/2010 15:00:50	1.00	5	PDA 260.0nm	5527190	1002480
3	实施例 1 PROB 2	pH7.4	14	16.1	23/07/2010 15:31:42	1.00	5	PDA 260.0nm	5433650	992252
4	实施例 1 PROB 2	pH7.4	14	16.1	23/07/2010 16:02:29	1.00	5	PDA 260.0nm	5438948	988427
平均值										
RSD%										

[0267] 表11

[0268] 样品

[0269] 样本:pH7.4

[0270]

	浓度	单位	Res Id	Cal Id	样品重量

1	229.0	μg/ml	40794	40782	1.00
2	229.3	μg/ml	40795	40782	1.00
3	225.3	μg/ml	40796	40782	1.00
4	225.5	μg/ml	40797	40782	1.00
平均值					
RSD%					

[0271] 实施例9:药物代谢动力学参数Cmax和AUC

[0272] 检测在Wistar Hannover大鼠中单次口服施用25mg/kg的实施例1(化合物63)的药物代谢动力学。为此,在不同的时间点收集血浆样品,并使用带有荧光检测的HPLC(高压液相色谱法)进行分析。

[0273] 样品获得

[0274] 该实验中使用两组。组1接受赋形剂,组2接受25mg/kg的实施例1,给药体积为10mL/kg。

[0275] 在以下时间点从眼部后区取出血样:给药前,15分钟、30分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、8小时和24小时。血液随后转移到包含肝素的塑料管中。4℃下约3000rpm离心10分钟获得血浆。将这些血浆样品进行标记并在约-65℃冻存直到进行分析。

[0276] 样品分析

[0277] 使用之前确定的分析方法对样品进行分析。简言之,大鼠血浆样品在室温下解冻,并在约4℃下,以3000rpm离心10分钟。将300μl血浆样品放入小瓶中,并用30μl内标工作溶液封闭。将小瓶加盖并完全混合。

[0278] 以下固相提取法用于提取实施例1。

[0279] 1.柱体用甲醇活化1分钟,以1.5ml/min。

[0280] 2.柱体用水活化2分钟,以1.5ml/min。

[0281] 3.装有水的柱体中装载样品(80μl)1.5分钟,以1.0ml/min。

[0282] 4.用水/ACN(90/10,v/v)冲洗30s,以1.5ml/min。

[0283] 5.用流动相洗脱样品1分钟,以0.5ml/min。

[0284] 6.用水和甲醇清洗柱体和毛细管。

[0285] 室温下,样品随后进行色谱分析,使用20mM pH为3的磷酸钾和乙腈(70-73%)A和(30-27%)B(v/v)的混合物作为流动相。使用的流速为0.5ml/min,分析时间在17分钟左右。

[0286] 对应于实施例1的峰值以及其内标通过荧光检测在260nm的激发波长和360nm的发射波长进行定量。其余的参数为:响应时间:>0.2分钟(4s标准)和PMT增益8。

[0287] 药物代谢动力学参数

[0288] 药物代谢动力学参数从平均血浆水平曲线中获得,通过使用软件程序WinNonlin专业版5.0.1进行非间隔动力学来获得。

[0289] 顶点血浆浓度值(C_{max})和达到所述浓度的时间(t_{max})可以直接从实验数据中获得。消除常数(k_{el})由曲线的最后阶段的线性回归计算(浓度比时间的log值)。消除半衰期($t_{1/2}$)由表达式$t_{1/2}=0.693/k_{el}$确定。通过梯形法计算低于曲线的血浆水平的面积与从0到最后确定的时间的比值(AUC_{0-t})。计算低于曲线的血浆水平的面积与从0到无穷大的时间的比值

($AUC_{0-\infty}$)，使用表达式$AUC_{0-\infty}=AUC_{0-t}+C_{last}/k_{el}$，其中$C_{last}$指的是最后一次测量的血浆浓度。

[0290] 实施例1的药物代谢动力学参数Cmax和AUC

[0291] 根据描述的方案得到Cmax：1152.8ng/ml，AUC_{0-t}：1218.4ng.h/ml以及$AUC_{0-\infty}$：1249.6ng.h/ml。参见图30所示的相关图示。

[0292] 在最后两个测试中(溶解度和药物代谢动力学)获得的结果证实盐酸盐对于化合物63的相关制剂和临床研究来说是更优的盐。

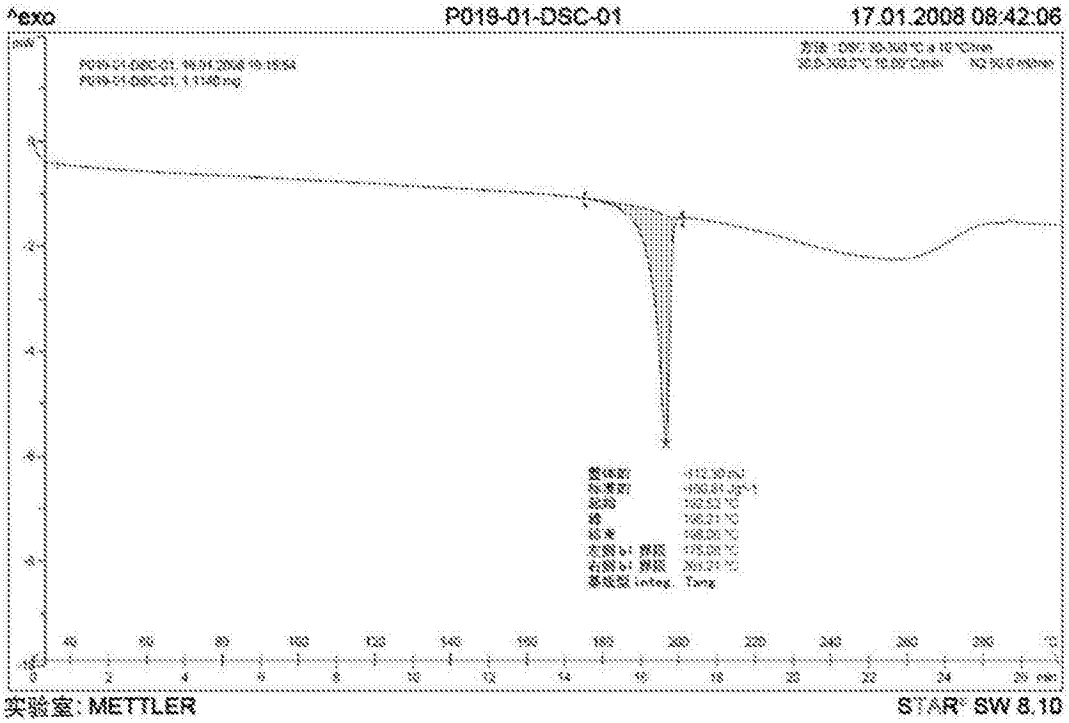

^exo
P019-01-DSC-01
17.01.2008 08:42:06
实验室: METTLER
STAR° SW 8.10

图1

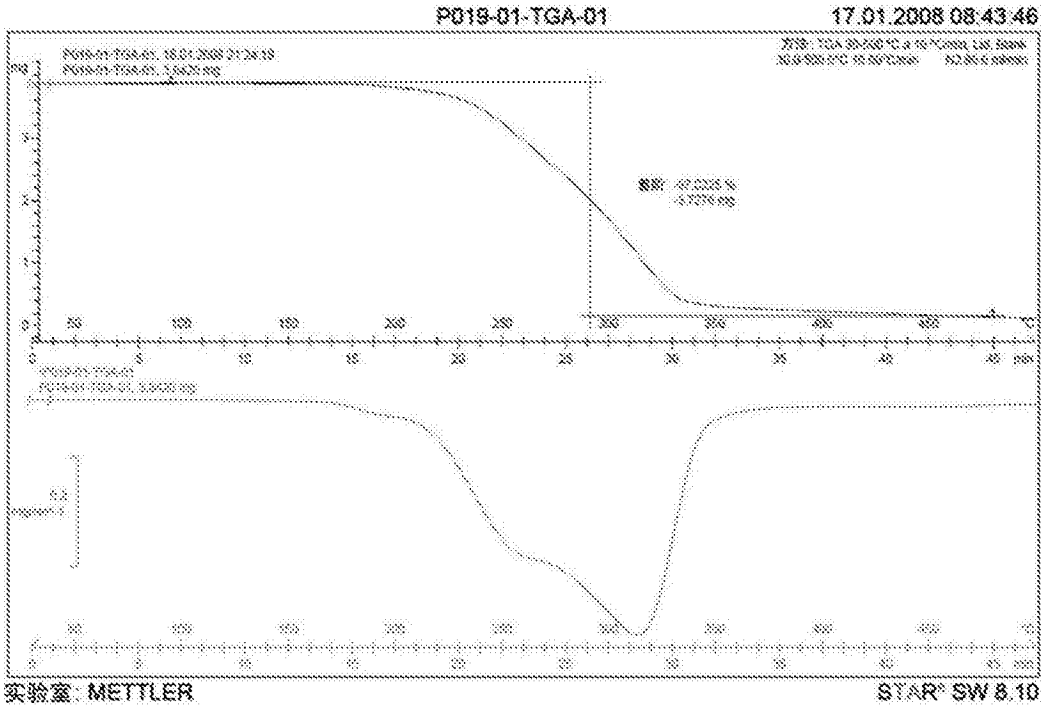

P019-01-TGA-01
17.01.2008 08:43:46
实验室: METTLER
STAR° SW 8.10

图2

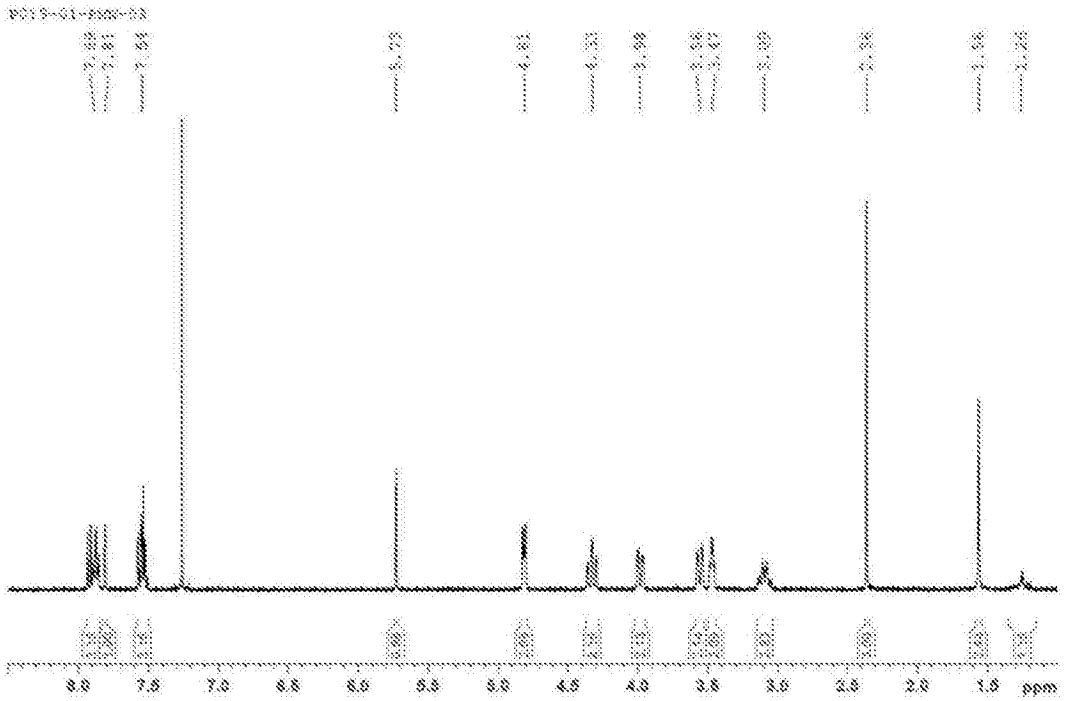


图3

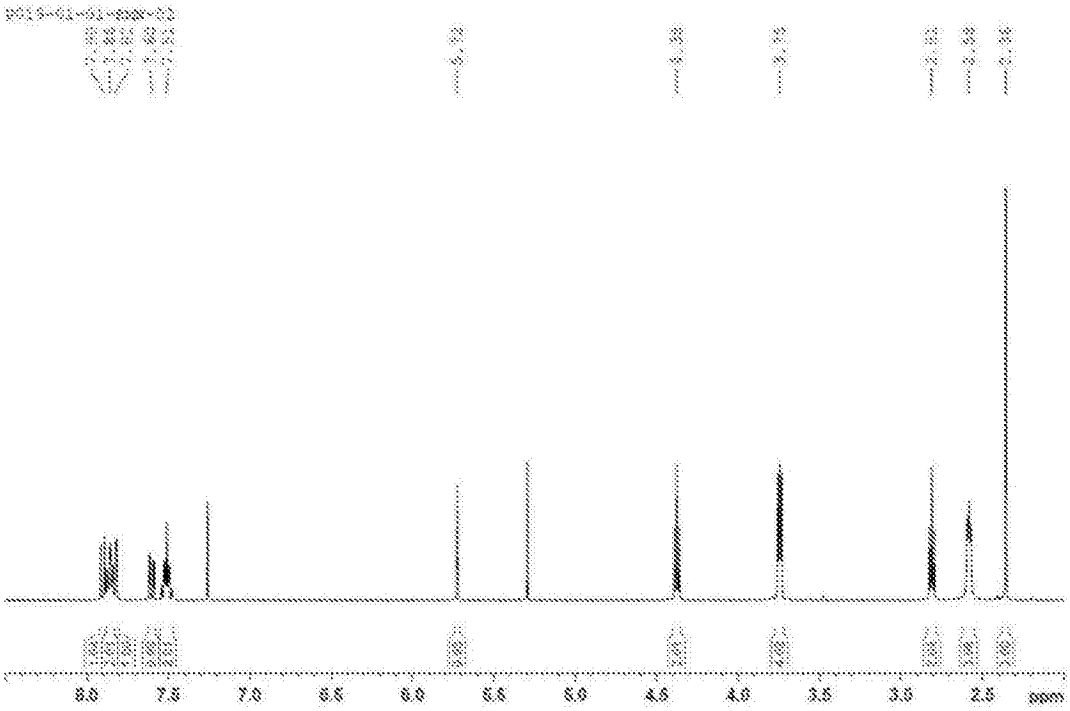


图4

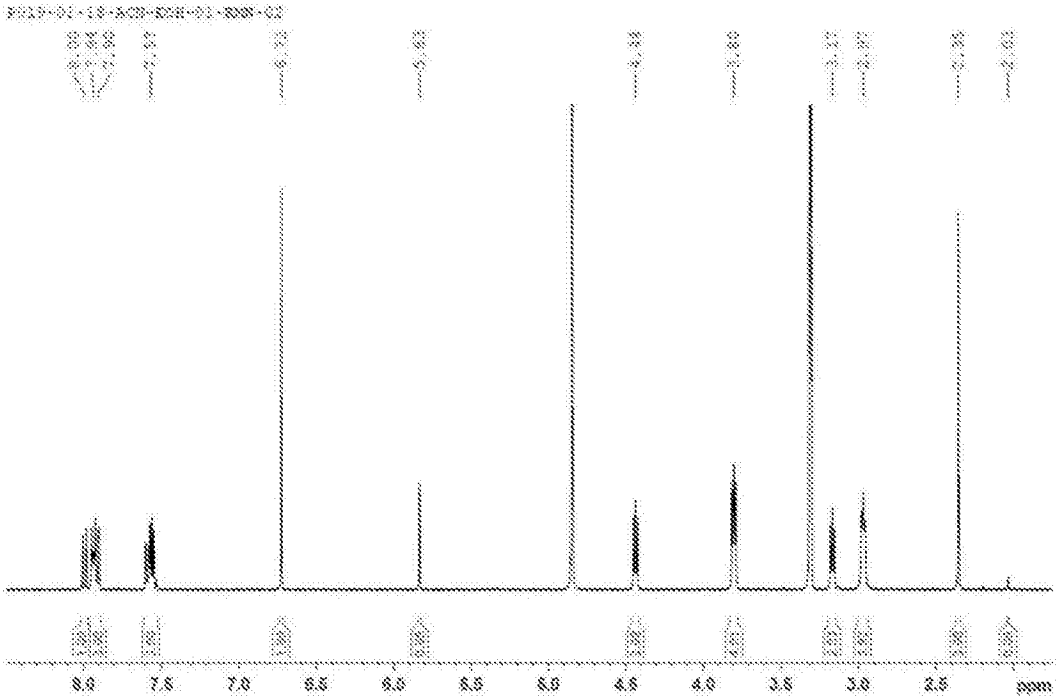


图5

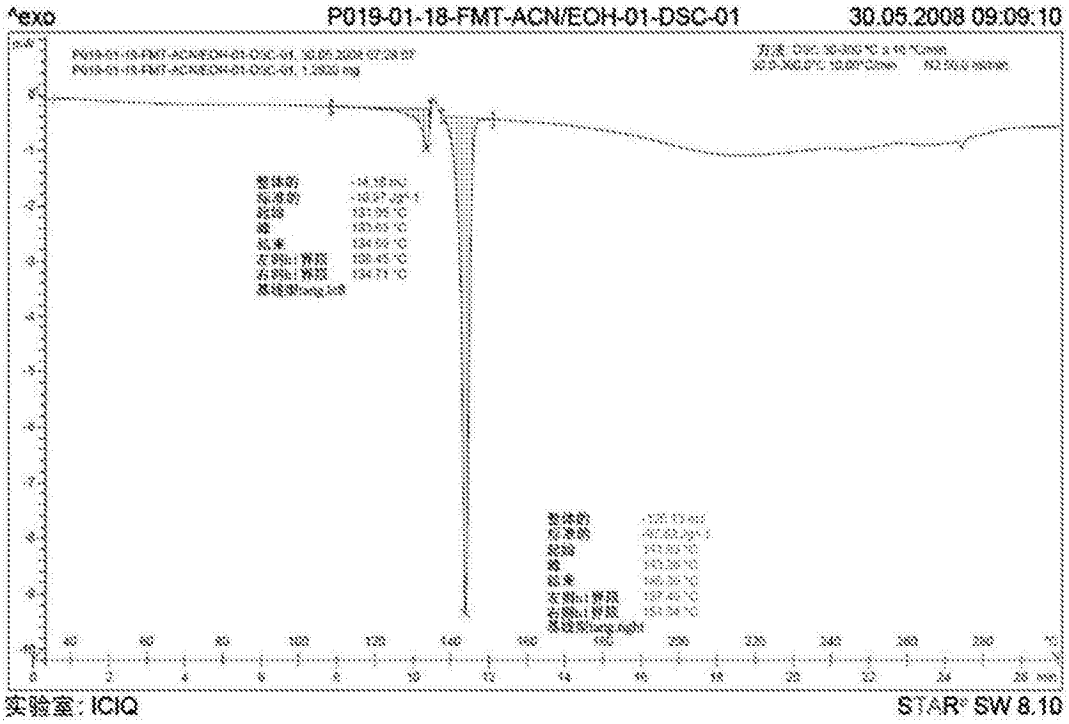

^exo
P019-01-18-FMT-ACN/EOH-01-DSC-01
30.05.2008 09:09:10
实验室: ICIQ
STAR^e SW 8.10

图6

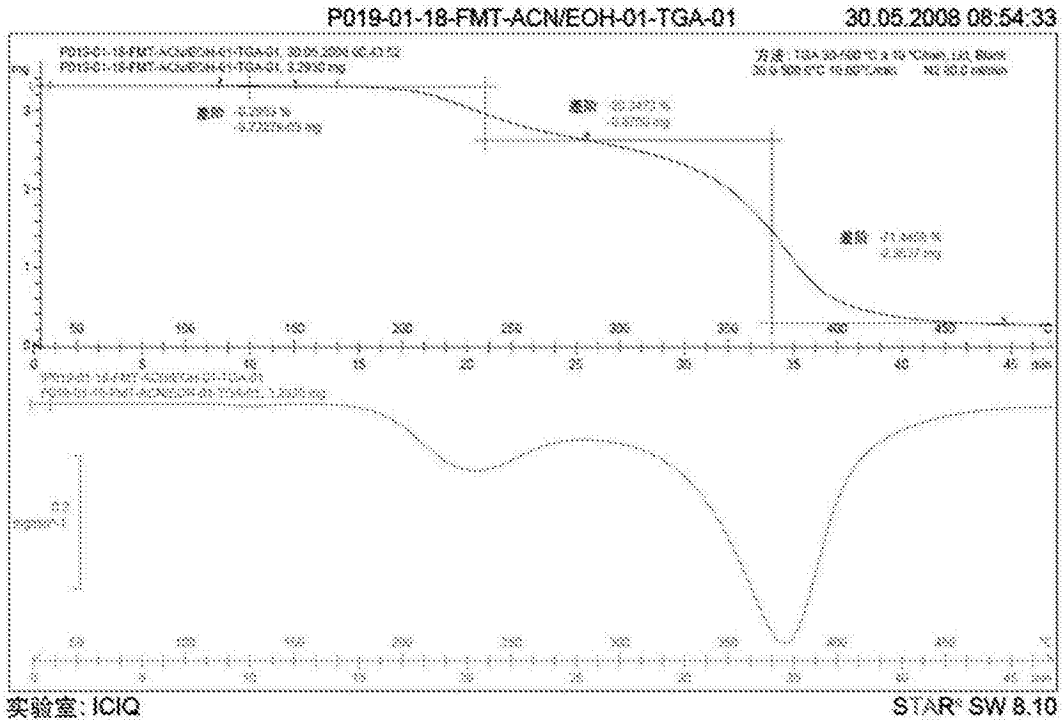

P019-01-18-FMT-ACN/EOH-01-TGA-01
30.05.2008 08:54:33
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图7

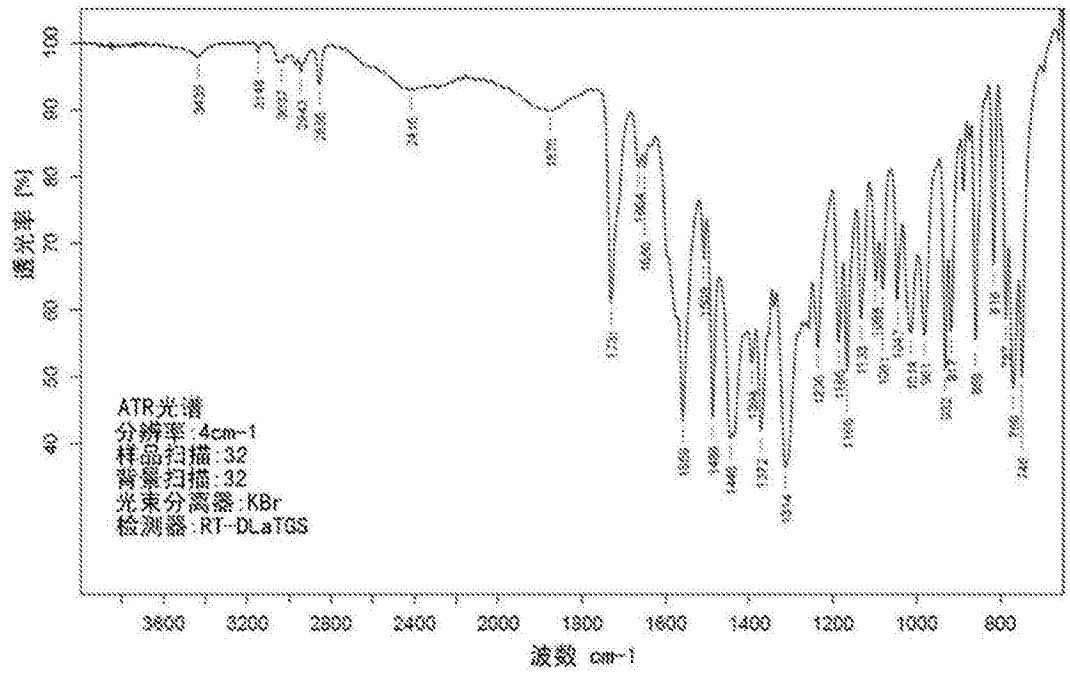

ATR光谱
分辨率 : 4cm-1
样品扫描 : 32
背景扫描 : 32
光束分离器 : KBr
检测器 : RT-DLaTGS
波数 cm-1

图8

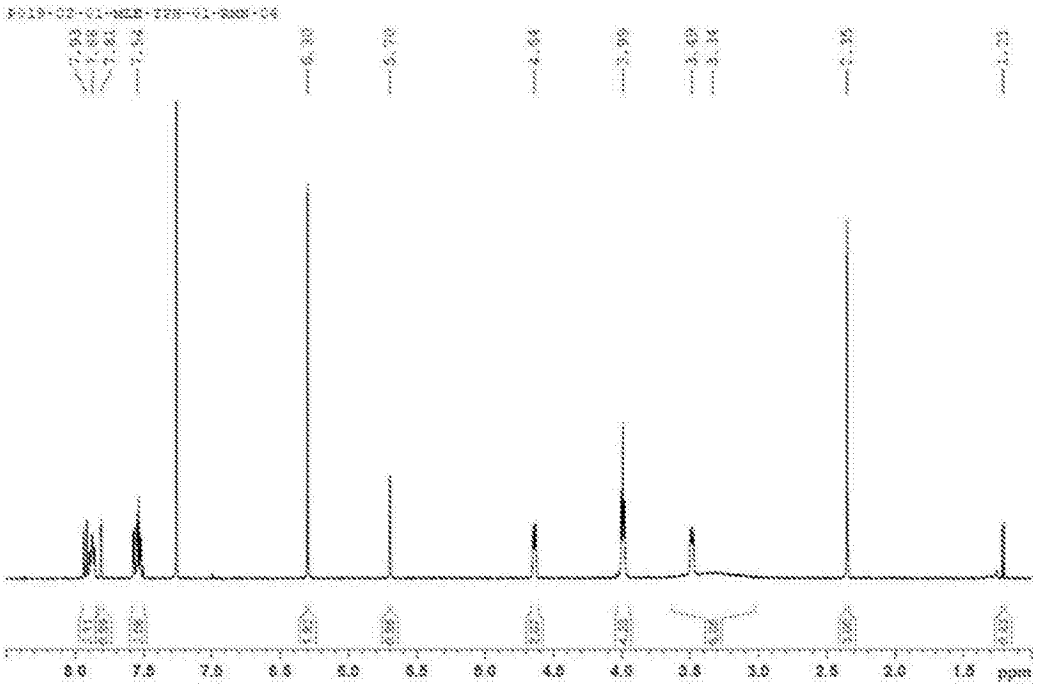


图9

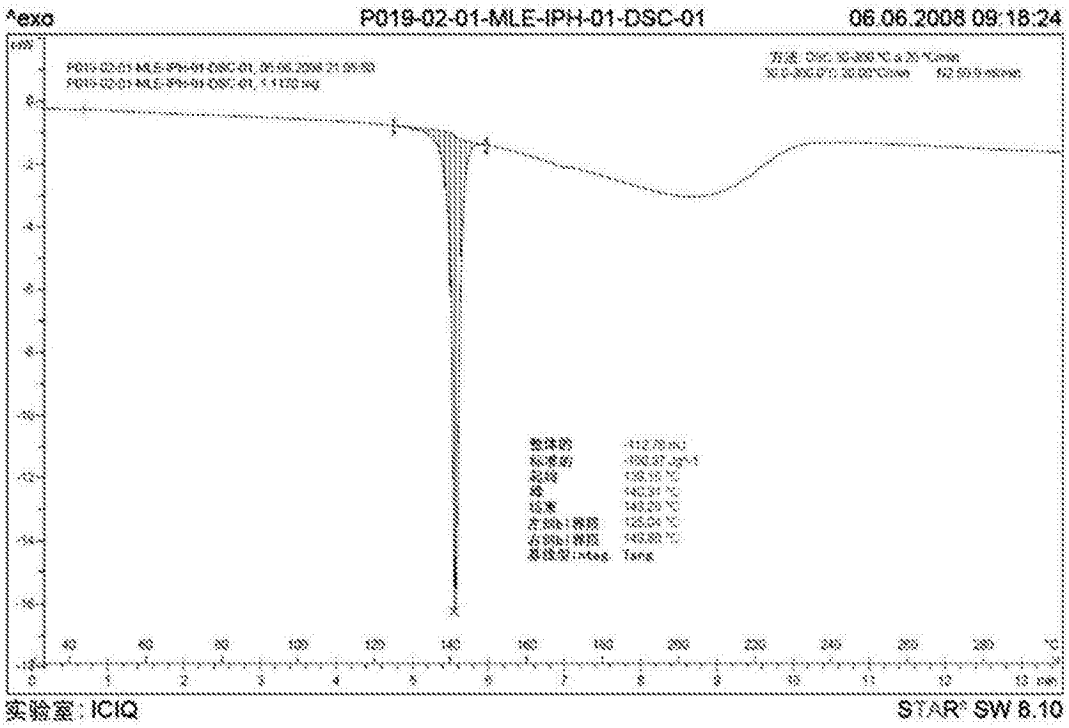

^exo
P019-02-01-MLE-IPH-01-DSC-01
06.06.2008 09:18:24
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图10

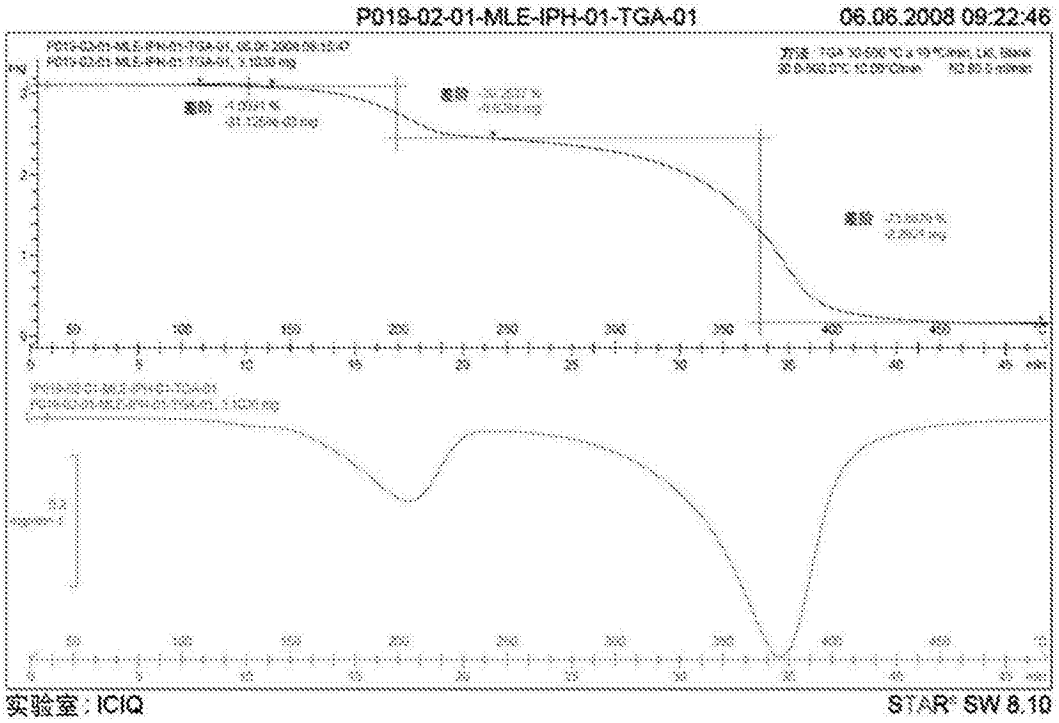

P019-02-01-MLE-IPH-01-TGA-01
06.06.2008 09:22:46
实验室 : ICIQ
STAR° SW 8.10

图11

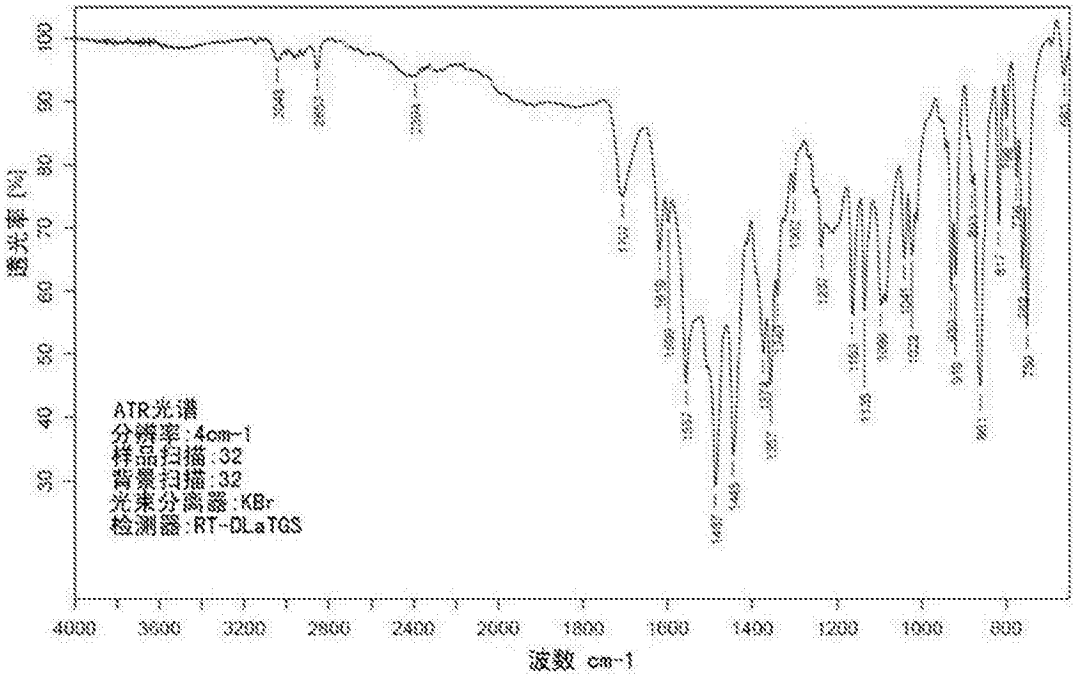

ATR光谱
分辨率 : 4cm-1
样品扫描 : 32
背景扫描 : 32
光束分离器 : KBr
检测器 : RT-DLaTGS
波数 cm-1

图12

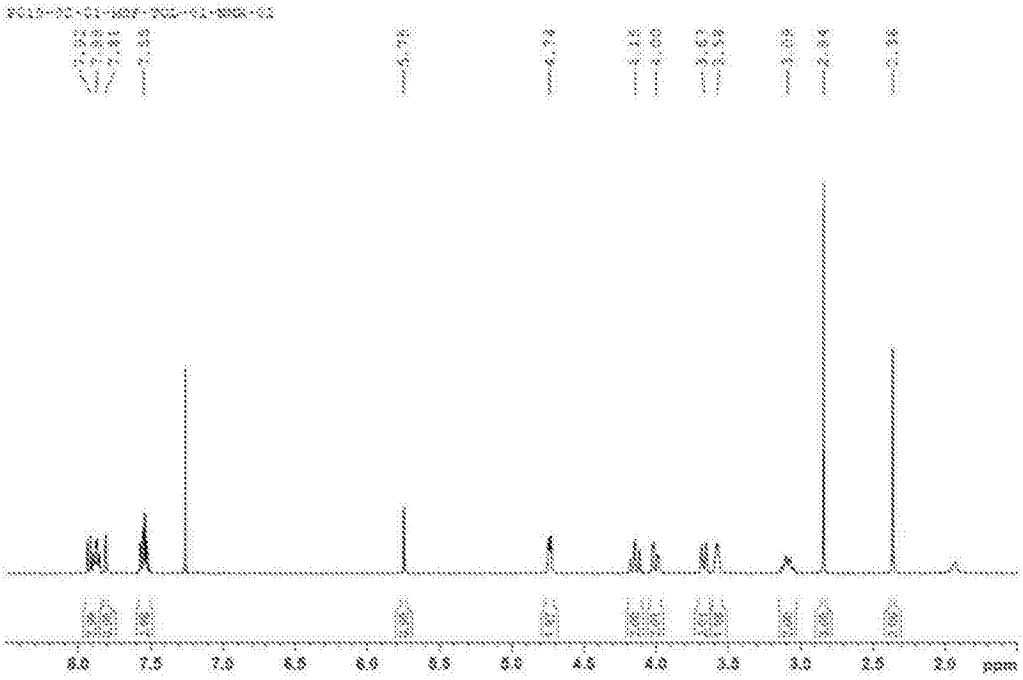

8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
ppm

图13

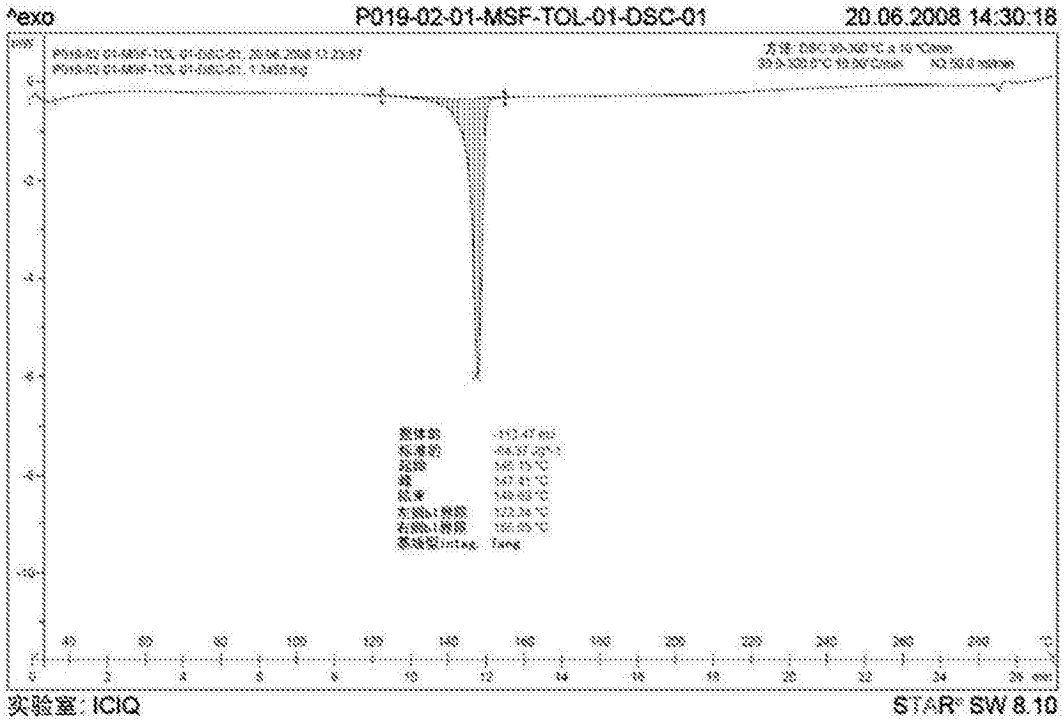

^exo
P019-02-01-MSF-TOL-01-DSC-01
20.06.2008 14:30:18
实验室: ICIQ
STARe SW 8.10

图14

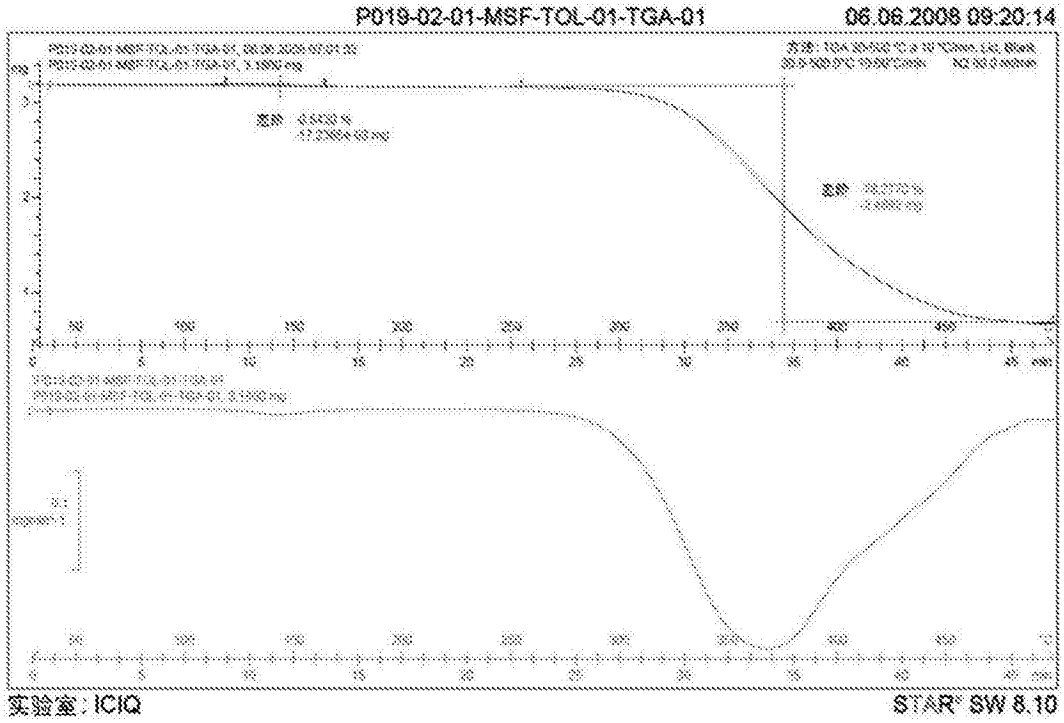

P019-02-01-MSF-TQL-01-TGA-01
06.06.2008 09:20:14
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图15

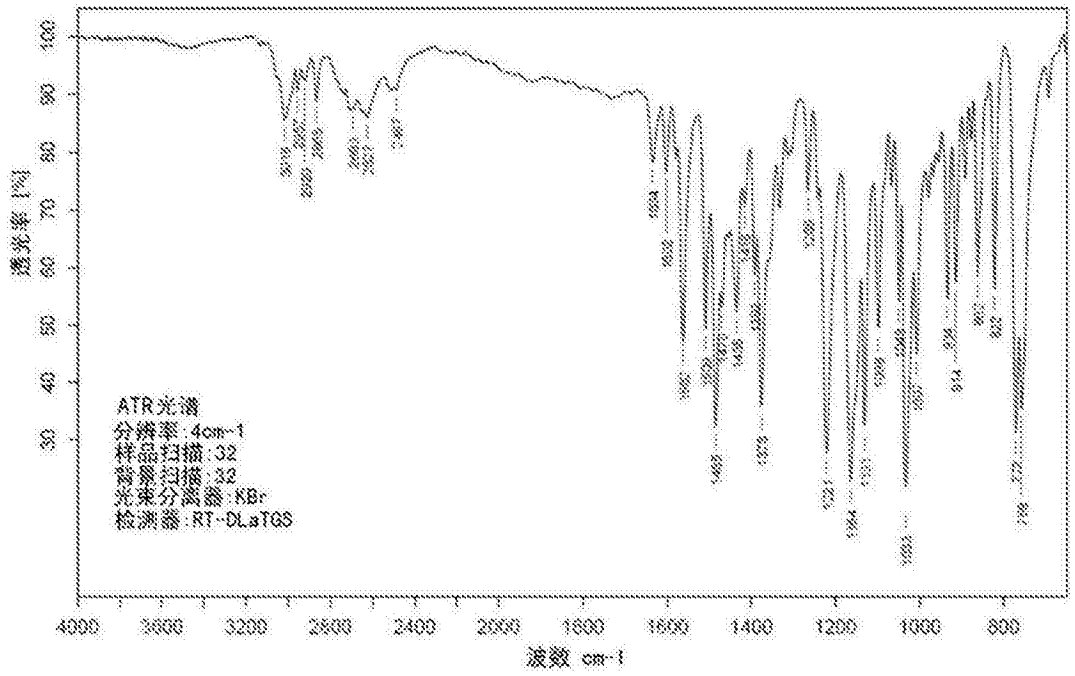

ATR光谱
分辨率 :4cm-1
样品扫描 :32
背景扫描 :32
光束分离器 :KBr
检测器 :RT-DLaTGS
波数 cm-1

图16

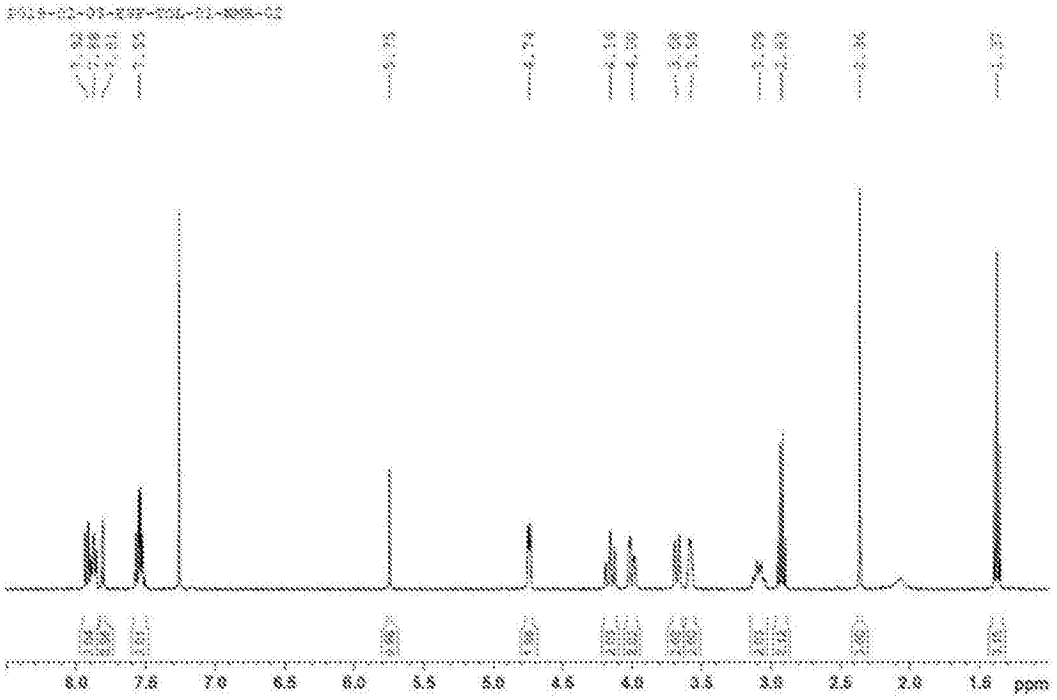

8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm

图17

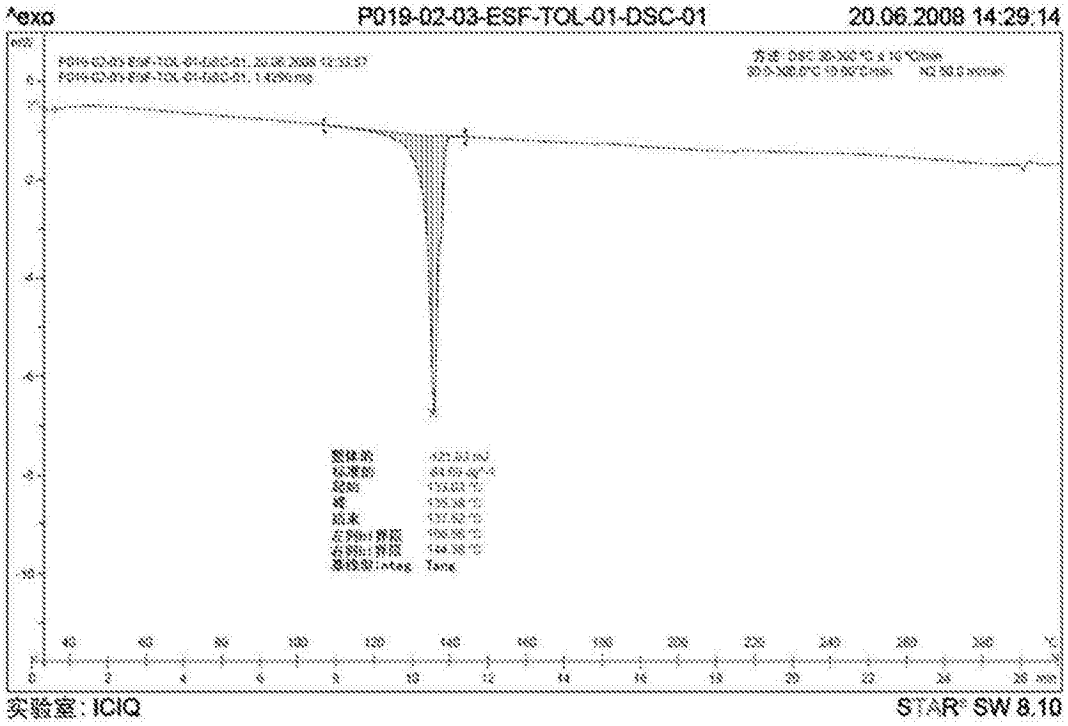

^exo
P019-02-03-ESF-TQL-01-DSC-01
20.06.2008 14:29:14
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图18

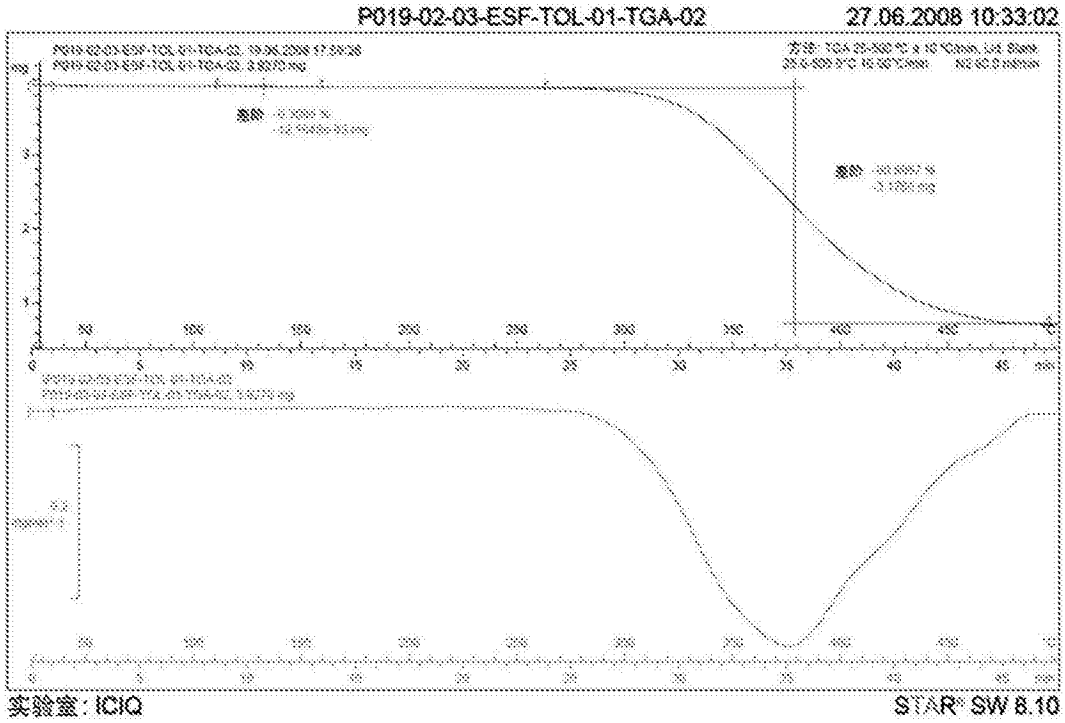

P019-02-03-ESF-TOL-01-TGA-02
27.06.2008 10:33:02
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图19

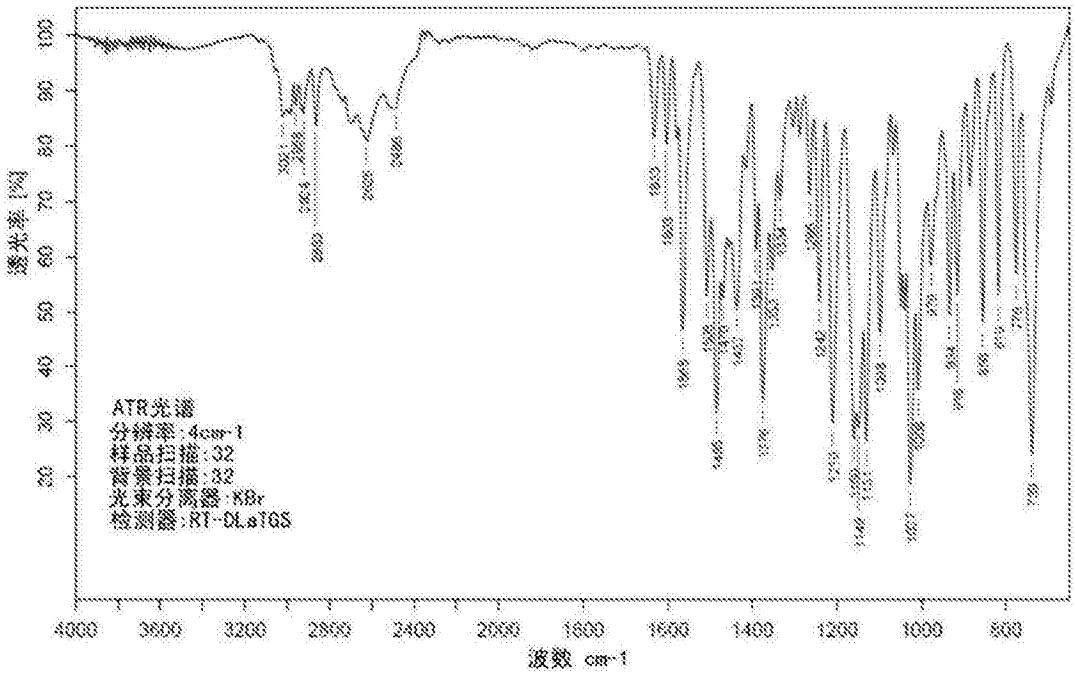

ATR光谱
分辨率:4cm-1
样品扫描:32
背景扫描:32
光束分离器:KBr
检测器:RT-DLaTGS
透光率 [%]
波数 cm-1

图20

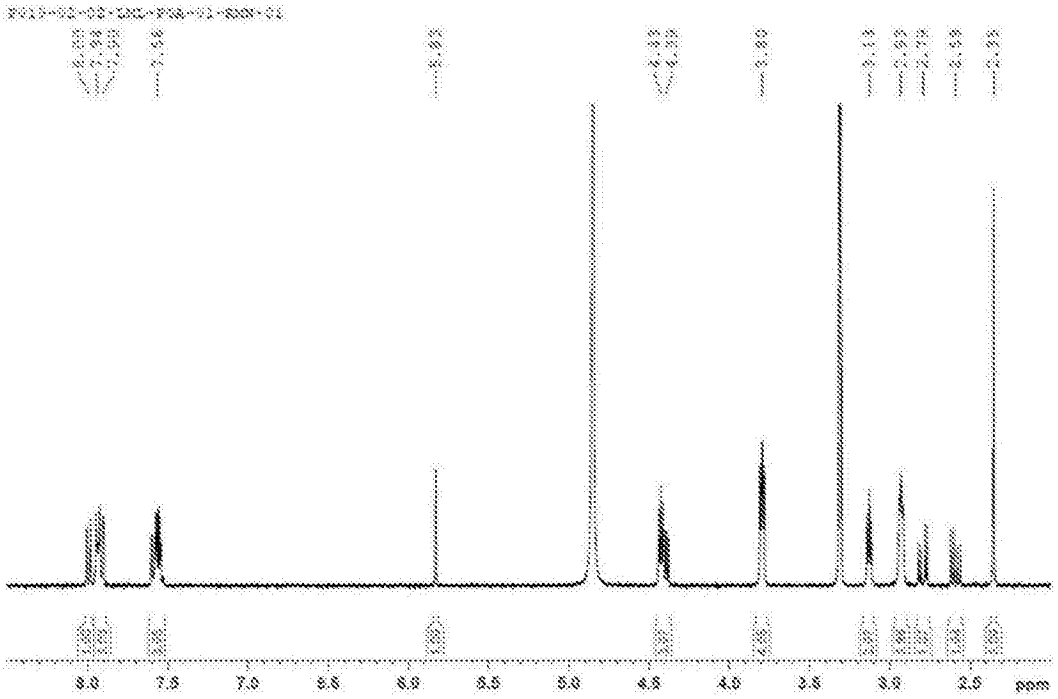


图21

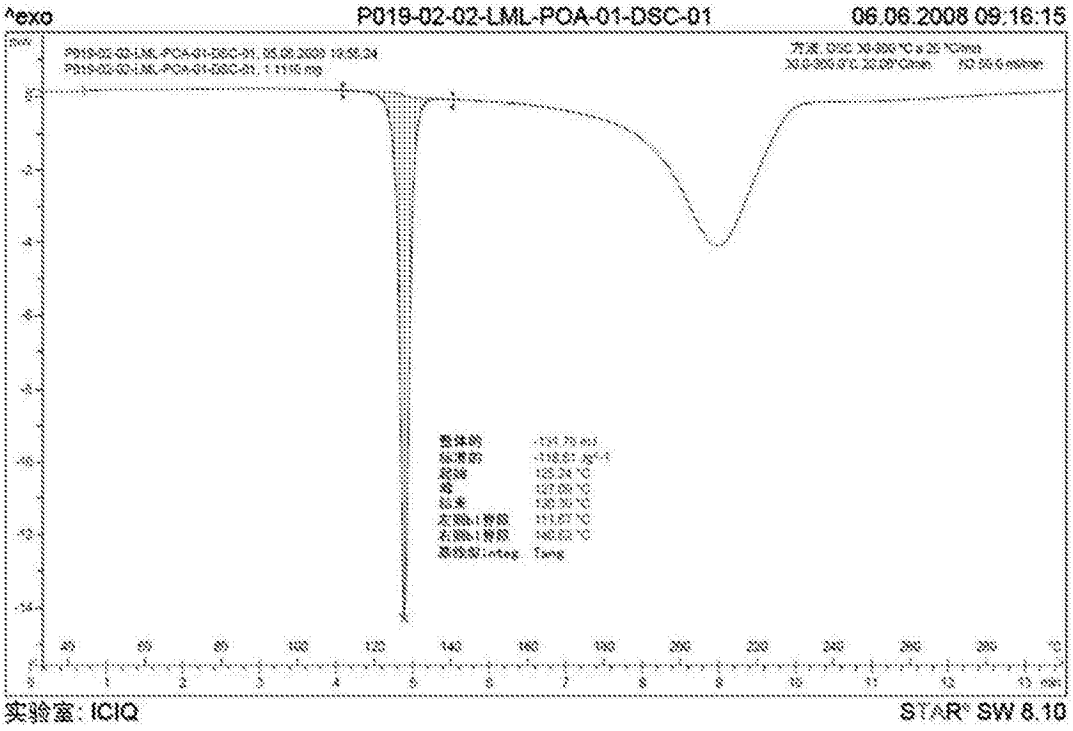

^exo
P019-02-02-LML-POA-01-DSC-01
06.06.2008 09:16:15
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图22

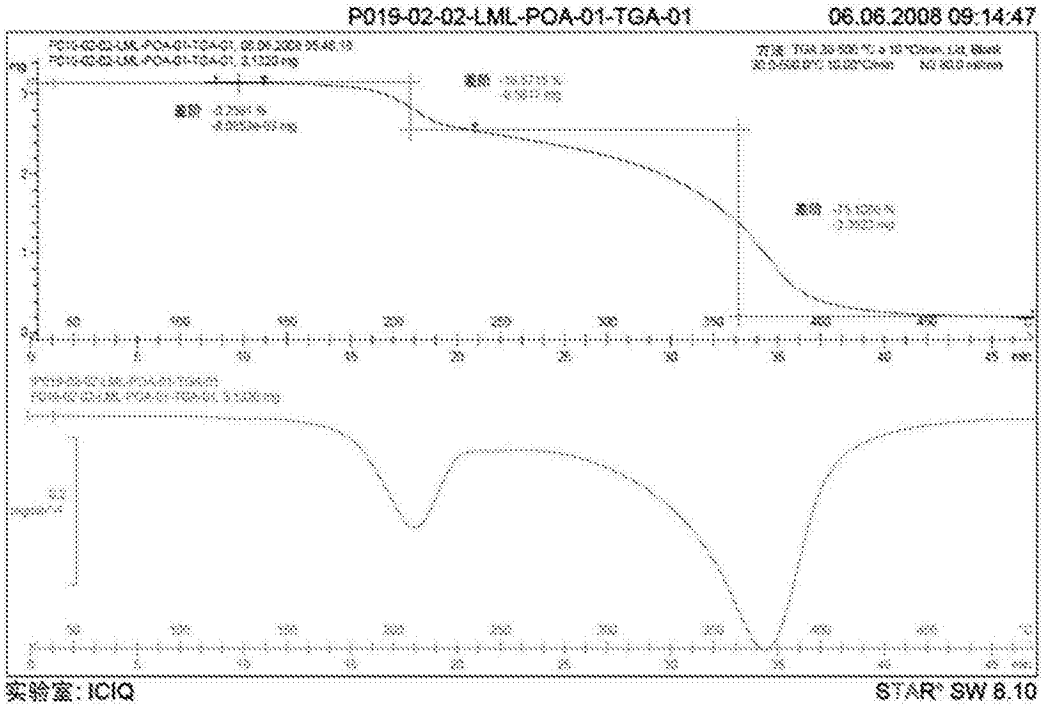

P019-02-02-LML-POA-01-TGA-01
06.06.2008 09:14:47
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图23

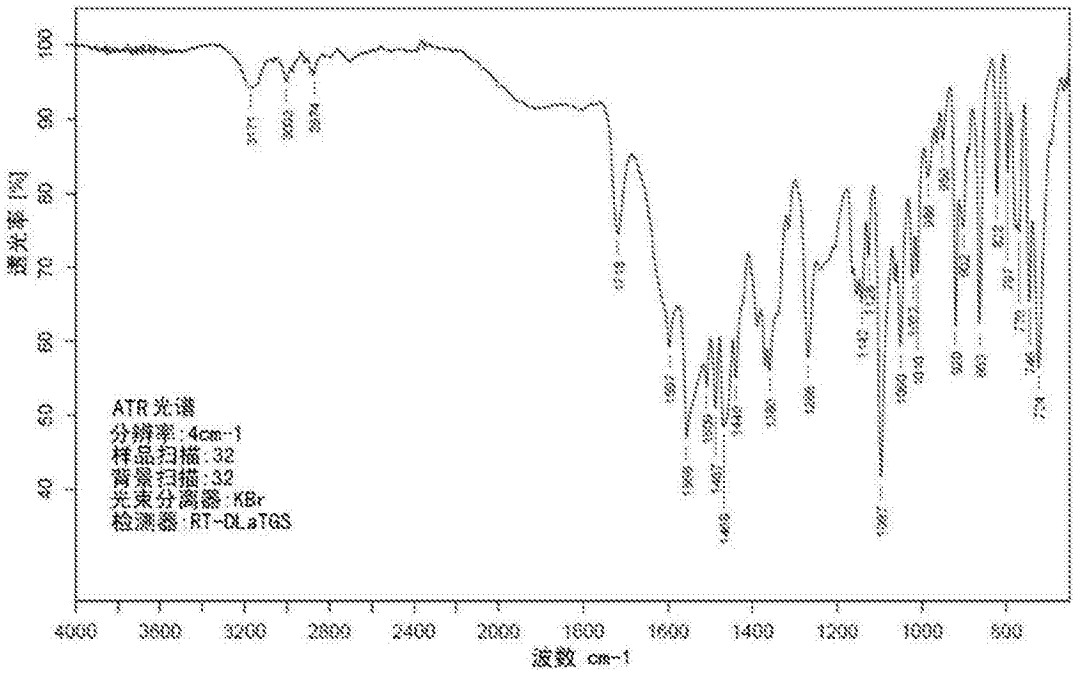

ATR 光谱
分辨率: 4cm-1
样品扫描: 32
背景扫描: 32
光束分离器: KBr
检测器: RT-DLaTGS
透光率 [%]
波数 cm-1

图24

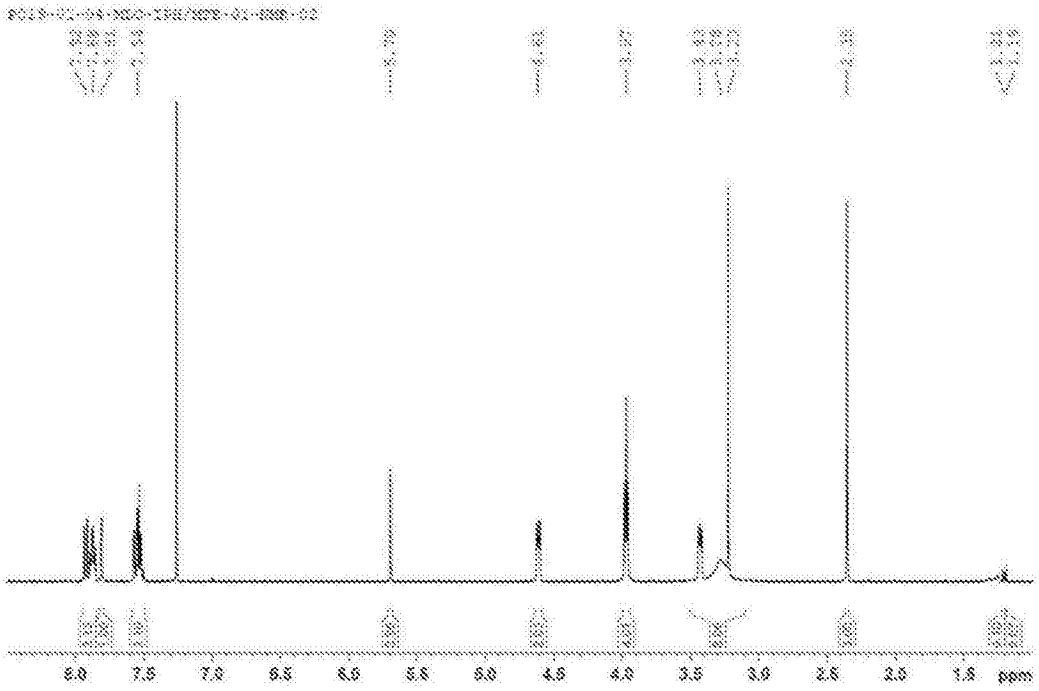


图25

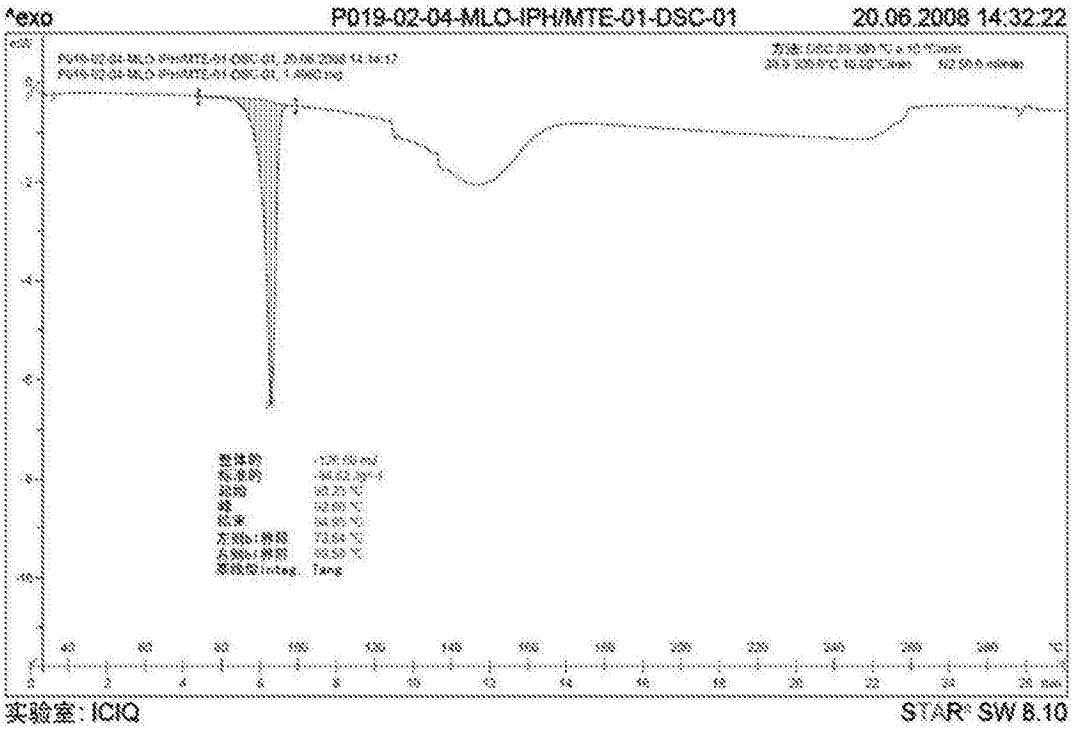

^exo
P019-02-04-MLO-IPH/MTE-01-DSC-01
20.06.2008 14:32:22
实验室: ICIQ
STARe SW 8.10

图26

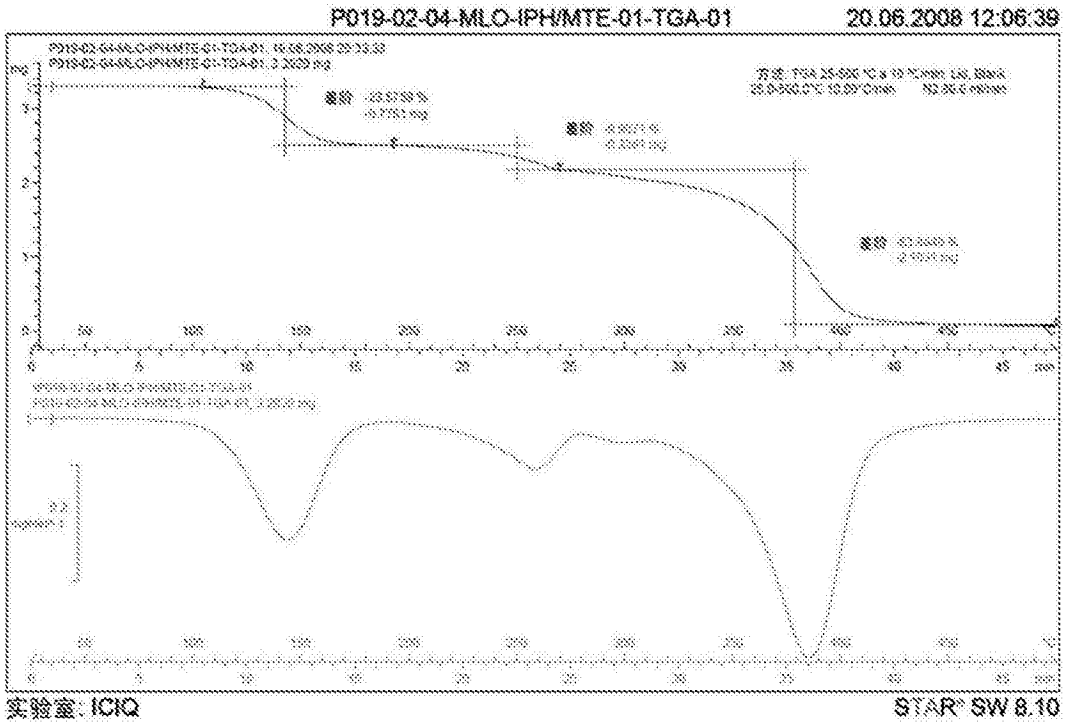

P019-02-04-MLO-IPH/MTE-01-TGA-01
20.06.2008 12:06:39
实验室: ICIQ
STAR° SW 8.10

图27

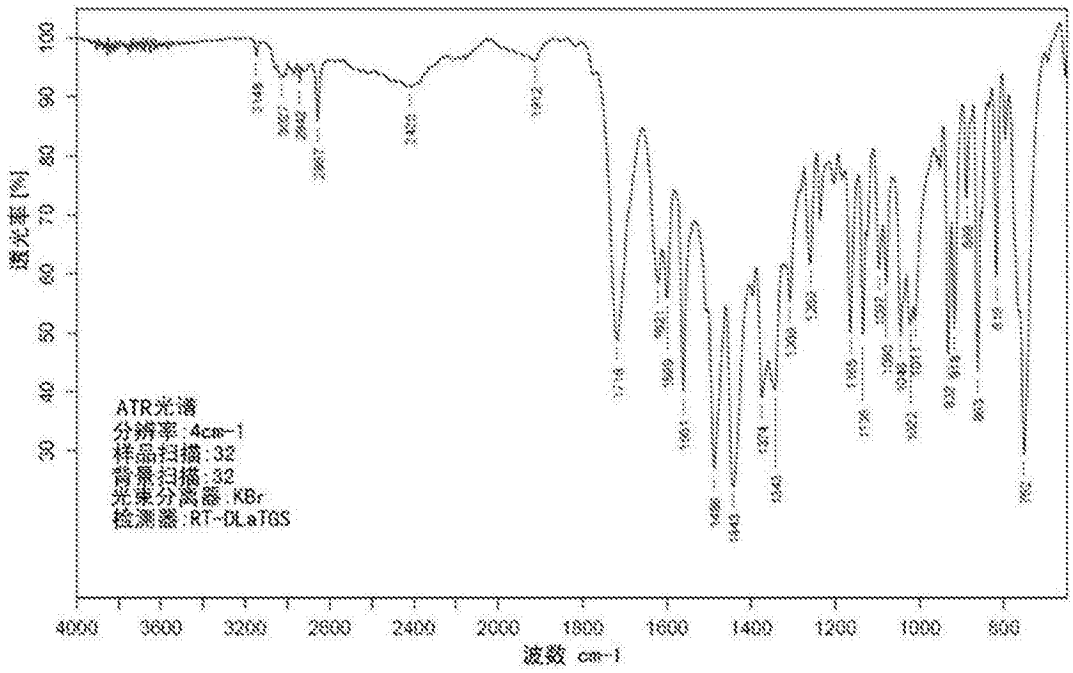

ATR光谱
分辨率 :4cm-1
样品扫描 :32
背景扫描 :32
光束分离器 :KBr
检测器 :RT-DLaTGS
透光率 [%]
波数 cm-1

图28

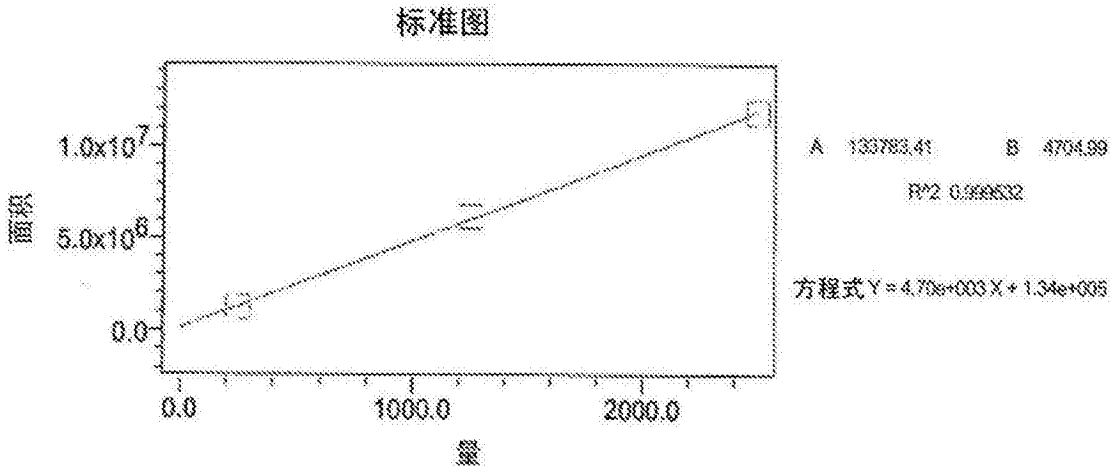

标准图
面积
1.0x10^7
5.0x10^6
0.0
0.0
1000.0
2000.0
量
A 133763.41
B 4704.99
R^2 0.998532
方程式 Y = 4.70e+003 X + 1.34e+005

图29

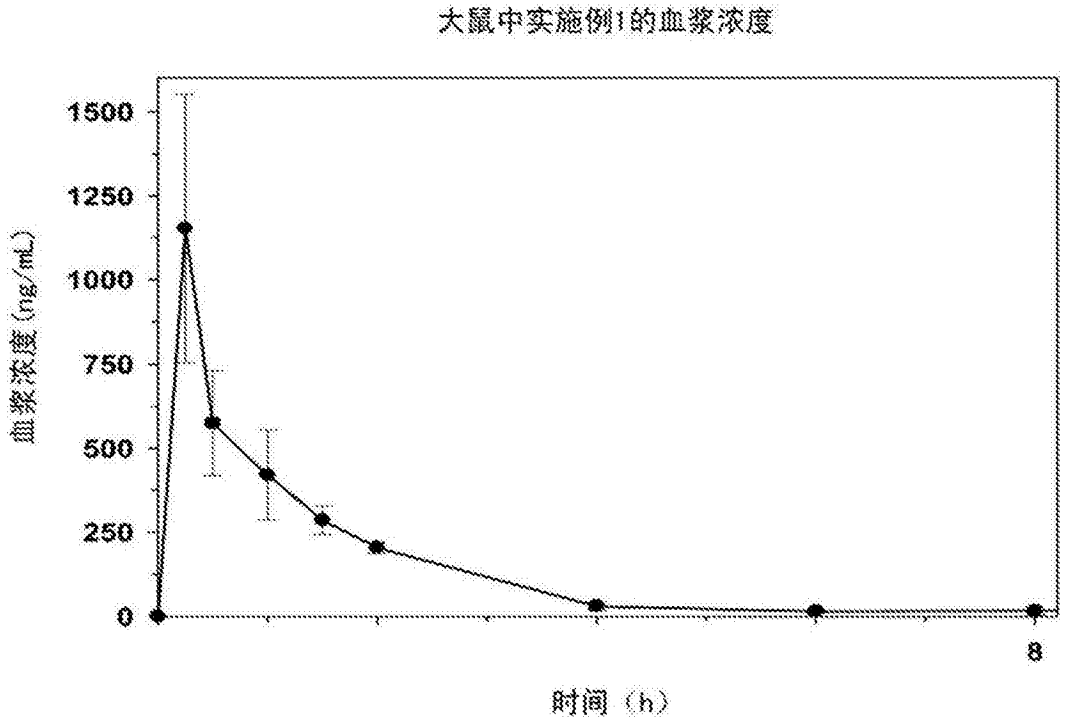

大鼠中实施例1的血浆浓度
血浆浓度(ng/mL)
1500
1250
1000
750
500
250
0
8
时间（h）

图30