



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108276278 B

(45) 授权公告日 2021.04.20

(21) 申请号 201810086114.0

CN 1950083 A, 2007.04.18

(22) 申请日 2014.11.12

CN 101678022 A, 2010.03.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108276278 A

CN 102458408 A, 2012.05.16

(43) 申请公布日 2018.07.13

C. Nemecek et al., "Design of Potent IGF1-R Inhibitors Related to Bis-azaindoles".《Chem.Biol.Drug.Des.》.2010, 第76卷第100-106页.

(30) 优先权数据

61/903,893 2013.11.13 US

Hyun Sook Kim et al., "Heterogeneous organocatalysis for the asymmetric desymmetrization of meso-cyclic anhydrides using silica gel-supported bis-cinchona alkaloids".《Tetrahedron》.2004, 第60卷(第52期), 第12051-12057页.

(62) 分案原申请数据

201480071166.0 2014.11.12

(73) 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司
地址 美国马萨诸塞

Yu-Mi Song et al., "Silica gel-supported bis-cinchona alkaloid: a chiral catalyst for the heterogeneous asymmetric desymmetrization of meso-cyclic anhydrides".《Tetrahedron Letters》.2004, 第45卷(第16期), 第3301-3304页.

(72) 发明人 G·J·坦奥利 W·A·纽金特
V·德沃尔尼科夫斯 P·J·罗斯

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
代理人 李华英

审查员 王婷

(51) Int.Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101052642 A, 2007.10.10

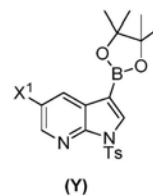
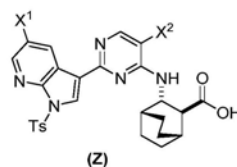
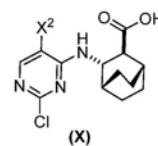
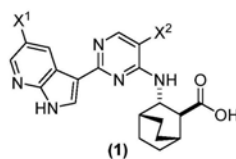
权利要求书1页 说明书110页 附图1页

(54) 发明名称

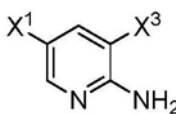
制备流感病毒复制抑制剂的方法

(57) 摘要

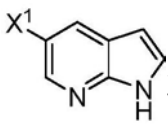
制备化合物 (1) 或其药学上可接受的盐的方法, 包括: (a) 使化合物 (X) 或其药学上可接受的盐与化合物 (Y) 在钯催化剂和碳酸盐或磷酸盐碱的存在下的反应, 形成化合物 (Z) 或其药学上可接受的盐; 和 (b) 使化合物 (Z) 的Ts基团脱保护, 形成化合物 (1) 或其药学上可接受的盐。



1. 制备化合物 (N) 的方法, 包含:

(q) 使化合物 (K)  或其药学上可接受的盐与乙醛在钯催化剂的存在下反

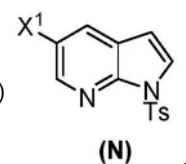
(K)

应, 形成化合物 (M)  或其药学上可接受的盐, 其中 X1 独立的是 -F 或 -Cl, 且 X3 是 -

(M)

Br 或 -I;

(p) 使化合物 (M) 或其药学上可接受的盐甲苯磺酰化, 形成化合物 (N)



2. 权利要求1的方法, 其中步骤 (q) 的钯催化剂包含双(二亚苄基丙酮)钯和叔膦配体 PR₃ 的混合物, 其中 R 是 C₁₋₆ 烷基或 C₅₋₆ 环烷基。

3. 权利要求2的方法, 其中所述叔膦配体 PR₃ 是 P(^tBu)₃、PCy₃、P(*i*-Pr)₃、P(Bu₃)、PEt₃、PMe₃ 或其任意的组合。

4. 权利要求3的方法, 其中所述叔膦配体包含 P(^tBu)₃。

5. 权利要求1的方法, 进一步包括在步骤 (p) 反应之前, 将步骤 (q) 的反应混合物与碳酸盐碱处理。

6. 权利要求5的方法, 其中所述碳酸盐碱是 Na₂CO₃。

制备流感病毒复制抑制剂的方法

[0001] 本申请是申请日为2014年11月12日、申请号为201480071166.0 (PCT/US2014/065121)、发明名称为“制备流感病毒复制抑制剂的方法”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本PCT申请要求2013年11月13日提交的美国临时申请No.61/903,893的利益。该对比文件被完整地以引用的方式并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及用于制备用作流感病毒复制抑制剂的化合物的方法和中间体。

背景技术

[0005] 在季节性流行病中流感在全世界传播,导致每年数十万人死亡-在大流行病年为数百万人。例如,20世纪发生了3次流感大流行,致数千万人死亡,每次大流行均起因于在人类中新病毒株的出现。通常,这些新病毒株由现有流感病毒从其它动物物种向人类的传播引起。

[0006] 流感主要通过感染者咳嗽或打喷嚏时产生的载有病毒的大飞沫在人与人之间传播;然后这些大飞沫可停留在靠近(例如,约6英尺内)感染者的易感个体的上呼吸道的粘膜表面。传播也可通过与呼吸道分泌物的直接或间接接触而发生,例如触摸被流感病毒污染的表面,然后触摸眼睛、鼻子或嘴。成人可能能够在出现症状前1天或症状开始后约5天将流感传播给他人。小孩和免疫功能弱的人可能在症状发作后10天或以上具有传染性。

[0007] 流感病毒是正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)的RNA病毒,其包括5个属:A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒、ISA病毒和托高土病毒(Thogoto virus)。

[0008] A型流感病毒属有1个物种,A型流感病毒。野生水鸟是大量A型流感的天然宿主。有时,病毒传播至其它物种并且可接着引起家禽中的毁灭性爆发或导致人类流感大流行。3种流感类型中,A型病毒是最具毒性的人类病原体并且会造成最严重的疾病。基于对这些病毒的抗体反应,可将A型流感病毒细分为不同血清型。以已知人类大流行死亡数排序的已确认人类血清型为:H1N1(1918年引起西班牙流感)、H2N2(1957年引起亚洲流感)、H3N2(1968年引起香港流感)、H5N1(2007-2008流感季的大流行威胁)、H7N7(具有罕见的动物传染病潜能)、H1N2(在人类和猪中的地方性流行)、H9N2、H7N2、H7N3和H10N7。

[0009] B型流感病毒属有1个物种,B型流感病毒。B型流感几乎专感染人类并且与A型流感相比较不常见。其它已知易受B型流感感染的唯一动物是海豹。这种类型的流感按照比A型慢2-3倍的速率突变并且因此遗传多样性低,仅有一种B型流感血清型。由于这种抗原多样性的缺乏,通常在早年获得一定程度的B型流感免疫力。然而,B型流感突变足以使不可能持久免疫。这样降低了抗原变化率,合并其受限宿主范围(抑制跨物种抗原转变),确保不会发生B型流感大流行。

[0010] C型流感病毒属有1个物种,C型流感病毒,其感染人类和猪并且可引起严重疾病和地方性流行病。然而,C型流感与其它类型流感相比较不常见并且通常似乎引起儿童的轻度

疾病。

[0011] A、B和C型流感病毒在结构上非常相似。病毒颗粒直径为80-120nm并且通常近似球体,尽管可能出现丝状形式。对于病毒而言不同寻常的是,其基因组并非单一片段的核酸;相反,基因组含有7个或8个片段的分段负义RNA。A型流感基因组编码11种蛋白质:血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)、核蛋白(NP)、M1、M2、NS1、NS2 (NEP)、PA、PB1、PB1-F2和PB2。

[0012] HA和NA是病毒颗粒外部的大分子糖蛋白。HA是介导病毒结合靶细胞和病毒基因组进入靶细胞的凝集素,而NA涉及通过裂解与成熟病毒颗粒结合的糖而从感染细胞释放子代病毒。因此,这些蛋白质已成为抗病毒药物的目标。而且,这些蛋白质是可产生抗体的抗原。基于对HA和NA的抗体反应将A型流感病毒分为亚型,形成例如H5N1中H和N区别的基础(参见上文)。

[0013] 由于丧失生产力和相关医疗流感会产生直接成本以及预防措施的间接成本。在美国,流感是造成每年超过100亿美元总成本的原因,而据估计未来的大流行病可引起数千亿美元的直接和间接成本。预防成本也很高。世界各国政府已花费了数十亿美元为可能的H5N1禽流感大流行做准备和计划,成本与购买药物和疫苗以及发展灾难演练和提高边境管制的策略相关。

[0014] 目前的流感治疗选择包括接种疫苗和用抗病毒药物进行化学治疗或化学预防。常常向高危群体,例如儿童和老年人,或有哮喘、糖尿病或心脏病的人推荐接种抗流感的流感疫苗。然而,可能经接种但仍得流感。每个季节重新配制一些特定流感株的疫苗,但不可能包括该季节世界上主动感染人的所有菌株。厂商用约6个月配制并生产处理季节性流行病所需的数百万份剂量;有时,新的或被忽视的菌株在这期间变得显著并感染人群,虽然这些人群已经接种疫苗(如2003-2004流感季H3N2 Fujian流感)。也可能就在接种之前被感染并恰好感染假定疫苗预防的菌株,因为疫苗需要约数周才起效。

[0015] 另外,这些流感疫苗的功效可变。由于病毒的高突变率,特定流感疫苗通常赋予不超过几年的保护。由于病毒随时间快速变化,并且不同菌株成为优势,为某年配制的疫苗可能在下一年无效。

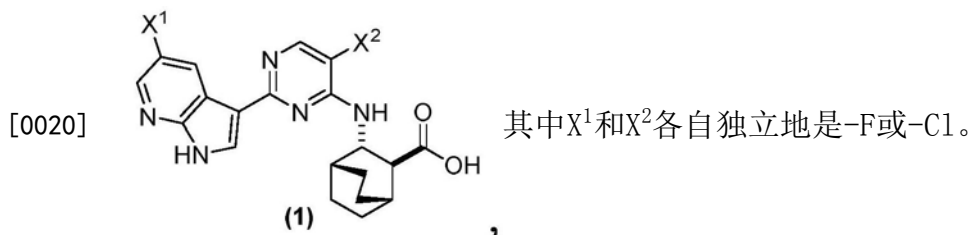
[0016] 同样,由于缺乏RNA校正读码酶,流感vRNA的RNA依赖性RNA聚合酶大约每1万个核苷酸(这是流感vRNA的近似长度)产生一个核苷酸插入错误。因此,几乎每种新制流感病毒均为突变-抗原漂移。如果不止一个病毒系感染了单个细胞,则基因组分离为8个单独的vRNA片段使vRNA混合或重配。所产生的病毒遗传学上的快速变化产生抗原转变并且使病毒感染新宿主物种并迅速克服保护性免疫。

[0017] 抗病毒药物也可用于治疗流感,其中神经氨酸酶抑制剂尤其有效,但病毒可对标准抗病毒药物产生抗药性。

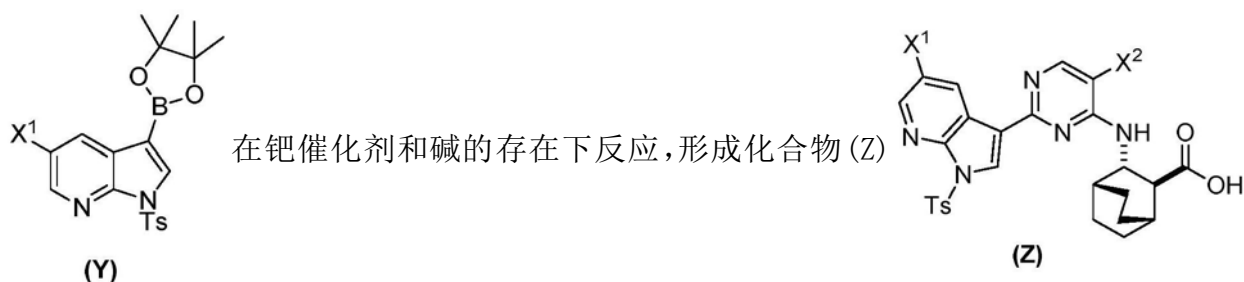
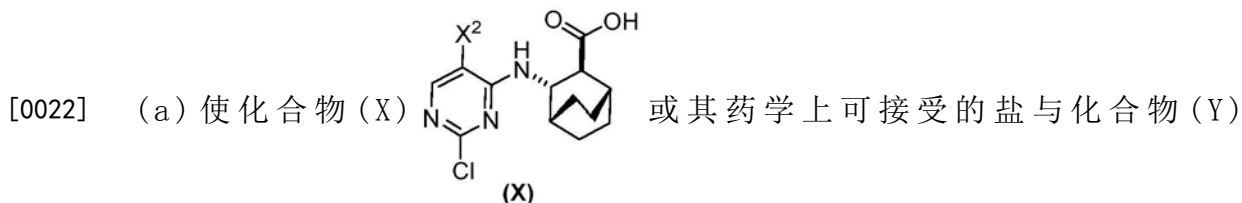
[0018] 因此,仍需要治疗流感感染的药物,例如治疗窗扩大和/或对病毒滴度的敏感性降低的药物。此外,需要用于有效地制备这类药物的方法。

发明内容

[0019] 本发明一般性涉及制备化合物(1)或其药学上可接受的盐的方法和制备用于它们的一些中间体化合物的方法:



[0021] 在一个实施方案中,本发明涉及制备化合物(1)或其药学上可接受的盐的方法。该方法包括:



或其药学上可接受的盐;和

[0023] (b) 使化合物(Z)或其药学上可接受的盐的Ts(甲苯磺酰基)基团脱保护,形成化合物(1)或其药学上可接受的盐。

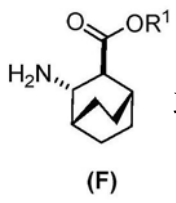
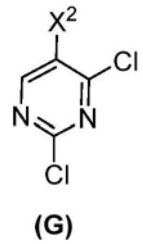
[0024] 在一些实施方案中,钯催化剂在原位形成。在一些实施方案中,这种钯催化剂是钯-XPhos配合物,其中XPhos是2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯。在另外的实施方案中,钯-XPhos配合物在原位通过混合Pd(0)或Pd(II)源与Xphos制备。并且,在一些实施方案中,Pd(0)或Pd(II)源包含Pd₂(dba)₃、Pd(OAc)₂、PdCl₂或其任意的组合,其中dba是二亚苄基丙酮,且OAc是乙酸根。例如,钯-XPhos配合物在原位通过混合Pd(OAc)₂和Xphos制备。

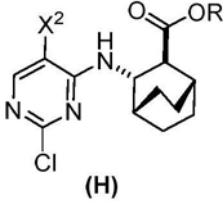
[0025] 在另外的实施方案中,所述碱包含磷酸盐碱或碳酸盐碱。例如,所述磷酸盐碱或碳酸盐碱选自Na₂CO₃、K₂CO₃、K₃PO₄或Na₃PO₄。

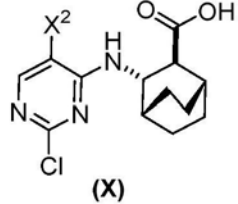
[0026] 在一些实施方案中,化合物(X)与化合物(Y)反应生成如上述步骤(a)中提供的化合物(Z)在溶剂系统中进行,所述溶剂系统包含水和选自2-甲基THF或THF或其任意的组合的有机溶剂。

[0027] 在另外的实施方案中,如上述步骤(b)中提供的化合物(Z)的甲苯磺酰基(Ts)的脱保护包含用包含LiOH、NaOH、KOH或其任意的组合的无机氢氧化物处理化合物(Z)或其药学上可接受的盐。

[0028] 一些实施方案还包含:

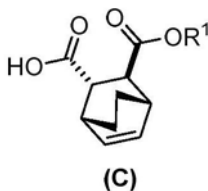
[0029] (c) 使化合物 (F)  或其药学上可接受的盐与化合物 (G)  反应，

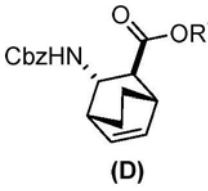
形成化合物 (H)  或其药学上可接受的盐，其中R¹是C₁₋₄烷基；和

[0030] (d) 水解化合物 (H) 或其药学上可接受的盐，形成化合物 (X)  或其

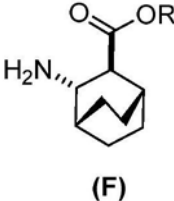
药学上可接受的盐。

[0031] 一些实施方案还包含：

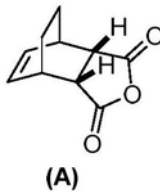
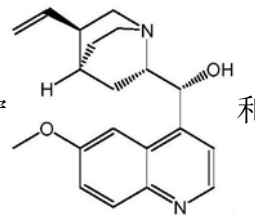
[0032] (e) 使化合物 (C)  或其药学上可接受的盐与二苯基磷酰基叠氮化物和苯醇反应，形成

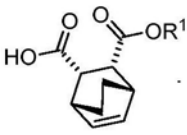
[0033] 化合物 (D)  或其药学上可接受的盐，其中Cbz是羧苄基；和

[0034] (f) 使化合物 (D) 或其药学上可接受的盐与H₂在披Pd碳催化剂的存在下反应，形成

化合物 (F)  或其药学上可接受的盐。

[0035] 一些实施方案还包含：

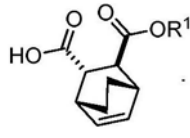
[0036] (g) 使化合物 (A)  与奎宁  和

[0037] R¹-OH反应,形成奎宁和化合物(C-1)  的加合物,其中R¹是C₁₋₄烷基;

(C-1)

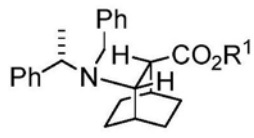
[0038] (h) 通过用HCl处理所述加合物打断奎宁和化合物(C-1)的加合物,形成化合物(C-1)或其药学上可接受的盐;和

[0039] (i) 使化合物(C-1)或其药学上可接受的盐差向异构化,形成化合物(C)

 或其药学上可接受的盐。


(C)

[0040] 在一些实施方案中,差向异构化步骤(i)包含用C₁₋₆醇盐处理化合物(C-1)。在一些实施方案中,C₁₋₆醇盐包含叔丁醇盐、叔戊醇盐或其任意的组合。在另外的实施方案中,R¹是乙基。

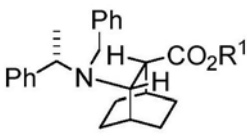
[0041] 一些实施方案还包含在钯催化剂的存在下氢化化合物(S)  或其

(S)

药学上可接受的盐,其中Ph是苯基,形成化合物(F)或其药学上可接受的盐,其中钯催化剂包含披Pd(0)碳(Pd(0)/C)、披Pd(OH)₂碳或其任意的组合。

[0042] 一些实施方案还包含使化合物(R)  与S-(-)-N-苄基-α-甲基苄基氨基锂


(R)

反应,形成化合物(S)  或其药学上可接受的盐。


(S)

[0043] 一些实施方案还包含:

[0044] (j) 使1,3-环己二烯与CH≡CHC(O)OR¹在铝催化剂的存在下反应,形成化合物(Q)

 其中R¹是C₁₋₄烷基;和

(Q)

[0045] (k) 氢化化合物(Q),形成化合物(R)  。

(R)

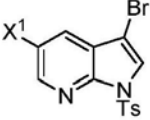
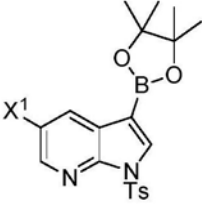
[0046] 在一些实施方案中, R¹是乙基。

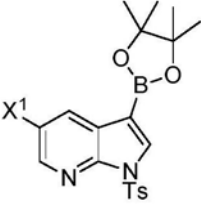
[0047] 在一些实施方案中, 所述铝催化剂包含EtAlCl₂、Et₂AlCl、AlCl₃和三辛基铝的混合物或其任意的组合。

[0048] 在一些实施方案中, 化合物(Q)的氢化包含使化合物(Q)与H₂在Rh(I)催化剂或中毒Pd(0)催化剂的存在下反应。

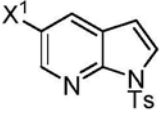
[0049] 在一些实施方案中, Rh(I)催化剂包含(PPh₃)₃RhCl、(PPh₃)₃RhCl和丙炔酸乙酯的混合物或其任意的组合, 其中Ph是苯基。

[0050] 在一些实施方案中, 中毒Pd(0)催化剂包含披铅中毒Pd(0) CaCO₃催化剂(Pd(Pb)/CaCO₃)。

[0051] 一些实施方案还包含使化合物(O)  与双(频哪醇合)二硼在包含膦配体的钯催化剂的存在下反应, 形成化合物(Y) 。

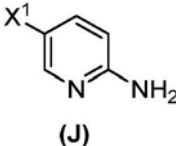
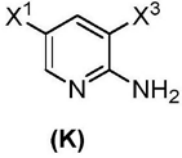
的钯催化剂的存在下反应, 形成化合物(Y) 。

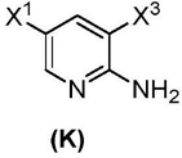
[0052] 在一些实施方案中, 包含膦配体的钯催化剂是Pd(Ph₃P)₄。

[0053] 一些实施方案还包含用溴化剂处理化合物(N)  所述溴化剂包含Br₂、N-溴琥珀酰亚胺、1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲或其任意的组合, 形成化合物(O)。

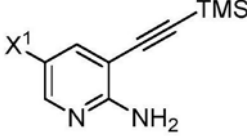
N-溴琥珀酰亚胺、1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲或其任意的组合, 形成化合物(O)。

[0054] 一些实施方案还包含

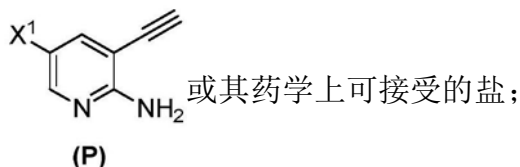
[0055] (1) 使化合物(J)  或其药学上可接受的盐与碘化剂或溴化剂反应, 形成化合物(K)  或其药学上可接受的盐, 其中X³是Br或I;

成化合物(K)  或其药学上可接受的盐, 其中X³是Br或I;

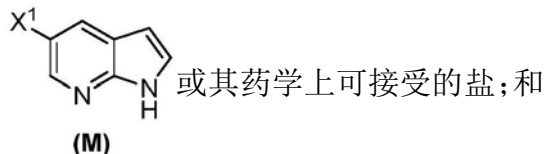
[0056] (m) 使化合物(K)或其药学上可接受的盐与三甲基甲硅烷基乙炔反应, 形成化合物

(L)  或其药学上可接受的盐, 其中TMS是三甲基甲硅烷基;

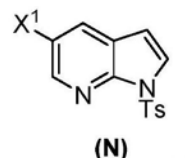
[0057] (n) 使化合物(L)或其药学上可接受的盐与C₁₋₆醇盐碱反应, 形成化合物(P)



[0058] (o) 使化合物 (P) 与叔丁醇钾、叔戊醇钾或其任意的组合反应, 形成化合物 (M)



[0059] (p) 使化合物 (M) 或其药学上可接受的盐甲苯磺酰化, 形成化合物 (N)



[0060] 在一些实施方案中, C₁₋₆醇盐碱包含叔戊醇钾、叔丁醇钾、甲醇钾、叔戊醇钠、叔丁醇钠、甲醇钠或其任意的组合。

[0061] 在一些实施方案中, 化合物 (K) 或其药学上可接受的盐与三甲基甲硅烷基乙炔的反应在包含 Pd (Ph₃P)₄、Pd (PPh₃)₂Cl₂、Pd (dppf)₂Cl₂ 或其任意的组合的钯催化剂、卤化亚酮 (I) 催化剂或其任意的组合的存在下进行。

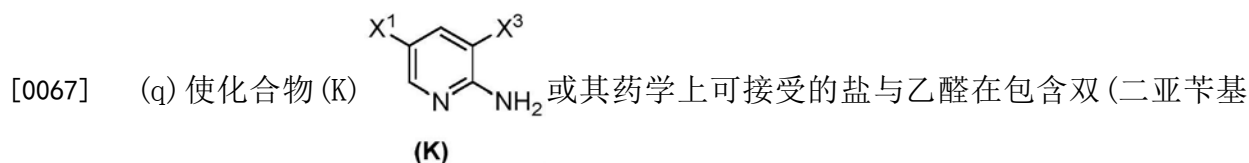
[0062] 在一些实施方案中, 化合物 (K) 或其药学上可接受的盐与三甲基甲硅烷基乙炔的反应在 CuI、Pd (Ph₃P)₄、Pd (PPh₃)₂Cl₂、Pd (dppf)₂Cl₂ 或其任意的组合的存在下进行。

[0063] 在一些实施方案中, 甲苯磺酰化步骤 (p) 通过使化合物 (M) 或其药学上可接受的盐与 TsCl 反应进行。

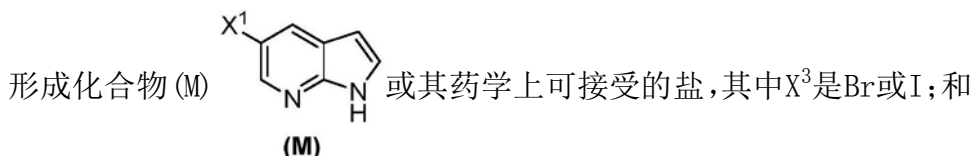
[0064] 在一些实施方案中, 使化合物 (J) 或其药学上可接受的盐与包含 I₂、ICl、N-碘琥珀酰亚胺的碘化剂反应, 且其中 X³ 是 I。在另外的实施方案中, 所述碘化剂是 I₂。

[0065] 在一些实施方案中, 化合物 (J) 或其药学上可接受的盐与包含 Br₂、N-溴琥珀酰亚胺、1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲或其任意的组合的溴化剂反应, 且其中 X³ 是 Br。在另外的实施方案中, 所述溴化剂是 Br₂。

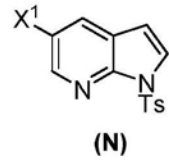
[0066] 一些实施方案还包含:



形成化合物 (M) 或其药学上可接受的盐, 其中 X³ 是 Br 或 I; 和



[0068] (p) 使化合物 (M) 或其药学上可接受的盐甲苯磺酰化, 形成化合物 (N)



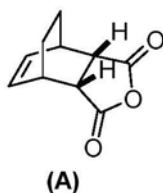
[0069] 在一些实施方案中, 所述叔膦配体 PR_3 包含 $P(^tBu)_3$ 、 PCy_3 、 $P(i-Pr)_3$ 、 $P(Bu_3)$ 、 PEt_3 、 PMe_3 或其任意的组合。例如, 所述叔膦配体包含 $P(^tBu)_3$ 。

[0070] 一些实施方案还包含在脱保护步骤 (b) 之后, 用 HCl 在包含水和一种或多种有机溶剂的溶剂系统中处理化合物 (1), 形成化合物 (1) 的 HCl 盐, 其中所述有机溶剂选自乙腈、氯苯、氯仿、环己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、1,2-二甲氧基乙烷、 N,N -二甲基乙酰胺、 N,N -二甲基甲酰胺、1,4-二噁烷、2-乙氧基乙醇、乙二醇、甲酰胺、己烷、甲醇、2-甲氧基乙醇、甲基丁基酮、甲基环己烷、 N -甲基吡咯烷酮、硝基甲烷、吡啶、环丁砜、四氢呋喃 (THF)、四氢萘、甲苯、1,1,2-三氯乙烯、二甲苯、乙酸、丙酮、茴香醚、1-丁醇、2-丁醇、乙酸丁酯、叔丁基甲基醚、枯烯、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、3-甲基-1-丁醇、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、2-甲基-1-丙醇、二甲亚砜、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、甲酸乙酯、甲酸、戊烷、1-戊醇、1-丙醇、2-丙醇、乙酸丙酯或其任意的组合。在一些实施方案中, 所述溶剂系统的有机溶剂选自 2-乙氧基乙醇、乙二醇、甲醇、2-甲氧基乙醇、1-丁醇、2-丁醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丙醇、乙醇、1-戊醇、1-丙醇、2-丙醇、甲基丁基酮、丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、吡啶、甲苯和二甲苯。

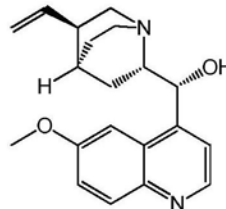
[0071] 在一些实施方案中, 所述溶剂系统包含水和丙酮或水和异丙醇。

[0072] 在另一个实施方案中, 本发明涉及制备化合物 (1) 或其药学上可接受的盐的方法, 其中该方法包括:

[0073] (g) 使化合物 (A)

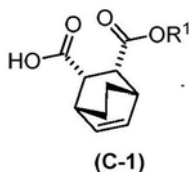


与奎宁



和乙醇反应, 形成奎宁和化

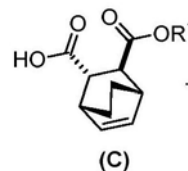
合物 (C-1)



的加合物, 其中 R^1 是乙基;

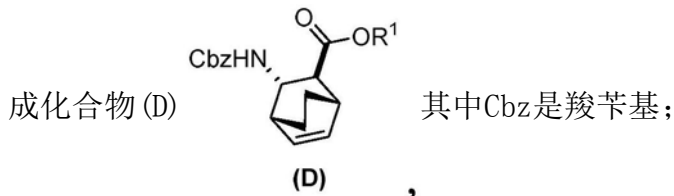
[0074] (h) 通过用 HCl 处理所述加合物打断奎宁和化合物 (C-1) 的加合物, 形成化合物 (C-1) 或其药学上可接受的盐;

[0075] (i) 使化合物 (C-1) 差向异构化成化合物 (C)

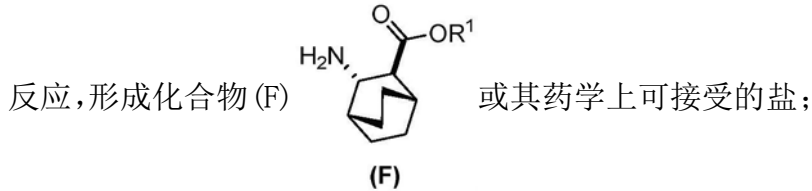


盐;

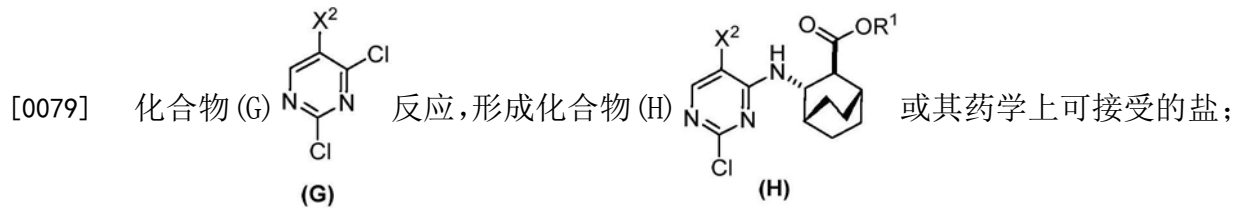
[0076] (e) 使化合物 (C) 或其药学上可接受的盐与二苯基磷酰氯叠氮化物和苄醇反应, 形

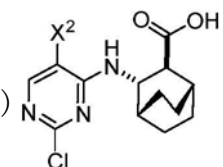


[0077] (f) 使化合物 (D) 或其药学上可接受的盐与H₂在披Pd碳催化剂 (Pd (0) /C) 的存在下

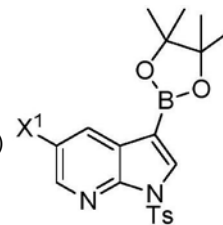


[0078] (c) 使化合物 (F) 或其药学上可接受的盐与



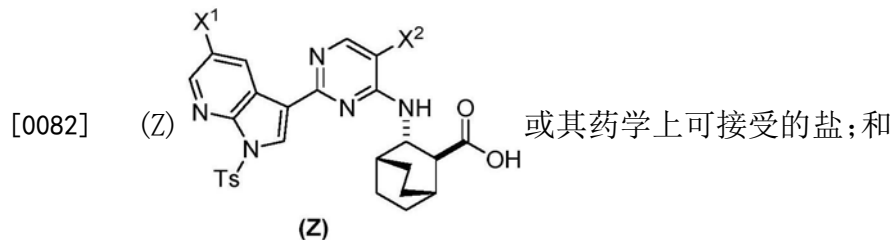
[0080] (d) 水解化合物 (H) 或其药学上可接受的盐, 形成化合物 (X)  或其药

学上可接受的盐；

[0081] (a) 使化合物 (X) 或其药学上可接受的盐与化合物 (Y)  在钯催化剂

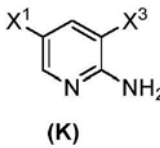
(Y)

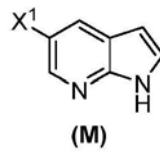
的存在下反应, 形成如下化合物

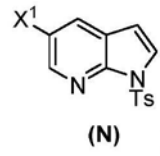


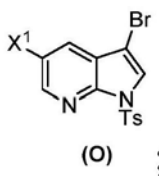
[0083] (b) 使化合物 (Z) 或其药学上可接受的盐的Ts基团脱保护, 形成化合物 (1) 或其药学上可接受的盐, 其中X¹和X²独立地是-F或-Cl; 且R¹各自独立地是乙基。

[0084] 在另一个实施方案中, 本发明涉及制备化合物 (1) 或其药学上可接受的盐的方法, 其中该方法包括:

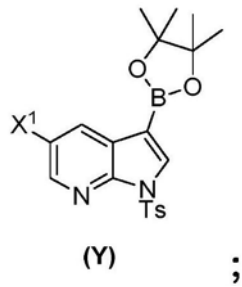
[0085] (q) 使化合物 (K)  或其药学上可接受的盐与

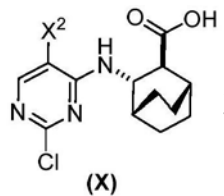
[0086] 乙醛在钯催化剂的存在下反应, 形成化合物 (M)  或其药学上可接受的盐;

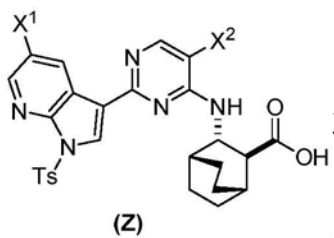
[0087] (p) 使化合物 (M) 或其药学上可接受的盐甲苯磺酰化, 形成化合物 (N)  ;

[0088] (s) 溴化化合物 (N), 形成化合物 (O)  ;

[0089] (t) 使化合物 (O) 与双(频哪醇合)二硼在钯催化剂的存在下反应, 形成化合物 (Y)



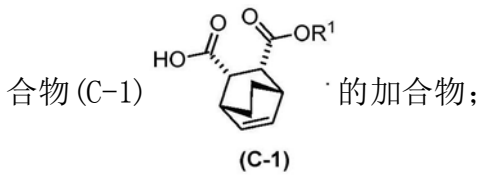
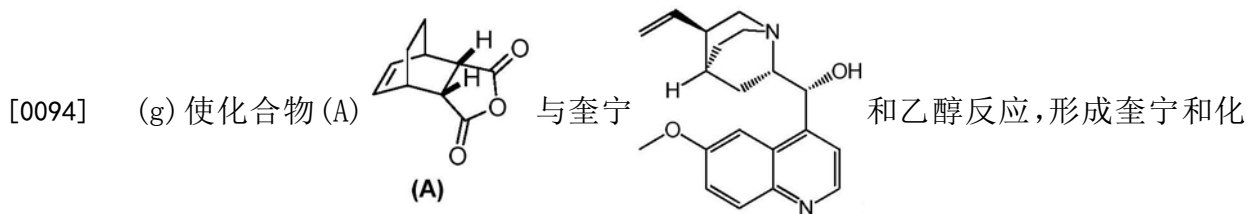
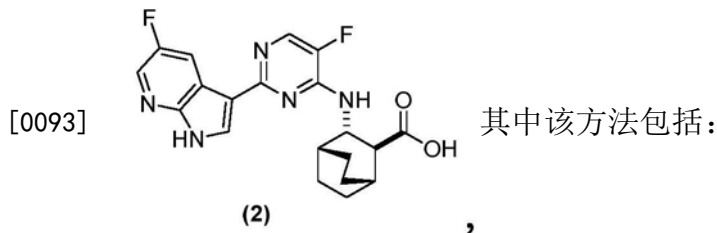
[0090] (a) 使化合物 (X)  或其药学上可接受的盐与化合物 (Y) 在钯催化剂

的存在下反应, 形成化合物 (Z)  或其药学上可接受的盐; 和

(Z)

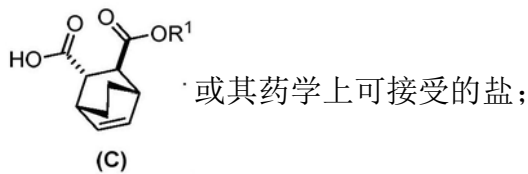
[0091] (b) 使化合物 (Z) 或其药学上可接受的盐的Ts基团脱保护, 形成化合物 (1) 或其药学上可接受的盐。 X^1 和 X^2 独立地是-F或-Cl; X^3 是-Br;且 R^1 各自独立地是乙基。

[0092] 在另一个实施方案中, 本发明涉及制备化合物 (2) 或其药学上可接受的盐的方法:

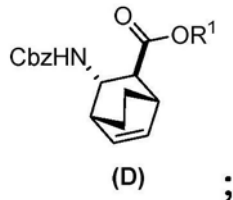


[0095] (h) 通过用HCl处理所述加合物打断奎宁和化合物 (C-1) 的加合物, 形成化合物 (C-1)；

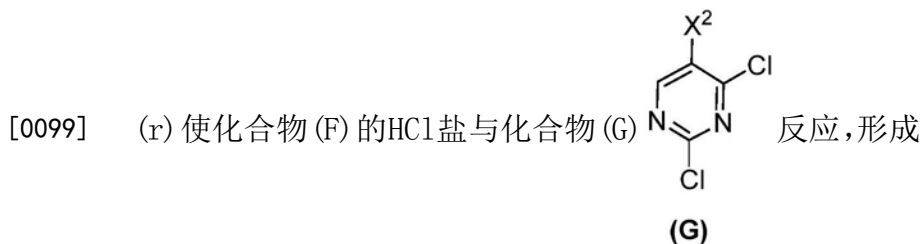
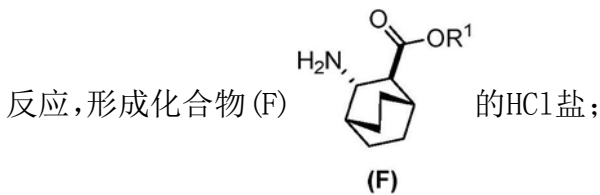
[0096] (i-1) 使化合物 (C-1) 与选自叔丁醇盐或叔戊醇盐的C₁₋₆醇盐反应, 形成化合物 (C)

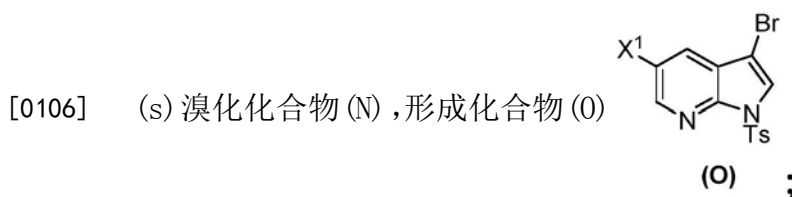
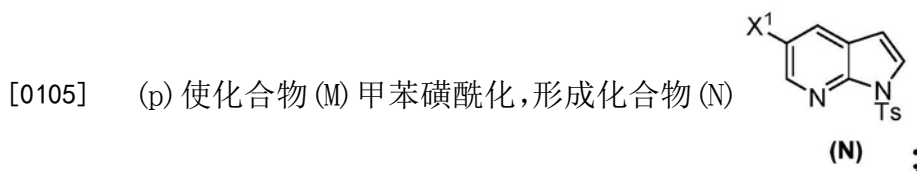
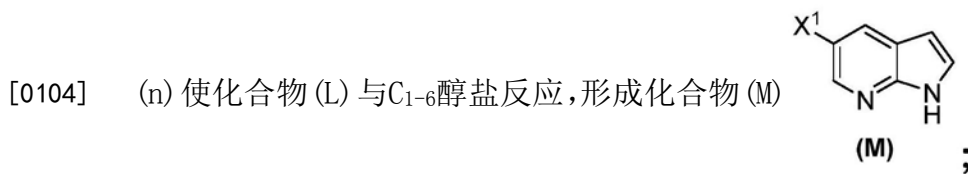
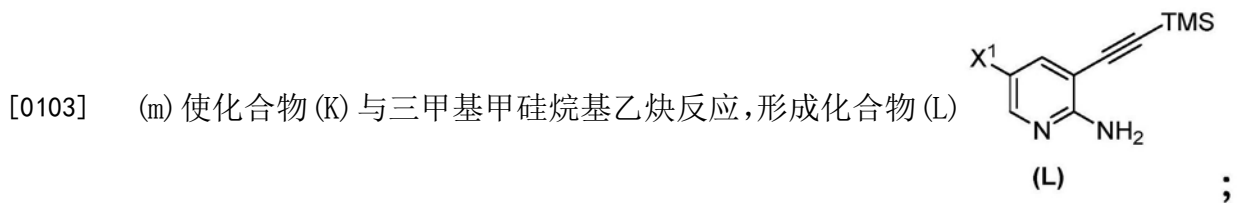
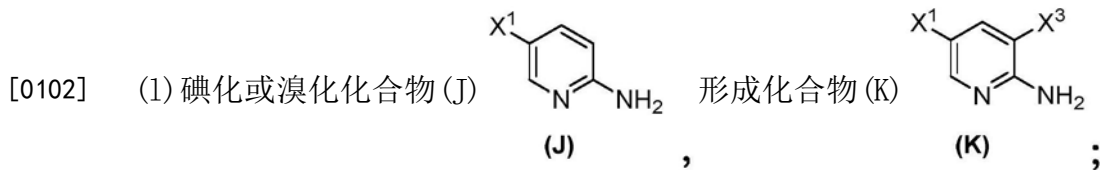
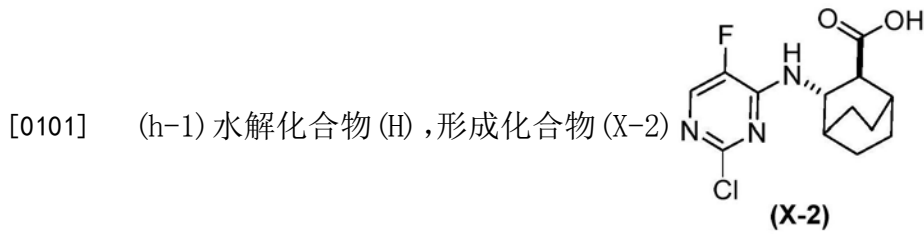
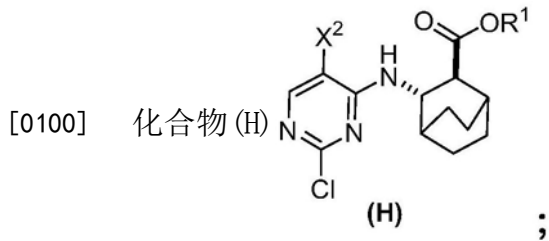


[0097] (e) 使化合物 (C) 与二苯基磷酰基叠氮化物且然后与苄醇反应, 形成化合物 (D)

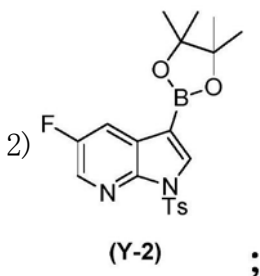


[0098] (f) 使化合物 (D) 或其药学上可接受的盐与H₂在披Pd碳催化剂 (Pd (0) /C) 的存在下



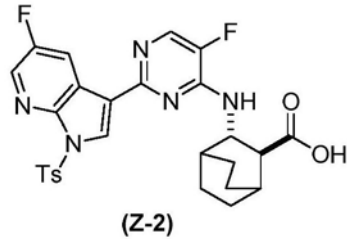


[0107] (t) 使化合物 (O) 与双(频哪醇合)二硼在 Pd(Ph₃P)₄ 的存在下反应, 形成化合物 (Y-



[0108] (a) 使化合物 (X-2) 与化合物 (Y-2) 在钯-XPhos配合物和选自 K_2CO_3 或 K_3PO_4 的磷酸

盐或碳酸盐碱的存在下反应,形成化合物 (Z-2):



或其药学上可接

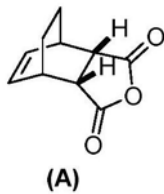
受的盐;和

[0109] (b) 使化合物 (Z-2) 或其药学上可接受的盐的Ts基团脱保护,形成化合物 (2) 或其药学上可接受的盐;且

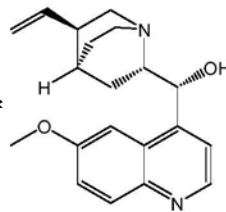
[0110] 其中:Cbz是羧苄基;XPhos是2-二环己基膦基-2',4',6'-三异丙基联苯; R^1 各自独立地是乙基; X^1 各自独立地是F; X^2 各自独立地是F;且 X^3 各自独立地是Br或I。

[0111] 在另一个实施方案中,本发明涉及制备化合物 (C) 或其药学上可接受的盐的方法,该方法包括:

[0112] (g) 使化合物 (A)

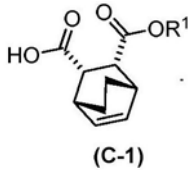


与奎宁



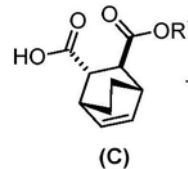
和乙醇反应,形成奎宁和化合

物 (C-1) 的加合物,其中 R^1 是乙基;



[0113] (h) 通过用HCl处理所述加合物打断奎宁和化合物 (C-1) 的加合物,形成化合物 (C-1);

[0114] (i) 使化合物 (C-1) 差向异构化成化合物 (C)

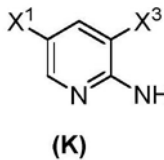


或其药学上可接受的

盐。

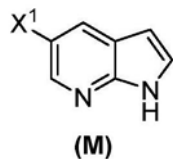
[0115] 在另一个实施方案中,本发明涉及制备化合物 (N) 的方法,该方法包括:

[0116] (q) 使化合物 (K)



(K)

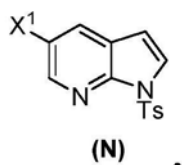
反应,形成化合物 (M)



(M)

或其药学上可接受的盐,其中 X^1 是F或Cl,且 X^3 是Br;和

[0117] (p) 使化合物 (M) 或其药学上可接受的盐甲苯磺酰化,形成化合物 (N):



附图说明

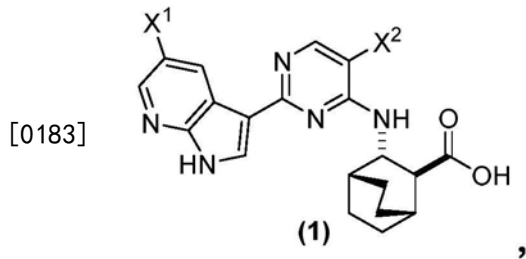
[0118] 图1是显示1200mg/600mg化合物(1)·1/2H₂O的HCl盐的形式A的剂量组在人的活性减弱的流感攻击模型中的AUC病毒减少的示意图。

[0119] 发明详述

[0120] I. 常用缩写

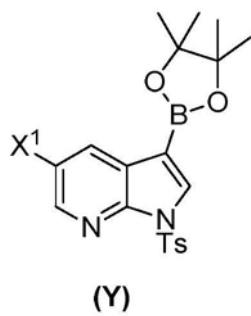
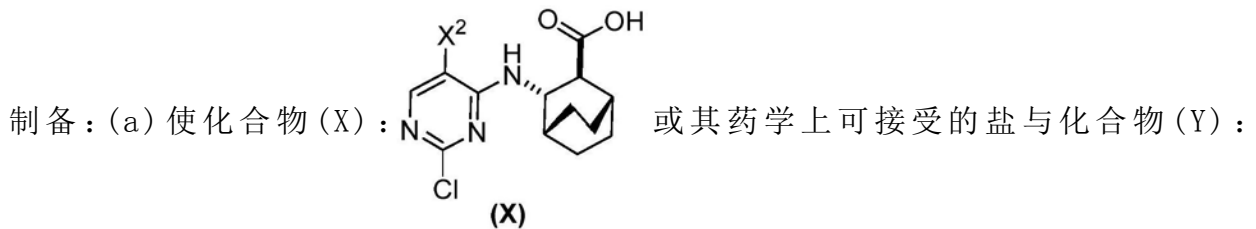
[0121]	ACN	乙腈
[0122]	tBuOAc	乙酸叔丁酯
[0123]	DABCO	1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷
[0124]	DCM	二氯甲烷
[0125]	EtOAc	乙酸乙酯
[0126]	IPAc	乙酸异丙酯
[0127]	MIBK	甲基叔丁基酮
[0128]	TEA	三乙胺
[0129]	THF	四氢呋喃
[0130]	PG	保护基
[0131]	LG	离去基
[0132]	Ac	乙酰基
[0133]	TMS	三甲基甲硅烷基
[0134]	TBS	叔丁基二甲基甲硅烷基
[0135]	TIPS	三异丙基甲硅烷基
[0136]	TBDPS	叔丁基二苯基甲硅烷基
[0137]	TOM	三异丙基甲硅烷氧基甲基
[0138]	DMP	戴斯-马丁试剂(Dess-Martin periodinane)
[0139]	IBX	2-碘氧基苯甲酸
[0140]	DMF	二甲基甲酰胺
[0141]	MTBE	甲基-叔丁基醚
[0142]	TBAF	氟化正丁基铵
[0143]	d.e.	非对映异构体过量
[0144]	e.e.	对映体过量
[0145]	d.r.	非对映异构体比
[0146]	DMSO	二甲亚砜
[0147]	TCA	三氯乙酸
[0148]	ATP	腺苷三磷酸
[0149]	EtOH	乙醇

- | | | |
|--------|--|--------------------|
| [0150] | Ph | 苯基 |
| [0151] | Me | 甲基 |
| [0152] | Et | 乙基 |
| [0153] | Bu | 丁基 |
| [0154] | DEAD | 偶氮二甲酸二乙酯 |
| [0155] | HEPES | 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 |
| [0156] | DTT | 二硫苏糖醇 |
| [0157] | MOPS | 4-吗啉丙磺酸 |
| [0158] | NMR | 核磁共振 |
| [0159] | HPLC | 高效液相色谱法 |
| [0160] | LCMS | 液相色谱法-质谱法 |
| [0161] | TLC | 薄层色谱法 |
| [0162] | Rt | 保留时间 |
| [0163] | HOBt | 羟基苯并三唑 |
| [0164] | Ms | 甲磺酰基 |
| [0165] | Ts | 甲苯磺酰基 |
| [0166] | Tf | 三氟甲磺酰基 |
| [0167] | Bs | 苯磺酰基 |
| [0168] | Ns | nosyl |
| [0169] | Cbz | 羧苄基 |
| [0170] | Moz | 对-甲氧羰基 |
| [0171] | Boc | 叔丁氧羰基 |
| [0172] | Fmoc | 9-芴基甲氧羰基 |
| [0173] | Bz | 苯甲酰基 |
| [0174] | Bn | 苄基 |
| [0175] | PMB | 对-甲氧基苄基 |
| [0176] | AUC | 曲线下的面积 |
| [0177] | DMPM | 3,4-二甲氧基苄基 |
| [0178] | PMP | 对-甲氧基苄基 |
| [0179] | XRPD | X-射线粉末衍射 |
| [0180] | II. 化合物的制备 | |
| [0181] | 注意, 本文所述的步骤可以按照任意时间次序进行, 无关步骤字母。例如, 步骤 (a) 可以在步骤 (g)、步骤 (e)、步骤 (f) 或步骤 (s) 前或之后进行。 | |
| [0182] | 化合物 (1) | |

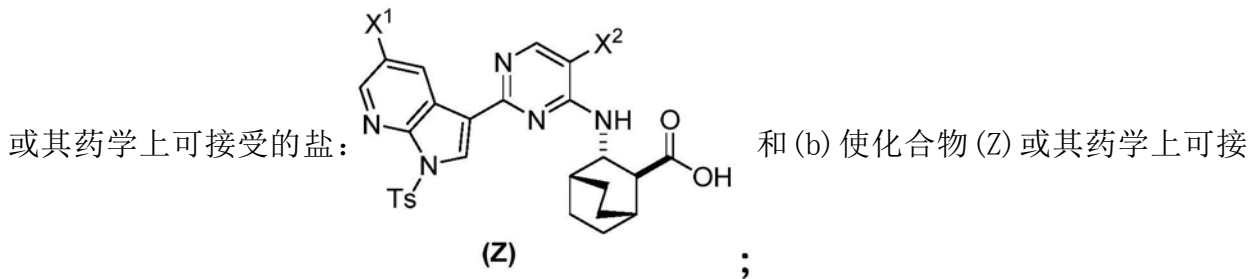


[0184] 化合物(2) (其中化合物(1)的 X^1 和 X^2 均为-F)及其药学上可接受的盐是流感病毒复制抑制剂,且可以用于治疗患者的流感,如W02010/148197中所述。在一个具体的实施方案中, X^1 是-F而 X^2 是-F。在另一个具体的实施方案中, X^1 是-Cl而 X^2 是-F。在另一个具体的实施方案中, X^1 是-Cl而 X^2 是-Cl。在另一个具体的实施方案中, X^1 是-F而 X^2 是-Cl。

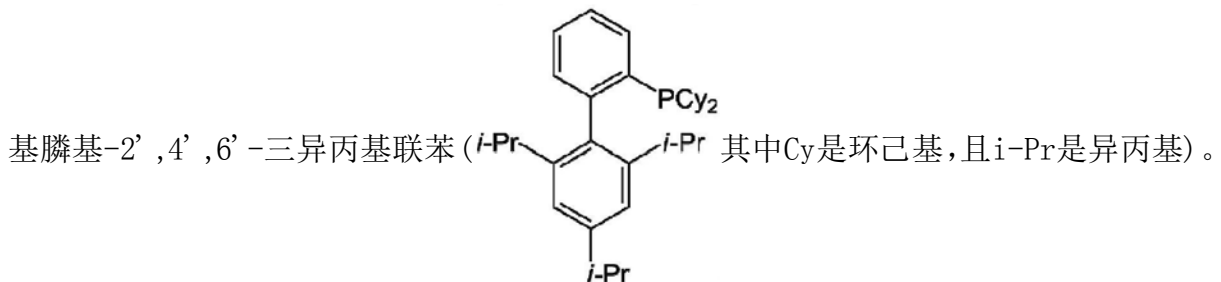
[0185] 在一个实施方案中,化合物(1)和(2)及其药学上可接受的盐可以如方案1中所述



在钯-XPhos配合物和磷酸盐或碳酸盐碱的存在下反应,形成化合物(Z)



受的盐的甲苯磺酰基(Ts)基团脱保护。 X^1 是-F或-Cl;Ts是甲苯磺酰基;且XPhos是2-二环己



[0186] 钯-XPhos配合物可以用作预先制备的试剂,或者可以在原位制备。在一个具体的实施方案中,钯-Xphos配合物通过混合Pd(0)或Pd(II)源与XPhos制备。Pd(0)或Pd(II)源的

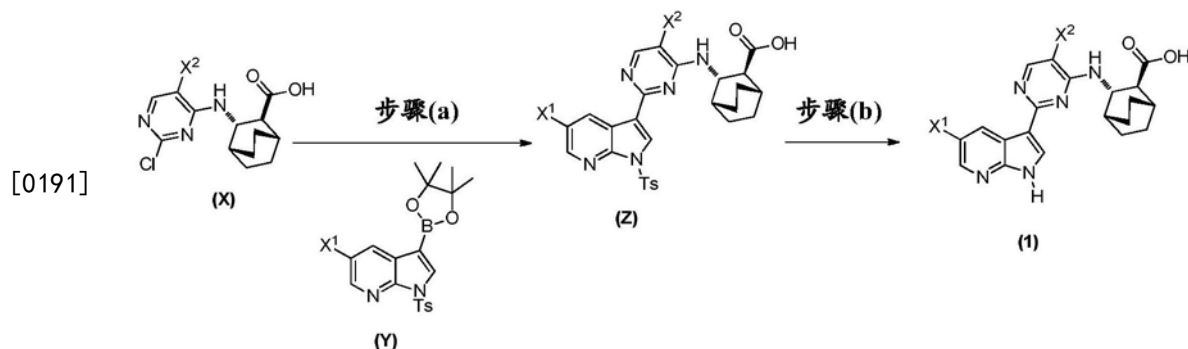
典型实例包括Pd₂(dba)₃、Pd(OAc)₂和PdCl₂,其中dba是二亚苄基丙酮,且OAc是乙酸盐。在一个具体的实施方案中,钯-XPhos配合物通过混合Pd(OAc)₂和XPhos在原位制备。

[0187] 化合物(X)或其药学上可接受的盐和化合物(Y)的反应在磷酸盐或碳酸盐碱的存在下进行。磷酸盐或碳酸盐碱的典型实例包括Na₂CO₃、K₂CO₃、K₃PO₄和Na₃PO₄。在一个具体的实施方案中,所述碱包括K₂CO₃或K₃PO₄。在另一个具体的实施方案中,所述碱包括K₂CO₃。在另一个实施方案中,所述碱包括K₃PO₄。

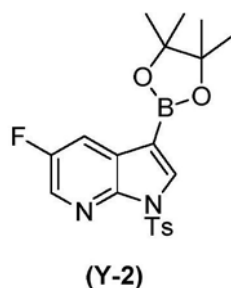
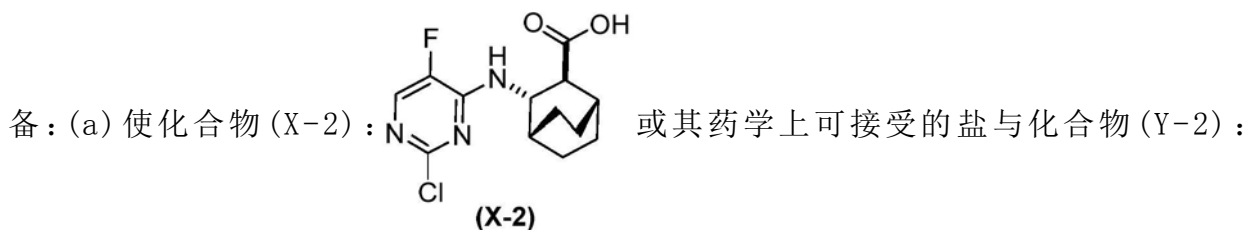
[0188] 化合物(X)或其药学上可接受的盐和化合物(Y)的反应在适合的溶剂系统中进行。在一个具体的实施方案中,该反应在包括水和选自2-MeTHF或THF或其组合的有机溶剂的溶剂系统中进行。在另一个具体的实施方案中,该反应在包括水和THF的溶剂系统中进行。在另一个具体的实施方案中,该反应在包括水和2-MeTHF的溶剂系统中进行。

[0189] 脱保护步骤(b)可以在本领域已知用于使甲苯磺酰基基团脱保护的任意适合的条件下进行。在一个具体的实施方案中,脱保护步骤使用无机氢氧化物处理化合物(Z)或其药学上可接受的盐。适合的无机氢氧化物的典型实例包括LiOH、NaOH和KOH。在一个具体的实施方案中,使用LiOH。在另一个具体的实施方案中,脱保护步骤(b)使用在包括THF的溶剂系统中的LiOH。

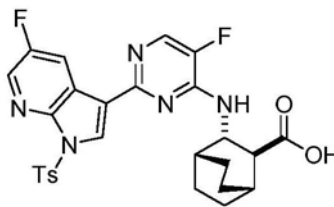
[0190] 方案1:



[0192] 在另一个实施方案中,化合物(2)及其药学上可接受的盐可以如方案1-A中所述制备:

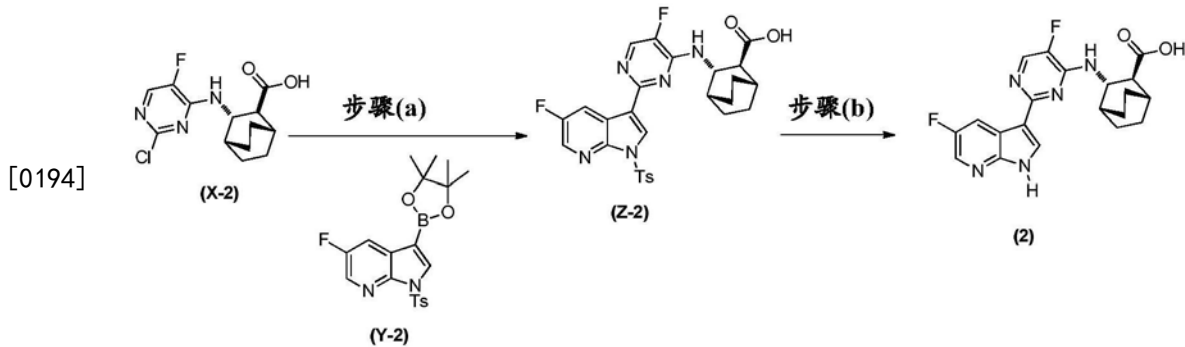


在钯-XPhos配合物和磷酸盐或碳酸盐碱的存在下反应,形成化合物(Z-2)

或其药学上可接受的盐： (Z-2) ;

和 (b) 使化合物 (Z-2) 或其药学上可接受的盐的甲苯磺酰基 (Ts) 基团脱保护。用于步骤 (a) 和 (b) 各自的适合的反应条件及其具体实例 (包括磷酸盐或碳酸盐碱) 如上述方案1中所述。

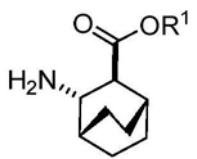
[0193] 方案1-A:

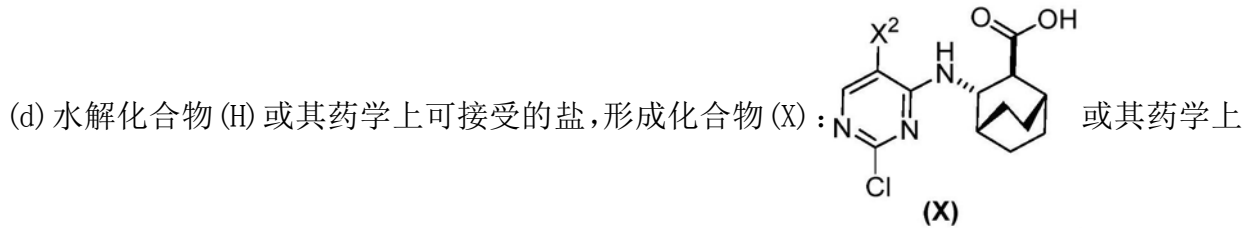
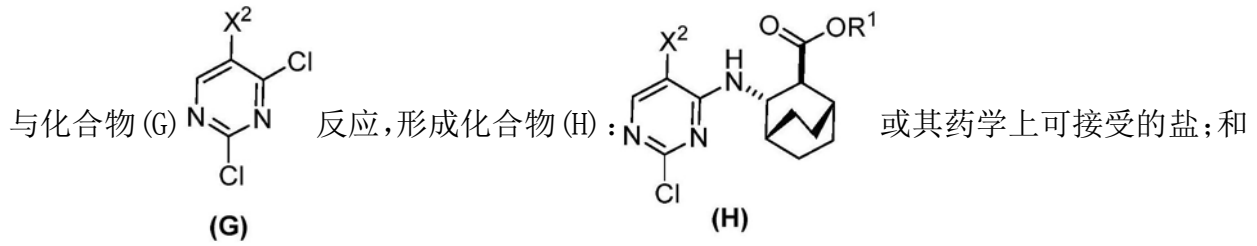


[0195] 在另一个实施方案中,方案1和1-A的步骤 (a) (例如化合物 (X) 和 (Y) 的反应和化合物 (X-2) 和 (Y-2) 的反应) 还可以在反应后使用Pd清除剂 (例如树脂或碳), 然后对Ts基团进行脱保护步骤 (b), 以便除去或减少任何残留的Pd催化剂的量。适合的Pd清除剂的典型实例包括聚苯乙烯-结合的三巯基三嗪树脂 (例如MP-TMP树脂)。

[0196] 如方案1和1-A中所述,本发明用于制备化合物 (1) 和 (2) 及其药学上可接受的盐的方法使用化合物 (X) 和 (Z), 它们各自具有游离羧酸基团。不期望受到特定理论约束,应用化合物 (X) 和 (Z) 而不是相应的其酯类可以更便利地和有效地提供对映体纯的化合物 (1) 和 (2) 及其药学上可接受的盐,因为化合物 (X) 和 (Z) 典型地为固体,而相应的其酯类为油状物。油状材料与固体材料相比一般难以纯化,这尤其是可以在大规模制备中影响终产物的总收率和/或对映体纯度,例如化合物 (1) 和 (2) 或其药学上可接受的盐的商业化生产过程中。具体地,化合物 (X) 和 (Z) 的相应的酯类通常进行差向异构化 (例如,在化合物 (X) 至化合物 (Z) 的Suzuki反应过程中和化合物 (Z) 的Ts的脱甲苯磺酰化过程中), 这可以影响终产物的总收率和/或对映体纯度。

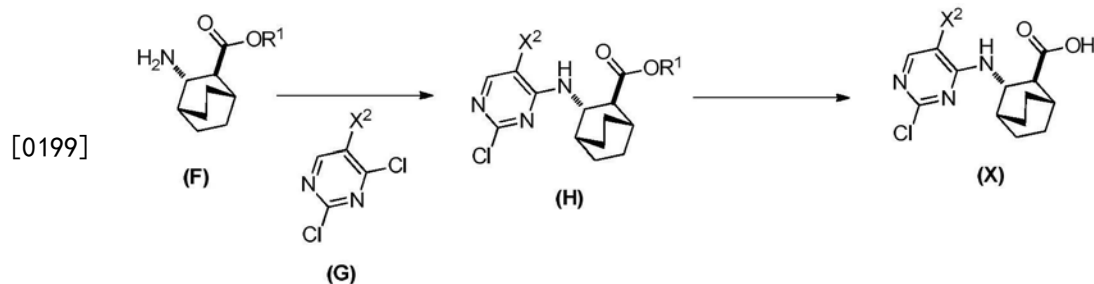
[0197] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用化合物 (X) 及其药学上可接受的盐的制

备,如下方案2中所述。该制备包含: (c) 使化合物 (F) 或其药学上可接受的盐: (F)



可接受的盐。 R^1 是 C_{1-4} 烷基, 例如乙基或甲基。在一个具体的实施方案中, R^1 是乙基。在另一个具体的实施方案中, R^1 是甲基。

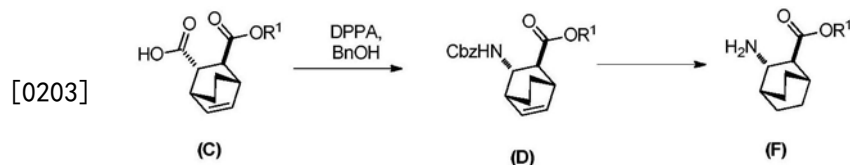
[0198] 方案2:



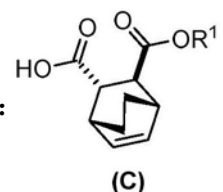
[0200] 化合物 (G) 和化合物 (F) 或其药学上可接受的盐之间的偶合 (步骤c) 和化合物 (H) 或其药学上可接受的盐的水解 (步骤d) 可以在本领域已知的任意适合的条件下进行。在一个具体的实施方案中, 化合物 (F) 或其药学上可接受的盐和化合物 (G) 之间的偶合在 15°C — 40°C (例如 25°C — 35°C) 的温度下、在碱例如胺碱的存在下进行。这类胺碱的典型实例包括N,N,二异丙基乙胺、三乙胺、N,N-二乙基甲胺等。在另一个具体的实施方案中, 化合物 (H) 或其药学上可接受的盐的水解在碱、例如无机碱的存在下进行。这类无机碱的典型实例包括LiOH、NaOH、KOH等。在另一个具体的实施方案中, 水解通过在 20°C — 50°C 、例如 35°C — 50°C (例如 45°C) 温度下用LiOH处理化合物 (H) 或其药学上可接受的盐来进行。

[0201] 在另一个实施方案中, 本发明的方法使用化合物 (F) 或其药学上可接受的盐的制备, 如下方案3中所述。

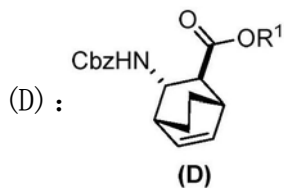
[0202] 方案3:



[0204] 化合物 (F) 或其药学上可接受的盐的制备包含: (e) 使化合物 (C) :

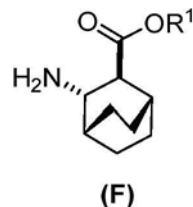


或其药学上可接受的盐与二苯基磷酰基叠氮化物 (DPPA) 且然后与苄醇反应, 形成化合物



或其药学上可接受的盐; (f) 使化合物 (D) 或其药学上可接受的盐与H₂

在披Pd碳催化剂 (Pd (0) /C) 的存在下反应, 形成化合物 (F)



或其药学上可接受

的盐。Cbz是羧苄基。

[0205] 化合物 (C) 或其药学上可接受的盐与DPPA和与苄醇反应, 形成化合物 (D) 或其药学上可接受的盐, 该反应可以在适合于Curtius重排的任何条件下进行。不期望受到特定理论约束, 在Curtius重排过程中, 通过DPPA与化合物 (C) 或其药学上可接受的盐反应形成酰基氮烯中间体, 然后重排成异氰酸酯中间体。该异氰酸酯中间体随后与苄醇反应, 产生化合物 (D) 或其药学上可接受的盐的Cbz-保护的胺。在一个具体的实施方案中, Curtius重排在60°C-100°C、例如90°C-100°C或95°C-100°C的温度下进行。在一个具体的实施方案中, 该反应在碱、例如胺碱的存在下进行。这类胺碱的典型实例包括三乙胺、N,N,二异丙基乙胺、N,N-二乙基甲胺等。在另一个具体的实施方案中, Curtius重排使用流式仪器在升温、例如90°C-110°C下进行。

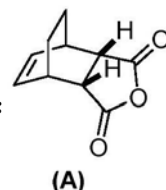
[0206] 化合物 (D) 或其药学上可接受的盐的双键氢化和Cbz基团的脱保护可以在本领域已知用于双键一般氢化和Cbz基团脱保护的任意适合的条件下进行。在一个具体的实施方案中, 化合物 (D) 或其药学上可接受的盐与H₂在披Pd (0) 碳催化剂 (Pd/C)、例如10% (基于干重的重量) Pd/C的存在下反应。在另一个具体的实施方案中, 用HCl的乙醇溶液处理化合物 (D) 或其药学上可接受的盐与H₂的反应产物, 形成化合物 (F) 的HCl盐。

[0207] 在另一个实施方案中, 本发明的方法使用化合物 (C) 或其药学上可接受的盐的制备, 如下方案4中所述。

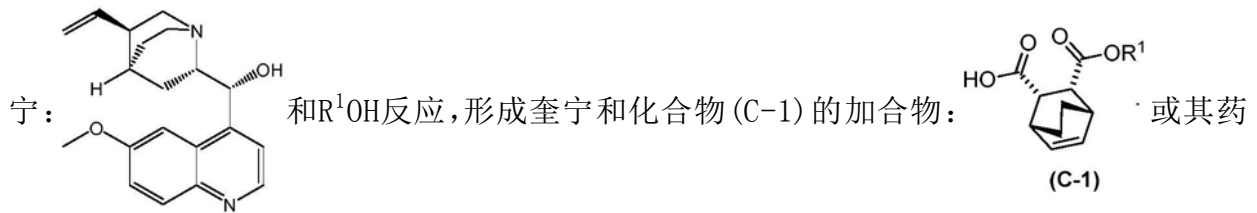
[0208] 方案4:



[0210] 化合物 (C) 或其药学上可接受的盐的制备包含: (g) 使化合物 (A):



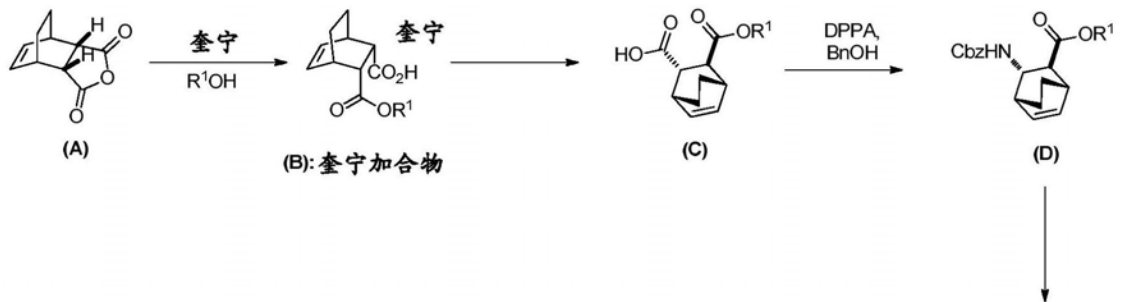
与奎



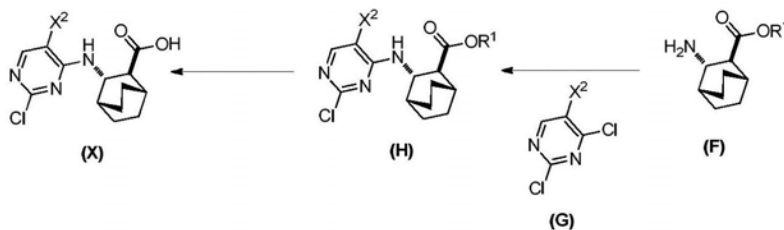
学上可接受的盐; (h) 通过用HCl处理该加合物打断加合物,形成化合物(C-1)或其药学上可接受的盐,其中R¹是C₁₋₄烷基(例如甲基、乙基、丙基、异丙基或丁基);与使化合物(C-1)或其药学上可接受的盐差向异构化成化合物(C)或其药学上可接受的盐。在一个具体的实施方案中。R¹是乙基。化合物(C-1)或其药学上可接受的盐的差向异构化可以在本领域已知的任意适合的条件下进行。典型地,该过程通过用碱例如醇盐处理进行。在一个具体的实施方案中,使用C₁₋₆醇盐(例如碱金属(例如钠或钾)或碱土金属(例如钙或镁)C₁₋₆醇盐)。在另一个具体的实施方案中,使用叔丁醇盐(例如叔戊醇钾)或叔戊醇盐(例如叔戊醇钾)。

[0211] 在一个具体的实施方案中,本发明的方法使用化合物(X)或其药学上可接受的盐的制备,如下方案5中所述。

[0212] 方案5:

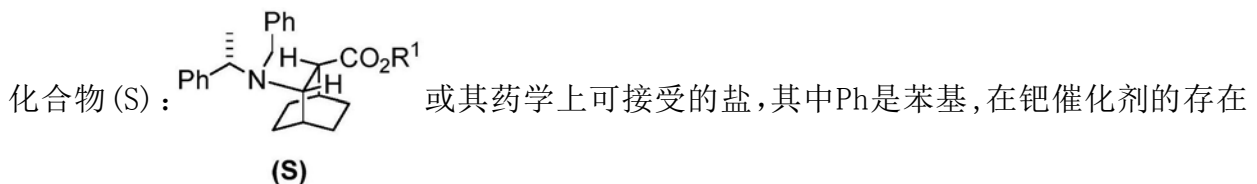


[0213]



[0214] 用于方案5的每个步骤的适合的反应条件及其具体实例如上所述。

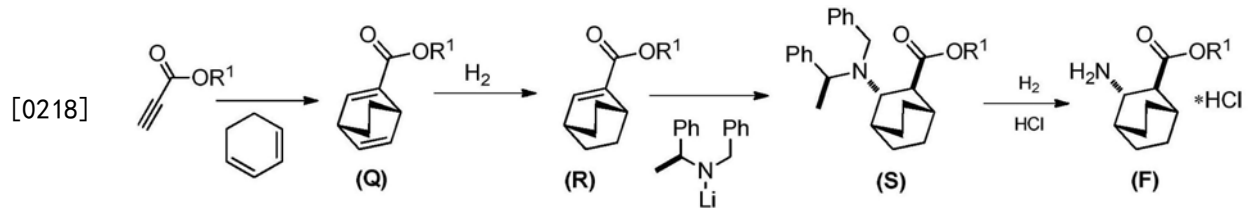
[0215] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用化合物(F)或其药学上可接受的盐的制备。在一个具体的实施方案中,制备化合物(F)的HCl盐(例如参见方案6)。该制备包含氢解

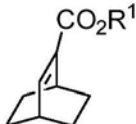


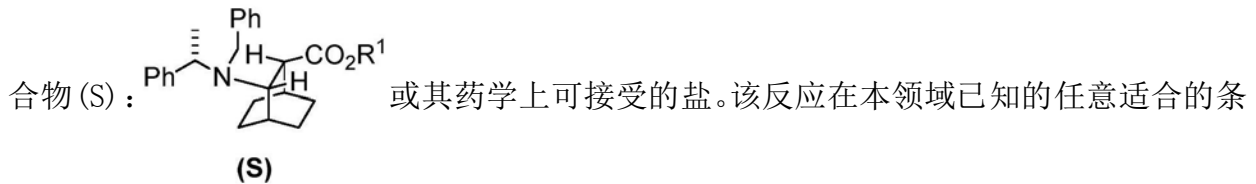
下,形成化合物(F)或其药学上可接受的盐,其中Ph是苯基。典型地,氢解是指一种化学反应,其中碳-碳或碳-氢(例如N、O或S)单键被裂解或被氢进行“裂解”。不期望受到特定理论约束,在化合物(S)或其药学上可接受的盐的氢解过程中,化合物(S)的-N(CH₂Ph)(CH(CH₃)Ph)的碳-氮键被裂解。典型地,氢解使用氢气催化进行。用于氢解步骤的钯催化剂的适合的实例包括披Pd(0)碳(Pd/C)、披Pd(OH)₂碳(Pd(OH)₂/C)及其组合。

[0216] 在一个具体的实施方案中,氢解步骤在HCl(例如37.7wt%的水溶液)的存在下进行并且生成化合物(F)的HCl盐。

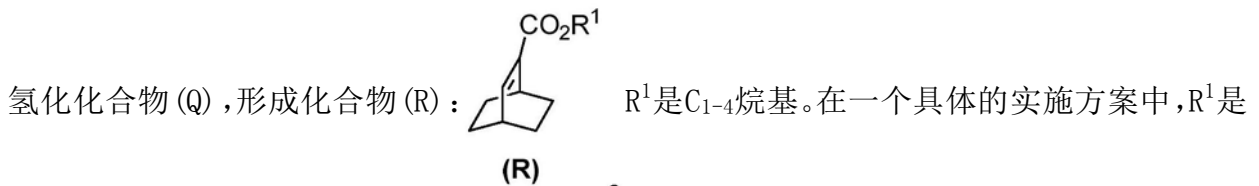
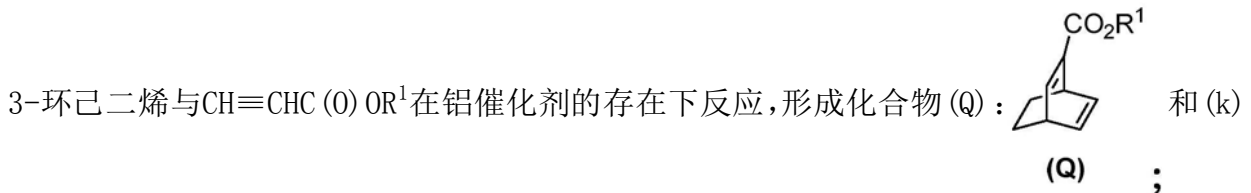
[0217] 方案6:



[0219] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用化合物(S)或其药学上可接受的盐的制备。该制备包含:使化合物(R):  与S-(-)-N-苄基-α-甲基苄基氨基锂反应,形成化



[0220] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用化合物(R)的制备。该制备包含:(j)使1,

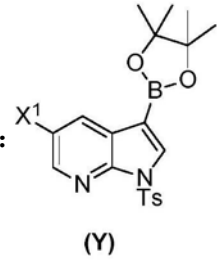


乙基。在另一个具体的实施方案中,R¹是甲基。

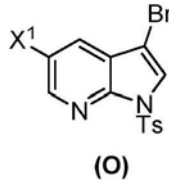
[0221] 上述段落中的步骤(j)是1,3-环己二烯与CH≡CHC(O)OR¹之间的狄尔斯-阿德耳反应。本领域已知用于狄尔斯-阿德耳反应的任意适合的铝催化剂可以用于步骤(j)。适合的铝催化剂的实例包括EtAlCl₂(Et=乙基)、Et₂AlCl和AlCl₃和三辛基铝的混合物。上述段落的氢化步骤(k)可以在本领域已知用于一般氢化的任意适合的条件下进行。在一个具体的实施方案中,步骤(k)包含使化合物(Q)与H₂在Rh(I)或中毒Pd(O)催化剂的存在下反应。Rh(I)催化剂的适合的实例包括(PPh₃)₃RhCl和(PPh₃)₃RhCl和丙炔酸乙酯的混合物,其中Ph是苯基。中毒Pd(O)催化剂是指Pd(O)催化剂,其中另一种化合物与其活性表面位置化学键合,以调节Pd反应性。中毒位置不再加速与推定催化的催化剂反应。通常,中毒催化剂可以用于改善反应的选择性。中毒Pd(O)催化剂的适合的实例包括披铅中毒Pd(O)CaCO₃催化剂(Pd

(Pb) /CaCO₃)。

[0222] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用制备化合物(Y)的方法:



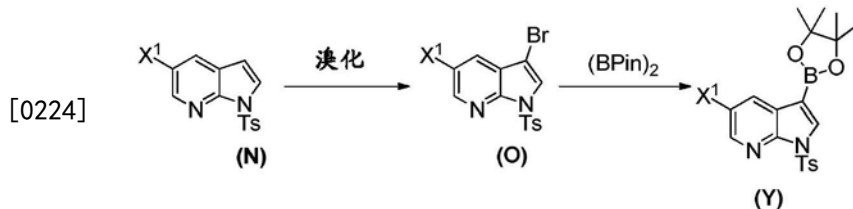
化合物(Y)的制备包含:使化合物(O):



与双(频哪醇合)二硼在钯催化剂的存在

下反应,形成化合物(Y)。参见,例如,方案7:

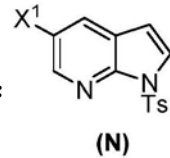
[0223] 方案7:



[0225] 适合的钯催化剂的典型实例包括Pd (Ph₃P)₄。

[0226] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用使化合物(O)与双(频哪醇合)二硼在钯催化剂的存在下反应,以便制备化合物(Y),并且进一步使用化合物(O)的制备,如上述方案

8中所示。化合物(O)的制备包含用溴化剂溴化化合物(N):

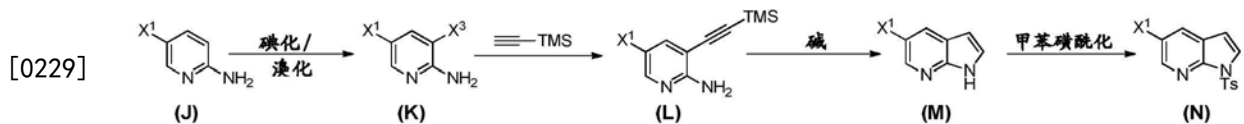


溴化剂的典型实

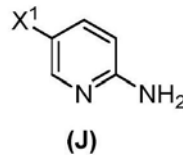
例包括Br₂、NBS和DBDMH,其中NBS是N-溴琥珀酰亚胺,且DBDMH是1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲。在一个具体的实施方案中,溴化剂包括Br₂或NBS。在另一个具体的实施方案中,溴化剂包括NBS。在另一个具体的实施方案中,溴化剂包括Br₂。

[0227] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用化合物(N)的制备,如方案8中所述。

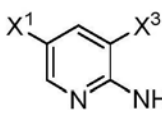
[0228] 方案8:



[0230] 化合物(N)的制备包含:(1)使化合物(J):

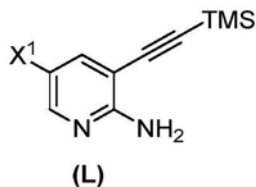


或其药学上可接受的盐与

碘化剂或溴化剂反应,形成化合物(K):  或其药学上可接受的盐; (m) 使化合物

(K)

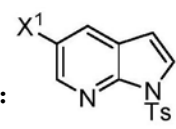
(K) 或其药学上可接受的盐与三甲基甲硅烷基乙炔反应,形成化合物(L):



或其药学上可接受的盐; (n-1) 使化合物(L) 或其药学上可接受的盐与

C₁₋₆醇盐碱反应,形成化合物(M):  或其药学上可接受的盐; 和 (p) 使化合物(M)

(M)

或其药学上可接受的盐甲苯磺酰化,形成化合物(N):  其中X¹是-F或-Cl; X³是-

(N) ,

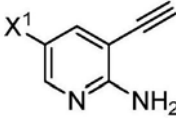
Br或-I; TMS是三甲基甲硅烷基; 且Ts是甲苯磺酰基。

[0231] 方案8中的碘化或溴化可以使用本领域已知的适合的条件和试剂进行。溴化剂的典型实例包括Br₂、NBS和DBDMH, 其中NBS是N-溴琥珀酰亚胺, 且DBDMH是1, 3-二溴-5, 5-二甲基乙内酰脲。碘化剂的典型实例包括I₂、ICl和NIS, 其中NIS是N-碘琥珀酰亚胺。在一个具体的实施方案中, 使用溴化。在另一个具体的实施方案中, 通过应用Br₂使用溴化。在另一个具体的实施方案中, 通过应用NBS使用溴化。在另一个具体的实施方案中, 使用碘化。在另一个具体的实施方案中, 通过应用I₂使用碘化。

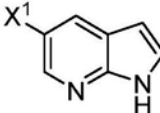
[0232] 化合物(K) 或其药学上可接受的盐与三甲基甲硅烷基乙炔的反应可以在本领域已知用于芳基卤与三甲基甲硅烷基乙炔之间的Sonogashira偶合的任意适合的条件下进行。典型地, 该反应在钯催化剂和/或卤化亚铜(I) 催化剂的存在下进行。卤化亚铜(I) 的典型实例包括CuI。钯催化剂的典型实例包括Pd (Ph₃P)₄ (Ph=苯基)、Pd (PPh₃)₂Cl₂、Pd (dppf)₂Cl₂ (dppf=1, 1'-双(二苯基膦基)二茂铁)、Pd (acac)₂ (acac=乙酰丙酮)、PdCl₂ (PCy₃)₂ (Cy=环己基)、Pd₂ (dba)₃ (dba=二亚苄基丙酮) 和其任意的组合。在一个具体的实施方案中, 该过程在钯催化剂和/或卤化亚铜(I) 催化剂的存在下进行。在另一个具体的实施方案中, 该过程在胺碱(例如C₁₋₄烷基胺, 例如三乙胺、N,N, 二异丙基乙胺、N,N-二乙基甲胺) 和钯催化剂和/或卤化亚铜(I) 催化剂的存在下进行。在另一个具体的实施方案中, 该过程在CuI和选自Pd (Ph₃P)₄、Pd (PPh₃)₂Cl₂、Pd (dppf)₂Cl₂或其任意的组合的Pd催化剂的存在下进行。在另一个具体的实施方案中, 该过程在C₁₋₄烷基胺(例如三乙胺) 和CuI和选自的Pd (Ph₃P)₄、Pd (PPh₃)₂Cl₂、Pd (dppf)₂Cl₂或其任意的组合Pd催化剂的存在下进行。

[0233] 化合物(L) 或其药学上可接受的盐与C₁₋₆醇盐碱的反应的步骤(n) 也可以使用本领域已知的适合的条件和试剂进行。C₁₋₆醇盐的典型实例如上所述。具体实例包括叔戊醇盐、叔丁醇盐和甲醇盐(例如叔戊醇钾、叔丁醇钾和甲醇钠) 及其任意的组合。在一个具体的实

实施方案中,使用叔丁醇钾。在另一个具体的实施方案中,步骤(n)包含使化合物(L)或其药

学上可接受的盐与甲醇钠反应,形成化合物(P):  或其药

(P)

学上可接受的盐,随后与叔丁醇钾和/或叔戊醇钾反应,形成化合物(M):  或其药

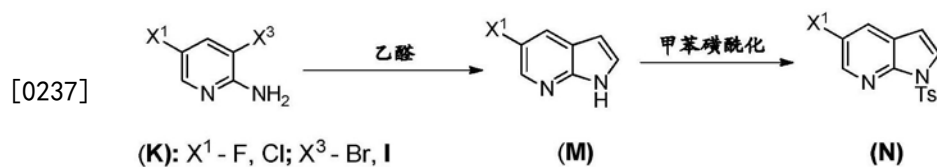
(M)

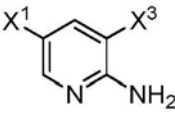
[0234] 甲苯磺酰化步骤(p)可以在本领域已知用于甲苯磺酰化的任意适合的条件下进行。在一个具体的实施方案中,甲苯磺酰化步骤通过使化合物(M)或其药

学上可接受的盐与TsCl反应来进行。

[0235] 在另一个实施方案中,本发明使用化合物(N)的制备,如方案9中所述。

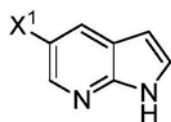
[0236] 方案9:



[0238] 该制备包含:(q)使化合物(K):  或其药

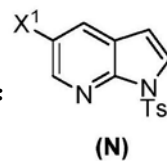
(K)

学上可接受的盐与乙醛在钯催



(M)

学上可接受的盐,其中X³是-Br或-I;和(p)使化合物(M)或其药



(N)

[0239] 用于化合物(K)或其药

学上可接受的盐与乙醛反应的钯催化剂的典型实例包括(二亚苄基丙酮)钯和叔膦配体PR₃的混合物,其中R是

[0240] C₁₋₆烷基或C₅₋₆环烷基。叔膦配体PR₃的典型实例包括P(^tBu)₃、PCy₃、P(*i*-Pr)₃、P(Bu)₃、PEt₃、PMe₃或其混合物。在一个具体的实施方案中,使用P(^tBu)₃。

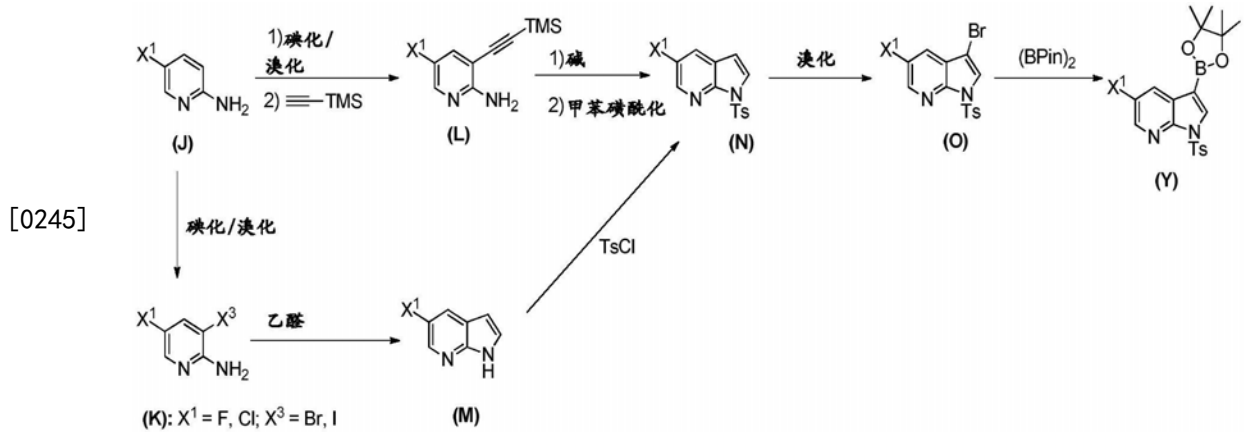
[0241] 在一个具体的实施方案中,如方案10中所述的化合物(N)的制备还包含用碳酸盐碱、例如Na₂CO₃处理化合物(K)或其药

学上可接受的盐与乙醛的反应混合物,然后进行甲苯磺酰化步骤,形成化合物(N)。

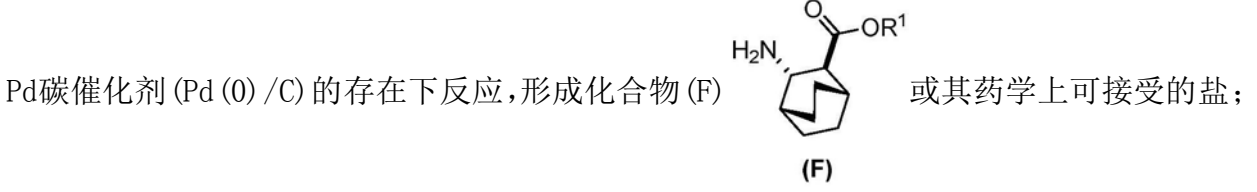
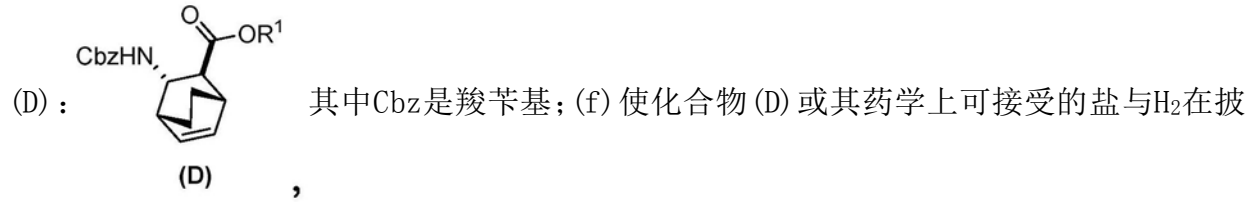
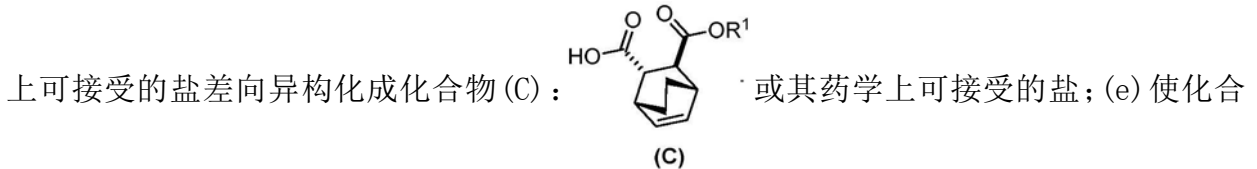
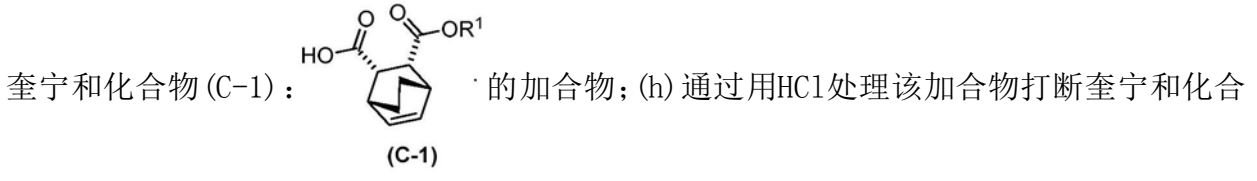
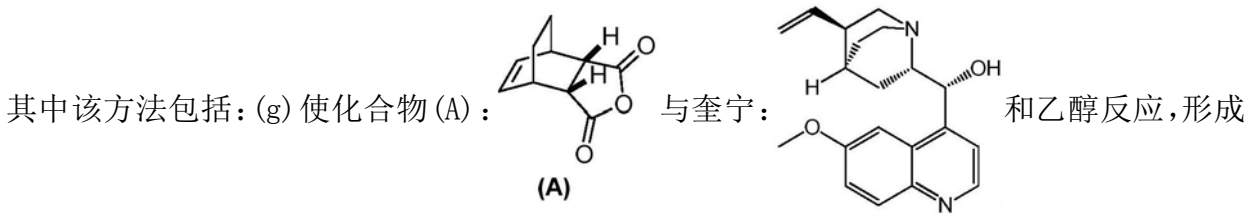
[0242] 甲苯磺酰化步骤(p)可以在本领域已知用于甲苯磺酰化的任意适合的条件下进行。在一个具体的实施方案中,甲苯磺酰化步骤通过使反应化合物(M)或其药

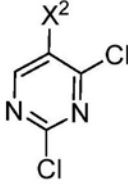
[0243] 在另一个实施方案中,本发明的方法使用如方案10中所述的化合物(Y)的制备。方案11的每个步骤的实例和条件独立地如上所述。

[0244] 方案10:

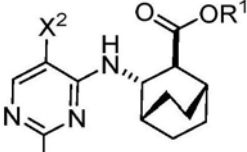


[0246] 在另一个实施方案中,本发明的方法用于制备化合物(1)或其药学上可接受的盐,

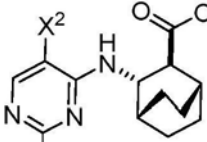


(c) 使化合物 (F) 或其药学上可接受的盐与化合物 (G) 反应： 形成化合物 (H)：

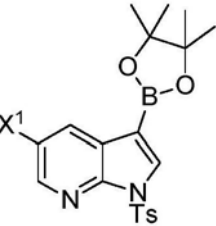
(G) ,

 或其药学上可接受的盐；(d) 水解化合物 (H) 或其药学上可接受的盐，形

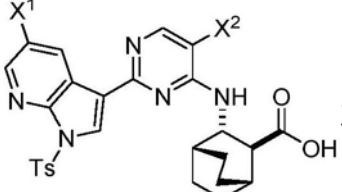
(H)

成化合物 (X)； 或其药学上可接受的盐；(a) 使化合物 (X) 或其药学上可接

(X)

受的盐与化合物 (Y)： 在钯催化剂的存在下反应，形成化合物 (Z)：

(Y)

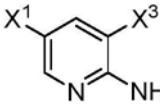
 或其药学上可接受的盐；和 (b) 使化合物 (Z) 或其药学上可接受的

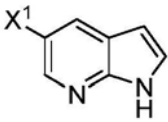
(Z)

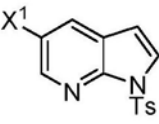
盐的Ts具体脱保护，形成化合物 (1) 或其药学上可接受的盐。 X^1 和 X^2 各自独立地是-F或-Cl；且 R^1 是乙基。适合的条件和试剂，包括用于每个步骤的具体条件和试剂如上述对方案1-10所述。在一个具体的实施方案中，化合物 (X) 或其药学上可接受的盐与化合物 (Y) 反应的步骤a) 在钯-XPhos配合物和磷酸盐或碳酸盐碱的存在下进行。磷酸盐和碳酸盐碱的具体实例如上所述。在另一个具体的实施方案中，化合物 (X) 或其药学上可接受的盐与化合物 (Y) 反应的步骤 (a) 在溶剂系统中进行，所述溶剂系统包括水和选自2-甲基THF或THF或其组合的有机溶剂。在另一个具体的实施方案中，脱保护步骤 (b) 包括用选自LiOH、NaOH和KOH的无机氢氧化物处理化合物 (Z) 或其药学上可接受的盐。在另一个具体的实施方案中，脱保护步骤 (b) 包括用LiOH在包括THF的溶剂系统中处理化合物 (Z) 或其药学上可接受的盐。在另一个具体的实施方案中，化合物 (D) 的氢化步骤 (d) 包含使化合物 (D) 与 H_2 在披Pd碳催化剂 (Pd/C) 的存在下反应。在另一个实施方案中，化合物 (C-1) 或其药学上可接受的盐的差向异构化通过用 C_{1-6} 醇盐处理该化合物来进行。 C_{1-6} 醇盐的具体实例如上所述。

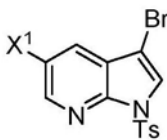
[0247] 在另一个具体的实施方案中,本发明的方法用于制备化合物(2)或其药学上可接受的盐,其中该方法包括上述段落中的步骤(a)–(i),其中 X^1 和 X^2 各自独立地是-F,且 R^1 是乙基。用于每个步骤的适合的反应条件及其具体实例如上述对化合物(1)或其药学上可接受的盐制备所述。

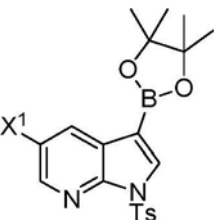
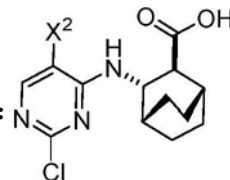
[0248] 在另一个实施方案中,本发明的方法用于制备化合物(1)或其药学上可接受的盐。

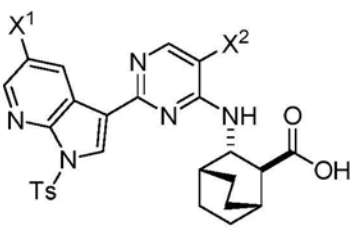
该方法包括:(q)使化合物(K)或其药学上可接受的盐:与乙醛在钯催化剂的存
(K)

在下反应,形成化合物(M):或其药学上可接受的盐;(p)使化合物(M)或其药学
(M)

上可接受的盐甲苯磺酰化,形成化合物(N):; (s)溴化化合物(N),形成化合物
(N) ;

(O):; (t)使化合物(O)与双(频哪醇合)二硼在钯催化剂的存在下反应,形成化
(O) ;

合物(Y):; (a)使化合物(X):或其药学上可接受的盐与化
(Y) ; (X)

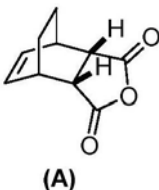
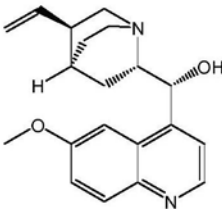
合物(Y)在钯催化剂的存在下反应,形成化合物(Z):或其药学上
(Z)

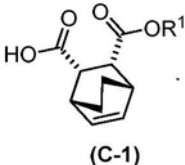
可接受的盐;和(b)使化合物(Z)或其药学上可接受的盐的Ts基团脱保护,形成化合物(1)或其药学上可接受的盐。 X^1 和 X^2 各自独立地是-F或-Cl;且 X^3 是-Br,用于每个步骤的适合的条件和试剂,包括具体的条件和试剂如上述对方案1-11中所述。在一个具体的实施方案中,化合物(X)与化合物(Y)反应的步骤(a)在钯-XPhos配合物和磷酸盐或碳酸盐碱的存在下进行。磷酸盐和碳酸盐碱的具体实例如上所述。在另一个具体的实施方案中,化合物(X)或其药学上可接受的盐与化合物(Y)的反应步骤(a)在溶剂系统中进行,所述溶剂系统包括水和

选自2-甲基THF或THF或其组合的有机溶剂。在另一个具体的实施方案中,脱保护步骤(b)包含用选自LiOH、NaOH和KOH的无机氢氧化物处理化合物(Z)或其药学上可接受的盐。在另一个具体的实施方案中,脱保护步骤(b)包含用LiOH在包括THF的溶剂系统中处理化合物(Z)或其药学上可接受的盐。在另一个具体的实施方案中,化合物(K)或其药学上可接受的盐与乙醛反应的步骤(q)的钯催化剂包括双(二亚苄基丙酮)钯和叔膦配体PR₃的混合物,其中R是C₁₋₆烷基或C₅₋₆环烷基。在另一个具体的实施方案中,所述叔膦配体包括P(^tBu)₃。

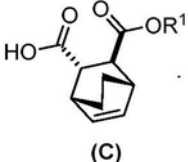
[0249] 在另一个具体的实施方案中,本发明的方法用于制备化合物(2)或其药学上可接受的盐,其中该方法包括上述段落中的步骤(a)–(f),其中X¹和X²各自独立地是–F。用于每个步骤的适合的反应条件及其具体实例如上述用于制备化合物(1)或其药学上可接受的盐所述。

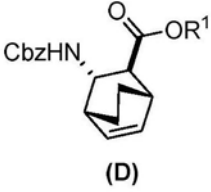
[0250] 在另一个实施方案中,本发明的方法用于制备化合物(2)或其药学上可接受的盐。

该方法包括:(g)使化合物(A):  与奎宁:  和乙醇反应,形成奎宁

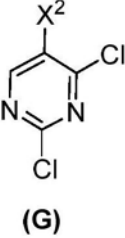
和化合物(C-1):  的加合物;(h)通过用HCl处理该加合物打断奎宁和化合物

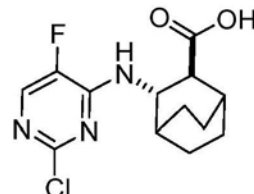
(C-1)的加合物,形成化合物(C-1)或其药学上可接受的盐;(i)使化合物(C-1)差向异构化

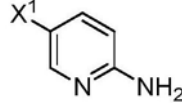
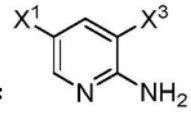
成化合物(C):  或其药学上可接受的盐;(e)使反应化合物(C)与二苄基磷酰基

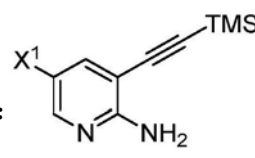
叠氮化物且然后与苄醇反应,形成化合物(D):  (f)使化合物(D)或其药学上

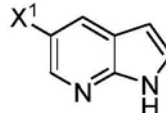
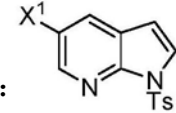
可接受的盐与H₂在的存在下被Pd碳催化剂(Pd(0)/C),形成化合物(F)的HCl盐;(r)使化合

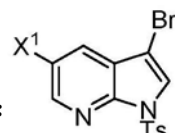
物(F)的HCl盐与化合物(G)反应:  形成化合物(H):  (h-1)水

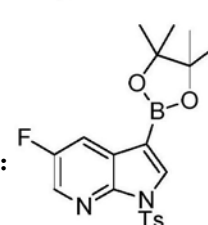
解化合物 (H), 形成化合物 (X-2):  (X-2) ; (1) 碘化或溴化化合物 (J):

 (J) , 形成化合物 (K):  (K) ; (m) 使化合物 (K) 与三甲基甲硅烷基乙炔反

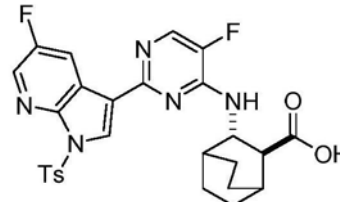
应, 形成化合物 (L):  (L) ; (n) 使化合物 (L) 与C₁₋₆醇盐反应, 形成化合物 (M):

 (M) ; (p) 使化合物 (M) 甲苯磺酰化, 形成化合物 (N):  (N) ; (s) 溴化化合物

(N), 形成化合物 (O):  (O) ; (t) 使化合物 (O) 与双(频哪醇合)二硼在Pd(Ph₃P)₄的存

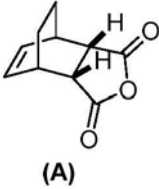
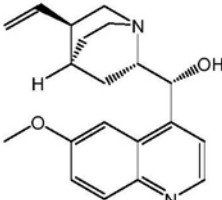
在下反应, 形成化合物 (Y-2):  (Y-2) ; (a) 使化合物 (X-2) 与化合物 (Y-2) 在钯-

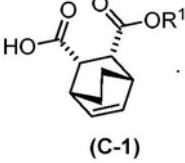
XPhos配合物和K₂CO₃或K₃PO₄的磷酸盐或碳酸盐碱的存在下选自反应, 形成化合物 (Z-2):

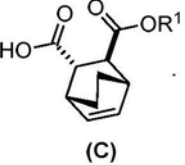
 (Z-2) 或其药学上可接受的盐; 和 (b) 使化合物 (Z-2) 或其药学上可接受

的盐的Ts基团脱保护, 形成化合物 (2) 或其药学上可接受的盐。R¹各自独立地是乙基; X¹各自独立地是-F; X²各自独立地是-F; 且X³各自独立地是-Br或-I。用于每个步骤的适合的条件和试剂, 包括具体的条件和试剂如上述对方案1-11中所述。

[0251] 在另一个实施方案中, 本发明涉及制备化合物 (C) 或其药学上可接受的盐的方法。

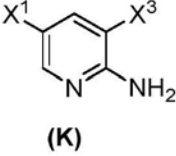
该方法包括：(g) 使化合物 (A)： 与奎宁： 和乙醇反应，形成奎宁

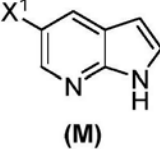
和化合物 (C-1)： 的加合物；(h) 通过用HCl处理该加合物打断奎宁和化合物

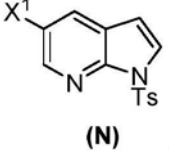
(C-1) 的加合物，形成化合物 (C-1) 或其药学上可接受的盐；和 (i) 使化合物 (C-1) 差向异构化成化合物 (C)： 或其药学上可接受的盐。不期望受到特定理论约束，奎宁和

具有R¹为乙基的化合物 (C) 的加合物从奎宁和化合物 (A) 的反应混合物中沉淀出来，可以得到化合物 (C)，为99%以上的对映体纯形式。

[0252] 在另一个实施方案中，本发明涉及制备化合物 (N) 的方法。该方法包括：(q) 使化合

物 (K)： 或其药学上可接受的盐与乙醛在钯催化剂的存在下反应，形成化合物

(M)： 或其药学上可接受的盐，其中X¹是-F或-Cl，且X³是-Br或-I；和 (p) 使化合

物 (M) 或其药学上可接受的盐甲苯磺酰化，形成化合物 (N)： 在一个具体的实

施方案中，X¹是-F。在另一个具体的实施方案中，X³是-Br。在另一个具体的实施方案中，X¹是-F，且X³是-Br。不期望受到特定理论约束，方案9的化合物 (N) 的制备具有超过方案8的几个优点(化合物 (K) → 化合物 (N)) 的方面在于方案9的化合物 (N) 的制备提供更好的收率和总体较少的过滤。它对于大规模反应而言还是成本有效的，例如商业化规模反应，这归因于乙醛相对低于三甲基硅烷基乙炔的成本。

[0253] 在另一个实施方案中，本发明的方法在上述方案1的步骤 (b) 的脱保护后，还使用用HCl处理化合物 (1)，形成化合物 (1) 的HCl盐。在一个具体的实施方案中，HCl处理在包括水和一种或多种有机溶剂的溶剂系统中进行，形成化合物 (1) 的HCl盐，其中所述有机溶剂独立地选自II类有机溶剂，其选自：氯苯、环己烷、1,2-二氯乙烯、二氯甲烷、1,2-二甲氧基乙烷、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、1,4-二噁烷、2-乙氧基乙醇、甲酰胺、己烷、2-甲氧基乙醇、甲基丁基酮、甲基环己烷、N-甲基吡咯烷酮、硝基甲烷、吡啶、环丁砜、四氢呋喃

(THF)、四氢萘、甲苯、1,1,2-三氯乙烯和二甲苯;或III类有机溶剂,其选自:乙酸、丙酮、茴香醚、1-丁醇、2-丁醇、乙酸丁酯、叔丁基甲基醚、枯烯、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、3-甲基-1-丁醇、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、2-甲基-1-丙醇、乙酸乙酯、乙醚、甲酸乙酯、戊烷、1-戊醇、1-丙醇、2-丙醇和乙酸丙酯。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统的有机溶剂选自:氯苯、环己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、1,2-二甲氧基乙烷、甲酰胺、己烷、2-甲氧基乙醇、甲基丁基酮、甲基环己烷、硝基甲烷、四氢萘、二甲苯、甲苯、1,1,2-三氯乙烯、丙酮、茴香醚、1-丁醇、2-丁醇、乙酸丁酯、叔丁基甲基醚、枯烯、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、甲酸乙酯、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、3-甲基-1-丁醇、甲基乙基酮、2-甲基-1-丙醇、戊烷、1-丙醇、1-戊醇、2-丙醇、乙酸丙酯、四氢呋喃和甲基四氢呋喃。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统的有机溶剂选自:2-乙氧基乙醇、乙二醇、甲醇、2-甲氧基乙醇、1-丁醇、2-丁醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丙醇、乙醇、1-戊醇、1-丙醇、2-丙醇、甲基丁基酮、丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、吡啶、甲苯和二甲苯。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统包括水和丙酮或者是水和异丙醇。

[0254] 在另一个实施方案中,本发明的方法在上述方案1-A的脱保护步骤(b)后,还使用用HCl处理化合物(2),形成化合物(2)的HCl盐。适合的溶剂系统,包括具体实例如上述对化合物(1)所述。

[0255] 适合于方案1-11的每个步骤的具体示例性条件如下文示例性部分中所述,其可以各自和独立地用于本发明的方法。

[0256] 上述本发明的方法可以用于制备化合物(1)或其药学上可接受的盐的具体固体形式。例如,化合物(1)可以以不同的多晶型形式存在或形成不同的多晶型。正如本领域已知的,多态现象是化合物作为一种以上不同的结晶或“多晶型”种类结晶的能力。多晶型物是具有至少两种不同的排列的化合物的固体结晶相或该化合物的固态的多晶型。任意指定的化合物的多晶型被定义为相同的化学式或组成且在化学结构方面为两种不同的化学化合物的晶体结构。一般地,可以用分析方法表征不同的多晶型物,例如X-射线粉末衍射(XRPD)图案、热重分析法(TGA)和示差扫描量热法(DSC)或使用其熔点或其它本领域已知的技术。本文所用的术语“多晶型”包括溶剂合物和不具有任何溶剂合物的净多晶型。注意,化合物(1)和化合物(1)的盐可以为溶剂化或非-溶剂化的,另有指定的除外。此外,注意,化合物(1)和化合物(1)的盐可以为结晶或无定形形式,另有指定的除外。

[0257] 化合物(1)或其药学上可接受的盐的固体形式的实例是化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的多晶型A。这种形式是化合物(1)的HCl盐的多晶型,其作为溶剂合物包括每个化合物(1)半当量的水。在一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A表征为具有XRPD图案与在 10.5 ± 0.2 、 5.2 ± 0.2 、 7.4 ± 0.2 和 12.8 ± 0.2 的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A表征为具有XRPD图案,其具有在如下实施例的表3A中列出的位置的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。XRPD图案在室温下使用Cu K α 射线得到。在另一个具体的实施方案中,化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的多晶型A的特征为在¹³C SSNMR光谱上在29.2、107.0、114.0和150.7(± 0.3 ppm)具有峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A表征为具有在实施例的表3B中列出的¹³C SSNMR峰。

[0258] 化合物(1)或其药学上可接受的盐的固体形式的另一个实例是化合物(1)的HCl盐·3H₂O的多晶型F。这种形式是化合物(1)的HCl盐的多晶型,其作为溶剂合物包括每个化合物(1)3当量的水。在一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F表征为具有XRPD图案,其具有在 7.1 ± 0.2 、 11.9 ± 0.2 和 12.4 ± 0.2 的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F表征为具有XRPD图案,其具有在如下实施例的表5中列出的位置的 $2-\theta$ (度)表示的特征峰。XRPD图案在室温下使用Cu K α 射线得到。在另一个具体的实施方案中,化合物(1)的HCl盐·3H₂O的多晶型F的特征为在C¹³SSNMR光谱上在20.7、27.4、104.8、142.5、178.6(± 0.3 ppm)具有峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F表征为具有在实施例的表6中列出的C¹³SSNMR峰。

[0259] 化合物(1)或其药学上可接受的盐的固体形式的另一个实例是化合物(1)的HCl盐的多晶型D。这种形式是化合物(1)的HCl盐的非溶剂化形式。在一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐的形式D表征为具有XRPD图案,其具有在 5.8 ± 0.2 、 17.1 ± 0.2 和 19.5 ± 0.2 的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐的形式D表征为具有XRPD图案,其具有在如下实施例的表7中列出的位置的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。XRPD图案在室温下使用Cu K α 射线得到。在另一个具体的实施方案中,化合物(1)的HCl盐的形式D的特征为在C¹³SSNMR光谱上在29.4、53.4、113.3、135.4、177.8(± 0.3 ppm)具有峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的HCl盐的形式D表征为具有在实施例的表8中列出的C¹³SSNMR峰。

[0260] 化合物(1)或其药学上可接受的盐的固体形式的另一个实例是化合物(1)的多晶型A。这种形式是化合物(1)的非溶剂化的游离碱形式。在一个具体的实施方案中,将化合物(1)的形式A表征为具有XRPD图案与在 15.5 ± 0.2 、 18.9 ± 0.2 和 22.0 ± 0.2 的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的形式A表征为具有XRPD图案,其具有在如下实施例的表10中列出的位置的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。XRPD图案在室温下使用Cu K α 射线得到。在另一个具体的实施方案中,化合物(1)的形式A的特征为在C¹³SSNMR光谱上在21.0、28.5、50.4、120.8、138.5和176.2(± 0.3 ppm)具有峰。在另一个具体的实施方案中,将化合物(1)的形式A表征为具有在实施例的表11中列出的C¹³SSNMR峰。

[0261] 化合物(1)或其药学上可接受的盐的固体形式的另一个实例是化合物(1)的甲苯磺酸盐的多晶型A。这种形式是化合物(1)的甲苯磺酸盐的非溶剂化形式。在一个具体的实施方案中,将化合物(1)的甲苯磺酸盐的形式A表征为具有XRPD图案,其具有在如下实施例的表14中列出的位置上的 $2-\theta$ (度)测定的特征峰。XRPD图案在室温下使用Cu K α 射线得到。

[0262] 化合物(1)或其药学上可接受的盐的固体形式的另外的实例是化合物(1)的2-MeTHF溶剂合物。在一个具体的实施方案中,该溶剂合物包括0.5-1.5当量的2-MeTHF/化合物(1),例如1当量的2-MeTHF/化合物(1)。在另一个具体的实施方案中,该溶剂合物包括1当量的2-MeTHF且表征为具有实施例的表12中列出的一些XRPD峰。

[0263] 化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A可以通过使用混合(例如搅拌)氯化氢(HCl)与化合物(1)来制备。化合物(1)可以是溶剂化的、非溶剂化的、无定形的或结晶的。可以将化合物(1)的溶液、淤浆或混悬液与HCl在包括水和一种或多种有机溶剂的溶剂系统中混合,其中所述溶剂系统具有等于或大于0.05和等于或小于0.85即0.05-0.85的水活度。作为本领域中已知使用的术语“水活度”(a_w)是指溶剂系统中水的能力状态的测量值。将其定义

为液体的蒸气压除以相同温度下的纯水的蒸气压。具体地,将其定义为 $a_w = \frac{p}{p_0}$, 其中 p 是水在该物质中的蒸气压,且 p_0 是纯水在相同温度下的蒸气压;或为 $a_w = l_w \times x_w$, 其中 l_w 是水的活度系数,且 x_w 是水在水部分中的摩尔分数。例如,纯水具有 1.0 的水活度值。水活度值可以典型地使用电容湿度计或露点湿度计得到。不同类型的水活度测量仪器也可以商购得到。或者,两种或多种溶剂的混合物的水活度值可以基于溶剂的量和溶剂的已知的水活度值计算。

[0264] 化合物 (1) 的结晶的实例包括化合物 (1) 的形式 A。化合物 (1) 的溶剂合物包括 2-MeTHF、N,N-甲醇、二甲苯、丙酮、2-丁醇、乙酸甲酯、1-戊醇、2-丙醇、四氢呋喃, 甲基四氢呋喃、二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、1,4-二噁烷、1-戊醇、2-甲基-1-丙醇、甲基乙基酮、3-甲基-1-丁醇、庚烷、甲酸乙酯、1-丁醇、乙酸和乙二醇的溶剂合物。在一个具体的实施方案中,使用 2-MeTHF 的溶剂合物 (例如化合物 (1) • 1 (2-MeTHF))。

[0265] 适合于制备化合物 (1) 的 HCl 盐 • 1/2H₂O 的形式 A 的溶剂系统可以由多种水和有机溶剂的组合组成,其中溶剂系统的水活度等于或大于 0.05 且等于或小于 0.85 (0.05-0.85)。在一个具体的实施方案中,水活度值为 0.4-0.6。适合的有机溶剂包括国际药品注册协调会议指导原则 (International Conference on Harmonization Guidelines) 中列出的 II 类或 III 类有机溶剂。适合的 II 类有机溶剂的具体实例包括氯苯、环己烷、1,2-二氯乙烯、二氯甲烷、1,2-二甲氧基乙烷、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、1,4-二噁烷、2-乙氧基乙醇、甲酰胺、己烷、2-甲氧基乙醇、甲基丁基酮、甲基环己烷、N-甲基吡咯烷酮、硝基甲烷、吡啶、环丁砜、四氢呋喃 (THF)、四氢萘、甲苯、1,1,2-三氯乙烯和二甲苯。适合的 III 类有机溶剂的具体实例包括:乙酸、丙酮、茴香醚、1-丁醇、2-丁醇、乙酸丁酯、叔丁基甲基醚、枯烯、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、3-甲基-1-丁醇、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、2-甲基-1-丙醇、乙酸乙酯、乙醚、甲酸乙酯、戊烷、1-戊醇、1-丙醇、2-丙醇和乙酸丙酯。在一个具体的实施方案中,所述溶剂系统的有机溶剂选自:氯苯、环己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、1,2-二甲氧基乙烷、己烷、2-甲氧基乙醇、甲基丁基酮、甲基环己烷、硝基甲烷、四氢萘、二甲苯、甲苯、1,1,2-三氯乙烷、丙酮、茴香醚、1-丁醇、2-丁醇、乙酸丁酯、叔丁基甲基醚、枯烯、乙醇、乙酸乙酯、乙醚、甲酸乙酯、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、3-甲基-1-丁醇、甲基乙基酮、2-甲基-1-丙醇、戊烷、1-丙醇、1-戊醇、2-丙醇、乙酸丙酯、四氢呋喃和甲基四氢呋喃。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统的有机溶剂选自:2-乙氧基乙醇、乙二醇、甲醇、2-甲氧基乙醇、1-丁醇、2-丁醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丙醇、乙醇、1-戊醇、1-丙醇、2-丙醇、甲基丁基酮、丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、吡啶、甲苯和二甲苯。在另一个实施方案中,所述加入选自丙酮、正-丙醇、异丙醇、乙酸异丁酯和乙酸。在另一个实施方案中,所述有机溶剂选自丙酮和异丙醇。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统包括水和丙酮。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统包括水和异丙醇。

[0266] 化合物 (1) 的 HCl 盐 • 1/2H₂O 的形式 A 的制备可以在任意适合的温度下进行。典型地,在 5°C-75°C 温度下进行。在一个具体的实施方案中,在 15°C-75°C 温度下进行。在另一个具体的实施方案中,在 15°C-60°C 温度下进行。在另一个具体的实施方案中,在 15°C-35°C 温度下进行。在另一个具体的实施方案中,该制备在 5°C-75°C 温度下在具有 0.4-0.6 水活度值

的溶剂系统中进行。在另一个具体的实施方案中,该制备在15°C-75°C温度下在具有0.4-0.6的水活度值的溶剂系统中进行。在另一个具体的实施方案中,该制备在15°C-60°C温度下在具有0.4-0.6的水活度值的溶剂系统中进行。在另一个具体的实施方案中,该制备在15°C-35°C温度下在具有0.4-0.6的水活度值的溶剂系统中进行。

[0267] 可以将氯化氢(HCl)作为溶液或气体导入。适合的氯化氢源的一个实例是氯化氢的30-40重量百分比的水溶液(例如34wt%-38wt%)。

[0268] 化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F通过在包括水的溶剂系统或包括水和一种或多种有机溶剂的溶剂系统中混合HCl和化合物(1)制备,其中所述溶剂系统具有等于或大于0.9(≥0.9)的水活度。该混合物可以是溶液、淤浆或混悬液。化合物(1)可以是溶剂化的、非溶剂化的、无定形的或结晶的。或者,可以通过在包括水的溶剂系统或包括水和一种或多种有机溶剂的溶剂系统中搅拌化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A制备,其中所述溶剂系统具有等于或大于0.9的水活度。典型地,纯水具有1.0的水活度值。因此,具有0.9-1.0的水活度的溶剂系统适合于制备化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F。在一个具体的实施方案中,混合或搅拌在环境温度下进行(18°C-25°C)。在另一个具体的实施方案中,混合或搅拌在15°C-30°C温度下进行。在另一个具体的实施方案中,混合或搅拌在20°C-28°C(例如25°C)温度下进行。用于形成化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F的适合的有机溶剂,包括具体实例如上述对化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A所述。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统包括水和丙酮。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统包括水和异丙醇。

[0269] 可以通过使化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A脱水制备化合物(1)的HCl盐形式D。脱水可以通过任意适合的方式进行,例如加热或干氮气净化或它们两者。

[0270] 化合物(1)的形式A与通过下列步骤制备:(a)搅拌无定形化合物(1)或化合物(1)的溶剂合物(例如化合物(1)的2-MeTHF溶剂合物)在包括水和乙醇的溶剂系统中的混合物。该混合物可以是溶液或淤浆。在一个具体的实施方案中,搅拌步骤在18°C-90°C的温度下进行。在另一个具体的实施方案中,搅拌步骤(a)在溶剂系统的回流温度下进行。在另一个具体的实施方案中,所述溶剂系统包括水5-15wt%。化合物(1)的溶剂合物的实例如上所述。在一个具体的实施方案中,使用2-MeTHF的溶剂合物(例如化合物(1)·1(2-MeTHF))。

[0271] 在另一个实施方案中,制备化合物(1)的形式A的方法还包含:(b)在硝基甲烷中搅拌化合物(1)的无定形式,形成化合物(1)的形式A的晶种;和(c)将化合物(1)的形式A的晶种添加到混合步骤(a)中得到的混合物中。在一个具体的实施方案中,该方法还包含:(b)在硝基甲烷中搅拌化合物(1)的无定形式,形成化合物(1)的形式A的晶种;(c)将混合步骤(a)中得到的混合物冷却至18°C-60°C(例如50-55°C或55°C)的温度;和(d)将化合物(1)的形式A的晶种添加到得到的混合步骤(c)中。在另一个具体的实施方案中,该方法还包含添加水,然后添加化合物(1)的形式A的晶种至通过回流步骤得到的混合物中,其用量使得添加水后得到的溶剂系统包括15-25wt%的水。在另一个具体的实施方案中,该非还包含将水添加到包括化合物(1)的形式A的晶种的混合物中,其用量使得在添加水后得到的溶剂系统包括35-45wt%的水。在另一个具体的实施方案中,该方法还包含在添加水后,将包括化合物(1)的形式A的晶种的混合物冷却至0°C-10°C温度。

[0272] 在一个具体的实施方案中,化合物(1)的形式A的晶种可以使用化合物(1)的2-MeTHF溶剂合物在硝基甲烷中制备。在一个实施方案中,用于回流步骤的溶剂系统包括5-

15wt%、例如10wt%的水。

[0273] 化合物(1)的甲苯磺酸盐形式A通过搅拌无定形化合物(1)或化合物(1)的溶剂合物(例如化合物(1)的2-MeTHF溶剂合物、对-甲苯磺酸和包括乙腈的溶剂系统的混合物制备。在一个具体的实施方案中,混合或搅拌步骤在环境温度下进行。在另一个具体的实施方案中,混合或搅拌步骤在15°C-30°C温度下进行。在另一个具体的实施方案中,混合或搅拌步骤在20°C-30°C(例如25°C)温度下进行。化合物(1)的溶剂合物的适合的实例,包括具体实例如上述用于制备化合物(1)的形式A所述。

[0274] 在另一个实施方案中,本发明涵盖化合物(1)及其药学上可接受的盐的无定形形式,例如无定形化合物(1)的HCl盐和无定形化合物(1)。在另一个实施方案中,本发明还涵盖化合物(1)水合物的形式B。化合物(1)水合物的形式B是与化合物(1)的形式A的同晶型,其显示与化合物(1)的形式A相同的XRPD峰,但在水的存在下、例如在具有大于0.6例如0.6-1.0的水活度的溶剂系统中、在环境温度下形成。

[0275] 本发明涵盖上述分离形式的、纯形式的或在与其它材料例如化合物(I)的其它形式(即化合物(1)的无定形形式、形式A等)或任意其它材料混合时作为固体组合物形式的化合物(1)的多晶型。

[0276] 在一个方面,本发明提供多晶型,例如化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A,化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F,化合物(1)的HCl盐的形式D,化合物(1)的形式A,化合物(1)水合物的形式B和化合物(1)的甲苯磺酸盐形式的形式A,其为分离的固体形式。在另一个方面,本发明提供化合物(1)及其药学上可接受的盐的无定形形式,例如无定形化合物(1)的HCl盐和无定形化合物(1),其为分离的固体形式。

[0277] 在另一个方面,本发明提供多晶型,例如化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A,化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F,化合物(1)的HCl盐的形式D,化合物(1)的形式A,化合物(1)水合物的形式B和化合物(1)的甲苯磺酸盐形式的形式A,其为纯的形式。纯的形式是指具体的多晶型占超过95%(w/w)、例如超过98%(w/w)、超过99%(w/w%)、超过99.5%(w/w)或超过99.9%(w/w)。在另一个方面,提供化合物(1)或其药学上可接受的盐的无定形形式,其为纯的形式。纯的形式是指无定形形式超过95%(w/w),例如,超过98%(w/w)、超过99%(w/w%)、超过99.5%(w/w)或超过99.9%(w/w)。

[0278] 更具体地,本发明提供组合物形式的多晶型或多晶型物与一种或多种结晶、溶剂合物、无定形或其它多晶型的混合物或其组合。例如,在一个实施方案中,组合物包含化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A与一种或多种另外的化合物(1)的多晶型,例如无定形形式、溶剂合物、化合物(1)的HCl盐的形式D、化合物(1)HCl盐·3H₂O的形式F、化合物(1)的形式A和/或其它形式或其组合。类似地,在另一个实施方案中,组合物包含化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F与一种或多种化合物(1)的另外的多晶型,例如无定形形式、溶剂合物、化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A、化合物(1)的HCl盐的形式D、化合物(1)的形式A和/或其它形式或其组合。类似地,在另一个实施方案中,组合物包含化合物(1)的HCl盐的形式D与一种或多种化合物(1)的另外的多晶型,例如无定形形式、溶剂合物、化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A、化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F、化合物(1)的形式A和/或其它形式或其组合。在另一个实施方案中,组合物包含化合物(1)的甲苯磺酸盐的形式A与一种或多种化合物(1)的另外的多晶型,例如无定形形式、水合物、溶剂合物和/或其它形式或其组合。在

另一个实施方案中,组合物包含化合物(1)的形式A与一种或多种化合物(1)的另外的多晶型,例如无定形形式、水合物、溶剂合物和/或其它形式或其组合。更具体地,组合物可以包含痕量至100%的具体的多晶型或任意用量,例如,0.1%-0.5%、0.1%-1%、0.1%-2%、0.1%-5%、0.1%-10%、0.1%-20%、0.1%-30%、0.1%-40%或0.1%-50%重量,以化合物(1)在组合物中的总量为基准。或者,组合物可以包含至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%重量的具体多晶型,以化合物(1)在组合物中的总量为基准。

[0279] 本文所述的化合物在本文中根据其化学结构和/或化学名称定义。如果化合物根据化学结构和化学名称指定,但化学结构和化学名称出现矛盾,则化学结构是化合物身份的决定因素。

[0280] 本领域技术人员应当理解,在本发明的方法中,起始试剂或中间体化合物上的一些官能团例如羟基或氨基基团需要用保护基保护,因此,上述化合物的制备可以在不同阶段包括添加和除去一个或多个保护基。官能团的保护和脱保护描述在“Protective Groups in Organic Chemistry.”,J.W.F.McOmie编辑,Plenum Press(1973)和“Protective Groups in Organic Synthesis,”第3版,T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Wiley Interscience和“Protecting Groups,”第3版,P.J.Kocienski,Thieme(2005)中。

[0281] 出于本发明的目的,根据第75版《物理化学手册》CAS版本的元素周期表鉴定化学元素。另外,在“Organic Chemistry”,Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999和“March's Advanced Organic Chemistry”,第5版,编辑:Smith,M.B.和March,J.,John Wiley&Sons,New York:2001中描述了有机化学的总则,其全部内容据此通过引用并入。

[0282] 如本文使用的术语“脂族”或“脂族基”指完全饱和或含有一个或多个不饱和单元,但为非芳香族的直链(即,无支链)或支链烃链。除非另有说明,脂族基含有1-10个脂族碳原子。在一些实施方案中,脂族基含有1-6个脂族碳原子,并且在其它实施方案中,脂族基含有1-4个脂族碳原子。脂族基可能为线性或支链、经取代或未经取代的烷基、烯基或炔基。具体实例包括但不限于甲基、乙基、异丙基、正丙基、仲丁基、乙烯基、正丁烯基、乙炔基和叔丁基和乙炔。

[0283] 术语“脂环族基团”(或“碳环”或“碳环基”或“碳环化合物”)是指仅包含一个非芳族。在一些实施方案中,碳原子数为3-10。在另外的实施方案中,碳原子数为4-7。在另外的实施方案中,碳原子数为5或6。该术语包括单环、双环或多环稠合的、螺或桥接的碳环系统。该术语还包括多环系统,其中碳环可以与一个或多个碳环或杂环或一个或多个芳族环“稠合”或其组合,其中连接残基或点位于碳环上。“稠合的”双环环系包含两个环,其共有两个相邻环原子。桥接双环基团包含两个环,其共有3或4个相邻环原子。螺双环系统共有1个环原子。脂环族基团的实例包括、但不限于环烷基和环烯基。具体实例包括、但不限于环己基、环丙烯基和环丁基。

[0284] 本文所用的术语“烷基”是指饱和直链或支链烃。在一些实施方案中,“烷基”是C₁-C₆烷基或C₁-C₄烷基。本文所用的术语“环烷基”是指饱和环状烃链。在一些实施方案中,“环烷基”是C₃-C₈烷基或C₅-C₆烷基。本文所用的“烷基”或“环烷基”各自可以任选地如下举出的被取代。

[0285] 烷基、脂族基团、环烷基或脂环族基团的饱和碳上的适合的取代基选自：卤素；-R^o；-OR^o；-SR^o；1,2-亚甲二氧基；1,2-亚乙二氧基；任选地被R^o取代的苯基(Ph)；任选地被R^o取代的-O(Ph)；任选地被R^o取代的-(CH₂)₁₋₂(Ph)；任选地被-R^o取代的-CH=CH(Ph)；-NO₂；-CN；-N(R^o)₂；-NR^oC(O)R^o；-NR^oC(S)R^o；

[0286] -NR^oC(O)N(R^o)₂；-NR^oC(S)N(R^o)₂；-NR^oCO₂R^o；-NR^oNR^oC(O)R^o；-NR^oNR^oC(O)N(R^o)₂；-NR^oNR^oCO₂R^o；-C(O)C(O)R^o；-C(O)CH₂C(O)R^o；-CO₂R^o；-C(O)R^o；-C(S)R^o；-C(O)N(R^o)₂；-C(S)N(R^o)₂；-OC(O)N(R^o)₂；-OC(O)R^o；-C(O)N(OR^o)R^o；-C(NOR^o)R^o；-S(O)₂R^o；-S(O)₃R^o；-SO₂N(R^o)₂；-S(O)R^o；-NR^oSO₂N(R^o)₂；-NR^oSO₂R^o；-N(OR^o)R^o；-C(=NH)-N(R^o)₂；或-(CH₂)₀₋₂NHC(O)R^o；其中R^o在每次出现时各自独立地选自氢、任选取代的C₁₋₆脂族基团、未取代的5-6元杂芳基或杂环、苯基、-O(Ph)或-CH₂(Ph)，或在同一或不同取代基上两次独立出现的R^o与各自键合R^o基团的原子一起形成5-8-元杂环基、碳环芳基或杂芳基环或3-8-元环烷基环，其中所述杂芳基或杂环基环具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。R^o的脂族基团上的任选取代基选自NH₂、NH(C₁₋₄脂族基团)、N(C₁₋₄脂族基团)₂、卤素、C₁₋₄脂族基团、OH、O(C₁₋₄脂族基团)、NO₂、CN、CO₂H、CO₂(C₁₋₄脂族基团)、O(卤代C₁₋₄脂族基团)或卤代C₁₋₄脂族基团、CHO、N(CO)(C₁₋₄脂族基团)、C(O)N(C₁₋₄脂族基团)，其中上述R^o的C₁₋₄脂族基团各自未被取代。另外的取代基包括：=O、=S、=NNHR*、=NN(R*)₂、=NNHC(O)R*、=NNHCO₂(C₁₋₄烷基)、=NNHSO₂(C₁₋₄烷基)或=NR*，其中R*各自独立地选自氢或任选取代的C₁₋₆脂族基团。R*的脂族基团上的任选取代基选自NH₂、NH(C₁₋₄脂族基团)、N(C₁₋₄脂族基团)₂、卤素、C₁₋₄脂族基团、OH、O(C₁₋₄脂族基团)、NO₂、CN、CO₂H、CO₂(C₁₋₄脂族基团)、O(卤代C₁₋₄脂族基团)或卤代(C₁₋₄脂族基团)，其中上述R*的C₁₋₄脂族基团各自未被取代。

[0287] 本文所用的术语“烷氧基”在本文中使用时是指如上述定义的烷基基团通过氧原子连接至分子(“烷氧基”，例如-O-烷基)。

[0288] 本文所用的术语“卤素”、“卤代”和“hal”是指F、Cl、Br或I。

[0289] 术语“卤代烷基”、“卤代烯基”、“卤代脂族基团”和“卤代烷氧基”是指烷基、烯基、脂族基团或烷氧基，在此情况中，可以被一个或多个卤原子取代。该术语包括全氟化烷基基团，例如-CF₃和-CF₂CF₃。

[0290] 如本文使用的“环”、“环状的”、“环状基团”或“环状部分”包括单、双和三环环系，包括每一个先前已定义的脂环族、杂环脂肪族、碳环芳基或杂芳基。

[0291] 如本文使用的“双环环系”包括形成2个环的8-12(例如，9、10或11)元结构，其中共有至少一个原子(例如，共有2个原子)。双环环系包括双环脂族(例如，双环烷基或双环烯基)、双杂环脂族、双碳环芳基和双环杂芳基。

[0292] 如本文使用的“桥连双环环系”指其中环为桥连的双杂环脂族环系或双环脂族环系。桥连双环环系的实例包括但不限于金刚烷基、降苧烷基、双环[3.2.1]辛基、双环[2.2.2]辛基、双环[3.3.1]壬基、双环[3.2.3]壬基、2-氧杂-双环[2.2.2]辛基、1-氮杂-双环[2.2.2]辛基、3-氮杂-双环[3.2.1]辛基和2,6-二氧杂-三环[3.3.1.03.7]壬基。桥连双环环系可任选由一个或多个取代基取代，例如烷基(包括羧基烷基、羟基烷基和卤代烷基(例如三氟甲基))、烯基、炔基、环烷基、(环烷基)烷基、杂环烷基、(杂环烷基)烷基、碳环芳基、杂芳基、烷氧基、环烷氧基、杂环烷氧基、(碳环芳基)氧基、杂芳氧基、芳烷氧基、杂芳烷氧基、芳酰基、杂芳酰基、硝基、羧基、烷氧基羰基、烷基羰基氧基、氨基羰基、烷基羰基氨基、

环烷基羰基氨基、(环烷基烷基)羰基氨基、(碳环芳基)羰基氨基、芳烷基羰基氨基、(杂环烷基)羰基氨基、(杂环烷基烷基)羰基氨基、杂芳基羰基氨基、杂芳烷基羰基氨基、氰基、卤代、羟基、酰基、巯基、烷基硫烷基、硫氧基、脲、硫脲、氨磺酰基、磺酰胺、氧代或氨甲酰基。

[0293] 如本文使用的术语“桥”指连接分子的两个不同部分的键或原子或未分支的原子链。将通过桥连接的两个原子(通常但并不总是两个叔碳原子)表示为“桥头”。

[0294] 如本文使用的术语“螺”指具有一个作为两个环之间唯一的共有原子的原子(通常为季碳原子)的环系。

[0295] 术语“环原子”为芳族基、环烷基环或非芳香族杂环中的原子,例如C、N、O或S。

[0296] 芳族基中的“可取代的环原子”为与氢原子结合的环境碳或氮原子。氢可任选地被适合的取代基基团替换。因此,术语“可取代的环原子”并不包括当两个环稠合时共用的环氮或碳原子。另外,“可取代的环原子”并不包括当结构描绘它们已经和除氢以外的部分连接的环境碳或氮原子。

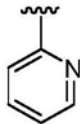
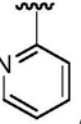
[0297] 术语“杂原子”指氧、硫、氮、磷或硅中的一个或多个(包括氮、硫、磷或硅的任何氧化形式;任何碱性氮的季铵化形式或杂环的可取代氮,例如N(如在3,4-二氢-2H-吡咯基中)、NH(如在吡咯烷基中)或NR⁺(如在N-取代的吡咯烷基中))。

[0298] 本发明涵盖的取代基和取代基组合的选择是导致形成稳定或化学上切实可行的化合物的那些。本文所用的术语“稳定的”是指在接触允许其生产、检测且特别是其回收、纯化和用于本文概括的目的的一个或多个时基本上不改变的化合物。在一些实施方案中,稳定的化合物或化学上切实可行的化合物是在保持在40°C或以下温度、在没有湿度或其它化学反应条件下保持至少1周基本上不改变的化合物。仅关注产生稳定结构的那些取代基选择和组合。这类选择和组合度与本领域技术人员显而易见且可以在不进行过度实验的情况下确定。

[0299] 如本文使用的术语“保护基”和“保护性基团”可交换使用并且指用于暂时阻碍多个反应部位的化合物中的一个或多个所需官能团的试剂。在某些实施方案中,保护基具有的一种或多种或特别是全部以下特征:a)以良好收率选择性加至官能团以产生保护性基质;b)对于在一个或多个其它反应部位发生的反应稳定;和c)可用不会攻击再生的去保护官能团的试剂以良好的收率选择性地去除。本领域的技术人员应了解,在一些情况下试剂并不攻击化合物中的其它反应基团。在其它情况下,试剂也可能与化合物中的其它反应基团反应。在Greene, T.W., Wuts, P.G.的“Protective Groups in Organic Synthesis”,第3版, John Wiley & Sons, New York: 1999(和本书的其它版本)中详述了保护基的实例,其全部内容据此通过引用并入。如本文使用的术语“氮保护基”指用于暂时阻碍多官能化合物中一个或多个所需氮反应部位的试剂。优选的氮保护基还具有以上对保护基例证的特征,并且Greene, T.W., Wuts, P.G.在“Protective Groups in Organic Synthesis”(第3版, John Wiley & Sons, New York: 1999)第7章中也详述了某些示例性氮保护基,其全部内容据此通过引用并入。

[0300] 如本文使用的术语“可替换的部分”或“离去基团”指与如本文定义的脂族或芳族基缔合并且通过受亲核试剂的亲核攻击将被替换的基团。

[0301] 除非另外注明,本文描绘的结构也意在包括结构的所有异构(例如,对映异构、非对映异构、顺-反、构象和旋转异构)形式。例如,每个不对称中心的R和S构型、(Z)和(E)双键

异构体和 (Z) 和 (E) 构象异构体包括在本发明内,除非特别画出仅一个异构体。正如本领域的技术人员应了解,取代基可围绕任何可旋转键自由旋转。例如,画为  也表示 。

[0302] 因此,本发明化合物的单个立体化学异构体以及光学异构、非对映异构体、顺/反、构象和旋转异构混合物在本发明范围之内。

[0303] 除非另有指示,否则本发明化合物的所有互补异构体形式均在本发明范围内。

[0304] 另外,除非另外注明,本文描绘的结构也意在包括仅在存在一个或多个富含同位素的原子方面不同的化合物。例如,除用氘或氚替换氢或用富含¹³C-或¹⁴C-的碳替换碳以外,具有现存结构的化合物在本发明范围之内。这种化合物可用作(例如)生物检定中的分析工具或探针。这种化合物,尤其是氘类似物在治疗上也有用。

[0305] 本文用其化学结构和/或化学名称定义本发明的化合物。当通过化学结构和化学名称来提及化合物,并且化学结构和化学名称相冲突时,由化学结构决定化合物的特性。

[0306] 本领域技术人员可以可以理解,本发明的化合物可以包含一个手性中心。由此通式化合物可以以两种不同的光学异构体存在(即(+)或(-)对映体)。所有这类对映体及其混合物包括外消旋混合物均包括在本发明范围内。可以通过本领域众所周知的方法,例如手性HPLC、酶拆分和手性助剂得到单一光学异构体或对映体。

[0307] 在一个实施方案中,提供单一对映体形式的本发明的化合物,其至少95%、至少97%和至少99%无相应的对映体。

[0308] 在另一个实施方案中,本发明的化合物为(+)对映体形式,其至少95%无相应的(-)对映体。

[0309] 在另一个实施方案中,本发明的化合物为(+)对映体形式,其至少97%无相应的(-)对映体。

[0310] 在另一个实施方案中,本发明的化合物为(+)对映体形式,其至少99%无相应的(-)对映体。

[0311] 在另一个实施方案中,本发明的化合物为(-)对映体形式,其至少95%无相应的(+)对映体。

[0312] 在另一个实施方案中,本发明的化合物为(-)对映体形式,其至少97%无相应的(+)对映体。

[0313] 在另一个实施方案中,本发明的化合物为(-)对映体形式,其至少99%无相应的(+)对映体。

[0314] III. 化合物的用途

[0315] 本文公开的化合物可以用于抑制生物样品或患者中的流感病毒复制,用于减少生物样品或患者中的流感病毒的量(降低病毒滴度)。在一个实施方案中,本发明一般涉及本文公开的化合物(例如药学上可接受的组合物中)在上述指定的任意用途中的应用。

[0316] 在又一实施方案中,本文公开的化合物可用于降低生物样品(例如,受感染的细胞培养物)或人类(例如,患者肺部的病毒滴度)中的病毒滴度。

[0317] 如本文使用的术语“流感病毒接介导的病状”、“流感感染”或“流感”可交换使用以指由感染流感病毒引起的疾病。

[0318] 流感是由流感病毒引起的影响鸟类和哺乳动物的传染病。流感病毒是正黏液病毒科的RNA病毒，正黏液病毒科包括5个属：A型流感病毒、B型流感病毒、C型流感病毒、ISA病毒和托高土病毒。A型流感病毒属有1个种，A型流感病毒，可基于对这些病毒的抗体反应将A型流感病毒细分为不同血清型H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3和H10N7。A型流感病毒的另一个实例包括H3N8和H7N9。B型流感病毒属有1个种，B型流感病毒。B型流感几乎专感染人类并且相比A型流感较不常见。C型流感病毒属有1个种，C型流感病毒，其感染人类和猪并且可引起严重疾病和地方性流行病。然而，C型流感相比其它类型较不常见并且通常似乎引起儿童的轻度疾病。

[0319] 在本发明的一些实施方案中，流感或流感病毒与A或B型流感病毒相关。在本发明的一些实施方案中，流感或流感病毒与A型流感病毒相关。在本发明的一些特定实施方案中，A型流感病毒为H1N1、H2N2、H3N2或H5N1。在本发明的一些实施方案中，A型流感病毒是H1N1、H3N2、H3N8、H5N1和H7N9。在本发明的一些特定实施方案中，A型流感病毒为H1N1、H3N2、H3N8和H5N1。

[0320] 在人类中，流感的常见症状是寒战、发烧、咽炎、肌肉痛、剧烈头痛、咳嗽、虚弱和全身不适。在更为严重的情况下，流感引起可致命的肺炎，尤其是在幼儿和老年人中。虽然常常和普通感冒混淆，但是流感是更为严重的疾病并且是由不同类型的病毒引起。特别是在儿童中，流感可引起噁心和呕吐，但是这些症状更多的特征在于无关的肠胃炎，有时称为“肠胃感冒”或“24小时流感”。

[0321] 感染后1-2天，流感症状可十分突然地开始。通常首发症状是寒战或畏寒，但感染中发烧也是常见的早期症状，体温范围为38-39°C (约100-103°F)。许多人病情严重到要卧床数天，全身疼痛，背部和腿部更严重。流感症状可能包括：身体疼痛，特别是关节和咽喉，极度寒冷和发烧、疲劳、头痛、刺激性流泪，眼睛、皮肤(特别是脸部)、口、咽喉和鼻子发红、腹痛(在患B型流感的儿童中)。流感症状与许多病原体(“类流感”)非特异性并发。通常，需要实验室数据以便确诊。

[0322] 术语“疾病”、“病症”和“病状”在此可交换使用以指流感病毒介导的医疗或病理状况。

[0323] 如本文使用的术语“受治疗者”和“患者”可交换地使用。术语“受治疗者”和“患者”指动物(例如，鸡、鹌鹑或火鸡等鸟类或哺乳动物)，特别是包括非灵长类动物在内的“哺乳动物”(例如，牛、猪、马、羊、兔、豚鼠、大鼠、猫、狗和小鼠)和灵长类动物(例如，猴子、黑猩猩和人类)，更特别的是人类。在一个实施方案中，受治疗者为非人类动物，例如家畜(例如，马、牛、猪或羊)或宠物(例如，狗、猫、豚鼠或兔)。在一个优选的实施方案中，受治疗者为“人类”。

[0324] 如本文使用的术语“生物样品”包括但不限于细胞培养物或其提取物、从哺乳动物获得的活组织检查物质或其提取物、血液、唾液、尿、粪便、精液、眼泪或其它体液或其提取物。

[0325] 如本文使用的术语“感染复数”(multiplicity of infection)或“MOI”是感染物(例如，噬菌体或病毒)与感染对象(例如，细胞)之比。例如，当涉及一群接种了感染性病毒颗粒的细胞时，感染复数或MOI是由一个孔中沉淀的感染性病毒颗粒数量除以该孔中存在的靶细胞数量而确定的比例。

[0326] 如本文使用的术语“抑制流感病毒的复制”包括减少病毒复制的量(例如,减少至少10%)和完全阻止病毒复制(即,100%减少病毒复制的量)。在一些实施方案中,流感病毒复制被抑制至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少90%或至少95%。

[0327] 可通过本领域已知的任何适合方法测量流感病毒复制。例如,可测量在生物样品(例如感染细胞培养物)或人类(例如,患者体内的肺部病毒滴度)中的流感病毒滴度。更特别地,对于基于细胞的检测而言,在所有情况下在体外培养细胞,在试验试剂存在或不存在下将病毒加入培养物中,并且在适当时间后评估病毒依赖型终点。对于典型检测而言,可使用马-达二氏犬肾细胞(MDCK)和标准组织培养适合的流感菌株A/Puerto Rico/8/34。在本发明中可使用的第一类细胞检测依赖于感染靶细胞的死亡,这是一个称为细胞病理效应(CPE)的过程,其中病毒感染引起细胞资源耗尽和细胞最终溶解。在第一类细胞检测中,感染微量滴定板孔内的一小部分细胞(通常1/10至1/1000),使病毒在48-72小时进行几次复制,然后使用与未感染对照相比细胞ATP的减少量测量细胞死亡数量。在本发明中可采用的第二类细胞检测依赖于病毒特异性RNA分子在感染细胞内的增殖,使用支链DNA杂交法(bDNA)直接测量RNA含量。在第二类细胞检测中,最初在微量滴定板的孔内感染少量细胞,使病毒在感染细胞内复制并传播到另外的细胞,然后溶解细胞并测量病毒RNA含量。通常在18-36小时后及早停止这个检测,而所有靶细胞仍然存活。通过与固定在检测板的孔上的特异性寡核苷酸探针杂交,然后通过报告酶连接的另外的探针杂交而扩增信号来定量病毒RNA。

[0328] 如本文使用的“病毒滴度”是病毒浓度的度量。滴度测试可采用连续稀释以从本质上仅评估为正或负的分析方法获得近似定量信息。滴度与仍产生正读数的最高稀释因子相对应;例如,在前8次连续两倍稀释中正读数转化为1:256的滴度。具体实例为病毒滴度。为确定滴度,制备几种稀释液,例如 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 。仍感染细胞的最低病毒浓度为病毒滴度。

[0329] 如本文使用的术语“治疗”指治疗性和预防性治疗。例如,治疗性治疗包括由于施用一种或多种疗法(例如,一种或多种治疗剂(例如本发明的化合物和组合物))减轻或改善流感病毒介导的病状的进展、严重程度和/或持续时间,或改善流感病毒介导的病状的一种或多种症状(特别地,一种或多种可辨症状)。在特定实施方案中,治疗性治疗包括改善流感病毒介导的病状的至少一个可测量物理参数。在其它实施方案中,治疗性治疗包括通过(例如)稳定可辨症状在物理上或通过(例如)稳定物理参数在生理上或二者抑制流感病毒介导的病状的进展。在其它实施方案中,治疗性治疗包括减轻或稳定流感病毒介导的感染。可在社区中使用抗病毒药物以治疗已经患流感的人以减少症状的严重程度并减少他们生病的天数。

[0330] 术语“化疗”指使用药物,例如小分子药物(而不是“疫苗”)治疗病症或疾病。

[0331] 如本文使用的术语“预防”、“预防性使用”和“预防性治疗”指目的在于预防,而不是治疗或治愈疾病的任何医疗或公共卫生程序。如本文使用的术语“防止”指降低获得或发展指定病状的风险,或减少或抑制复发或没有病但已经或可能靠近患病人的受治疗者的所述病状。术语“化学预防”指使用药物,例如小分子药物(而不是“疫苗”)防止病症或疾病。

[0332] 如本文使用的预防性使用包括用于已检测到爆发的情形下以防止在许多处于严重流感并发症高风险的人近距离接触的地方(例如,在医院病房、日托中心、监狱、疗养院

等) 传染或传播。还包括在需要流感防护但在接种疫苗后并未获得保护(例如, 由于免疫系统弱) 的群体中或对于他们而言疫苗不可用时, 或当他们由于副作用不能接种疫苗时使用。还包括在接种疫苗后2周内使用, 因为在此期间疫苗仍无效。预防性使用还可能包括治疗未患流感或未被视为处于并发症高风险的人以减少感染流感并将流感传给和他近距离接触的高危人(例如, 医护人员、疗养院工作人员等) 的机会。

[0333] 根据US CDC, 将流感“爆发”定义为在一群相互靠近的人中(例如在支援性生活设施的同一区域中、在同一家庭中等) 在48-72小时内急性发烧呼吸道疾病(AFRI) 突然增加超过正常本底率或当受分析的群体中任何受治疗者测试为流感阳性。将通过任何测试方法确定的流感病例视为爆发。

[0334] “群集”定义为在一群相互靠近的人中(例如, 在支援性生活设施的同一区域、同一家庭等) 在48-72小时内发生的3个或更多个AFRI病例组合。

[0335] 本文使用的“指示病例”、“原发病例”或“零号患者(patient zero)”是流行病学调查的人口抽样中的初始患者。通常在流行病学调查中用于指这种患者时, 术语不大写。当在关于特定调查的报告中将术语用于指特定的人而不是那个人的姓名时, 术语大写为零号患者(Patient Zero)。科学家常常寻找指示病例以确定疾病如何传播以及爆发期间何种带病原会控制疾病。注意指示病例是指示爆发存在的首个患者。可发现更早的病例, 并标记为第一、第二、第三等。

[0336] 在一个实施方案中, 本发明的方法是对患者, 特别是有由流感病毒感染引起的并发症的素因的人的预防性或“优先”措施。例如本文在优先使用、“优先地”等中使用的术语“优先”为在已确认“指示病例”或“爆发”的情形下的预防性使用, 以防止感染在社区或群体的其余部分中传播。

[0337] 在另一个实施方案中, 本发明的方法可用作对社区或群体的成员, 特别是人类的“优先”措施, 以防止感染传播。

[0338] 如本文使用的“有效量”指引起预期生物反应的量。在本发明中, 预期生物反应是抑制流感病毒复制, 减少流感病毒的量或减轻或改善流感病毒感染的严重程度、持续时间、进展或发作, 防止流感病毒感染蔓延, 防止流感病毒感染相关症状的复发、演变、发作或进展, 或增强或提高使用的另一种抗流感感染疗法的预防或治疗作用。向受治疗者施用的化合物的确切量将取决于施用模式、感染的类型和严重程度和受治疗者的特征, 例如健康状况、年龄、性别、体重和对药物的耐受性。技术人员将能够根据这些和其它因素确定适当剂量。当与其它抗病毒剂联合施用时, 例如与抗流感药物联合施用时, 第二种试剂的“有效量”将取决于所用药物的类型。已知经核准试剂的适合剂量并且技术人员可根据受治疗者的病状、治疗病状的类型和使用的本文所述化合物的量进行调节。在未明确指出量的情况下, 应采取有效量。例如, 可按约0.01-100mg/kg体重/天的剂量范围向受治疗者施用本文所述化合物做治疗性或预防性治疗。

[0339] 通常, 可根据多个因素选择剂量方案, 包括治疗病症和病症的严重程度, 采用的特定化合物的活性, 采用的特定组合物, 患者的年龄、体重、健康状况、性别和饮食, 施用时间、施用途径和采用的特定化合物的排泄率, 受治疗者的肝肾功能, 采用的特殊化合物或其盐, 治疗持续时间, 与采用的特定化合物结合或同时使用的药物和医学上众所周知的同类因素。技术人员可易于确定并指定治疗、防止、抑制(完全或部分) 或阻止疾病进展所需的本文

所述化合物的有效量。

[0340] 本文所述化合物的剂量范围为约0.01-100mg/kg体重/天、0.01-50mg/kg体重/天、0.1-50mg/kg体重/天或1-25mg/kg体重/天。应理解,每天的总量可按单次剂量施用或可按多次剂量施用,例如每日2次(例如,每12小时)、每日3次(例如,每8小时)或每日4次(例如,每6小时)。

[0341] 在一些实施方案中,本文所述的化合物(例如化合物(1)及其药学上可接受的盐,包括各种剂型)的剂量为100mg-1,600mg,例如400mg-1,600mg或400mg-1,200mg。将每种即刻每日服用1次(QD),例如2次(例如每隔12小时(BID))或每日3次(例如q8h(TID))。注意,根据需要,可以使用QD、BID和TID的任意组合,例如在第1天时BID,随后QD。

[0342] 在一个具体的实施方案中,本文所述化合物的剂量为400mg-1,600mg、400mg-1,200mg或600mg-1,200mg,每日1次。在另一个具体的实施方案中,本文所述化合物的剂量为400mg-1,600mg、400mg-1,200mg或300mg-900mg,每日2次。在另一个具体的实施方案中,本文所述化合物的剂量为400mg-1,000mg,每日1次。在另一个具体的实施方案中,本文所述化合物的剂量为600mg-1,000mg,每日1次。在另一个具体的实施方案中,本文所述化合物的剂量为600mg-800mg,每日1次。在另一个具体的实施方案中,本文所述化合物的剂量为400mg-800mg,每日2次(例如每隔12小时400mg-800mg)。在另一个具体的实施方案中,本文所述化合物的剂量为400mg-600mg,每日2次。

[0343] 在一些实施方案中,使用负荷剂量方案。在一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用400mg-1,600mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用600mg-1,600mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用800mg-1,600mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用900mg-1,600mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用900mg-1,200mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用900mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用1,000mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,在第1天治疗时,使用1,200mg的负荷剂量。

[0344] 在一个具体的实施方案中,本文所述的化合物的剂量方案在第1天时使用600mg-1,600mg的负荷剂量并且在其余的治疗期间使用300mg-1,200mg的常规剂量。可以服用每种常规剂量,每日1次,每日2次或每日3次或其任意的组合。在另一个具体的实施方案中,使用900mg-1,600mg例如900mg、1,200mg或1,600mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,使用900mg-1,200mg、例如900mg或1,200mg的负荷剂量。在另一个具体的实施方案中,400mg-1,200mg例如400mg、600mg或800mg的常规剂量用于其余的治疗期限。在另一个具体的实施方案中,400mg-1,000mg的常规剂量用于其余的治疗期限。在另一个具体的实施方案中,400mg-800mg的常规剂量用于其余的治疗期限。在另一个具体的实施方案中,使用300mg-900mg的常规剂量,每日2次。在另一个具体的实施方案中,使用600mg-1,200mg的常规剂量,每日1次。在另一个具体的实施方案中,在第2天时,使用600mg的常规剂量,每日2次,然后是600mg,每日1次,用于其余的治疗期限。

[0345] 对于治疗性治疗而言,例如可在症状发作(例如,鼻塞、咽喉痛、咳嗽、疼痛、疲劳、头痛和寒战/出汗)48小时内(或在40小时或少于2天或少于1.5天或24小时内)向患者施用本文所述化合物。或者,对于治疗性治疗而言,例如,可以在症状发作96小时内向患者施用

本文所述的化合物。治疗性治疗可持续任何适合时间,例如3天、4天、5天、7天、10天、14天等。对于社区爆发期间的预防性治疗而言,例如可在指示病例症状发作2天内向患者施用本文所述化合物,并且可继续任何适合时间,例如7天、10天、14天、20天、28天、35天、42天等,直到整个流感季节。流感季节是每年复发的时间期限,其特征不在于流感暴发流行。流感活动有时可以预期且甚至在地理上可以追踪。当在每个季节中主要的流感活动开始因地理位置的不同而改变时,在任何特定的地点,这些较少的疾病流行通常花费3-4周达到峰值并且再经过3-4周明显减弱。典型地,在美国疾病控制中心(Centers for Disease Control)(CDC)采集、搜集和分析有关流感活度年的信息并且产生自十月至五月中旬的每周报告。

[0346] 在一个实施方案中,治疗性治疗持续1天至整个流感季节。在一个具体的实施方案中,治疗性治疗持续3天-14天。在另一个具体的实施方案中,治疗性治疗持续5天-14天。在另一个具体的实施方案中,治疗性治疗持续3天-10天。在另一个具体的实施方案中,治疗性治疗持续4天-10天。在另一个具体的实施方案中,治疗性治疗持续5天-10天。在另一个具体的实施方案中,治疗性治疗持续4天-7天(例如4天、5天、6天或7天)。在另一个具体的实施方案中,治疗性治疗持续5天-7天(例如5天、6天或7天)。在一个具体的实施方案中,预防性治疗持续至整个流感季节。

[0347] 在一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,600mg的负荷剂量施用于患者3天-14天(例如5天-14天),并且使用400mg-1,000mg的常规剂量用于其余的治疗期限。在另一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,200mg的负荷剂量施用于患者3天-14天(例如5-14天),在又一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,600mg的负荷剂量施用于患者3天-14天,并且使用400mg-1,000mg的常规剂量用于其余的治疗期限。在另一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,200mg的负荷剂量施用于患者3天-14天(例如5天-14天),并且使用400mg-800mg的常规剂量用于其余的治疗期限。可以服用每种剂量,每日1次,每日2次或每日3次或其任意的组合。

[0348] 在一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,600mg的负荷剂量施用于患者3天-14天,并且使用600mg-1,000mg、每日1次的常规剂量用于其余的治疗期限。在另一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,200mg的负荷剂量施用于患者3天-14天,并且使用600mg-800mg(例如600mg、650mg、700mg、750mg或800mg)、每日1次的常规剂量用于其余的治疗期限。在一些实施方案中,该期限持续4天-10天、5天-10天或5天-7天。

[0349] 在一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,600mg的负荷剂量施用于患者3天-14天,并且使用400mg-800mg、每日2次的常规剂量用于其余的治疗期限。在另一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,200mg的负荷剂量施用于患者3天-14天,并且使用400mg-600mg(例如400mg、450mg、500mg、550mg或600mg)、每日2次的常规剂量用于其余的治疗期限。在一些实施方案中,该期限持续4天-10天、5天-10天或5天-7天。

[0350] 在一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg-1,200mg(例如900mg或1,200mg)的负荷剂量施用于患者4天或5天,并且使用400mg-600mg(例如400mg或600mg)、每日2次的常规剂量用于其余的治疗期限(例如第2天-第4天或第2天-第

5天)。在另一个具体的实施方案中,在第1天时,将本文所述的化合物使用900mg—1,200mg(例如900mg或1,200mg)的负荷剂量施用于患者4天或5天,并且使用600mg—800mg(例如600mg或800mg),每日1次的常规剂量用于其余的治疗期限。

[0351] 在本发明中可采用各种类型的施用方法,并且在以下标题为“施用方法”的部分下详细描述。

[0352] IV. 联合疗法

[0353] 可以在单独采用的或与另一种适合的治疗剂例如抗病毒剂或疫苗结合的本发明的化合物(包括其药学上可接受的盐或溶剂化物(例如,水合物)的本发明方法或药物组合物中达到有效量。当采用“联合疗法”时,使用第一种量的本发明化合物和第二种量的另外的适合治疗剂(例如,抗病毒剂或疫苗)可达到有效量。

[0354] 在本发明的另一实施方案中,将本发明的化合物和另外的治疗剂各以有效量(即,如果单独施用,则各以治疗上有效的量)施用。在另一实施方案中,将本发明的化合物和另外的治疗剂各以单独不会提供疗效的量(亚治疗剂量)施用。在又一实施方案中,可按有效量施用本发明的化合物,而按亚治疗剂量施用另外的治疗剂。在再一实施方案中,可按亚治疗剂量施用本发明的化合物,而按有效量施用另外的治疗剂,例如适合的癌症治疗剂。

[0355] 如本文使用的术语“结合”或“联合施用”可交换使用以指使用一种以上的疗法(例如,一种或多种预防和/或治疗剂)。术语的使用并不限制向受治疗者施用疗法(例如,预防和/或治疗剂)的顺序。

[0356] 联合施用涵盖按基本上同时的方式施用联合施用的第一种和第二种量的化合物,例如按单一药物组合物施用,例如第一种和第二种量比例固定的胶囊或片剂,或按多个单独的胶囊或片剂施用。另外,这种联合施用还涵盖按任一顺序依次使用每种化合物。

[0357] 在一个实施方案中,本发明涉及使用本文所述的化合物或药物组合物抑制生物样品或患者中流感病毒复制或治疗或防止患者流感病毒感染的联合疗法。因此,本发明的药物组合物还包括那些包含与表现出抗流感病毒活性的抗病毒化合物结合的本发明的流感病毒复制抑制剂。

[0358] 本文所述的化合物和组合物的使用方法还包括结合化学疗法和本发明的化合物或组合物,或结合本发明的化合物或组合物的组合和另一抗病毒剂和接种流感疫苗。

[0359] 当联合施用包括单独施用第一种量的本发明化合物和第二种量的另外的治疗剂时,在足以接近有预期疗效的时间施用化合物。例如,每次可产生预期疗效的施用的间隔时间范围可为几分钟至几小时,并且可考量每种化合物的性质,例如效力、溶解性、生物利用率、血浆半衰期和动力学特征。例如,可按任何顺序在相互间隔约24h内、相互间隔约16小时内、相互间隔约8小时内、相互间隔约4小时内、相互间隔约1小时内或相互间隔约30min内施用本发明的化合物和第二种治疗剂。

[0360] 更具体地,可以在对受治疗者施用第二种疗法(例如预防或治疗剂,例如抗癌剂)之前(例如前5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)、与之同时或在其之后(例如之后5分钟,15分钟,30分钟,45分钟,1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)施用第一种疗法(例如预防或治疗剂,例如本发明的化合物)。

[0361] 应当理解,共同施用第一种用量的本发明化合物和第二种用量的另外的治疗剂的方法可以产生增强或协同治疗作用,其中联合作用大于因分开施用第一种用量的本发明化合物和第二种用量的另外的治疗剂的累加作用。

[0362] 如本文使用的术语“协同”指本发明化合物和另一疗法(例如,预防或治疗剂)的组合,这比疗法的累加效应更有效。疗法的组合(例如,预防或治疗剂的组合)的协同效应可允许使用更低剂量的一种或多种疗法和/或更低频率地向受治疗者施用所述疗法。能够利用更低剂量的疗法(例如,预防或治疗剂)和/或更低频率地施用所述疗法可降低向受治疗者施用所述疗法相关的毒性,而不降低所述疗法在病症预防、管理或治疗中的功效。另外,协同效应可引起试剂在病症预防、管理或治疗中的功效提高。最后,疗法的组合(例如,预防或治疗剂的组合)的协同效应可避免或减少与单独使用任一疗法相关的有害或不良副作用。

[0363] 当使用本发明的本发明化合物进行的联合疗法与流感疫苗结合时,可施用两种治疗剂以致每次施用的间隔时间可更长(例如,数天、数周或数月)。

[0364] 可使用评估药物相互作用的适合方法确定协同效应的存在。适合方法包括(例如)Sigmoid-Emax公式(Holford,N.H.G.和Scheiner,L.B.,Clin.Pharmacokinet.6:429-453(1981))、Loewe相加公式(Loewe,S.和Muischnek,H.,Arch.Exp.Pathol Pharmacol.114:313-326(1926))和中效公式(Chou,T.C.and Talalay,P.,Adv.Enzyme Regul.22:27-55(1984))。以上提及的每个公式可与实验数据一起应用以生成相应的图,以有助于评估药物组合的效应。以上提及的与公式相关的相应的图分别为浓度-效应曲线、等效线图曲线和组合指数曲线。

[0365] 可与本文所述化合物联合施用的具体实例包括神经氨酸酶抑制剂(例如,奥司他韦(**Tamiflu®**)和扎那米韦(**Rlenza®**))、病毒性离子通道(M2蛋白)阻滞剂(例如,金刚胺(**Symmetrel®**)和金刚乙胺(**Flumadine®**))和WO 2003/015798中所述的抗病毒药物,包括日本Toyama Chemical研发的T-705(也参见Ruruta等,Antiviral Research,82:95-102(2009),“T-705(flavipiravir)and related compounds:Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections.”)。在一些实施方案中,本文所述化合物可与常规流感疫苗一起联合施用。在一些实施方案中,本文所述化合物可与与扎那米韦一起联合施用。在一些实施方案中,本文所述化合物可与奥司他韦一起联合施用。在一些实施方案中,本文所述化合物可与T-705一起联合施用。在一些实施方案中,本文所述化合物可与金刚胺和金刚乙胺一起联合施用。可以按照具体在标签上指定的剂量方案施用奥司他韦。在一些具体的实施方案中,将其施用75mg,每日2次;或150mg,每日1次。

[0366] V. 药物组合物

[0367] 可将本文所述化合物配制为进一步包含药学上可接受的载体、稀释剂、辅料或赋形剂的药物组合物。在一个实施方案中,本发明涉及包含以上所述本发明的化合物和药学上可接受的载体、稀释剂、辅料或赋形剂的药物组合物。在一个实施方案中,本发明为包含有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体、稀释剂、辅料或赋形剂的药物组合物。药学上可接受的载体包括,例如,药物稀释剂、赋形剂或就预期施用形式适当选择的符合方便药物实践的载体。

[0368] “有效量”包括“治疗有效量”和“预防有效量”。术语“治疗有效量”指治疗和/或改

善感染了流感的患者的流感病毒感染有效的量。术语“预防有效量”指防止和/或大体上减少流感病毒感染爆发的机会或范围有效的量。在以上标题为公开化合物的使用部分描述了有效量的具体实例。

[0369] 药学上可接受的载体可能含有不会过度抑制化合物的生物活性的惰性成分。药学上可接受的载体应生物相容,例如无毒、非炎性、非免疫原性或一旦施用给患者无其它不良反应或副作用。可采用标准制药技术。

[0370] 如本文使用的药学上可接受的载体、辅料或赋形剂包括任何全部适于所需特殊剂型的溶剂、稀释剂或其它液体赋形剂、分散或悬浮辅助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington的Pharmaceutical Sciences第16版, E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980)公开了配制药学上可接受的组合物中使用的各种载体及其已知制备技术。除了在任何常规载体范围内介质与本文所述化合物不相容,例如通过产生任何非所期望的生物效应或以有害方式与药学上可接受的盐的任何其它组分相互作用,其用途被考虑到本发明的范围之内。如本文使用的短语“副作用”涵盖了疗法(例如,预防或治疗剂)的有害不利作用。副作用总是不期望的,但不期望的作用并非必定有害。疗法(例如,预防或治疗剂)的不利作用可能有害或不适或危险。副作用包括但不限于发烧、寒战、嗜睡、胃肠毒性(包括胃和肠溃疡和糜烂)、恶心、呕吐、神经毒性、中毒性肾损害、肾毒性(包括如同肾乳头坏死和慢性间质性肾炎等病状)、肝毒性(包括血清肝酶水平升高)、骨髓中毒性(包括白细胞减少、骨髓抑制、血小板减少和贫血)、口干、金属味、延长孕、虚弱、嗜眠、疼痛(包括肌肉痛、骨痛和头痛)、脱发、无力、眩晕、锥体外系症状、静座不能、心脏血管障碍和性功能障碍。

[0371] 可用作药学上可接受的载体的物质的一些实例包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人血清白蛋白)、缓冲物质(例如twin 80、磷酸盐、甘氨酸、山梨酸或山梨酸钾)、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质(例如硫酸精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠或锌盐)、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧化丙烯-嵌段共聚物、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羊毛脂、糖类(例如乳糖、葡萄糖和蔗糖)、淀粉(例如玉米淀粉和马铃薯淀粉)、纤维素及其衍生物(例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素)、粉状黄蓍胶、麦芽、凝胶、滑石、赋形剂(例如可可油和栓剂蜡)、油(例如花生油、棉花子油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油)、乙二醇(例如丙二醇或聚乙二醇)、酯(例如油酸乙酯和月桂酸乙酯)、琼脂、缓冲剂(例如氢氧化镁和氢氧化铝)、褐藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、乙醇和磷酸盐缓冲液以及其它无毒相容性滑润剂(例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁)以及根据配制人的判断着色剂、防粘剂、涂层剂、甜味剂和增香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中。

[0372] VI. 施用方法

[0373] 可根据受治感染的严重程度经口、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(如同通过粉剂、药膏或滴剂)、口腔作为口或喷鼻剂等向人或其它动物施用以上所述化合物和药学上可接受的组合物。

[0374] 供口服的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微型乳剂、溶液、悬浮剂、糖浆和酏剂。除活性化合物外,液体剂型可能含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它

溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其是棉花子油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨聚糖的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物也可包括辅料,例如湿润剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、调味剂和增香剂。

[0375] 可根据已知技术使用适合的分散或湿润剂和悬浮剂配制可注射制剂,例如无菌可注射水或油悬浮剂。无菌可注射制剂也可能是无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮剂或乳剂,例如1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的赋形剂和溶剂中,可采用的是水、林格氏溶液、U.S.P. 和等渗氯化钠溶液。另外,按照惯例采用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可采用任何无味的不挥发性油,包括合成的单酸甘油酯或甘油二酯。另外,脂肪酸,例如油酸,用于制备注射剂。

[0376] 例如,可通过细菌保留过滤器过滤或通过加入呈无菌固体组合物形式,使用之前可溶于或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中的杀菌剂为可注射制剂灭菌。

[0377] 为延长本文所述化合物的作用,常常希望减缓化合物由皮下或肌肉注射的吸收。这可通过使用水溶性差的晶体或无定形物质的液体悬浮液实现。然后,化合物的吸收速率取决于其溶解速率,而溶解速率又取决于晶体大小和晶形。或者,通过将化合物溶解或悬浮于油赋形剂中实现延迟吸收经肠胃外施用的化合物。通过在生物可降解的聚合物例如聚交酯-聚乙醇酸交酯中形成化合物的微胶囊矩阵制成可注射的储存形式。根据化合物与聚合物之比和采用的特殊聚合物的性质,可控制化合物释放速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。也可通过将化合物截留在与身体组织相容的脂质体或微型乳剂中制备可注射的储存制剂。

[0378] 经直肠或阴道施用的组合物特别是可通过混合本文所述化合物和适合的非刺激性赋形剂或载体(例如可可油、聚乙二醇或栓剂蜡)制备的栓剂,所述赋形剂或载体在环境温度下为固体但在体温下为液体并因此在直肠或阴道腔内融化并释放活性化合物。

[0379] 口服固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒。在这种固体剂型中,活性化合物混有至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体例如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或a) 填料或膨胀剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,b) 粘合剂,例如羧基甲基纤维素、藻酸盐、凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,c) 保湿剂,例如甘油,d) 崩解剂,例如琼脂--琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,e) 溶液阻滞剂,例如石蜡,f) 吸收加速剂,例如季铵化合物,g) 湿润剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,h) 吸收剂,例如高岭土和膨润土,和i) 润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物。在为胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型也可包含缓冲剂。

[0380] 也可使用如乳糖或奶糖以及高分子聚乙二醇等赋形剂将相似类型的固体组合物用作软和硬凝胶胶囊中的填料。可用包衣和壳,例如肠溶衣和制药领域众所周知的其它包衣制备片剂、糖锭、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型。它们可任选含有乳浊剂并且还可具有组合物的性质,以致任选地以延迟方式仅释放活性成分,或优选地,在肠道的某一部分释放。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物和蜡。也可使用乳糖或奶糖以及高分子聚乙二醇等赋形剂将相似类型的固体组合物用作软和硬凝胶胶囊中的填料。

[0381] 活性化合物也可呈具有一种或多种上述赋形剂的微密封形式。可用包衣和壳,例如肠溶衣、控释包衣和制药领域中众所周知的其它包衣制备片剂、糖锭、胶囊、丸剂和颗粒

的固体剂型。在这种固体剂型中,活性化合物可能混有至少一种惰性稀释剂,例如蔗糖、乳糖或淀粉。一般地,这种剂型也可能包含除惰性稀释剂外的另外的物质,例如压片润滑剂和其它压片辅助剂,例如硬脂酸镁和微晶纤维素。在为胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型也可包含缓冲剂。它们可任选含有乳浊剂并且还可具有组合物的性质,以致任选地以延迟方式仅释放活性成分,或优选地,在肠道的某一部分释放。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物和蜡。

[0382] 本文所述化合物的局部或经皮施用剂型包括药膏、软膏、乳膏、洗剂、凝胶、粉剂、溶液、喷剂、吸入剂或贴片。在无菌条件下,活性化合物与药学上可接受的载体和任何需要的防腐剂或可能需要的缓冲剂。眼科制剂、耳滴剂和眼药水也被考虑到本发明的范围之内。另外,本发明考虑到具有提供控制化合物向身体递送的附加优点的皮肤贴片的用途。可通过将化合物溶解或分散于恰当介质中制成这种剂型。吸收促进剂也可用于提高化合物通过皮肤的流量。可通过提供速率控制膜或通过化合物分散于聚合物基质或凝胶中控制速率。

[0383] 也可经口、肠胃外,通过吸入喷剂经局部、直肠、鼻、口腔、阴道或通过植入药盒施用本文所述的组合物。如本文使用的术语“肠胃外”包括但不限于皮下、静脉内、肌肉、关节内、滑膜腔内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。特别地,经口、腹膜内或静脉内施用组合物。

[0384] 本文所述组合物的无菌可注射形式可为水或油悬浮液。这些悬浮液可根据本领域已知的技术使用适合的分散或湿润剂和悬浮剂制备。无菌可注射制剂也可能是于无毒的可经肠胃外接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如于1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的赋形剂和溶剂中,可采用的是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,按照惯例采用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可采用任何无味的不挥发性油,包括合成的单酸甘油酯或甘油二酯。脂肪酸例如油酸及其甘油酯衍生物用于制备注射剂,因为它们天然药学上可接受的油,例如橄榄油或蓖麻油,尤其其呈聚氧乙烯化形式。这些油溶液或悬浮液也可能含有长链醇稀释剂或分散剂,例如羧甲基纤维素或在配制药学上可接受的剂型(包括乳剂和悬浮液)中常用的类似分散剂。其它常用表面活性剂,例如Tweens、Spans和在生产药学上可接受的固体、液体或其它剂型中常用的其它乳化剂或生物利用率增强剂也可用于配制的目的。

[0385] 可以任何口服可接受的剂型,包括但不限于胶囊、片剂、水悬浮液或溶液,口服本文所述药物组合物。在为供口服片剂的情况下,常用载体包括但不限于乳糖和玉米淀粉。典型地还加入润滑剂,例如硬脂酸镁。为了以胶囊形式口服施用,有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服应用需要水悬浮液时,活性成分与乳化剂和悬浮剂结合。若需要,还可加入某些甜味剂、矫味剂或着色剂。

[0386] 或者,可以供直肠使用的栓剂形式施用本文所述的药物组合物。可通过混合试剂和非刺激性赋形剂制备这些药物组合物,所述赋形剂在室温下为固体,但在直肠温度下为液体,因此将在直肠内融化以释放药物。这种物质包括但不限于可可油、蜂蜡和聚乙二醇。

[0387] 尤其是当治疗目标包括局部施用易于接近的区域或器官(包括眼部、皮肤或低位肠道疾病)时,还可局部施用本文所述的药物组合物。易于为这些区域或器官的每一个制备适合的局部制剂。

[0388] 以直肠栓剂制剂(见上文)或适合的灌肠剂制剂可实现对低位肠道的局部施用。也可使用局部皮肤贴片。

[0389] 对于局部施用而言,可将药物组合物配制为含有悬浮或溶于一种或多种载体中的活性组分的适合药膏。适于局部施用本发明的化合物的载体包括但不限于矿物油、凡士林油、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者,可将药物组合物配制为含有悬浮或溶于一种或多种药学上可接受的载体中的活性组分的适合洗剂或乳膏。适合的载体包括但不限于矿物油、山梨醇酐单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二醇、苜醇和水。

[0390] 为了眼科使用,可用或不用防腐剂例如苯扎氯铵,将药物组合物配制为在等渗pH调节无菌盐水中的微粉化悬浮液,或特别是等渗pH调节无菌盐水中的溶液。或者,为了眼科使用,可将药物组合物配制为药膏,例如凡士林。

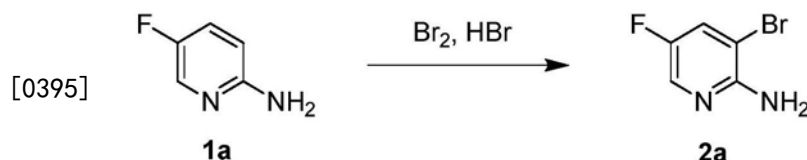
[0391] 也可通过鼻用气化喷雾剂或吸入施用药物组合物。根据制药领域中众所周知的技术制备这种组合物并且采用苜醇或其它适合的防腐剂、提高生物利用率的吸收促进剂、碳氟化合物和/或其它常规增溶剂或分散剂制备成盐水中的溶液。

[0392] 可将所述化合物配制成单位剂型。术语“单位剂型”指适合作为受治疗者的单位剂量的物理分立单位,每单位含有经计算产生预期疗效的预定量的活性物质,任选地与适合的药物载体结合。单位剂型可作单次日剂量或多次日剂量(例如,每日约1-4次或更多次)的其中一次。当使用多次日剂量时,对于每次剂量的单位剂型可相同或不同。

具体实施方案

[0393] VII. 实施例

[0394] 实施例1:2-氨基-3-溴-5-氟吡啶(化合物2a)的制备



[0396] 方法A:在14℃向2-氨基-5-氟吡啶(6kg,53.6mol)在水(24L)中的淤浆中加入48%氢溴酸(18.5kg,110mol),历时10分钟。该反应放热,温度升至24℃。将该化合物再冷却至12℃,然后分9部分加入溴(9kg,56.3mol),历时50分钟(放热,保持在20℃)。将该混合物在22℃搅拌过夜,通过¹HNMR监测猝灭的等分试样(5滴猝灭入1ml 20%K₂CO₃、0.3ml 10%Na₂S₂O₃和0.7ml DCM的混合物。蒸发有机层,测定)。将该混合物冷却至10℃,然后通过添加亚硫酸氢钠(560g,5.4mol)的水(2L)溶液猝灭,再冷却至0℃。将该混合物加入到冷的(-4℃)DCM(18L)和5.4M氢氧化钠(35L,189mol)混合物中。通过硅藻土垫过滤底部的~35L,然后形成相破裂。用DCM(10L)再萃取水层。通过3kg酸式硅酸镁垫过滤有机层,用DCM(8L)洗涤。蒸发滤液,与己烷一起研磨,过滤。

[0397] 尽管在方法的测定中显示97%完成,但是来自所有4次运行的这种起始产物典型地包含~10%SM。合并它们,在50℃在己烷中研磨(2L/kg材料),然后冷却至15℃,过滤,得到化合物2a(30.0kg,~95%纯度,149mol,67%)。对来自起始研磨和再纯化的母液进行色谱(20kg硅胶,洗脱液25-50%EtOAc的己烷溶液),又得到化合物2a(4.7kg,~99%纯度,

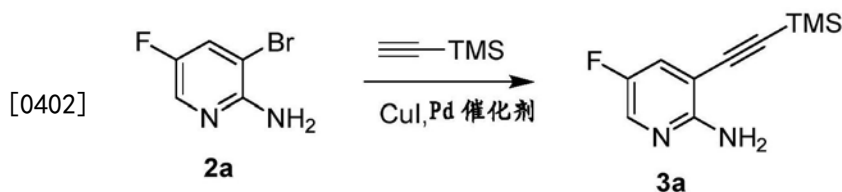
24.4mol, 11%)。

[0398] 方法B:或者,通过使用HOAc而不是HBr进行溴化。在一个具体的实例中,将氨基吡啶(952g, 8.49mmol)溶于HOAc(7L),用NaOAc(1.04kgs, 12.7mmol)处理,然后滴加Br₂(用滴液漏斗-冰用于冷却反应体系)。在添加Br₂后,将该反应体系在rt搅拌过夜。将该反应混合物倾入水,通过添加6N NaOH使其呈碱性。用EtOAc萃取该反应体系。大量固体不溶于有机或水相。过滤整个混合物,分离各相。干燥有机层(MgSO₄),用SiO₂垫过滤,用EtOAc洗脱。蒸发滤液,得到棕色固体889g。

[0399] 方法C:或者,通过使用H₂SO₄进行溴化。在一个具体的实例中,在50-L反应器中向93%硫酸(12.5kg, 119mol)水(26L)溶液中加入2-氨基-5-氟吡啶(6.5kg, 58mol)。将温度调整至30°C,然后分10部分加入溴(10kg, 63mol),历时3小时。将该混合物在45°C搅拌18小时,然后在50°C搅拌5小时。将该混合物冷却至15°C,在400-L反应器中进行后处理。

[0400] 合并上述反应的4个部分(4×6.5kg),在-3°C猝灭入50%氢氧化钠(110kg, 1375mol)和硫代硫酸钠(1.8kg, 11.4mol)在水(100L)中的混合物,历时1小时。将温度调整至32°C,过滤淤浆,用水(80L)洗涤,得到水-湿润的粗产物(62kg)。类似地进行第二次运行的3次反应(3×6.5kg SM),得到水-湿润的粗产物(41kg)。在25-30°C将粗产物(103kg)溶于(一些不溶物)甲苯(280kg)。加入盐水(20kg),但因固体相破裂不可能。通过硅藻土垫过滤该混合物,用甲苯洗涤,然后分离各层。将有机层浓缩至347L体积,与残留的水共沸,用于制备化合物3a。将等分试样用于测定产物浓度,为181g/升溶液。收率=62.8kg。通过用乙酸乙酯(10L)萃取水/盐水层再分离600g,随后通过酸式硅酸镁垫过滤、蒸发、与己烷研磨。总收率是82%。

[0401] 化合物3a的制备

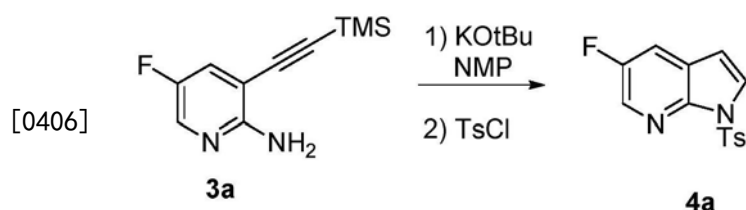


[0403] 方法A:向惰性400-L反应器中装入化合物2a(27.5kg, 96%纯度, 138mol)、Pd(PPh₃)₄(1044g, 0.90mol)和CuI(165g, 0.87mol),然后装入甲苯(90kg)。用3次真空-氮气循环给该混合物脱氧,然后加入三乙胺(19.0kg, 188mol)。用一次以上真空-氮气循环给该混合物脱氧,然后加入TMS-乙炔(16.5kg, 168mol)。将该混合物加热至48°C 23小时(最初放热需要温度达到53°C最大值),然后冷却至18°C。通过硅藻土垫过滤淤浆,用甲苯(80kg)洗涤。用12%Na₂HPO₄(75L)洗涤滤液,然后通过硅胶垫(25kg)过滤,用1:1己烷:MTBE(120L)洗涤。将该滤液蒸发至得到棕色油状物,然后溶于NMP,用于下一步。化合物3a的溶液重量-58kg, ~50wt%, 138mol, 100%。¹H NMR(CDCl₃, 300MHz): δ7.90(s, 1H); 7.33-7.27(m, 1H); 4.92(s, NH₂), 0.28(s, 9H) ppm。

[0404] 方法B:用CuI(1.72g, 9.03mmol)、Pd(dppf)Cl₂(2.87g, 3.92mmol)、TMS乙炔(8.25g, 11.8mL, 84mmol)、THF(200mL)和Et₃N(190mL)处理2-氨基-3-溴-5-氟吡啶(2a: 10.7g, 56mmol),温热至回流过夜。通过TLC判定反应完全,倾入水(200mL)。分离各相,用EtOAc(3×200mL)萃取各相。合并有机相,干燥(MgSO₄),过滤,真空浓缩滤液,得到油状物,真空固化。将该固体溶于CH₂Cl₂,通过SiO₂垫,用CH₂Cl₂洗脱,得到黄色固体。11.7g, 93%收

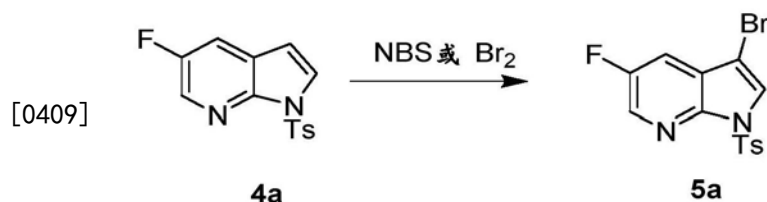
率。

[0405] 化合物4a的制备



[0407] 向惰性400-L反应器中装入叔丁醇钾(17.5kg, 156mol)和NMP(45kg)。将该混合物加热至54℃,然后加入化合物3a(29kg, 138mol)在NMP(38kg)中的溶液,历时2.75小时,用NMP(6kg)冲洗(放热,维持在70-77℃)。将该反应体系在74℃搅拌2小时,然后冷却至30℃,加入甲苯磺酰氯(28.5kg, 150mol)在NMP(30kg)中的溶液,历时1.5小时,用NMP(4kg)冲洗。反应放热,维持在30-43℃。将该反应体系搅拌1小时,同时冷却至20℃,然后加入水(220L),历时35分钟(放热,维持在18-23℃)。将该混合物在20℃搅拌30分钟,然后过滤,用水(100L)洗涤。用DCM(250kg)从滤器中过滤出固体,与残留水分离,通过酸式硅酸镁(15kg, 上部)和硅胶(15kg, 下部)垫过滤有机层,再用DCM(280kg)洗涤。浓缩滤液至得到浓稠淤浆(~50L体积),然后加入MTBE(30kg),同时持续以恒定体积蒸馏(最终蒸馏物温度为51℃)。再加入MTBE(10kg),将该淤浆冷却至15℃,过滤,用MTBE(40L)洗涤,得到化合物4a(19.13kg, 95%纯度, 62.6mol, 45%)。部分浓缩滤液,得到第二批(2.55kg, 91%纯度, 8.0mol, 6%)。¹H NMR (CDCl₃, 300MHz): δ8.28-8.27 (m, 1H); 8.06-8.02 (m, 2H); 7.77 (d, J=4.0Hz, 1H); 7.54-7.50 (m, 1H); 7.28-7.26 (m, 2H); 6.56 (d, J=4.0Hz, 1H); 2.37 (s, 3H) ppm。

[0408] 化合物5a的制备



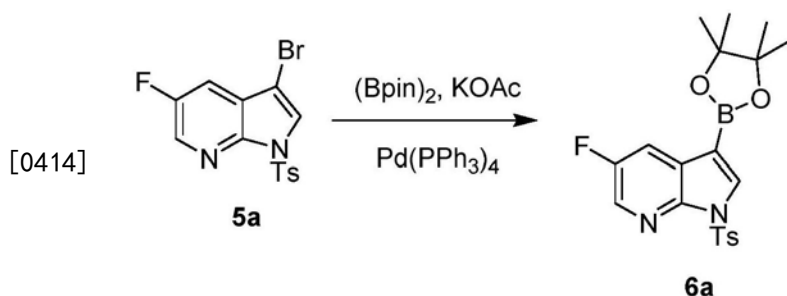
[0410] 方法A: 在15℃向N-溴琥珀酰亚胺(14.16kg, 79.6mol)在DCM

[0411] (30kg)中的淤浆中加入化合物4a(19.13kg, 95%纯度和2.86kg, 91%纯度, 71.6mol)在DCM(115kg)中的溶液,用DCM(20kg)冲洗。将该混合物在25℃搅拌18小时,然后冷却至9℃,通过添加硫代硫酸钠溶液(400g)和50%氢氧化钠(9.1kg)水(130L)溶液猝灭。将该混合物温热至20℃,分离各层,用12%盐水(40L)洗涤有机层。依次用DCM(4×50kg)再萃取水层。合并有机层,蒸馏40L与水共沸,然后通过硅胶(15kg, 底部)和magensol(15kg, 上部)垫过滤该溶液,用DCM(180kg)洗涤。浓缩至得到浓稠淤浆(~32L体积),然后加入己烷(15kg)。在加入己烷(15kg),同时以恒定体积持续蒸馏(最终蒸馏物温度52℃)。将该淤浆冷却至16℃,过滤,用己烷(25kg)洗涤,得到化合物5a(25.6kg, 69.3mol, 97%)。¹H NMR (CDCl₃, 300MHz): δ8.34-8.33 (m, 1H); 8.07 (d, J=8.2Hz, 2H); 7.85 (s, 1H); 7.52-7.49 (m, 1H); 7.32-7.28 (m, 2H); 2.40 (s, 3H) ppm。

[0412] 方法B: 将Br₂(115mL, 1.15eq)在CH₂Cl₂(1L)中的溶液滴加到化合物4a(566g, 1.95mol)在CH₂Cl₂(4L)中的溶液中,历时90分钟。在添加过程中,温度从16增加至23℃,用

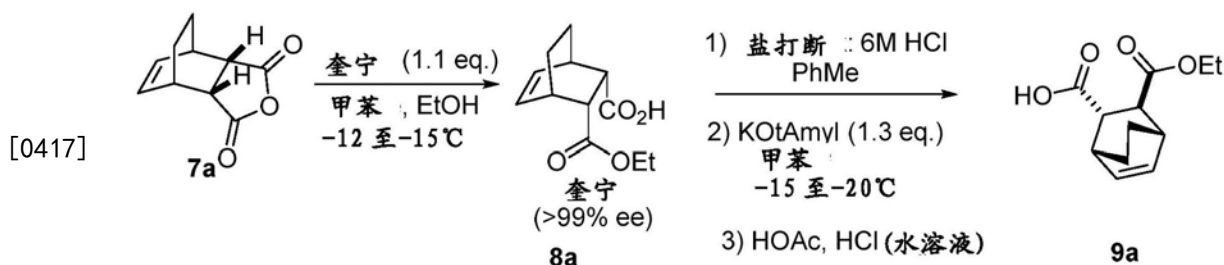
冰-盐浴将该反应混合物冷却至10℃。添加完成后,温度达到12℃。将该混悬液(橙色固体在添加过程中形成)搅拌30分钟。将该反应混合物在RT搅拌过夜。谨慎地加入饱和NaHCO₃水溶液(4L),历时5-10分钟。将该反应混合物剧烈搅拌1小时,使各层分离。用滤器过滤得到的溶液。用饱和NaHCO₃水溶液(2L)和盐水(2x1L)洗涤有机层,用Na₂SO₄干燥,用硅胶(2kg)清扫,用CH₂Cl₂(总计~10L)洗涤。减压除去溶剂(~20L),得到化合物5a(580g),为白色固体。将产物再溶于CH₂Cl₂(2.5L)和,再用滤器与硅胶(2kg)过滤,用CH₂Cl₂洗脱。减压除去溶剂后,得到化合物5a(568g,79%收率),为黄白色固体。测试反应体系用于下一步后,用庚烷(2x)洗涤其余的物质,干燥,得到更好的结果,用于下一步。¹H NMR(CDCl₃,300MHz): δ 8.34-8.33(m,1H);8.07(d,J=8.2Hz,2H);7.85(s,1H);7.52-7.49(m,1H);7.32-7.28(m,2H);2.40(s,3H)ppm。

[0413] 化合物6a的制备:BEFTAI反应



[0415] 向惰性400-L反应器中装入化合物5a(25.6kg,69.3mol)、双(频哪醇合)二硼(19kg,74.8mol)、乙酸钾(19kg,194mol)、乙酸钯(156g,0.69mol)和三苯膦(564g,2.15mol),然后加入二噁烷(172kg),使用真空-氮气循环分别脱氧(x3)。搅拌该混合物,使用真空-氮气循环脱氧(x2),然后加热至100℃15小时。将该混合物冷却至35℃,然后过滤,用30℃THF(75kg)洗涤。蒸发滤液,将残余物溶于DCM(~90L)。将该溶液与1kg碳和2kg酸式硅酸镁一起搅拌45分钟,然后通过硅胶(22kg,下部)和magenzol(10kg,上部)垫过滤,用DCM(160kg)洗涤。浓缩滤液至得到浓稠淤浆(~40L体积),然后在35℃研磨,加入己烷(26kg)。将该淤浆冷却至20℃,过滤,用DCM(5.3kg)和己烷(15kg)、然后用己烷(15kg)洗涤,在氮气气氛中在滤器上干燥,得到化合物6a(23.31kg,56.0mol,81%),为白色固体。¹H-NMR与期望的产物一致,HPLC 99.5%,钯测定2ppm。¹H NMR(CDCl₃,300MHz): δ 8.25(s,1H);8.18(s,1H);8.09-8.02(m,2H);7.91-7.83(m,1H);7.30-7.23(m,2H);2.39(s,3H);1.38(s,12H)ppm。

[0416] 化合物8a和9a的制备



[0418] 化合物8a:将酸酐7a(24.6kgs,Apex)和奎宁(49.2kgs,Buchler)加入到反应器中,然后添加无水PhMe(795.1kgs)。然后将反应器冷却至-16℃,以维持内部反应器温度<-12℃的速率加入EtOH(无水,41.4kgs)。对于本实验记录的最高反应温度为-16℃。然后将该反应

混合物在 -16°C 搅拌16h。取出样品,过滤。干燥固体,通过 $^1\text{H-NMR}$ 评价,其显示无酸酐保留。过滤反应器的内容物。用PhMe(无水,20kgs)洗涤反应器和随后的湿滤饼。将得到的固体在 $<45^{\circ}\text{C}$ 与 N_2 吹扫下置于盘式干燥器至少48h。在本实验中,实际温度为 44°C ,真空为 -30inHG 。2.5d干燥后对物质采样,通过NMR显示3%PhMe。再经过8hrs后,分析的PhMe的amt显示存在相同的3%PhMe且干燥终止。白色固体的重量为57.7kgs,76%收率。 $^1\text{H-NMR}$ 显示与结构一致且手性SFC分析显示物质 $>99\%$ de。

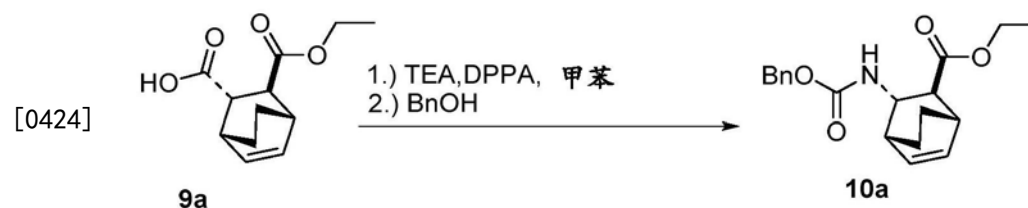
[0419] 化合物9a:向反应器中装入奎宁盐8a(57.7kgs)和PhMe(250.5kgs,Aldrich ACS级, $>99.5\%$),启动搅拌器。将内容物冷却至 $<15^{\circ}\text{C}$,用6N HCl处理(用21.4kgs浓HCl处理18kgs H_2O),同时保持温度 $<25^{\circ}\text{C}$ 。将该混合物搅拌40min,目视检查验证无固体存在。停止搅拌,使各相沉降,分离各相。再用PhMe(160kgs;典型地尽可能少地使用,计算值为43kgs)萃取水相。然而,为因小体积而有效地搅拌,再加入PhMe。合并有机相。对有机相采样,运行HPLC分析以确保存在产物;仅为了试验信息。

[0420] 向冷却至 $<5^{\circ}\text{C}$ ($0-5^{\circ}\text{C}$)的有机相中加入硫酸钠(无水,53.1kgs),搅拌8hrs(在这种情况下为12hrs)。使包含有机相的反应器的内容物通过包含硫酸钠(31kgs,无水)的滤器,并且进入清洁和干燥的反应器。用PhMe(57.4kgs)冲洗反应器,通过滤器进入反应器201。启动搅拌器,再加入一定量的PhMe(44kgs),将该反应混合物冷却至 -20°C 。在该温度下,加入叔戊醇钾的PhMe溶液,历时2h,同时保持温度在 $-15-22^{\circ}\text{C}$ 。将该反应混合物保持在约 -20°C ,再经过30min,然后采样。通过取出等分试样,即刻猝灭入6N HCl进行采样。

[0421] 由于得到目标比(96:4(反式:顺式)),所以向反应器中装入乙酸(2.8kgs),历时6min。温度停留在 -20°C 。然后将温度调整至 -5°C ,加入2N HCl水溶液(用15.4kgs浓HCl处理65.7kgs水)。将内容物温热至 $5^{\circ}\text{C}+/-5^{\circ}\text{C}$,搅拌45min,然后温热至 $20^{\circ}\text{C}+/-5^{\circ}\text{C}$,同时搅拌15min。使搅拌器停止,使各相沉降。取出水层。用水(48kgs,适合饮用的)洗涤有机相,搅拌15min,使各相沉降(至少15min),取出水层,加入到水层中。向有机相中加入制备的1/3缓冲溶液(50L)(7.9kgs NaH_2PO_4 、1.3kgs Na_2HPO_4 和143.6kgs水),搅拌至少15min。停止搅拌,使各相分离至少15min。弃去下层。另一部分缓冲溶液(50L)用于洗涤如上所述的有机层。如上所述进行第3次洗涤。

[0422] 在 $42^{\circ}\text{C}/-13.9\text{psig}$ 开始真空蒸馏PhMe相(150L),蒸馏至得到约20L体积油状物。在体积大量减少后,将该混合物转入较小容器以完成蒸馏。加入庚烷(13.7kgs),将该混合物温热至 $40+/-5^{\circ}\text{C}$ 30min,然后将内容物冷却至 $0-5^{\circ}\text{C}$,历时1.5h。过滤固体,用约14kgs冷($0-5^{\circ}\text{C}$)庚烷洗涤反应器。真空干燥固体。然在 $<40^{\circ}\text{C}$ 后放入在室内真空气氛(-28psig)下的烘箱至LOD是 $<1\%$ 。15.3kgs,64%,96%HPLC纯度。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 11.45(br.s,1H),6.41(t, $J=7.2\text{Hz}$,1H),6.25(t, $J=7.2\text{Hz}$,1H),4.18(m,2H),3.27(m,1H),3.03(m,1H),2.95(m,1H),2.77(m,1H),1.68(m,1H),1.49(m,1H),1.25(t, $J=7.2\text{Hz}$),1.12(m,1H)。

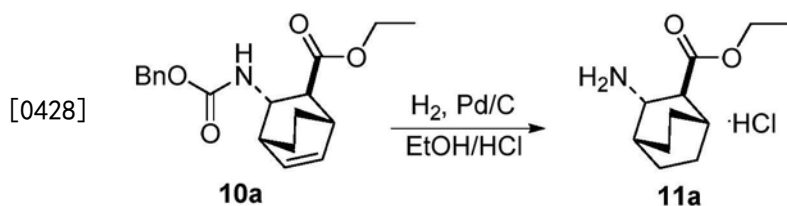
[0423] 化合物10a的制备



[0425] 在氮气气氛中向安装机械搅拌器、温度探头、回流冷凝器、加液漏斗和氮气入口的3颈烧瓶中装入化合物9a (145.0g, 1当量) 和无水甲苯 (Aldrich, 目录#244511) (1408g, 1655ml)。然后分次向搅拌的溶液中加入三乙胺 (Aldrich, 目录号#471283) (140g, 193ml, 2.14当量), 历时5分钟, 在此过程中, 观察到放热至最高温度为27°C。开始通过ReactIR获取数据。然后将该反应混合物加热至95°C, 历时70分钟。然后用加液漏斗分次加入二苯基磷酰基叠氮化物 (Aldrich, cat#178756) (176.2g; 138.0ml, 0.99当量), 历时总时间为2.25小时。

[0426] 在添加二苯基磷酰基叠氮化物完成后 (用少量甲苯洗涤加液漏斗), 将得到的混合物在96°C再加热50分钟。通过GC/MS分析用甲苯稀释的反应混合物样品, 显示二苯基磷酰基叠氮化物耗尽。然后用加液漏斗加入苄醇 (Aldrich, 目录#108006) (69.9g, 67.0ml, 1.0当量), 历时5-10分钟。然后将得到的混合物在97°C加热过夜 (约19小时)。通过GC/MS显示用稀释的反应混合物样品形成产物 ($m/e=330$)。然后将该反应混合物冷却至21°C, 此后, 分次加入水 (870g, 870ml) (观察到适度放热至最高温度为22°C)。通过添加500g水首先使反应混合物猝灭, 机械搅拌10分钟。然后将该混合物转入包含其余370g水的分液漏斗, 然后手动搅拌。在搅拌和相分离后, 分离有机层和水层 (在pH~10时切下水层)。然后再用部分水 (870g; 1×870ml) 洗涤有机层。分离有机层和水层 (在pH~10切下水层)。然后减压浓缩采集的有机相至干 (水浴, 在45-50°C), 得到215g粗化合物10a (约190ml体积)。¹H NMR和GC/MS与化合物10a一致 (含有残留的甲苯和苄醇)。

[0427] 化合物11a的制备



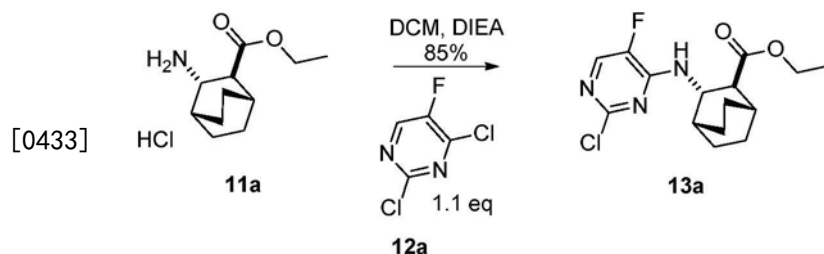
[0429] a.) 乙醇制备中的HCl: 在氮气气氛中向按照温度探头、氮气入口和磁搅拌器的3颈烧瓶中装入乙醇 (1000ml, 773g)。搅拌该溶液, 用干冰/丙酮浴冷却至达到内部温度为-12°C。然后使无水HCl (~80g, 2.19moles) 在冷却的溶液中缓慢地起泡 (观察到温度在添加观察中从-24至-6°C), 历时2小时。添加后, 将该溶液转入玻璃瓶, 温热至环境温度。将溶液样品进行滴定, 得到2.6M浓度。然后将该溶液储存在冷室温 (约5°C) 内过夜。

[0430] b.) 氢化/HCl盐形成: 在氮气气氛中经连接至2加仑Parr高压反应器的玻璃插入物装入披钯碳 (Pd/C (Aldrich, 目录#330108), 10%干基; (50%湿), 13.11g, 0.01当量, 以化合物10a为基础), 用乙醇 (93g; 120ml) 湿润。然后向玻璃插入物中加入粗化合物10a (212g, 1eq) 在乙醇 (1246g; 1600ml) 中的溶液 (用乙醇少量冲洗以辅助转入)。将玻璃插入物放入高压反应器, 此后加入HCl的乙醇溶液 (如上所述制备; 2.6M; 1.04当量, 基于化合物10a; 223g; 259ml)。密封高压反应器, 然后用氢气净化 (3×20psi)。然后在氢气施加压力下 (15psi) 启动氢化3小时, 此时, 氢的压力出现恒定。通过¹H NMR和GC/MS分析反应混合物的等分试样显示原料耗尽/产物形成。然后用硅藻土床 (192g) 过滤得到的混合物, 此后, 再用乙醇 (3x; 在洗涤过程中总计使用1176g乙醇) 洗涤硅藻土床。然后减压浓缩 (水浴, 在45°C) 滤液 (绿色) 至~382g (~435ml); 2.9体积, 基于化合物11a的理论数据收率。然后乙酸异丙酯 (1539g; 1813ml (12体积, 基于化合物11a的理论收率)), 加入到其余部分中。使用温度逐步增加真空

蒸馏得到的溶液。

[0431] 停止蒸馏。此后,使其余的溶液(370g,~365ml总体积;浅棕色)在环境温度静置1个周末。过滤该混合物(乙酸异丙酯用于辅助过滤),再用乙酸异丙酯(2x116ml;各自用约100g洗涤)洗涤采集的固体。然后在40℃真空干燥固体(最高观察到的温度为42℃)过夜,得到118g(78.1%,2步内)化合物11a。该物质的¹H NMR与化合物11a的结构一致且GC/MS显示99%纯度。

[0432] 化合物13a的制备



[0434] 方法A:用CH₂Cl₂(169mL)处理5-氟-2,4-二氯嘧啶(12a,39.3g,235mmol,1.1当量)和HCl胺盐(11a,50g,214mmol)的混合物,将该混合物温热至30℃。然后通过注射器泵缓慢地用DIEA(60.8g,82mL,471mmol,2.2当量)处理该混合物,历时3h。峰值温度达到32℃。将该反应体系搅拌20h,通过HPLC判定反应混合物完全,冷却至rt。依次用水(211mL,pH=8-9)、5%NaHSO₄(211mL,pH=1-2)、然后5%NaCl水溶液(211mL,pH=5-6)洗涤得到的反应混合物。

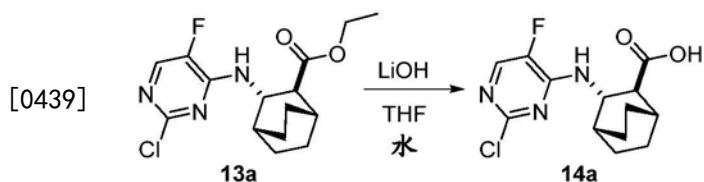
[0435] 然后将有机相减压蒸馏至190mL。装入PhMe(422mL),将温度设定在70-80℃和内部温度在60-65℃,直到体积恢复至190mL。将该混合物冷却至约37℃,同时搅拌,约10min后,结晶开始发生,观察到温度增加至约41℃。在37℃平衡后,向该混悬液中加入正-庚烷(421mL),历时3.5h,然后冷却至22℃,历时1h。将该混合物在该温度下搅拌,然后过滤。用10%PhMe的正-庚烷溶液(2x210mL)洗涤过滤器上得到的固体。然后在烘箱中与N₂吹扫下在50℃真空干燥固体过夜。得到的固体称重为62g(88%收率)。

[0436] 方法B:在氮气气氛中向按照机械搅拌器、温度探头、回流冷凝器、氮气入口和加液漏斗的3颈烧瓶中装入化合物11a(51.2g)和化合物12a(40.2g)。加入二氯甲烷(173mL,230g),搅拌得到的混合物,同时温热至内部温度为30℃。然后用加液漏斗缓慢地加入N,N-二异丙基乙胺(85mL,63.09g),历时2.5-3小时,在此过程中,放热至观察到的最高温度为33.5℃。在添加完成后,将得到的溶液在30-31℃在氮气气氛中搅拌过夜(约19小时)。

[0437] 用二氯甲烷将该反应混合物的100μl样品稀释至总体积为10ml,充分混合该溶液。通过GC/MS分析稀释等分试样的样品,通过GC/MS显示反应完成;观察到产物形成(m/e=328)。将该反应混合物冷却至26℃,转入分液漏斗(用二氯甲烷辅助)。然后依次用水(211mL,211g;切下水相的pH为~8;用切下的水层转移少量切下的层(raglayer))、5%NaHSO₄水溶液((使用50g一水合硫酸氢钠(Aldrich目录#233714)和950g水制备)211mL,216g;切下水层的pH为~2)、然后用(使用50g氯化钠(Aldrich目录#S9888)和950g水)制备的5%NaCl水溶液(211mL,215g;切下的水层的pH为~4-5)洗涤该混合物。然后减压浓缩采集的有机相(水浴,在35℃)至~190ml(2.7体积,基于化合物13a的理论收率,此后,加入甲苯(Aldrich目录#179418,422mL,361g)。减压浓缩得到的混合物(水浴,在55-65℃)至~

190ml (2.7体积, 基于化合物13a的理论收率)。在该阶段通过¹H NMR分析溶液样品显示不存在二氯甲烷。将其余的混合物冷却至37°C (使用水浴, 在37°C, 用旋转蒸发与搅拌)。在此过程中, 观察到显著的结晶。然后机械搅拌该混合物, 加热至约37°C (外部热源设定至38°C), 此后, 通过加液漏斗缓慢地加入正-庚烷 (430ml, 288g; Aldrich目录#H2198), 历时3小时。在添加后, 停止加热, 机械搅拌得到的淤浆, 同时冷却至环境温度过夜。然后过滤得到的混合物, 用10%甲苯的正-庚烷溶液 (2×210ml; 各自通过混合21ml (16g) 甲苯和189ml (132g) 正-庚烷制备洗涤液) 洗涤采集的固体。施加真空, 直到几乎不再观察到滤液。然后在50°C在氮气气氛中进一步真空干燥固体至恒重 (3.5小时), 得到64.7g (90%) 化合物13a。通过¹H NMR对固体样品进行分析显示该物质与结构一致且LC分析显示使用提供的LC方法的纯度为99.8%。

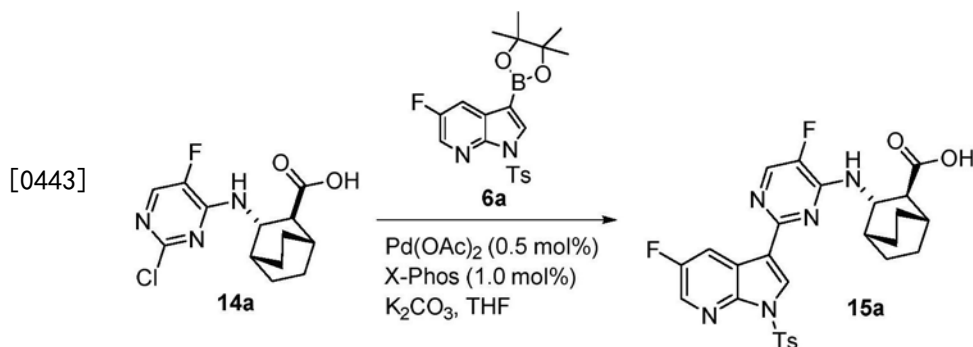
[0438] 化合物14a的制备



[0440] 将乙酯13a (85g, 259mmol) 溶于THF (340mL), 用LiOH溶液 (2M, 389mL, 778mmol) 处理, 历时10min (温度从21至24°C)。将该混合物温热至45°C, 同时搅拌17h, 此时, 通过HPLC判定反应完成 (未观察到SM)。将该反应混合物冷却至rt, 加入CH₂Cl₂ (425mL)。然后缓慢地加入柠檬酸溶液 (2M, 400mL), 历时45min (温度达到26°C)。注意, 在添加过程中, 发现一些白色固体, 但在搅拌下快速溶解。将该反应混合物再搅拌15min, 然后使各相分离。在各相分离后, 测定水相的pH为pH=4.0。用水 (255mL) 洗涤有机相 (15min搅拌), 使各相分离。然后将包含期望的产物的下层 (有机层) 储存在冷藏箱内过夜。

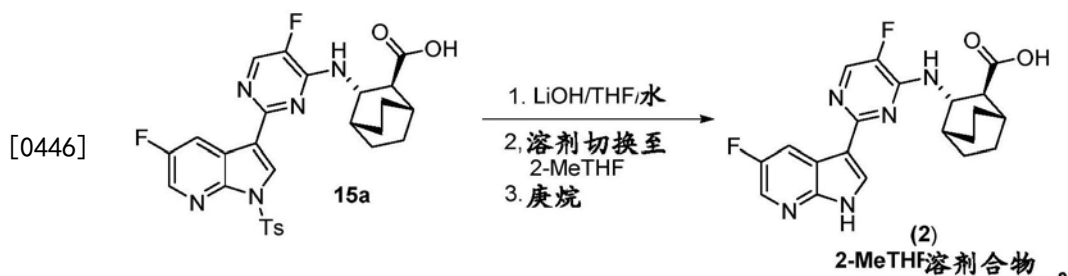
[0441] 减压浓缩有机相 (罐设定至65°C) 至约150mL (est. 1.76vol wrt SM)。加入IPA (510mL), 减压蒸馏 (85°C冷却器温度设置) 至255mL (3vol)。通过添加IPA (298mL) 使溶剂水平达到约553mL (6.5vol)。然后加入水 (16mL), 将该反应混合物温热至回流 (77°C), 同时良好搅拌, 在容器壁上沉淀的固体溶解。然后将反应混合物缓慢地冷却至65°C (历时60min), 保持-全部物质仍然在溶液中 (取出样品用于残留溶剂分析)。将该反应体系再冷却至60°C, 该反应混合物出现适度不透明。搅拌15min后, 再冷却至55°C。尽管更多产物沉淀, 但是该混合物仍然稀薄且易于搅拌。极缓慢地加入水 (808mL) (2.5-3hrs), 同时维持温度约为55°C。然后将该混合物冷却至22°C, 历时2h, 搅拌过夜。然后过滤物质, 用水:IPA的混合物 (75:25, 2x255mL) 洗涤。在55°C在真空烘箱中干燥酸过夜。得到69g酸化合物14a, 88%收率, 白色固体。通过HPLC分析的该物质>99%纯度。

[0442] 化合物15a的制备: Suzuki偶合



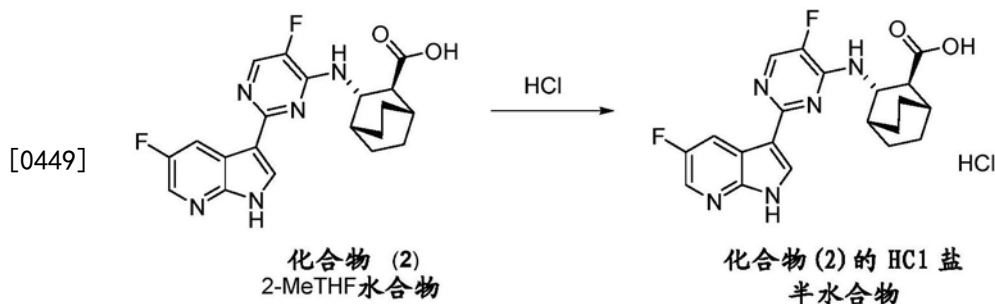
[0444] 向14a (91.4g, 305mmol)、6a (158.6g, 381mmol, 1.25当量)、Pd(OAc)₂ (0.34g, 1.5mmol, 0.5mol%)、X-Phos (1.45g, 3.0mmol, 1.0mol%) 和K₂CO₃ (168.6g, 1220mmol, 4当量) 中加入THF (731mL, 8个体积) 和水 (29mL, 0.32vol)。用N₂吹扫该反应混合物30min, 然后温热至65-70℃, 搅拌5h。该反应混合物的HPLC分析显示99.3%转化率。将该反应混合物冷却至22-25℃, 加入水。搅拌该混合物, 使各相分离, 滗析水相。向有机相中加入18wt% NaCl水溶液(半饱和NaCl水溶液), 使用2N HCl将该混合物的pH调整至6.0-6.5。使各相分离, 滗析水相。浓缩有机相至小体积, 加入乙腈。重复该过程1次, 加入乙腈至最终体积至910mL (10vol)。将该淤浆温热至80-85℃ 6h, 然后冷却至20-25℃。将该淤浆搅拌2h, 然后过滤。用乙腈冲洗固体, 得到化合物15a (161g, 89%收率)。

[0445] 化合物(2)的制备: 脱甲苯磺酰化步骤



[0447] 向15a (25g, 45.2mmol) 中加入THF (125mL, 5vol), 然后加入MP-TMT树脂 (6.25g, 25wt%)。将该混合物在20-25℃搅拌16h, 过滤, 用1vol THF冲洗。重复树脂处理过程和过滤。将THF溶液浓缩至5vol。在22-25℃向该混合物中加入2M LiOH水溶液 (90.3mL, 4当量)。将该反应混合物温热至40-45℃, 搅拌5h。HPLC分析显示99.7%转化率。将该反应混合物冷却至22-25℃, 加入MTBE (50mL, 2vol)。发生相分离。采集下部的水相。用MTBE萃取水相。采集下部的水相。向水相中加入2-MeTHF, 搅拌该混合物。将该混合物的pH调整至6.0-6.5, 滗析下部水相。用pH 6.5红花草药洗涤有机相。将有机相浓缩至85mL, 用2-MeTHF (150mL) 稀释, 浓缩至180mL最终体积。将得到的淤浆温热至70-75℃, 搅拌至完全溶解, 然后冷却至45-50℃, 得到淤浆。将淤浆搅拌1h, 然后加入庚烷 (180mL)。将该淤浆冷却至20-25℃, 历时1h, 搅拌16h。过滤该批量, 用庚烷冲洗固体。干燥固体, 得到粗化合物(2)·2-MeTHF溶剂合物, 79%收率。

[0448] 化合物(2) HCl盐半水合物的制备: 盐形成

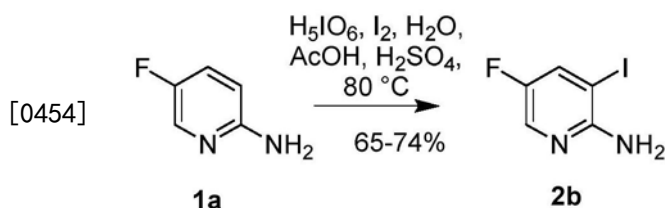


[0450] 方法A:将化合物 (2) • 2-MeTHF (953g, 2.39mol) 放入30L加套反应器,用IPA (15L) 和水 (0.57L) 处理。启动搅拌器,将该反应混合物温热至73℃,使每种物质形成溶液,然后冷却至50-55℃。在50-55℃,用新鲜制备的HCl的IPA溶液 (0.83M, 4.34L) 通过缓慢添加处理该反应混合物,历时4h。采样该反应体系,通过XRPD检查正确形式。添加后。启动冷却器程序以变速至0℃,历时480min,同时搅拌。在XRPD通过分析证实形式后,将淤浆过滤入两个滤器。用3L IPA洗涤反应器,用来自反应器中的IPA冲洗液的~1.5L IPA洗涤每种滤饼。通过抽吸将滤饼风干过夜。然后将滤饼放入盘式干燥器,真空与N₂吹扫 (22inHg) 无加热24h。残留的溶剂和水分析显示505ppm IPA、8ppm 2-Me-THF和约2.15% H₂O。从烘箱中取出物质,共同研磨至打碎团块,得到805g化合物 (2) 的HCl盐 • 1/2H₂O。

[0451] 方法B:或者,使用丙酮替代IPA,但按照与上述方法A中所述类似方式进行,形成化合物 (2) 的HCl盐 • 1/2H₂O。

[0452] 实施例2:一些化合物的可选制备和Suzuki反应条件

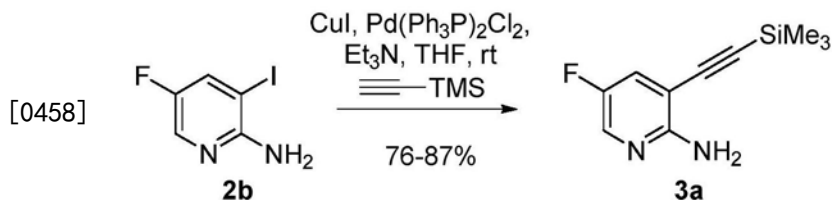
[0453] A. 实施例1的化合物3a的制备



[0455] 步骤1:5-氟-3-碘吡啶-2-胺 (2b)

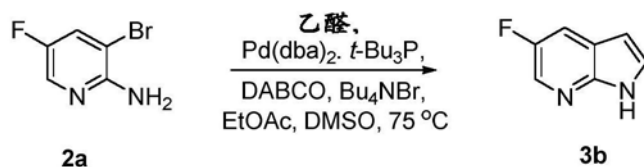
[0456] 将H₂SO₄ (120mL) 滴加到2-氨基-5-氟吡啶 (1kg, 8.9mol) 在AcOH (4L) 和H₂O (1L) 中的溶液中,历时5分钟。加入高碘酸 (H₅IO₆; 450g, 1.97mol, 0.22eq) 和I₂ (1kg, 3.94mol, 0.44eq),将该反应混合物在82℃ (内部) 搅拌过夜。样品 (用H₂O稀释,用30%NaOH呈碱性,用EtOAc萃取,浓缩) 显示13-15%的原料。再加入H₅IO₆ (80g) 和I₂ (180g),在80℃持续搅拌过夜。除去外部加热,将该反应混合物在RT搅拌过夜。将该反应混合物倾倒在冰-水 (8L) 上,用33%NaOH水溶液呈碱性 (需要~6.5L),搅拌2h。通过过滤采集沉淀的产物,用热H₂O (8×3L) 洗涤。将滤器保持洗涤过夜,此后,用庚烷 (3x) 洗涤产物。将产物在加热器中在45℃干燥1个周末。得到化合物2b (1390g, 65%收率),为黑色固体。向庚烷层中加入H₂O,保持经过1个周末。使深色水层与淡黄色有机层分离,浓缩至干。由此又得到化合物2b (95g, 70%总收率),为黄色固体。¹H NMR (DMSO-d₆, 300MHz): δ7.95-7.88 (m, 2H) ppm。¹H NMR (CDCl₃, 300MHz): δ 7.95-7.90 (m, 1H); 7.68-7.62 (m, 1H); 4.85 (s, NH₂) ppm。

[0457] 步骤2:5-氟-3-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)吡啶-2-胺 (3a)

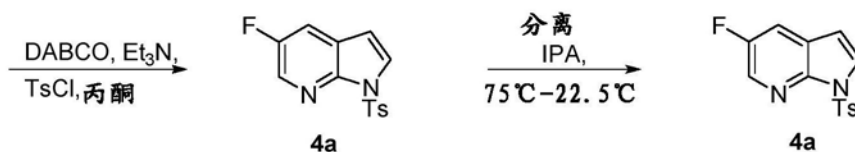


[0459] 使用 N_2 (g)/真空循环给化合物2b(790g, 3.3mol)在THF(2.9L)中的溶液脱气(3×)。开始用 N_2 (g)净化,然后添加CuI(6.32g, 0.01eq)、 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (23.4g, 0.01eq)和 Et_3N (1.4L, 3eq)。净化持续10分钟,给该反应混合物脱气1次,然后滴加三甲基甲硅烷基乙炔(605mL, 1.3eq),历时40-45分钟。在添加过程中,放热反应并非通过自身开始,将该反应体系加热至 $\sim 45^\circ\text{C}$ 。除去外部加热。放热反应此时开始,温度达到 $\sim 66^\circ\text{C}$ (添加完成后40分钟)。将该反应混合物再搅拌2h,此后,使温度降至 26°C 。样品(用硅藻土过滤,浓缩)显示完全转化,用EtOAc(3L)稀释该反应混合物。用硅胶(2Kg)过滤该溶液,用EtOAc(总计9L)洗脱。减压除去溶剂,得到化合物3a(642g, 93%收率),为深色油状物。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz): δ 7.90(s, 1H); 7.33-7.27(m, 1H); 4.92(s, NH_2), 0.28(s, 9H) ppm。

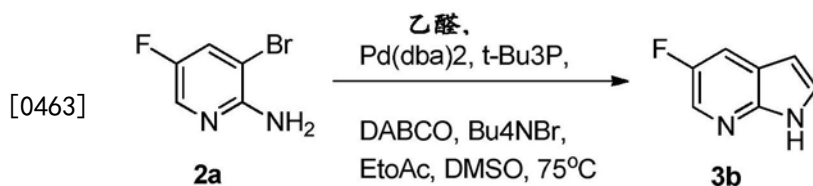
[0460] B. 实施例1的化合物4a的制备



[0461]



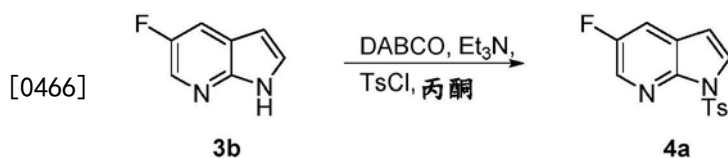
[0462] 步骤1: 5-氟-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(3b)



[0464] 向用氮气净化的500mL压片烧瓶中装入3-溴-5-氟吡啶-2-胺(化合物2a)(20g, 104.7mmol, 1当量)、DABCO(17.6g, 157.0mmol, 1.5当量)和溴化四丁基铵(3.38g, 10.5mmol, 0.1当量)。向烧瓶中装入二甲亚砜(无水, 40mL)和乙酸乙酯(无水, 120mL),用氮气吹扫得到的混合物30min。加入双(二亚苄基丙酮)钯(0)(3.01g, 5.24mmol, 0.05当量)、10%w/w的三叔丁基磷的己烷溶液(21.2g, 10.47mmol, 0.1当量)和乙醛(5.08g, 115.2mmol, 1.1当量),密封烧瓶。将该混合物在室温搅拌1h,然后用油浴在 76.5°C 加热5h。冷却该批量,采样用于HPLC分析。观察到完全转化成化合物3b后(典型地5h后100%转化率),用水(40mL)使该批量猝灭。用乙酸乙酯(40mL)反萃取水相,通过硅藻土垫过滤合并的有机层,以除去细固体。用乙酸乙酯(40mL)冲洗硅藻土,向得到的粗产物溶液中加入5% Na_2CO_3 (60mL),用氮气吹扫30min,同时混合。用水(60mL)洗涤得到的有机相,在 $<30^\circ\text{C}$ 浓缩至43mL。基于HPLC标准,来自

3-溴-5-氟吡啶-2-胺的溶液收率为13.1g (92%)。

[0465] 步骤2:5-氟-1-甲苯磺酰基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(4a)

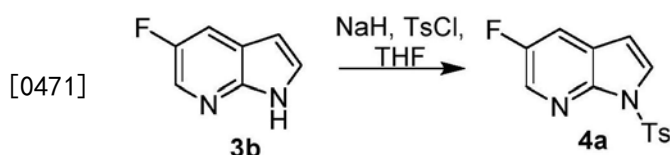


[0467] 向来自步骤1的粗化合物3b(推定14.26g(100%来自步骤1),1当量)在乙酸乙酯中的溶液中加入丙酮(71.2mL)、DABCO(5.8g,52.35mmol,0.5当量)和三乙胺(29.4mL,209.4mmol,2当量),用氮气净化反应烧瓶。在单独的烧瓶中,制备甲苯磺酰氯(29.9g,157.0mmol,1.5当量)在丙酮(35.6mL)中的溶液。将甲苯磺酰氯的溶液在室温加入到化合物3b的溶液中,历时30min。通过HPLC分析该反应体系4h后的%转化率。当<0.2%AUC时,化合物3b保留(典型地在4h后),用水(10mL)使反应停止,搅拌30min,加入HCl(80mL)和二氯甲烷(144mL)。将该批量搅拌30min。用二氯甲烷(43mL)萃取水相,用5%NaCl(72mL)洗涤合并的有机层。基于HPLC标准,该步骤的化合物4a的溶液收率为27.0g(97%)。

[0468] 步骤3:5-氟-1-甲苯磺酰基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(4a)的分离

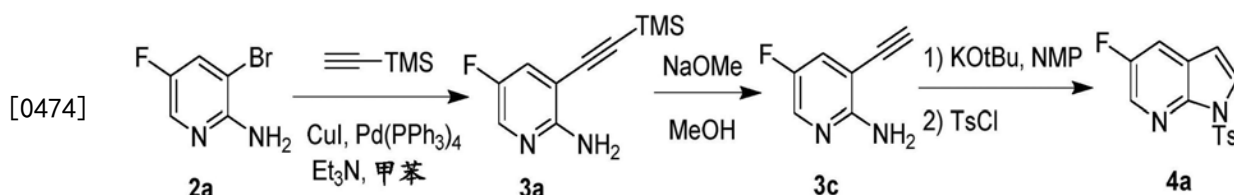
[0469] 真空浓缩来自步骤2的粗化合物4a的溶液至57mL,加入2-丙醇(184mL),浓缩至120.8mL。将得到的混合物加热至83.6℃。在该温度下搅拌1h后,将该混合物冷却至22.5℃,历时2h,维持该温度下20h。然后过滤淤浆,用25/75水/2-丙醇(2×80mL)洗涤反应器和采集的固体。在56℃用氮气吹扫真空干燥该物质7h。分离化合物4a,来自3-溴-5-氟吡啶-2-胺(3个步骤,包括分离)的收率为81%(24.5g),98.4%AUC纯度。¹H NMR(CDCl₃,300MHz):δ8.28-8.27(m,1H);8.06-8.02(m,2H);7.77(d,J=4.0Hz,1H);7.54-7.50(m,1H);7.28-7.26(m,2H);6.56(d,J=4.0Hz,1H);2.37(s,3H)ppm。

[0470] C. 实施例1的化合物4a的制备



[0472] 方法A:将化合物3b(280g,2mol)溶于THF(6L),用冰浴将该溶液冷却至<10℃。分次加入60%NaH(95g,57g NaH,1.15eq)在矿物油中的分散液,历时30分钟。将温度保持在5-10℃。将该反应混合物搅拌40分钟。滴加对-甲苯磺酰氯(408g,1.04eq)在THF(总溶液2.5L)中的溶液,历时40分钟。除去外部冷却,将该反应混合物搅拌70分钟,此时温度达到8℃。样品的NMR分析(用EtOAc稀释,用饱和NaHCO₃洗涤,浓缩)显示反应完成。用饱和NaHCO₃水溶液(2L)使反应混合物猝灭,用EtOAc(8L)稀释。分离各层,将有机层分成2批。用饱和NaHCO₃水溶液(2×1.5L)和盐水(2×1L)洗涤每批。合并批量,用Na₂SO₄干燥,用硅胶(2Kg)过滤,用EtOAc(总计~10L)洗脱。减压除去溶剂(~28L),将得到的固体(628g)转入过滤器,用庚烷(2×)洗涤。注意:第一次庚烷洗涤减压橙红色,且第二次洗涤几乎无色。干燥后,得到纯化合物4a(566g,94.6%收率),为浅棕色固体。¹H NMR(CDCl₃,300MHz):δ8.28-8.27(m,1H);8.06-8.02(m,2H);7.77(d,J=4.0Hz,1H);7.54-7.50(m,1H);7.28-7.26(m,2H);6.56(d,J=4.0Hz,1H);2.37(s,3H)ppm。

[0473] 方法B:



[0475] 步骤1:化合物3c的制备

[0476] 包含化合物2a的甲苯溶液(185L, ~33.5kg, 175mol)的惰性400-L反应器中装入Pd(PPh₃)₄(1215g, 1.05mol)和CuI(200g, 1.05mol)。用两次真空-氮气循环给该混合物脱氧,然后加入三乙胺(23kg, 227mol)。用一次以上真空-氮气循环给该混合物脱氧,然后加入TMS-乙炔(19kg, 193mol)。将该混合物加热至50℃22小时,然后加热至54℃再经过9小时,冷却至25℃过夜。一次加入25wt%甲醇钠的甲醇溶液(41.6kg, 193mol),将该混合物在25℃搅拌40分钟。将该混合物冷却至20℃,然后一次加入乙酸(2L, 35mol),搅拌1小时。通过硅藻土垫过滤淤浆,用甲苯(30kg)洗涤,保持滤液用于产物分离。按照类似方式进行第二次来自~29.8kg化合物2a的甲苯溶液(156mol)的运行。

[0477] 将来自两次运行的滤液浓缩至~220L体积(蒸发甲醇),用新鲜甲苯稀释至~290L。通过酸式硅酸镁垫(20kg)过滤该溶液,用MTBE(240L)洗涤。蒸发滤液,得到浓稠淤浆(~75L体积),然后在~35℃加入己烷(65kg)。将该淤浆冷却至20℃。当尝试过滤时,固体未在反应器中出现,但易于得到液体。在排出液体后,用己烷(93kg)洗涤罐中的固体。固体再停留在罐中,进行洗涤。在罐中真空干燥固体(~95%纯, 249mol, 75%收率)。

[0478] 浓缩滤液,使残余物分配在DCM(25L)与2M HCl(30L)之间。用DCM(5L)洗涤上部水层。用2M HCl(6L)依次再萃取有机层。将水层与DCM(25L)一起搅拌,通过添加K₃P₁₀(1kg)、然后添加8M NaOH(8.3L)将pH调整至~8。分离各层(产物在有机层中),用DCM(5L)再萃取水层。通过(3kg)垫过滤有机层,用DCM(7L)洗涤。浓缩滤液至干,在45℃与己烷(4L)一起研磨,冷却至20℃,过滤,用己烷洗涤,又得到步骤2(8.25kg, ~95%纯, 58mol, 17%),为橙棕色固体。

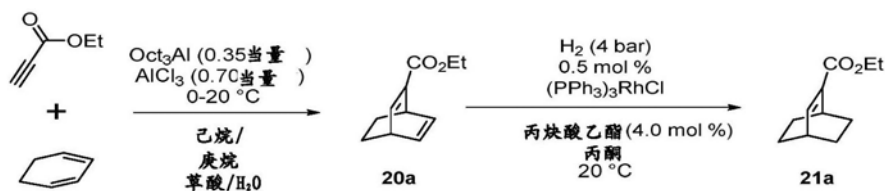
[0479] 步骤2:化合物4a的制备

[0480] 向惰性400-L反应器中装入NMP(80kg)和叔丁醇钾(40kg, 357mol)。将该混合物加热至59℃,然后加入步骤2(44kg, ~95%纯, 307mol)在NMP(80kg)中的溶液,历时2小时,用NMP(10kg)冲洗(放热,维持70-83℃)。将该反应体系在75℃搅拌1小时。通过NMR显示猝灭入DCM/NaHCO₃的样品无原料剩余。用过量TsCl使样品猝灭,然后用DCM/NaHCO₃后处理,显示~4%N-H剩余。将该混合物冷却至48℃,再加入叔丁醇钾(2kg, 18mol)。将该混合物再冷却至37℃,加入甲苯磺酰氯(62kg, 326mol)在NMP(60kg)中的溶液,历时1.5小时,用NMP(4kg)冲洗(放热,维持30-45℃)。将该反应体系搅拌1小时同时冷却至20℃。

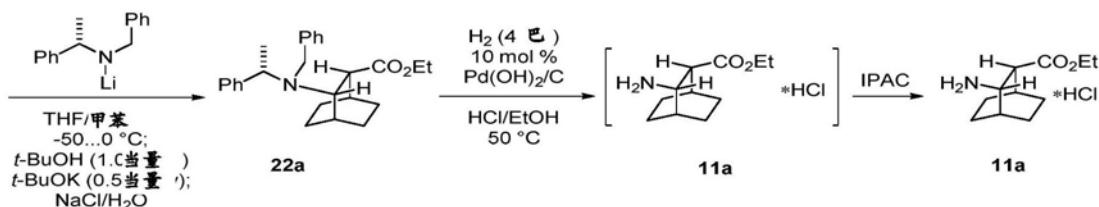
[0481] 猝灭入DCM/NaHCO₃的样品显示~9%N-H剩余。再加入甲苯磺酰氯(3kg, 16mol),将该混合物在20℃搅拌过夜,然后转入惰性800-L反应器,用NMP(10kg)冲洗。在5℃加入水(500L),历时2.5小时(放热,维持17-23℃)。将该混合物在17℃搅拌30分钟。当尝试过滤时,混合物未从反应器中析出。沉降后,抽吸出上部的液体(通过过滤器)。将罐中的固体浸入水(100L,不搅拌),然后再抽吸出上部液体。再用100L(静置过夜)且然后用200L水(静置7小时)重复洗涤。将反应器设定在慢速氮气流通过固体,从底部阀门放出(通过过滤器),历时1个周末。将得到的固体溶于DCM(400kg),与残留的水分离。再用DCM(50kg)萃取水层。蒸馏合并

的有机层以除去~30L溶剂(共沸残留的水),然后通过酸式硅酸镁垫(30kg)过滤,然后通过硅胶垫(50kg)过滤,再用DCM(~600kg)洗涤。将滤液浓缩至得到浓稠淤浆(~110L体积),然后分次加入MTBE(65kg),同时持续蒸馏至最终蒸汽温度为50℃(最终体积145L)。将该淤浆冷却至15℃,过滤,用MTBE(65kg)洗涤,得到产物(43.46kg,150mol,49%),为淡橙色固体。部分浓缩滤液,得到第二批(2.65kg,~93%纯度,8.5mol,3%)。将该滤液浓缩至干,然后分配在DCM(60L)与2.2M NaOH(35L)之间。用水(2×30L)、然后用盐水(20L)洗涤有机层,通过硅胶垫(35kg)过滤,用DCM洗脱。浓缩滤液,将残余物与MTBE(20L)一起研磨,过滤,得到第三批(3.72kg,12.8mol,4%)。

[0482] D. 实施例1的化合物11a的制备



[0483]



[0484] 化合物20a的制备:Diels-Alder反应

[0485] 将AlCl₃(380.6g,2.85mol,0.7当量)加入10-L Chemglass加套底部排出反应器,用N₂吹扫,然后加入庚烷(1.6L,4vols)。将该混合物滤器至0℃。通过加液漏斗加入三辛基铝(2.99L,1.43mol,0.35当量,25wt%的己烷溶液),历时40min。将淡绿色淤浆搅拌1h。加入丙炔酸乙酯(400g,413mL,1.0当量),历时1h。在添加结束时温度为6.0℃。加入1,3-环己二烯(425g,494mL,1.3当量),历时3h。将该反应体系保持搅拌16h。反应外观从淡橙色淤浆变成均匀橙色溶液。将该反应体系冷却至0℃。将9%的草酸水溶液在N₂气氛中放入30-L Chemglass加套底部排出反应器,冷却至0℃。将该反应混合物从10-L反应器中分部分转入猝灭30-L反应器,历时1h。用庚烷(800mL,2vol)冲洗10-L反应器,将冲洗液转入30-L猝灭反应器。将猝灭的反应混合物温热至22.5℃,同时搅拌。停止搅拌,使各相分离。排出底部水相。将水(800mL,2vol)加入猝灭30-L反应器,将该混合物搅拌30min。停止搅拌,使各相分离。排出下部水相,在相同条件和规模下用旋转蒸发器浓缩上部有机相(浴温为40-50℃)与另一批中产生的溶液。浓缩物质重量为1771g,且发现其包含83%的产物(平衡为残留辛烷)。收率计算为101%。HPLC纯度为99.39%AUC。¹H NMR(400MHz,CDC13) δ7.27(dd,J=6.5,1.8Hz,1H),6.37(ddd,J=7.5,6.2,1.5Hz,1H),6.26(ddd,J=7.3,5.9,1.5Hz,1H),4.23-4.13(m,3H),3.78-3.70(m,1H),1.40-1.19(m,7H)。

[0486] 化合物21a的制备

[0487] 将Wilkinson催化剂Rh(PPh₃)₃Cl(22.97g,25mmol,0.005当量)加入到粗化合物20a(1068g,83wt.%,4.97mol,1当量)中。将该混悬液转入3-L Buchi氢化器,其具有的加套温度设定至20℃。用丙酮(885mL,1vol)冲洗包含原料的瓶子,将其转入氢化器。加入丙炔酸乙

酯(19.49g, 20.2mL, 200mmol, 0.04当量)。将该反应体系在4巴的氢气气氛中在20℃搅拌17h。观察到99.6%AUC转化成期望的化合物21a。通过相同条件处理697g粗化合物20a, 实际得到相同的转化率。用旋转蒸发器与40-50℃浴温浓缩两种粗化合物21a溶液, 得到1913g粗产物。使用纯化标准的W/w测定得到计算的活性成分含量为70.9%:1357g活性产物, 92%收率, 2步内。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.34 (dd, J=6.9, 1.7Hz, 1H), 4.20 (q, J=7.1Hz, 2H), 3.17 (m, 1H), 2.69-2.73 (m, 1H), 1.54-1.60 (m, 4H), 1.31 (t, J=7.1Hz, 3H), 1.23-1.27 (m, 4H)。

[0488] 化合物22a的制备

[0489] 将S-(-)-N-苄基-α-甲基苄胺(585g, 579mL, 2.77mol, 1.1当量)装入22-L圆底烧瓶, 然后加入无水THF(5.1L, 11vol), 启动搅拌, 用干冰/丙酮浴将烧瓶冷却至0℃。加入n-BuLi(1.1L, 2.77mol, 1.1当量, 2.5M的己烷溶液), 历时50min。将该反应体系搅拌15min。将该反应混合物在干冰浴/丙酮中冷却至-42.2℃, 历时10min。加入在甲苯(640mL, 1.4vol)中的化合物(R)(640g, 70.9wt.%, 454g活性成分, 2.52mol, 1.0当量)。历时30min, 维持内部温度-45--40℃。将该反应体系搅拌1h。加入t-BuOH(186g, 240mL, 2.52mol, 1.0当量)在无水THF(95mL, 0.2vol)中的溶液, 历时20min, 然后加入t-BuOK溶液(1.26L, 1.26mol, 0.5当量, 1.0M的THF溶液), 历时20min, 自始至终维持内部温度为-45--40℃。使该反应体系达到室温, 搅拌18h。将该反应体系冷却至0℃, 加入氯化钠(160g)的水(3.0L)溶液。将该混合物温热至20℃, 使相分离。排出下部的水层。将水(3L)加入反应器, 同时搅拌。温度从21℃增加26℃。将该混合物搅拌30min, 然后停止搅拌, 使相沉降30min。采集上部有机相。将该批量中制备的溶液与两批另外的在相同条件和类似规模下得到的上述批量共同旋转蒸发。粗产物(黄色油状物)总重为3630g。将物质用于下一步。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.49-7.41 (m, 2H), 7.41-7.14 (m, 8H), 4.27-4.18 (m, 1H), 4.09-3.93 (m, 2H), 3.89-3.81 (m, 1H), 3.48 (m, 2H), 2.52-2.45 (m, 1H), 2.08-1.95 (m, 2H), 1.76 (m, 1H), 1.70-1.21 (m, 7H), 1.44 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.19 (q, J=7.2Hz, 3H)。

[0490] 化合物11a的制备

[0491] 将Pearlman催化剂(Pd(OH)₂/C, 支持物上20wt.%, 50%水, 总计500g, 50g活性成分, 0.36mol, 0.095当量)装入带有加套温度设定至20℃的20-L Buchi氢化器。加入化合物22a(1815g实际重量, 1468g推定的活性成分, 3.75mol, 1.0当量), 然后加入EtOH(7.5L, 基于活性成分载量5.1vol)。加入浓HCl(37.7wt.%的水溶液, 305mL, 363g, 137g活性成分, 3.75mol, 1.0当量), 历时20min。用pH试纸测定反应体系的pH, 记录为1。在1巴H₂气氛中氢化该反应体系, 加热至50℃。一旦达到50℃, 则用H₂给该反应器进一步加压至4巴。将该反应体系保持在上述设定的条件下96h。用硅藻土过滤过滤出催化剂, 用EtOH(2L)冲洗氢化器, 将冲洗液用于冲洗硅藻土层, 与主要滤液合并。用旋转蒸发器与基本上相同条件和相同规模下制备的上述批量一起浓缩粗产物化合物11a的乙醇溶液。产生浓稠糊状物。向包含来自上述步骤的产物的旋转蒸发器球管中加入乙酸异丙酯(2L)。然后将球管在N₂大气压下旋转30min以混悬固体。真空蒸馏出溶剂。再加入乙酸异酯(2L), 将球管在N₂大气压下旋转以混悬固体。将该淤浆转入30-L Chemglass加套反应器。用乙酸异丙酯(2L)冲洗球管, 将冲洗液加入到反应器中。加入乙酸异丙酯(12L, 总计16L, 5.5vol, 基于推定的活性化合物11a)。将该黄色混悬液在24.4℃的室温搅拌20h。用陶瓷滤器与滤纸过滤淤浆。用乙酸异丙酯(4L)冲

洗反应器,将冲洗液用于冲洗滤饼。得到白色致密滤饼。将其保留在抽真空中几个小时。在40°C与N₂气流中真空烘箱干燥滤饼20h。得到的产物的量为924g (3.95mol,来自丙炔酸乙酯的收率为48%)。纯度(GC)为98.31%AUC。¹H NMR (400MHz, MeOH-d₄) δ4.28-4.14 (m, 2H), 3.87-3.79 (m, 1H), 2.63-2.56 (m, 1H), 2.07 (dd, J=5.4, 2.7Hz, 1H), 1.95-1.86 (m, 1H), 1.86-1.72 (m, 2H), 1.73-1.53 (m, 4H), 1.54-1.37 (m, 2H), 1.28 (t, J=7.1Hz, 3H)。¹³C NMR (101MHz, MeOH-d₄) δ174.03, 62.37, 52.00, 48.89, 29.58, 28.96, 25.94, 25.05, 21.48, 19.28, 14.56.

[0492] F. 为制备化合物(Z-2)的Suzuki反应条件筛选

[0493] 进行13次1g等级的化合物(Z-2)制备,使用不同的催化剂系统完成,包括使用Pd(OAc)₂/X-Phos组合用于基线化目的。Pd(OAc)₂/X-Phos组合显然优于其它催化剂。

[0494] 向安装螺旋帽的40mL反应小瓶中加入化合物(X-2) (1.0g, 3.3mmol, 1.0当量)、化合物(Y-2) (1.7g, 4.2mmol, 1.25当量)、催化剂(0.25mol%)和碳酸钾(1.8g, 13.3mmol, 4.0eq),然后加入THF(8mL, 8vol)。在开始搅拌后,用3个真空/氮气循环给浓稠淤浆脱气,加热至60-65°C。一旦达到期望的温度,加入脱气的水(0.32mL, 0.3vol),历时15分钟。在水添加完成后,将该反应混合物在设定温度下搅拌,在不同时间点取HPLC测定值(表1)。

[0495] 表1:用于制备化合物(Z-2)的催化剂筛选

催化剂	时间 (h)	转化率 (%)
Pd (OAc) 2/X-Phos	1.25	>99.9
(1, 1'-双(二叔丁基膦基二茂铁基)) PdCl ₂	1.25	91.0
	2.50	91.2
(PCy ₃) ₂ PdCl ₂	1.25	39.2
	2.00	39.7
	10.0	39.8
(tBuAmphos) PdCl ₂	1.25	41.8
	2.50	43.4
	10.0	43.4
(1, 1'-双(二环己基膦基二茂铁基)) PdCl ₂	1.25	27.5
	2.50	27.4
Pd (OAc) 2/tBuBrettphos	1.25	1.0
	2.50	1.2
[0496] (dppf) 2PdCl ₂	1.25	17.4
	2.50	17.4
(三-邻-甲苯基膦) 2PdCl ₂	1.25	13.0
	2.50	13.0
(PEt ₃) ₂ PdCl ₂	1.25	<1
	2.50	<1
(dppe) PdCl ₂	1.25	2.5
	2.50	2.5
FibreCAT 1026	1.25	<1
	3.00	<1
	10.0	1.5
(三叔丁基膦) 2Pd ₀	1.25	2.3
	2.50	3.1
Pd (PPh ₃) ₄	1.25	4.5
	2.50	4.8

[0497] 实施例3:化合物(1)的HCl盐的多晶型物的形成

[0498] 3A:化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A的制备

[0499] 通过在水和有机溶剂的混合物中混合化合物(1)的2-甲基四氢呋喃(2-MeTHF)溶剂合物(1当量)(化合物(1)·1(2-MeTHF))与氯化氢制备化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A,其中水和有机溶剂的混合物具有0.05-0.85的水活度。将所用的具体反应条件概括在下表2中。

[0500] 表2:用于制备化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A的反应条件

[0501]

化合物 (1) (mg) (2-MeTHF)	Solvent	溶 剂 (mL)	水 (mL)	6N HCl 水 溶 液 (mL)	T (°C)	Eq (HCl: 化 合 物 (1))	水 (wt%)
40	丙酮	640	40	15.70	35	1.1332	8.84%
25	丙酮	400	25	9.80	46	1.1318	8.84%
10.09	丙酮	160	64	3.98	35	1.1389	32.71%
5	正-丙醇	186	10	1.29	20	0.7449	6.87%
6.01	异-丙醇	88	2	2.31	35	1.1097	5.10%
6.6	iPrOH/ 乙酸 => 丙酮*	100/1.0	4	3.10	45	1.3561	7.25%
18	丙酮	180	6	3.60	30	0.5774	5.33%
18	丙酮	180	8	6.40	35	1.0266	7.73%
6	丙酮	66	11	2.82	30	1.3561	18.57%
0.101	iBuOAc	5	0.1	0.10	~ 20	2.8586	4.36%
6	乙酸	50	8.7	2.18	35	1.0499	15.37%

[0502] *2步: iPrOH/AcOH, 然后在丙酮/水中再搅拌成淤浆。

[0503] 或者, 还通过下列方法制备化合物 (1) 的 HCl 盐 · 1/2H₂O 的形式 A: 方法 A: 将化合物 (1) · 2-MeTHF (953g, 2.39mol) 放入 30L 加套的反应器, 用 IPA (15L) 和水 (0.57L) 处理。开启搅拌器, 将该反应混合物温热至 73°C, 使每种物质形成溶液, 然后冷却至 50-55°C。在 50-55°C, 用新鲜制备的 HCl 的 IPA 溶液 (0.83M, 4.34L) 通过缓慢添加处理该反应混合物, 历时 4h。采样反应体系, 以便通过 XRPD 检查正确的形式。添加后, 使冷却器按照程序在搅拌下变速至 0°C, 历时 480min。通过 XRPD 分析证实形式后, 将淤浆分入两个滤器。用 3L IPA 洗涤反应器, 用来自反应器的 IPA 冲洗液的 ~1.5L IPA 洗涤每种滤饼。将滤饼使用抽真空风干过夜。然后将滤饼放入盘式干燥器, 在真空与 N₂ 净化气氛中 (22inHg) 24h, 无加热。残留溶剂和水分析显示 505ppm IPA, 8ppm 2-Me-THF 和约 2.15% H₂O。从烘箱中取出物质, 共研磨以打碎团块, 得到 805g 化合物 (1) 的 HCl 盐 · 1/2H₂O。

[0504] 方法 B: 或者, 使用丙酮替代 IPA, 但按照与如上所述方法 A 中类似的方式进行, 形成化合物 (1) 的 HCl 盐 · 1/2H₂O。

[0505] 将一些观察到的 XRPD 峰和 C¹³SSNMR 峰分别概括在表 3A 和 3B 中。

[0506] 表 3A: 化合物 (1) 的 HCl 盐 · 1/2H₂O 的形式 A 的 XRPD 峰

[0507]

XRPD 峰	角 (2- θ \pm 0.2)	强度%
1	10.5	100.0
2	5.2	71.6
3	7.4	46.8
4	18.9	42.0
5	25.2	41.7
6	16.5	39.5
7	18.1	28.1
8	23.0	27.5
9	24.1	25.3
10	20.2	21.6
11	26.4	21.3
12	15.8	19.8
13	21.8	18.3
14	13.8	17.6

[0508]

XRPD 峰	角 (2- θ \pm 0.2)	强度%
15	27.4	17.3
16	29.0	16.7
17	14.8	15.0
18	32.0	15.0
19	25.7	13.8
20	28.6	13.4
21	33.8	13.0
22	12.8	12.0
23	30.8	11.7
24	32.4	11.6
25	24.5	11.5
26	23.4	11.1
27	21.0	10.4

[0509] 表3B: 化合物(1)的HCl盐 \cdot 1/2H₂O的形式A的C¹³ SSNMR峰

[0510]

峰#	化学位移 [\pm 3 ppm]	强度 [rel]
1	180.1	50.4
2	157.9	9.1
3	154.6	26.4
4	150.7	25.3
5	144.9	31.0
6	140.1	6.7
7	132.4	36.3
8	131.2	30.0
9	129.0	21.0
10	117.5	33.6
11	114.0	38.0
12	107.0	34.4

[0511]	13	54.8	42.0
	14	47.7	52.7
	15	29.2	100.0
	16	24.6	74.0
	17	22.1	83.6

[0512] 发现制备的化合物(1)的HCl盐化合物(1)·1/2H₂O的形式A在如下溶剂系统中是稳定的(但不限于):氯苯,环己烷,1,2-二氯乙烷,二氯甲烷,1,2-二甲氧基乙烷,己烷,2-甲氧基乙醇,甲基丁基酮,甲基环己烷,硝基甲烷,四氢萘,二甲苯,甲苯,1,1,2-三氯乙烷,丙酮,茴香醚,1-丁醇,2-丁醇,乙酸丁酯,叔丁基甲基醚,枯烯,乙醇,乙酸乙酯,乙基醚,甲酸乙酯,庚烷,乙酸异丁酯,乙酸异丙酯,乙酸甲酯,3-甲基-1-丁醇,甲基乙基酮,2-甲基-1-丙醇,戊烷,1-丙醇,1-戊醇,2-丙醇,乙酸丙酯,四氢呋喃,甲基四氢呋喃。具体地,为了化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A的溶解度和稳定性试验,使化合物的样品与500μl溶剂载入2mL HPLC小瓶。将该混合物在环境温度搅拌2周,然后通过离心过滤、通过XRPD分析得到的固体,通过定量NMR对氢醌标准品分析溶液的溶解度。将结果概括在表4中。

[0513] 表4:化合物(1)的HCl盐的形式A的形式和溶解度数据概述

溶剂	溶解度(mg/ml)	得到的形式
乙腈	0.5	溶剂合物
氯苯	<0.1	A
氯仿	<0.1	溶剂合物
环己烷	<0.1	A
1,2-二氯乙烷	1.7	A
溶剂	溶解度(mg/ml)	得到的形式
二氯甲烷	0.1	A
1,2-二甲氧基乙烷	0.5	A

[0515]

溶剂	溶解度(mg/ml)	得到的形式
1,4-二噁烷	0.4	A
乙二醇	108.1	溶剂合物
己烷	<0.1	A
甲醇	46.4	溶剂合物
2-甲氧基乙醇	34.1	A
甲基丁基酮	0.4	A
甲基环己烷	<0.1	A
硝基甲烷	<0.1	A
四氢萘	<0.1	A
甲苯	<0.1	A
1,1,2-三氯乙烷	<0.1	A
二甲苯	<0.1	A
丙酮	1.5	A
茴香醚	<0.1	A
1-丁醇	2.9	A
2-丁醇	2.9	A
乙酸丁酯	0.2	A
叔丁基甲基醚	0.4	A
枯烯	<0.1	A
二甲亚砜	346.5	溶剂合物
乙醇	19.9	A
乙酸乙酯	0.2	A
乙基醚	0.1	A
甲酸乙酯	0.4	A
甲酸	214.0	溶剂合物
庚烷	<0.1	A
乙酸异丁酯	0.2	A
乙酸异丙酯	0.4	A

溶剂	溶解度(mg/ml)	得到的形式
乙酸甲酯	0.6	A
3-甲基-1-丁醇	3.2	A
甲基乙基酮	0.5	A
2-甲基-1-丙醇	3.5	A
戊烷	<0.1	A
[0516] 1-戊醇	3.3	A
1-丙醇	10.7	A
2-丙醇	3.3	A
乙酸丙酯	0.8	A
四氢呋喃	0.7	A
甲基四氢呋喃	0.7	A
水	0.6	F

[0517] 通过将样品放入铂样品盘并且通过以10°C/min从室温加热至300°C得到热分析图数据(数据未显示)。热分析图数据显示30°-170°C重量减轻为2.1%，与半水合物理论值(2.0%)一致。

[0518] 通过10°C/min将样品从室温加热至300°C得到DSC热分析图数据(数据未显示)。DSC热分析图数据显示50-100°C的脱水启动温度，然后是200-260°C的开始熔化/分解温度。

[0519] 3B: 化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F的制备

[0520] 通过将化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A在异-丙醇和水或丙酮和水或水(具有等于或大于0.9的水活度)中搅拌成淤浆制备化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F。

[0521] 例如,将100mg化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A在5mL水活度为0.9的异-丙醇/水或丙酮/水中的淤浆在环境温度搅拌过夜。滗析上清液,将得到的固体物质适度风干,得到化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F。

[0522] 将一些观察到的XRPD峰和C¹³SSNMR峰分别概括在表5和6中。

[0523] 表5: 化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式的F的XRPD峰

XRPD峰	角(2-θ±0.2)	强度%
1	7.1	100.0
2	9.6	83.0
3	11.9	88.8
4	12.4	84.6
5	16.4	83.5
6	17.1	83.0
7	17.5	82.8
8	19.2	86.9

9	21.1	82.2
10	21.8	83.7
11	23.9	83.8
12	28.7	83.4

[0525] 表6: 化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F的C¹³ SSNMR峰

[0526]

峰#	化学位移 [± 3 ppm]	强度[rel]
1	178.6	67.6
2	156.8	21.5
3	154.3	49.3
4	152.1	12.6
5	151.2	21.3
6	142.5	37.0
7	132.3	85.7
8	127.9	15.4
9	118.0	38.6
10	117.5	43.7

峰#	化学位移 [± 3 ppm]	强度[rel]
11	115.2	36.3
12	114.5	35.2
13	106.1	15.4
14	104.8	31.6
15	52.7	43.1
16	52.3	37.2
17	48.8	44.8
[0527] 18	48.4	46.4
19	30.3	100.0
20	27.4	35.4
21	25.5	37.4
22	24.5	44.5
23	23.8	40.9
24	22.0	46.4
25	21.1	47.0
26	20.7	50.5
27	20.3	47.7

[0528] 通过将样品以2°C/min从-20°C加热至350°C得到MDSC热分析图数据(数据未显示)并且每隔60秒调节±1°C。MDSC热分析图数据显示低于150°C脱水,熔化并且在150°C-200°C重结晶,且高于250°C降解。

[0529] 还对该形式进行热重分析(TGA)。热分析图显示12%-125°C重量减轻,接近三水合物理论值(11%)。通过TGA-MS显示第二步低于200°C的重量减轻,为HCl的损耗。熔化/分解开启在约270-290°C。

[0530] 3C: 化合物(1) HCl盐的形式D的制备

[0531] 一般通过使化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A脱水制备化合物(1)的HCl盐的无水形式D。脱水可以通过加热或干氮气净化或两者的组合进行。例如,用热板加热2mg化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A,在约85°C生成期望的无水形式D。

[0532] 将一些观察到的XRPD峰和C¹³SSNMR峰分别概括在表7和8中。

[0533] 表7: 化合物(1)的无水HCl盐的形式D的XRPD峰

[0534]

XRPD峰	角($2-\theta \pm 0.2$)	强度%
1	5.3	100.0
2	10.5	56.0
3	15.9	49.2
4	25.9	30.5
5	21.0	24.6
6	26.5	24.1
7	5.8	22.6
8	7.4	21.7
9	19.0	17.4
10	16.6	17.2
11	25.3	16.1
12	24.7	16.0
13	29.4	15.5
14	13.8	14.6
15	20.3	14.5
16	32.0	14.4
17	19.5	12.4
18	28.6	12.4
19	17.1	11.5
20	30.3	11.4
21	27.5	11.0
22	27.0	10.7
23	23.7	10.4
24	28.0	10.2
25	21.6	10.1

[0535] 表8: 化合物(1)的无水HCl盐的形式的D C¹³ SSNMR峰

[0536]

峰#	化学位移 [± 3 ppm]	强度[rel]
1	179.7	43
2	177.8	44.85
3	157.5	16.88
4	154.9	43.14
5	151.1	25.79
6	149.8	21.51
7	145.0	26.82
8	143.9	35.41
9	141.6	14.85
10	139.7	12.9
11	135.4	29.94
12	132.5	43.37
13	130.1	23.65
14	128.9	27.35
15	127.3	25.35
16	118.1	27.24
17	116.6	28.25
18	113.3	52.71
19	107.5	29.33
20	106.1	30.73
21	54.4	39.43
22	53.4	42.25
23	48.2	54.53
24	47.2	47.8
25	31.6	52.54
26	29.4	100

峰#	化学位移	强度[rel]
	[± 3 ppm]	
27	26.0	50.37
28	24.8	47.38
29	23.9	63.88
30	22.9	98.06
31	20.2	45.7

[0538] 3D:水活度试验

[0539] 用水活度为0.0—0.8的异丙醇/水的化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F种晶的化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式的竞争性淤浆研究显示,在环境条件下搅拌约2周后,在化合物(1)的无水HCl盐的形式D、化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形式F和化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A中,形式A为最稳定形式。在IPA/水活度为0.9时,化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A被转化,化合物(1)的HCl盐·3H₂O的形成F。将来自这些研究的结果概括在下表9中。

[0540] 表9:对在IPA/水混合物中的化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的水活度试验

起始形式	水活度(a _w)	水wt%	最终形式	描述
A+F	0+>80°C		D	脱水物
A+F	0		A	半水合物
A+F	0.1	0.1	A	半水合物
A+F	0.2	0.25	A	半水合物
A+F	0.3	0.35	A	半水合物
A+F	0.4	0.55	A	半水合物
A+F	0.5	0.75	A	半水合物
A+F	0.6	1.00	A	半水合物
A+F	0.7	1.35	A	半水合物
A+F	0.8	1.85	A	半水合物
A+F	0.9	2.80	F	三水合物
A+F	1	100	F	三水合物

[0542] 3F:无定形的HCl盐化合物(1)

[0543] 通过在水和2-MeTHF中用1.05eq. NaOH处理化合物(1)的Me₂NEt盐(1.985g)形成化合物(1)的无定形的HCl盐,然后用HCl处理以除去胺并且从水层(pH 2-3)中析出。浓缩得到的淤浆以除去任何有机物,然后过滤。用小部分水冲洗得到的固体,干燥。根据WO 2010/148197制备化合物(1)的Me₂NEt盐,然后进行常规的手性分离和纯化:SCF手性色谱法,使用包括Me₂NEt的调节剂(生成化合物(1)的Me₂NEt盐)。

[0544] 实施例4:游离碱化合物(1)的多晶型物的形成

[0545] 4A:游离碱化合物(1)的形式A的制备

[0546] 通过下列方法生产游离碱化合物(1)的形式A:将粗无定形游离碱化合物(1)(约

135g) 转入4L加套的反应器,向反应器中装入乙醇(2.67L)和水(0.325L)(10%水溶液)。将该混合物加热至回流。向步骤2)得到的混合物中加入水(300mL),制成20%水溶液。然后将得到的混合物冷却至55°C(速率=-1°C/min),随后保持30分钟。然后将化合物(1)游离碱的形式A的晶种(1.5g,3.756mmol)加入冷却的混合物,将得到的混合物保持30分钟,同时产物沉淀。通过将无定形游离碱化合物(1)(20mg)在硝基甲烷(0.5mL)中搅拌成淤浆生产化合物(1)游离碱的形式A的晶种。通过将无定形游离碱化合物(1)(900mg)在乙腈(10mL)中与使用硝基甲烷得到的晶种一起搅拌成淤浆生产另外的化合物(1)游离碱的形式A的晶种物质。向包含化合物(1)游离碱的形式A晶种的混合物中缓慢地加入水(795.0mL),制成40%水溶液。将得到的混合物冷却缓慢地冷却至0°C(~-10°C/小时),随后保持2小时。然后过滤固体物质,风干,然后在60°C在烘箱中再风干18小时。

[0547] 或者,使用游离碱化合物(1)的2-甲基THF溶剂合物替代无定形游离碱化合物(1),按照如上所述的类似方式也得到游离碱化合物(1)的形式A。

[0548] 发现制备的化合物(1)的形式A化合物(1)在如下溶剂系统中是稳定的(但不限于):乙腈、氯苯、氯仿、环己烷、1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、1,2-二甲氧基乙烷、乙二醇、甲酰胺、己烷、甲基丁基酮、甲基环己烷、N-甲基吡咯烷酮、硝基甲烷、四氢萘、甲苯、1,1,2-三氯乙烷、乙酸、茴香醚、1-丁醇、乙酸丁酯、枯烯、乙酸乙酯、乙基醚、甲酸乙酯、庚烷、乙酸异丁酯、乙酸异丙酯、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丙醇、戊烷、乙酸丙酯、水、水-异-丙醇(1:3体积/体积)和水-乙腈(1:1体积/体积;1:3体积/体积)。

[0549] 将一些观察到的XRPD峰和 C^{13} SSNMR峰分别概括在表10和11中。

[0550] 表10:化合物(1)的形式A的XRPD峰

[0551]

XRPD 峰	角 (2- θ \pm 0.2)	强度%
1	11.8	100.0
2	18.9	100.0
3	16.9	99.8
4	15.5	99.7
5	22.0	99.7
6	25.5	99.7
7	9.1	99.4
8	23.6	98.6
9	27.6	98.5
10	17.5	98.3
11	23.0	98.3
12	24.0	98.3
13	13.7	98.2
14	20.2	98.2
15	12.5	97.8
16	10.6	97.7
17	15.8	97.5
18	20.6	97.5

[0552]

XRPD 峰	角 (2- θ \pm 0.2)	强度%
19	12.9	97.4
20	24.7	97.4
21	26.2	97.4
22	6.2	97.3
23	21.1	97.3

[0553] 表11:化合物(1)的形式A的 C^{13} SSNMR峰

[0554]

峰#	化学位移 [± 3 ppm]	强度[rel]
1	180.0	60.1
2	176.2	68.7
3	175.9	62.4
4	160.2	28.8
5	158.6	18.4
6	157.9	28.1
7	157.3	47.2
8	156.0	34.3
9	155.4	49.7
10	152.3	32.5
11	151.4	49.5
12	146.5	18.6
13	144.4	61.1
14	143.8	56.4
15	142.9	19.2
16	140.2	21.2
17	138.5	55.6
18	133.6	29.4
19	132.3	61.4

峰#	化学位移 [± 3 ppm]	强度[rel]
20	131.0	52.1
21	126.2	23.0
22	121.5	35.8
23	120.8	39.3
24	119.7	90.9
25	116.2	59.3
26	115.3	44.3
27	112.7	35.0
28	52.5	39.0
29	51.6	75.9
30	50.4	94.8
31	49.8	74.6
32	31.8	80.4
33	31.2	53.0
34	30.5	86.0
35	30.1	95.1
36	28.5	100.0
37	26.3	81.0
38	25.9	96.1
39	25.0	82.2
40	22.8	66.97
41	22.2	55.41
42	21.6	64.44
43	21.0	82.87
44	20.4	57.45
45	19.8	52.2

[0555]

[0556] 使用TA Instruments TGA型号Q500对产物化合物(1)的形式A进行热重分析(数据

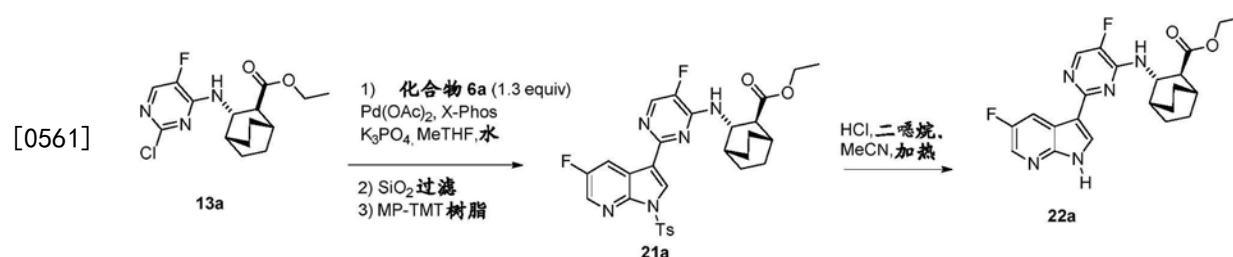
在本文中未显示), 通过将其样品置于铂样品盘上且随后以10°C/min将该盘从室温加热至300°C来进行。热分析图显示分解开始在约293°C。

[0557] 化合物(1)的形式A的DSC热分析图也使用TA Instruments DSC Q200得到。将该形式的样品以10°C/min加热至350°C。DSC热分析图显示熔化温度约为278°C。

[0558] 4B: 游离碱化合物(1)的水合物的形式B的制备

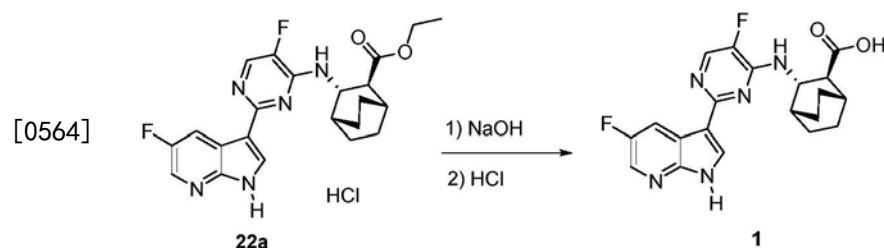
[0559] 当暴露于高湿度时, 游离碱化合物(1)的水化形式显示与游离碱化合物(1)的形式A为同晶型—游离碱化合物(1)的形式A可以自由地转化成水化形式B, 当湿度降低时, 恢复。根据使用DSC实验测定的相变(数据未显示), 转变温度接近环境温度并且随水活度的不同而改变。例如, 在环境温度下, 观察到水化形式, 其中水活度大于0.6, 例如0.6-1.0。

[0560] 4C: 无定形游离碱化合物(1)的制备



[0562] Suzuki偶合通过将氯嘧啶、化合物13a、硼酸酯化合物6a、催化剂Pd(OAc)₂和配体(X-Phos)溶于10vol 2-MeTHF进行偶合。将该混合物加热至65°C, 以维持反应混合物在65°C的速率加入2vol 50%K₃PO₄水溶液。两个反应完全转化, 然后冷却至20°C, 通过硅藻土过滤。分离水层, 弃去, 用5%NaCl水溶液洗涤有机层, 然后浓缩至干, 各自得到约3.5kg深绿色糊状物。将粗油状物分成4个等份, 与400g SiO₂和500g Florisil一起搅拌成淤浆, 通过2.3kg SiO₂柱与庚烷/EtOAc(5:1-3:1, 2L级分)洗脱, 合并包含全部产物的级分。将这些级分浓缩至干, 得到约2.9kg化合物21a。

[0563] 将化合物21a溶于10vol (25L) CH₃CN, 用4eq. HCl (4.31L 4N HCl的1,4-二噁烷溶液)在70°C处理15h。通过HPLC判定反应100%完成。将稀薄淤浆冷却至20°C, 历时1h。以0.5L/min加入TBME (28L, 11vol), 在添加结束时淤浆变成极为浓稠(凝胶状)。在4-5h搅拌后, 该淤浆变成非常稀薄。通过抽滤采集得到的固体, 用3×5L TBME洗涤, 得到低密度滤饼, 在N₂流气氛中干燥3天, 得到1.71kg (86%收率, 98.9%AUC纯度)的化合物22a·HCl。



[0565] 在20°C将NaOH溶液(55.60mL 2M, 111.2mmol)加入到化合物22a·HCl(10g, 22.23mmol)在2-MeTHF(100.00mL)中的混悬液中。将该反应混合物在60°C搅拌5h, 然后再在67°C搅拌。约22小时搅拌后, 将100mL (10vol) 2-MeTHF加入到得到的混合物中。然后将该批量冷却至0°C。向得到的混合物中加入HCl以便将pH调整至pH6.6, 产生粗游离碱化合物(1)。将在60mL (6vol) 2-Me-THF中的粗物质加热至50°C。将50mL (5vol) 正-庚烷加入到得到的混合物中, 历时1小时。然后将该批量冷却至20°C。过滤固体产物, 再通过柱色谱法(EtOAc/庚

烷2:1-4:1)纯化固体产物。其XRPD数据显示无定形游离碱化合物(1)。

[0566] 或者,在游离碱化合物(1)的形式A和选自2-乙氧基乙醇、2-甲氧基乙醇、叔丁基甲基醚、甲酸或甲基乙基酮的溶剂混合物中观察到无定形游离碱化合物(1)(例如,参见下表13),在环境温度下搅拌。

[0567] 4D:游离碱化合物(1)的2-MeTHF溶剂合物的制备

[0568] 如上述实施例2中所述制备化合物(1)·1(2-MeTHF)。将一些观察到的该化合物的XRPD峰概括在表12中。

[0569] 表12:化合物(1)·1(2-MeTHF)的XRPD峰

[0570]

XRPD峰	角($2-\theta \pm 0.2$)	强度%
1	6.4	9.78
2	8.4	38.07
3	9.7	43.96
4	12.9	15.57
5	16.7	100
6	16.9	46.55
7	17.4	18.67
8	19.4	16.54
9	20.0	14.62
10	21.0	20.4
11	21.3	13.58
12	22.3	37.59
13	24.3	15.36
14	25.7	16.34
15	25.9	10.06

[0571] 4F:游离碱化合物(1)的形式A和无定形化合物(1)在不同溶剂系统中的溶解度和稳定性数据

[0572] 在环境温度下按照与如上所述用于化合物(1)的HCl盐的形式A类似的方式测试游离碱化合物(1)形式A(“形式A”)和无定形化合物(1)(“无定形”)在不同溶剂系统中的溶解度和稳定性。将得到的数据概括在表13中。

[0573] 表13:游离碱化合物(1)的形式A(“形式A”)和无定形化合物(1)(“无定形”)的溶解度和稳定性数据

[0574]

溶剂	起始形式 A		起始无定形
	溶解度 (mg/ml)	得到的形式	得到的形式
乙腈	1.0	A	无定形
氯苯	0.4	A	无定形
氯仿	3.8	A	无定形
环己烷	<0.1	A	无定形
1,2-二氯乙烷	0.4	A	无定形
二氯甲烷	0.9	A	无定形
1,2-二甲氧基乙烷	114.0	A	无定形
N,N-二甲基乙酰胺	>150	溶剂合物	溶剂合物
N,N-二甲基甲酰胺	39.2	溶剂合物	无信号
1,4-二噁烷	21.3	溶剂合物 (1: 1)	溶剂合物 (1: 1)
2-乙氧基乙醇	>113	无定形	无信号
乙二醇	10.4	A	溶剂合物
甲酰胺	7.0	A	无定形
己烷	<0.1	A	无定形
甲醇	25.5	溶剂合物	溶剂合物
2-甲氧基乙醇	>114	无定形	无信号
甲基丁基酮	20.0	A	无定形
甲基环己烷	<0.1	A	无定形
N-甲基吡咯烷酮	>149	A	无信号
硝基甲烷	0.3	A	无定形
四氢萘	<0.1	A	无定形
甲苯	0.3	A	无定形
1,1,2-三氯乙烷	1.0	A	无定形
二甲苯	0.3	溶剂合物	无定形
乙酸	42.8	A	溶剂合物

[0575]

	起始形式 A		起始无定形
溶剂	溶解度 (mg/ml)	得到的形式	得到的形式
丙酮	16.3	溶剂合物	溶剂合物
茴香醚	0.7	A	无定形
1-丁醇	21.0	A	溶剂合物 (1: 1)
2-丁醇	14.0	溶剂合物 (1: 1)	溶剂合物 (1: 1)
乙酸丁酯	8.1	A	无定形
叔丁基甲基醚	10.4	无定形	无定形
枯烯	0.3	A	无定形
二甲亚砜	>113	无信号	无信号
乙醇	35.5	无信号	A
乙酸乙酯	11.6	A	无定形
乙基醚	3.5	A	无定形
甲酸乙酯	8.1	A	溶剂合物 (1: 1)
甲酸	>89.4	无定形	无信号
庚烷	<1.5	A	溶剂合物
乙酸异丁酯	4.4	A	无定形
乙酸异丙酯	6.2	A	无定形
乙酸甲酯	9.4	溶剂合物	溶剂合物
3-甲基-1-丁醇	9.7	A	溶剂合物
甲基乙基酮	27.3	无定形	溶剂合物 (1: 1)
2-甲基-1-丙醇	12.2	A	溶剂合物 (1: 1)
戊烷	<0.3	A	无定形
1-戊醇	14.5	无信号	溶剂合物 (1: 1)
1-丙醇	15.9	溶剂合物	无信号
2-丙醇	12.9	溶剂合物 (1: 1)	溶剂合物 (1: 1)
乙酸丙酯	7.5	A	无定形
四氢呋喃	61.2	溶剂合物 (1: 1)	溶剂合物 (1: 1)
甲基四氢呋喃	34.8	溶剂合物 (1: 1)	溶剂合物 (1: 1)

	起始形式 A		起始无定形
	溶解度 (mg/ml)	得到的形式	得到的形式
水	<0.1	A	无定形
水-IPA 1: 1	-	溶剂合物	-
[0576] 水-IPA 1: 3	-	A	-
水-ACN 1: 1	-	A	-
水-ACN 1: 3	-	A	-
水-MeOH 1: 1	-	溶剂合物	-
水-MeOH 1: 3	-	溶剂合物	-

[0577] 实施例5:化合物(1)的甲苯磺酸盐的形式A的制备

[0578] 化合物(1)的甲苯磺酸盐的形式A通过将无定形游离碱化合物(1) (500mg) 和对-甲苯磺酸在乙腈 (20ml) 中搅拌成淤浆制备。将样品搅拌过夜。将一些观察到的该化合物的XRPD峰概括在表14中。

[0579] 或者,可以按照与如上所述类似的方式,使用游离碱化合物(1)的2-甲基THF溶剂合物替代无定形游离碱化合物(1)以制备化合物(1)的甲苯磺酸盐的形式A。

[0580] 表14:化合物(1)的甲苯磺酸盐的形式A的XRPD峰

XRPD 峰	角 ($2-\theta \pm 0.2$)	强度%
1	6.0	30.21
2	7.2	100
3	9.3	37.8
4	12.9	13.96
[0581] 5	13.7	39.23
6	14.3	50.25
7	14.7	42.94
8	16.4	9.99
9	16.9	89.79
10	18.7	59.65

XRPD 峰	角 (2- θ \pm 0.2)	强度%
11	19.3	19.62
12	19.6	33.34
13	20.3	11.38
14	20.8	11.98
15	21.9	41.6
16	23.0	33.45
17	24.2	14.97
[0582] 18	25.4	23.83
19	26.3	44.54
20	26.9	51.79
21	27.5	34.02
22	28.0	36.07
23	29.1	13.36
24	29.7	8.92
25	32.2	9.25
26	33.1	4.75

[0583] 实施例6:化合物(1)的制剂

[0584] A. 化合物(1)的片剂

[0585] 组合物

[0586] 化合物(1)的HCl盐 \cdot 1/2H₂O的形式A(下文简称为实施例6的化合物(1))用于片剂形成。全部赋形剂符合欧洲药典(European Pharmacopoeia)和USP/NF的最新专著标准并且购自经批准的供应商。

[0587] 用于预制粒配混物和制粒粘合剂溶液的制剂组成和批量大小如表15A中所示。粘合剂溶液的批量大小包括100%过量用于泵校准和启动溶液管线。理论压制配合物组成也如表15B中所示。基于干燥颗粒的收率计算用于该批量的实际用量。薄膜包衣混悬液的组成和近似批量大小如表15B中所示且包括100%过量用于泵校准和启动混悬液管线。薄膜包衣层的目标用量占片剂重量的3.0%w/w。

[0588] 表15A: 化合物(1)的片剂的组成。

		预制粒配合物中的%	千颗粒中的%	片芯中的%	片剂中的mg (300mg)
颗粒内	化合物(1)结晶半水合物, HCl 盐(形式 A)	76.13	74.99	50.00	333.00
	Avicel PH-101, NF, PhEur	10.03	9.88	6.59	43.89
	一水合乳糖, #316, NF, PhEur	10.03	9.88	6.59	43.89
	Ac-Di-Sol, NF, PhEur, JP	3.81	3.75	2.50	16.65
	总预制粒配合物:	100.00	98.50	65.68	437.43
粘合剂溶液中	聚维酮 K30, USP		1.50	1.0	6.66
	水, USP		na	na	na
	总颗粒:		100.00	66.68	444.09
颗粒外	Prosolv 50, NF			28.82	191.94
	Ac-Di-Sol, NF, PhEur, JP			2.50	16.65
	SSF, NF			2.00	13.32
	总片芯			100	666.00
薄膜包衣混悬液中	欧巴代 II, 85F18422			(3.2 wrt 芯)	21.31
	水, USP				na
	总最终包衣片				687.31

[0590] 表15B: 薄膜衣混悬液组成和近似批量大小

成分	% W/W	批量大小(g)
欧巴代 II 白, 33G	15.00	210.00
水, USP	85.00	1190.00
总计	100.00	1400.00

[0592] 粘合剂溶液制备

[0593] 粘合剂溶液由聚维酮和水组成。基于最终颗粒中40%的含水量制备该溶液。因此，

固体在溶液中的总量(聚维酮)为3.6% (w/w)。制备100%过量用于启动管线等。基于颗粒试验启动的视觉检查,制备最终颗粒中 $\pm 2\%$ (38-42%)水的另外的储备溶液。典型地,称重87.00g聚维酮K30和2320.00g纯(DI)水,在恒定搅拌下,将聚维酮K30加入包含DI水的容器。添加后,密封容器以便将蒸发减至最少,将该溶液搅拌至存在的全部固体完全溶解。

[0594] 湿制粒法流程

[0595] 通过下述方法进行湿法制粒:将过量(10%)的化合物(1)、Avicel PH-101、Fastflo乳糖和交联羧甲基纤维素钠称重(参见表15A)。将它们使用20目硬筛或安装813 μm 搓碎筛目的锥形磨(U5Quadro Co-mill)以1000rpm过筛。将过筛的物质放入单个的袋子或容器。然后将这些物质转入搅拌机,典型地以15RPM配混15分钟。使用带有4mm方孔筛的U5Quadro锥形磨以1000rpm研磨配混的物质。再次配混研磨的物质,重复配混步骤。然后将再配混的物质进料入双螺杆制粒机。使用重量损耗进料器(K-tron或类似物)将批量湿颗粒进料入制粒机。然后将得到的物质制粒。使用蠕动泵将粘合剂流体(参见表15A)注入双螺杆制粒机。溶液进料速率与粉末进料速率之比为0.4095。例如,如果粉末进料速率为15.00g/min,则溶液进料速率为 $0.4095 \times 15.00 = 6.14\text{g/min}$,其中含水量为40% (基于干质量)。将颗粒批量采集入预先配衡的干燥盘。将采集的物质均匀地喷在盘上,用烘箱干燥该物质,形成干燥颗粒。将干燥颗粒放入K-tron以连续研磨方式进料入锥形磨,随后研磨。

[0596] 颗粒外配混和压制过程

[0597] 通过下列方法进行颗粒外配混和压制过程:称重基于压制配混物组成的颗粒外赋形剂的量。使用带有32C筛和圆形棒叶轮的U5 Comil以1000rpm将称重的赋形剂过筛。首先将研磨的化合物(1)颗粒加入到包含过筛的Avicel PH-102和Ac-Di-Sol的搅拌机中。将它们配混以16RPM 8分钟。将硬脂酸钠(SSF)通过50目硬筛过筛入适合的容器。将约等于SSF质量的10倍的部分颗粒外配混物与SSF放入容器,袋配混30秒,然后将该混合物加入箱式搅拌机。然后将全部物质以16rpm配混2分钟。然后根据预备的片剂压制加工参数压制最终配混物。

[0598] 薄膜包衣法

[0599] 在Vector VPC 1355平底包衣锅中将薄膜包衣层作为15%w/w欧巴代II白#33G水性混悬液施加于片芯上。目标包衣层为具有2.5%—3.5%可接受范围的3.0%w/w片芯重。为了达到这一目标,喷雾相当于3.2%重量增加的包衣混悬液的量,得到3.0%包衣层,推定包衣效率为95%。

[0600] 化合物(1)的静脉内(IV)制剂

[0601] 将化合物(1)的HCl盐 $\cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ 的形式A(下文简称为实施例6的化合物(1))作为用于静脉内(IV)施用的2mg/mL溶液提供。将该溶液的组成与质量参比和每种成分的功能提供在表16A和16B中。

[0602] 表16A:溶液赋形剂的组成^a

成分	质量标准	成分功能	量 (mg/50g IV 溶液)	含量 (% w/w)
磷酸二氢钠, 无水	USP	缓冲剂	26	0.052
磷酸一氢钠, 七水合物	USP	缓冲剂	1281	2.562
葡萄糖, 无水	USP	张度调节剂	500	1.000
注射用水	USP	溶剂	48,193	96.386
总计	--	--	50,000	100%

缩写: USP, 美国药典 (United States Pharmacopoeia)

[0604] ^a用NaOH或HCl调整溶液的pH

[0605] 表16B: 化合物(1) 静脉内溶液的组成^a

成分	成分功能	量 (mg/50g IV 溶液)	含量 (% w/w)
化合物(1) ^b	药物物质	111	0.222
溶液赋形剂(来自表1)	溶剂	49,889	99.778
总数	--	50,000	100%

[0607] ^a用NaOH或HCl调整溶液的pH。溶液密度为1.000g/cm³。

[0608] ^b药物物质为半水合物HCl盐。基于活性无水游离碱当量计算药物物质的量,其中游离碱与半水合物HCl盐的转化因子为1.11。

[0609] 实施例7: 化合物(1) 与或不与奥司他韦组合的体内测定

[0610] 用赋形剂或增强剂量水平的化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O形式A与临床相关剂量的奥司他韦组合治疗感染小鼠,从48小时A型流感攻击后或B型流感攻击前2小时开始。

[0611] 方法: 在这些研究中,用包含0.5% (w/v) MC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 的赋形剂配制化合物(1)的HCl盐半水合物的形式A(下文简称为实施例7的化合物(1)),得到均匀混悬液,且化合物剂量基于化合物(1)的HCl盐半水合物。蒸馏的去离子水配制奥司他韦,得到均匀混悬液。用包含0.5% (w/v) MC的赋形剂配制化合物(1)与奥司他韦的组合。在每次研究开始时制备组合制剂并且储存在4℃下至多10天,同时在暗处搅拌。将全部制剂和赋形剂通过口腔管饲法以10mL/kg的施用体积施用于小鼠。

[0612] 用致死剂量的小鼠适应的流感病毒A/PR/8/34或B/Mass/3/66通过鼻内滴注麻醉和接种雄性Balb/c小鼠(5-7周,17-19克)。每个研究组登记8只小鼠。治疗在A型流感接种后+48小时或B型流感接种前2小时开始。在A型流感研究中,单独地或与10mg/kg奥司他韦组合地施用赋形剂(10mL/kg)和0.1-10mg/kg剂量的化合物(1),口服(PO),每日2次(BID),持续10天。在B型流感研究中,单独地或与10mg/kg奥司他韦组合地施用赋形剂(10mL/kg)和1-

10mg/kg剂量的化合物(1),口服(PO),每日2次(BID),持续10天。赋形剂(10mL/kg)和化合物(1)。给小鼠称重并且每日观察感染后21天的病态征候。此外,通过无限制的WBP(Buxco, Troy, NY)监测肺功能。

[0613] A型流感/PR/8/34(VR-1469)和B型流感/Mass/3/66(VR-523)得自ATCC(Manassas, VA)。通过本领域已知的标准方法制备储备溶液。简言之,使病毒以低感染复数在Madin-Darby犬肾细胞(MDCK细胞,CCL-34,ATCC)中传代,约48小时后收获上清液,并且以650xg离心10分钟。将病毒储备溶液冷冻在-80℃下至使用为止。在顺序稀释病毒样品、感染MDCK培养物和测定致细胞病变效应(CPE)复制后,基于96小时时ATP的含量通过Spearman-Karger方法计算病毒滴度(TCID₅₀/ml)(CellTiter-Glo,Promega, Madison WI)。

[0614] 在感染后每日称重小鼠,持续21天。使用两种方式ANOVA和Bonferroni事后检验分析体重数据以比较各组。将小于0.05的P-值视为具有显著性。

[0615] 流感感染后每日观察小鼠,持续21天。认为评分为如下6种观察结果(>35% BW减轻、有褶皱边的皮毛、姿势弯成弓形、呼吸性窘迫、活动性减少或体温过低)的4种阳性的任意小鼠是垂死的,然后实施安乐死并且根据Vertex Institutional Animal Care and Use Committee建立的指导原则评分为死亡。使用Kaplan Meier方法分析存活率数据。

[0616] 对小鼠进行无限制WBP(Buxco, Troy, NY)。将肺功能表示为增强的停顿(Penh),即反映出肺阻力的无单位计算值。该值衍生自作为动物呼吸型改变结果浮动的保持储存压力改变。动物气道的支气管收缩影响气流和由此的保持储存压力。在呼气(PEP)和吸气(PIP)过程中追踪压力的改变。根据公式 $Penh = \text{停顿} \times PEP/PIP$ 计算Penh值,其中“停顿”反映出定时的呼气。使小鼠适应体积描记术室15分钟,然后在1分钟间隔采集数据,求10分钟内的平均值并且表示为绝对Penh值。使用两种方式ANOVA和Bonferroni事后检验分析数据以比较各组。将小于0.05的P-值视为具有显著性。

[0617] 结果:评价化合物(1)与奥司他韦组合在流感肺部感染鼠模型中与单独的化合物(1)或奥司他韦相比在预防死亡率和发病率、减少BW减轻和预防和/或恢复肺功能中的能力。该组合显示与每种单独施用的药物相比对每种药物的效能没有有害影响。此外,联合治疗显示作为每种单独的化合物的失败剂量(分别为0.3和10mg/kg的化合物(1)和奥司他韦(Osetamivir))在A型流感治疗中显示协同作用,此时合并增加的存活率从0达到100%。化合物(1)在体内对B型流感几乎没有活性(正如根据可得到的体外数据所预期的)且不干扰奥司他韦的有效性。

[0618] A型流感小鼠模型:全部赋形剂-治疗的对照组截至到第9或10天仍患病。当感染后+48小时施用时,与赋形剂对照组相比,以1、3和10mg/kg单独的化合物(1) BID治疗提供完全预防死亡,减少了BW减轻并且恢复了肺功能(表17)。当A型流感感染后+48小时开始治疗时,以单独施用的0.1和0.3mg/kg化合物(1)和10mg/kg奥司他韦治疗无法防止死亡、减少BW减轻或恢复肺功能。有意义地,A型流感感染后+48小时共同施用的0.3mg/kg化合物(1)和奥司他韦提供了完全防止死亡、减少BW减轻和恢复肺功能。

[0619] 表17:A型流感感染后+48小时施用的化合物(1)与或不与奥司他韦的体内效能数据

[0620]

FluA 中的化合物 (1)/奥司他韦组合						
奥司他韦 mg/kg	0			10		
化合物 (1) mg/kg	存活率 (21 天) (%)	体重减轻 (第 8 天) (%)	Penh (第 3 天)	存活率 (21 天) (%)	体重减轻 (第 8 天) (%)	Penh (第 3 天)
0	0	33.9	2.28	0	32.0	2.36
0.1	0	34.2	2.15	0	31.6	2.09
0.3	0	32.4	1.90	100	29.3	1.80
1	100	28.2	2.11	100	23.4	1.23
3	100	22.2	1.68	100	17.6	1.11
10	100	14.6	0.95	100	8.4	0.79

[0621] B型流感小鼠模型：全部赋形剂-治疗的对照组截至到第7或8天时仍然患病。施用1、3或10mg/kg单独的化合物(1)-B型流感感染前2h和持续BID 10天与对照组相比没有提供对发病率、BW减轻或肺功能丧失的显著预防作用。以10mg/kg施用单独的奥司他韦或与1、3或10mg/kg化合物(1)组合-B型流感感染前2h提供了对死亡的完全预防、减少了BW减轻和恢复了肺功能(表18)。

[0622] 表18：B型流感感染后+48小时施用的化合物(1)与或不与奥司他韦的体内效能数据

[0623]

FluB 中的化合物 (1)/奥司他韦组合						
奥司他韦 mg/kg	0			10		
化合物 (1) mg/kg	存活率 (21 天) (%)	体重减轻 (第 8 天) (%)	Penh (第 6/7 天)	存活率 (21 天) (%)	体重减轻 (第 8 天) (%)	Penh (第 6/7 天)
0	0	ND	2.20	100	12.8	1.08
1	0	33.6	1.90	100	7.7	1.26
3	0	33.9	2.06	100	11.5	1.41
10	0	33	2.04	100	9.7	1.17

[0624] 实施例8：化合物(1)与奥司他韦组合的体内测定

[0625] 从使用 5×10^3 TCID₅₀A/PR/8/34的A型流感攻击前24小时开始，用赋形剂或增强剂量水平的化合物(1)的HCl盐·1/2H₂O的形式A(下文简称为实施例8的化合物(1))与扎那米韦

的组合治疗感染小鼠。按照与如所述实施例7中所述类似的方式制备A型流感攻击和化合物(1)混悬液。在IN攻击与 5×10^3 TCID₅₀A/PR/8/34前24小时以0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg IN(鼻内)扎那米韦治疗受攻击的小鼠,并且在使用 5×10^3 TCID₅₀A/PR/8/34攻击前2小时开始,以0.1mg/kg、0.3mg/kg或1mg/kg BID 10天化合物(1)治疗受攻击的小鼠。

[0626] 将结果概括在下表19A和19B中。如下表18A中所示,使用化合物(1)和扎那米韦联合疗法提供了额外的存活有益性(表19A)。将效能商数、存活率复合测量值、体重减轻和肺功能(%存活率/(在第8天时的%体重减轻)*(在第6天时的Penh))概括在表19B中。

[0627] 表19A:存活率:化合物(1)与扎那米韦的联合疗法。

		感染前 2h 的第 1 次剂量的化合物(1) (mg/kg, BID)				
			0.1	0.3	1	
[0628]	扎那米韦	0	0	12.5	44.4	100
	(mg/kg, IN x	0.3	37.5	0	100	100
	1), 感染前 24h	1	50	75	100	100
	的第 1 次剂量	3	62.5	100	100	100

[0629] 表19B:效能商数:化合物(1)与扎那米韦的联合疗法。

		感染前 2h 的第 1 次剂量的化合物(1) (mg/kg, BID)				
			0.1	0.3	1	
[0630]	扎那米韦	0	--	--	0.59	2.32
	(mg/kg, IN x 1),	0.3	0.44	--	1.35	2.97
	感染前 24h 的第	1	0.73	1.00	1.61	2.31
	1 次剂量	3	0.73	1.30	1.48	4.28

[0631] 实施例9:化合物(1)在小鼠A型流感感染模型中的预防和感染后效能

[0632] 材料和方法

[0633] 动物:雌性18-20g BALB/c小鼠得自Jackson Laboratories(Bar Harbor,ME)用于抗病毒实验。将动物维持在标准啮齿动物食物上并且可随意饮自来水。在使用前将它们隔离48小时。

[0634] 病毒:小鼠适应的A型流感/California/04/2009(pndH1N1)病毒得自Elena Govorkova博士(St.Jude Children's Research Hospital,Memphis,TN)。将病毒储备溶液在MDCK细胞中扩增,然后在BALB/c小鼠中进行致死率滴定。A型流感/Victoria/3/75(H3N2)病毒得自美国模式培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(Manassas,VA)。使该病毒在小鼠中传代7次以使小鼠适应它,然后在MDCK细胞中传代1次。在BALB/c小鼠中进一步滴定该病毒的致死率,得到适当的致死攻击剂量。A型流感/Vietnam/1203/2004(H5N1)病毒得自疾病控制中心(Centers for Disease Control)的Jackie Katz博士(Atlanta,GA)。使小鼠暴露于致死剂量的病毒(5MLD₅₀,5PFU/小鼠),在该剂量下,其先在6-

13天导致死亡,截至到第10天时死亡率为90-100%。

[0635] 化合物:奥司他韦(作为**Tamiflu**[®])得自当地药房。在体内代谢时,每粒Tamiflu胶囊包含75mg活性成分奥司他韦羧酸盐。奥司他韦剂量基于这一测量值。化合物(1)的HCl盐半水合物的形式A(下文简称为实施例9的化合物(1))用于本研究,且该化合物的剂量基于化合物(1)的HCl盐半水合物。用0.5%甲基纤维素(Sigma,St.Louis,MO)制备化合物(1)和奥司他韦用于口腔管饲法(p.o.)施用于小鼠。

[0636] 实验设计:通过腹膜内注射氯胺酮/赛拉嗪(50/5mg/kg)麻醉小鼠并且经鼻内使动物感染90- μ l流感病毒混悬液。病毒攻击约为4个50%小鼠致死感染剂量。如指示的,从病毒攻击前2小时或攻击后48小时开始给予治疗,每日2次(间隔12小时),持续10天。用于评价感染的参数是存活率、平均死亡天数、体重改变和肺感染参数(出血评分、重量和病毒滴度)。在感染的隔天至第21天各自称重动物。认为在治疗期的前6天期间死亡的小鼠死于非流感病毒感染的原因且从总统计数中排除。

[0637] 为了评价肺感染参数,收获来自处死动物的肺(开始为该目的分开设定的每个组5只动物)。通过目视检查从粉红色到李子色的颜色改变评价肺出血评分。这种情况发生在肺的局部区域,而不是整个肺逐步改变成较深的颜色。出血评分为0(正常)至4(显示李子色的完整肺)且由此是非参数测量值。称重肺且然后冷冻在-80℃。随后,将融化的肺在1ml细胞培养基中均化,将上清液流体离心以除去颗粒物质,并且将液体样品再冷冻在-80℃下。在准备96-孔MDCK细胞平板后,融化样品,以10-倍稀释递增顺序稀释,并且通过终点稀释法在平板(1)中滴定,使用4微孔/稀释。将病毒滴度计算为 \log_{10} 50%细胞培养感染剂量/克肺组织(\log_{10} CCID₅₀/g)。

[0638] 统计学分析:通过Mantel-Cox时序检验分析用于多组比较的Kaplan-Meier图,以便确定统计学显著性。随后,通过Gehan-Breslow-Wilcoxon检验进行配对比较。基于进行治疗对比的数量将相对实验显著性调整至Bonferroni校准的显著性阈值。通过克-瓦二氏检验,然后通过Dunn多重比较检验分析死亡的平均天数和平均肺出血评分。通过ANOVA评估平均体重、肺重量和 \log_{10} 肺病毒滴度,推定等同的变异性和正态分布。在ANOVA后,通过Tukey-Kramer多重比较检验比较各个处理值。使用**Prism**[®]软件(GraphPad Software, San Diego, CA)进行分析。

[0639] 结果和讨论

[0640] 在小鼠A型流感模型中研究化合物(1)的预防剂量响应。在感染前2h开始施用赋形剂或化合物(1),并且每日2次持续10天。将结果概括在表20和21中。接受单独的赋形剂的全部小鼠截至到研究的第9天仍然患病,且平均失去~32%的体重(BW)。以1、3或10mg/kg BID施用的化合物(1)提供了完全的存活和BW减轻的剂量依赖性减少。以0.3mg/kg BID单独施用的化合物(1)提供了一些存活有益性(2/8只小鼠),不过,小鼠存在显著的BW减轻。在相同实验中,给小鼠施用10mg/kg BID奥司他韦,为临床相当的人体剂量(基于AUC)。全部施用奥司他韦的小鼠均存活,且与施用1mg/kg BID化合物(1)的小鼠相比存在类似的体重减轻分布。

[0641] 在感染后48小时连续BID施用10天施用,化合物(1)在这种被A型流感/Vietnam/1203/2004(H5N1)病毒攻击的模型中仍然提供有效性(表22)。以10mg/kg施用化合物(1)提

供了完全的预防作用,如表20中所示。

[0642] 表20:使用化合物(1)和奥司他韦在BALB/c小鼠中对A型流感/California/04/2009(pndH1N1)病毒感染的预防作用(预防)。

[0643]

化合物(mg/kg) ^a	幸存者/总数	MDD ^b ± SD	平均肺参数(第6天)		
			评分	重量(mg)	病毒滴度 ^c
化合物(1) (10 mg/kg)	10/10***	—	0.2 ± 0.4**	132 ± 20***	<2.6 ^d ***
化合物(1) (3 mg/kg)	9/9***	—	0.0 ± 0.0***	123 ± 21***	3.1 ± 0.9***
化合物(1) (1 mg/kg)	10/10***	—	0.6 ± 0.9 ^e	246 ± 21*	5.5 ± 1.2***
奥司他韦 (10 mg/kg)	10/10***	—	1.0 ± 0.0 ^e	178 ± 28***	7.9 ± 0.2
安慰剂	2/20	9.9 ± 1.3	3.4 ± 0.5	282 ± 26	7.9 ± 0.4

^a 给予的每次治疗的剂量, 每日2次, 持续10天, 在病毒暴露前2小时开始。
^b 在第21天时或之前死亡的小鼠的平均死亡天数。
^c Log₁₀ CCID₅₀/g。
^d 低于检测限(2.6 log₁₀)。
^e 通过极为严格的Dunn多重比较检验无显著性, 但通过配对双尾Mann-Whitney U-检验与安慰剂相比具有显著性(P<0.01)。与安慰剂相比, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001。

[0644] 表21:化合物(1)和奥司他韦对BALB/c小鼠中A型流感/Victoria/3/75(H3N2)病毒感染的作用(预防)

[0645]

化合物(mg/kg) ^a	幸存者/总数	MDD ^b ± SD	平均肺参数(第6天)		
			评分	重量(mg)	病毒滴度 ^c
化合物(1) (10 mg/kg)	10/10***	—	0.1 ± 0.2 ^d	164 ± 11**	6.1 ± 0.5***
化合物(1) (3 mg/kg)	10/10***	—	3.3 ± 0.6 ^e	260 ± 25	7.2 ± 0.2
化合物(1) (1 mg/kg)	4/10	9.8 ± 1.9	3.2 ± 0.3 ^e	274 ± 49	7.3 ± 0.3
奥司他韦 (10 mg/kg)	9/10***	7.0	1.7 ± 1.1	218 ± 24	7.0 ± 0.3**
安慰剂	3/20	9.8 ± 2.1	2.2 ± 0.6	264 ± 54	7.8 ± 0.4

^a 给予的每次治疗的剂量, 每日2次, 持续10天, 在病毒暴露前2小时开始。
^b 在第21天时或之前死亡的小鼠的平均死亡天数。
^c Log₁₀ CCID₅₀/g。
^d 通过极为严格的Dunn多重比较检验无显著性, 但通过配对双尾Mann-Whitney U-检验与安慰剂相比具有显著性(P<0.01)。
^e 与脚注"d"相同, 但与安慰剂相比具有显著性, P<0.05水平, ** P<0.01, *** P<0.001。

[0646] 表22:(+48h)使用化合物(1)和奥司他韦治疗在BALB/c小鼠中对A型流感/Vietnam/1203/2004(H5N1)病毒感染的作用

化 合 物 (mg/kg) ^a	幸存者/ 总数	MDD ^b ± SD	平均肺参数(第 6 天)	
			重量(mg)	病毒滴度 ^c
化合物(1) (10 mg/kg)	10/10	>21	0.15 ± 0.02	3.75 ± 0.94
[0647] 奥司他韦 (10 mg/kg)	0/10	9.5 ± 1.2	0.17 ± 0.02	5.22 ± 0.38
安慰剂	0/20	9.9 ± 0.8	0.16 ± 0.02	4.65 ± 1.23
^a 给予的每次治疗的剂量, 每日 2 次, 持续 10 天, 在病毒暴露前 2 小时开始。 ^b 在第 21 天时或之前死亡的小鼠的平均死亡天数。 ^c Log ₁₀ CCID ₅₀ /g。				

[0648] 实施例10: 化合物(1)对A型谱的流感株的体外效能

[0649] 细胞和病毒. Madine Darby 犬肾 (MDCK) 细胞最初得自美国模式培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA) 并且使用标准实验室技术传代, 然后用于感染测定。将细胞维持在 37°C 在补充了 10% 胎牛血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、2mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES、100U/mL 青霉素和 100ug/mL 链霉素 (Invitrogen) 的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基 (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。流感病毒得自 ATCC、Virus Surveillance and Diagnosis Branch of the Influenza Division of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, GA) 或 Influenza Reagent Resource, Influenza Division, WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza, CDC。为了生成病毒储备溶液, 使 MDCK 细胞在补充了 2mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES、100U/mL 青霉素、100ug/mL 链霉素和 1μg/mL 甲苯磺酰基苯丙氨酰基氯甲基酮 (TPCK) - 处理的胰蛋白酶 (USB Corp.; Santa Clara, CA) 的 DMEM 中感染低感染复数 (MOI)。将细胞在 37°C 与 5% CO₂ 温育 48h, 此后, 通过使用 Beckman GS-6R 离心机以 900xg 离心 10min 收获上清液。将病毒储备溶液等分并且冷冻在 -80°C 下。

[0650] 化合物. 将化合物(1)的游离碱或 HCl 盐 (例如无定形的化合物(1) HCl 盐, 化合物(1)的 HCl 盐半水合物的形式 A, 无定形游离碱化合物(1)) (下文简称为实施例 10 的化合物(1)) 溶于 100% 二甲亚砜 (DMSO), 制成 10mM 浓度的溶液。

[0651] 抗病毒活性. 在 MDCK 细胞中使用 CellTiter-Glo (Promega; Madison, WI) 如 ATP 水平所确定的评价化合物(1)和金刚烷胺的抗病毒活性。将 MDCK 细胞在黑色澄清底部 384-孔平板中的 50μL VGM 上铺板至密度为 2x10⁴ 细胞/孔。将细胞在 37°C、5% CO₂、在标准湿度下温育至细胞粘附并且形成单层。5h 后, 取出 40μL 培养基, 并且加入 15μL MOI 为 0.005 的病毒。将化合物作为在具有补体的 DMEM 中 25μL 的 10 点、3-倍稀释液加入 (最终 DMSO 浓度为 0.5%)。内部对照组由仅包含细胞和未处理的感染病毒的细胞的孔组成。72h 温育后, 将 20μL CellTiter-Glo 加入到每个孔中并且在室温温育 10min。使用 EnVision Multilabel 读出器 (PerkinElmer; Waltham, MA) 测定发光。通过使用 4-参数曲线拟合法、应用 Levenburg

Marquardt算法 (Condoseo软件;Genedata,Basel,Switzerland) 拟合化合物剂量与响应数据计算EC₅₀值 (确保未感染的对照组中50%细胞存活率的化合物浓度)。在Southern Research Institute在BSL-3防范下进行hpaIH5N1的体外测试。

[0652] 如下表23中所示,化合物(1)显示对全部测试A型流感株的有效活性,包括来自1934—2009的H1N1和H3N2参照株和大范围流行的2009H1N1株A/California/07/2009、A/Texas/48/2009和高致病性禽H5N1株A/VN/1203/2004。化合物(1)对所有株同样有效,包括对金刚烷胺和神经氨酸酶抑制剂具有抗性的那些。其显示对B型流感病毒有限的活性。

[0653] 表23:化合物(1)对一组流感株的效能

流感株	感染病毒株	亚型	细胞保护测定 ^a
			EC ₅₀ ± SD 化合物 (1) (nM)
A/WS/33 ^a	A	H1N1	3.2 ± 4.3
A/NWS/33 ^a	A	H1N1	0.73 ± 0.10
A/Puerto Rico/8/34 ^a	A	H1N1	3.2 ± 1.8
A/Weiss/43 ^a	A	H1N1	0.31 ± 0.23
A/FM/1/47	A	H1N1	0.57 ± 0.036
A/Ma1/302/54	A	H1N1	0.57 ± 0.055
A/Denver/1/57	A	H1N1	0.42 ± 0.19
A/Chelyabinsk/1/2006	A	H1N1	0.70 ± 0.49
A/Florida/3/2006	A	H1N1	0.92 ± 1.5
A/Fukushima/141/2006	A	H1N1	0.18 ± 0.20
A/Georgia/17/2006	A	H1N1	0.13 ± 0.048
A/Georgia/20/2006 ^b	A	H1N1	2.6 ± 3.8
A/Missouri/3/2006	A	H1N1	0.21 ± 0.060
A/St. Petersburg/8/2006 ^a	A	H1N1	0.88 ± 0.69
A/Virginia/01/2006 ^a	A	H1N1	0.42 ± 0.24
A/Cambodia/0371/2007 ^{a*}	A	H1N1	0.61 ± 0.33
A/South Dakota/6/2007	A	H1N1	0.31 ± 0.25
A/California/07/2009 NYMC X-179A ^a	A	H1N1	2.7 ± 1.8
A/Aichi/2/68	A	H3N2	1.4 ± 1.1
A/Hong Kong/8/68	A	H3N2	0.60 ± 0.11
A/Port Chalmers/1/73 ^a	A	H3N2	0.54 ± 0.11
A/Victoria/3/75	A	H3N2	1.3 ± 0.63
A/Wisconsin/67/2005 ^a	A	H3N2	1.8 ± 0.24

[0654]

流感株	感染病毒株	亚型	细胞保护测定 ^o
			EC ₅₀ ± SD 化合物(1) (nM)
A/Hawaii/2/2006	A	H3N2	1.4 ± 0.91
A/Nebraska/1/2006 ^{aa}	A	H3N2	2.1 ± 1.3
A/Texas/12/2007 ^{aa}	A	H3N2	0.65 ± 0.22
A/Uruguay/716/2007 ^a	A	H3N2	3.5 ± 5.1
A/New Jersey/8/76	B	H1N1	0.20 ± 0.096
A/California/07/2009 ^a	C	H1N1	1.8 ± 1.6
A/Mexico/4108/2009 ^a	C	H1N1	2.7 ± 1.8
A/New York/18/2009 ^{aa}	C	H1N1	0.59 ± 0.40
A/Texas/48/2009 ^b	C	H1N1	2.8 ± 3.2
A/Virginia/ATCC2/2009	C	H1N1	1.9 ± 3.0
A/Virginia/ATCC3/2009	C	H1N1	1.9 ± 3.2
A/Swine/Iowa/15/30	C	H1N1	0.65 ± 0.082
A/Swine/1976/31	C	H1N1	0.47 ± 0.11
A/Equine/2/Miami/63	C	H3N8	0.50 ± 0.065
A/Viet Nam/1203/2004 ^a	K	H5N1	<1.5 ± ND
B/Lee/40			>10 ± ND
B/Russia/69			>10 ± ND
^a : 金刚烷胺抗性: M2 31N 突变。 ^b : 奥司他韦羧酸盐抗性: NA 275Y 突变。 ^c : 奥司他韦羧酸盐抗性: NA 119V 突变。 [*] : 体外验证的表型抗性, 序列数据未得到。			

[0656] 实施例11: 化合物(1)和奥司他韦、扎那米韦或法维拉韦的体外联合实验

[0657] 在与神经氨酸酶抑制剂奥司他韦羧酸盐和扎那米韦或聚合酶抑制剂T-705的联合实验中, 在感染MOI为0.01的A/Puerto Rico/8/34的3日MDCK细胞基于CPE的测定中测试化合物(1) (类似地在实施例10中的化合物(1)的游离碱或HCl盐)在100%二甲亚砜(DMSO)中的溶液。将奥司他韦羧酸盐和T-705溶于100%二甲亚砜(DMSO); 将扎那米韦以10mM的浓度

溶于Dulbecco改进的eagle培养基 (DMEM) 并且储存在-20℃下。本研究使用Bliss独立性方法 (Macsynergy) (例如Prichard, M.N. 和C. Shipman, Jr., *Antiviral Res*, 1990. 14 (4-5) : p. 181-205) 或Loewe加和性/中间效应方法 (例如Chou, T.C. 和P. Talalay, *Adv Enzyme Regul*, 1984. 22: p. 27-55)。Bliss独立性方法包括以棋盘方式测试不同浓度的抑制剂组合, 而Loewe独立性方法包括以不同的固定比例的稀释液测试固定比例的抑制剂组合。还使用化合物 (1) 自身作为对照进行实验, 从而证实了加和性。使用CellTiter-Glo测定细胞存活力。

[0658] Bliss独立性方法导致奥司他韦羧酸盐和扎那米韦的协同作用体积分别为312和268; 且对于法维拉韦得到协同作用体积为317。协同作用体积大于100一般被视为强协同作用, 且50-100的体积被视为中度协同作用。Loewe加和性方法对于奥司他韦、扎那米韦和T-705在50%效应水平下分别产生0.58、0.64和0.89C.I. (联合指数) 值。小于0.8的C.I. 值被视为强协同作用, 而0.8-1.0的值被视为累加至适度协同作用。如表24中所示的这些数据共同启示化合物 (1) 与测试的神经氨酸酶抑制剂和聚合酶抑制剂具有协同作用。

[0659] 表24: 体外协同作用和拮抗作用实验概述

Loewe 加和性	联合指数			结果
	ED ₅₀	ED ₇₅	ED ₉₀	
化合物 (1) + 奥司他韦	0.60, 0.56	0.57, 0.56	0.59, 0.58	强协同作用
[0660] 化合物 (1) + 扎那米韦	0.68, 0.61	0.67, 0.66	0.71, 0.77	强协同作用
化合物 (1) + 法维拉韦	0.83, 0.96	0.76, 1.0	0.71, 1.1	达到弱协同作用的累加作用

Bliss 独立性	协同作用体积, 95%置信度	结果
化合物 (1) + 奥司他韦	312	强协同作用
[0661] 化合物 (1) + 扎那米韦	268	强协同作用
化合物 (1) + 法维拉韦	317	强协同作用
ED ₅₀ , ED ₇₅ , ED ₉₀ : 分别保护 50%、75%或 90%的细胞的化合物浓度; 在 ED ₅₀ 、ED ₇₅ 和 ED ₉₀ 效应水平下计算联合指数。		

[0662] 实施例12: 小鼠A型流感感染模型中的效能

[0663] 在小鼠A型流感模型中研究化合物 (1) (化合物 (1) HCl盐的半水合物的无定形或形式A (本实施例下文中简称为化合物 (1)) 的预防剂量响应。在感染前2h开始施用赋形剂或化合物 (1) 并且每日2次持续10天。接受单独的赋形剂的全部小鼠截止到研究第9天时仍然被感染, 且平均失去了~32%的其体重 (BW)。以1、3或10mg/kg BID施用的化合物 (1) 提供完全的存活和剂量依赖性BW减轻减少。以0.3mg/kg BID施用的化合物 (1) 提供了一些存活有益性 (2/8只小鼠), 不过, 小鼠存在显著的BW减轻。在相同实验中, 给小鼠施用10mg/kg BID奥司他韦, 为临床相当的人体剂量 (基于AUC)。全部施用奥司他韦的小鼠均存活, 且与施用

1mg/kg BID化合物(1)的小鼠相比存在类似的体重减轻分布。

[0664] 通过用A型流感病毒攻击小鼠并且在感染后24、48、72、96或120h时开始施用赋形剂、奥司他韦或化合物(1)持续BID施用10天研究可以推迟化合物(1)施用且在该模型中仍然提供有效性的程度(表25)。全部赋形剂对照组在截至到第8或9天时仍然患病。与赋形剂对照组对比,以1、3或10mg/kg BID施用的化合物(1)在感染后达72h开始施用完全防止了死亡,并且减少了BW减轻。仅以10mg/kg BID施用奥司他韦在感染后24h或以下开始施用提供了完全的预防作用。当再推迟开始施用化合物时,3或10mg/kg BID的化合物(1)在感染后96h时提供完全的存活并且在感染后推迟120h开始施用提供了部分保护作用。

[0665] 研究化合物(1)在降低肺病毒滴度中的有效性。使小鼠感染A型流感,并且在24h后,施用赋形剂、奥司他韦(10mg/kg BID)或化合物(1)(3、10、30mg/kg BID),直到收集肺并且在第6天时测定病毒负荷(表26)。全部化合物(1)-施用组显示与奥司他韦-和赋形剂-施用的动物相比强烈的具有统计学显著性的肺病毒滴度降低。

[0666] 为了建立PK/PD模型,使小鼠感染流感病毒24h,且然后再施用化合物(1)24h。将剂量分成单剂量、2个剂量或4个剂量,分别在每隔12h或6h施用。采集肺和血浆用于测定肺病毒载量和化合物(1)浓度。将来自这些施用方案(q6h、q12h和q24h)的各个肺滴度数据对各 C_{max} 、 C_{min} 或AUC值绘图(数据未显示)。尽管在肺滴度降低与 C_{min} 之间存在明显的相关性,但是与 C_{max} 几乎没有相关性,且与AUC仅有弱的相关性。当将血浆中测定的化合物(1)浓度与测定的肺滴度绘图时,与 C_{min} 存在强烈相关性。肺滴度的半数最大降低(2-3log)出现在接近血清转换的 EC_{99} (100ng/mL)。在肺滴度与测定的肺中化合物(1)浓度之间发现了类似的相关性(数据未显示)。

[0667] 表25:A型流感小鼠模型中存活率百分比和体重减轻百分比的概述

[0668]

相对于感染的治疗开始时间(h)	化合物(1)剂量(mg/kg; BID)	奥司他韦剂量(mg/kg; BID)	存活率百分比	第8天研究时的体重减轻百分比
-2 ^a	10		100	-2.8
	3		100	-8.7
	1		100	-16.8
	0.3		25	-30.4
	0.1		0	-31.9
		10	100	-19.1
	0		0	-32.2
+24 ^a	10		100	-6.2
	3		100	-14.2
	1		100	-23.4
		10	100	-28.9
	0		0	-33.8
+48 ^a	10		100	-7.1
	3		100	-10.9
	1		100	-22.5
		10	80	-31.1
	0		0	-34.4
+72 ^a	10		100	-17.4
	3		100	-23.2
	1		100	-29.4
		10	0	-31.3
	0		0	-36.1
+96 ^b	10		100	-25.5
	3		100	-27.3
		10	ND ^c	ND ^c
	0		0	-34.6
+120 ^b	10		37.5	-34.4
	3		12.5	-32.6
		10	ND ^c	ND ^c
	0		0	-34.6

[0669] ^a数据来自独立的实验。[0670] ^b数据来自相同的实验。[0671] ^cND, 未测定。[0672] 表26:A型流感小鼠模型中的肺病毒滴度和Log₁₀降低的概述

治疗 ^a	研究 1		研究 2	
	肺病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀) ^b	与赋形剂对比 的 Log ₁₀ 降低	肺病毒滴度 (Log ₁₀ TCID ₅₀) ^b	与赋形剂对比 的 Log ₁₀ 降低
10 mg/kg BID 赋形剂	6.20		6.28	
10 mg/kg BID 奥司他韦	6.05	-0.15		
30 mg/kg BID 化合物 (1)	3.95	-2.25***	4.53***	-1.75
10 mg/kg BID 化合物 (1)			5.20***	-1.08
3 mg/kg BID 化合物 (1)			5.24***	-1.04

[0674] ^a动物治疗在感染后24小时开始,持续5天。

[0675] ^b在研究第6天时测定肺病毒滴度。

[0676] ^cND,未测定。

[0677] 2种方式ANOVA与Bonferroni Post测验,***P<0.001。

[0678] 实施例13:理念验证的流感攻击

[0679] 活的减毒流感攻击模型之前被用于预测流感抗病毒药在人体的天然感染中的有效性(Calfee,D.P.,Peng,A.W.,Hussey,E.K.,Lobo,M.&Hayden F.G.Safety and efficacy of once daily intranasal zanamivir in preventing experimental human influenza A infection.Antivir Ther.4,143-149 (1999);Hayden,F.G.等人Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza.JAMA282, 1240-1246 (1999)。在接种了活的A型流感/Wisconsin/67/2005 (H3N2) 攻击株病毒的健康志愿者中进行化合物 (1) 的HCl盐半水合物的形式A(在本实施例的下文中简称为化合物 (1)) 的随机化、双盲、安慰剂-对照的单中心研究。受试者接受5个每日剂量的安慰剂(N=33) 或化合物 (1), 每日1次(QD) (由净化合物 (1) 组成的胶囊形式): 在第1天时,100mg (N=16)、400mg (N=19) 或900mg, 随后600mg 2-5天 (N=20); 或在第1天时,1200mg, 随后600mg 2-5天 (N=18)。受试者接受每日3次的鼻拭子, 并且保持每日3次有关临床症状的评分卡片, 1-7天, 且在第8天时从设施中离开, 基本上在第28天时进行安全性随访。测定(初步分析) 和通过qRT-PCR(二次测定) 测定鼻拭子在细胞培养物中的流感病毒。

[0680] 对完全分析(FA)组进行效能分析, 将所述完全分析(FA)组定义为接受至少一种剂量的研究药物(化合物 (1) 或安慰剂) 剂量的所有随机化受试者, 其病毒浓度高于或等于在接种后48h内的任意时间点时的TCID₅₀细胞培养物的定量下限, 或在接种期后其血细胞凝集抑制反应滴度从基线升高4-倍或以上(第1天) (N=74)。安全性组包括在第0天时接种流感

并且接受至少一种剂量的安慰剂或化合物(1)的所有受试者(N=104)。

[0681] 效能评价

[0682] 本研究的主要措施在于显示在研究第1天(第1天药物施用)至第7天之间病毒减少的AUC的剂量响应趋势,正如在FA组中细胞培养测定中的TCID₅₀所确定的。在鼻拭子中平均AUC病毒减少中观察到具有统计学限制性的剂量响应趋势(P=0.036, Jonckheere-Terpstra趋势检验)。此外,在汇集的安慰剂组与各化合物(1)剂量组之间进行平均AUC病毒减少、平均减少期限和峰值病毒减少的平均量级的配对比(表27)。对于1200/600mg剂量组观察到AUC病毒减少的具统计学显著性的减少(P=0.010, 威尔科克森秩和检验),且对于1200/600mg剂量组、400mg剂量组和汇集的化合物(1)剂量组,观察到峰值减少的显著性减少(图1)。进行额外的FA组分析(数据未显示)。

[0683] 还通过qRT-PCR定量鼻部流感减少并且结果与使用细胞培养物观察到的类似。在化合物(1)剂量组与安慰剂之间的血清转化率方面无差异,正如抗流感滴度从预先接种基线开始增加4-倍或以上所确定的,这启示在流感接种后24h施用的化合物(1)不影响流感感染获取率且无法消除随后对感染的体液免疫应答(表28A)。

[0684] 受试者每日3次在日记中记录临床症状。计算第1天至第7天的临床AUC和流感样症状评分。与安慰剂对比,化合物(1)的1200/600mg剂量组显示在复杂临床症状平均期限(P=0.001)、流感样症状的平均AUC(P=0.040)和流感样症状的平均期限方面具有统计学显著性减少(P<0.001)(表28B)。

[0685] 表28A: 平均AUC病毒减少、平均减少期限和平均峰值病毒减少量级

[0686]

终点[单位]		汇集的 安慰剂 (N=22)	化合物(1)					汇集的 (N=52)
			100 mg (N=12)	400 mg (N=12)	900/600 mg (N=14)	1200/600 mg (N=14)		
使用组织 培养物的 病毒减少 ^a	AUC, 平均值(范围)	5.85	1.25	0.70	3.20	0.35	0.65	
	[log ₁₀ TCID ₅₀ mL*天]	(0.0, 17.1)	(0.0, 16.1)	(0.0, 18.0)	(0.0, 16.1)	(0.0, 8.4)	(0.0, 18.0)	
	P值 ^b	NA	0.269	0.206	0.723	0.010	0.057	
	期限, 平均值	2.38	0.96	1.60	2.71	0.00	0.71	
	(95%CI) [天]	(0.03, 4.63)	(0.00, 3.39)	(0.00, NA)	(0.00, 4.68)	(0.00, 1.33)	(0.00, 2.43)	
	P值 ^d	NA	0.331	0.831	0.893	0.169	0.487	
	峰值, 平均值(SD)	3.13	2.09	1.73	2.68	1.00	1.87	
	[log ₁₀ TCID ₅₀ /mL]	(1.878)	(2.209)	(1.976)	(2.201)	(1.365)	(2.002)	
P值 ^e	NA	0.139	0.049	0.505	0.002	0.015		
通过 qRT-PCR 测定的病 毒减少 ^c	AUC, 平均值(范围)	18.40	6.05	4.90	10.65	0.45	3.45	
	[log ₁₀ 拷贝/mL*天]	(0.0, 42.1)	(0.0, 41.9)	(0.0, 36.9)	(0.0, 37.1)	(0.0, 24.7)	(0.0, 41.9)	
	P值 ^b	NA	0.218	0.306	0.821	0.014	0.075	
	期限, 平均值	2.91	0.96	1.36	2.39	0.00	0.71	
	(95%CI) [天]	(0.03, 5.35)	(0.00, 3.39)	(0.00, NA)	(0.00, 5.01)	(0.00, 0.66)	(0.00, 2.394)	

终点[单位]		汇集的安慰剂(N=22)	化合物(1)				汇集的(N=52)
			100 mg (N=12)	400 mg (N=12)	900/600 mg (N=14)	1200/600 mg (N=14)	
[0687]	<i>P</i> 值 ^d	NA	0.318	0.753	0.602	0.084	0.238
	峰值, 平均值(SD)	5.36	4.36	3.90	5.08	2.37	3.91
	[log ₁₀ TCID ₅₀ /mL]	(3.108)	(3.379)	(3.514)	(3.097)	(2.861)	(3.276)
	<i>P</i> 值 ^e	NA	0.380	0.202	0.794	0.007	0.081
血清学 ^f	血清转化率,	21/32	11/16	9/19	13/19	12/18	45/72
	n/N (%)	(66%)	(69%)	(47%)	(68%)	(67%)	(63%)
	<i>P</i> 值	NA	>0.999	0.247	>0.999	>0.999	0.828

[0688] AUC:数值与时间曲线下的面积;CI:置信区间;NA:不适用;qRT-PCR:定量逆转录聚合酶链反应;SD:标准偏差;TCID₅₀:50%组织培养感染量。

[0689] 注意:统计学显著性*P*值($P < 0.05$)用粗字体表示。

[0690] ^a*P*=0.036,对于来自Jonckheere-Terpstra趋势检验的AUC的剂量响应趋势。

[0691] ^b*P*值根据威尔科克森秩和检验计算。

[0692] ^c*P*值根据ANOVA计算。

[0693] ^d*P*值根据时序检验计算。

[0694] ^e*P*=0.031,对于来自Jonckheere-Terpstra趋势检验的AUC的剂量响应趋势。

[0695] ^f血清-转化率定义为在与极限比较的随访时抗流感抗体滴度 ≥ 4 -倍增加。*P*值使用Fisher确切检验计算。

[0696] 表28B:复杂临床症状和流感样症状的平均AUC、平均期限和峰值平均量级

终点[单位]		汇集的 安慰剂 (N=22)	化合物(1)				汇集的 (N=52)
			100 mg (N=12)	400 mg (N=12)	900/600 mg (N=14)	1200/600 mg (N=14)	
复杂临床 症状	AUC, 平均值(范围)	4.85	1.85	4.70	1.75	1.95	2.15
	[等级*天]	(0.0, 23.5)	(0.0, 25.3)	(0.0, 16.0)	(0.0, 32.3)	(0.0, 5.5)	(0.0, 32.3)
	<i>P</i> 值 ^b	NA	0.422	0.694	0.595	0.83	0.211
	期限, 平均值	3.69	3.21	3.34	2.69	1.88	2.34
	(95%CI) [天]	(2.04, 4.73)	(0.03, 5.43)	(1.28, 4.63)	(0.00, 4.61)	(0.00, 2.24)	(1.87, 3.06)
	<i>P</i> 值 ^d	NA	0.946	0.994	0.686	0.001	0.355
	峰值, 平均值 (SD)	3.91	3.17	2.83	3.71	1.50	2.79
	[等级]	(3.637)	(3.881)	(2.167)	(4.232)	(1.286)	(3.158)
	<i>P</i> 值 ^e	NA	0.532	0.366	0.863	0.036	0.187
流感样症 状	AUC, 平均值(范围)	4.05	1.85	3.80	1.75	1.75	2.05
	[等级*天]	(0.0, 17.7)	(0.0, 21.3)	(0.0, 14.0)	(0.0, 28.6)	(0.0, 4.4)	(0.0, 28.6)
	<i>P</i> 值 ^b	NA	0.363	0.617	0.595	0.040	0.149
	期限, 平均值	3.69	3.21	3.34	2.69	1.88	2.34
	(95%CI) [天]	(2.04, 4.73)	(0.00, 5.40)	(1.28, 4.63)	(0.00, 4.61)	(0.00, 2.24)	(1.87, 3.00)
	<i>P</i> 值 ^d	NA	0.957	0.994	0.653	<0.001	0.342
	峰值, 平均值 (SD)	3.41	2.75	2.42	3.21	1.36	2.42
	[等级]	(3.003)	(3.361)	(1.832)	(3.534)	(1.216)	(2.689)
	<i>P</i> 值 ^e	NA	0.511	0.323	0.838	0.034	0.168

[0697]

[0698] AUC:数值与时间曲线下的面积;CI:置信区间;NA:不适用。

[0699] 注意:统计学显著性*P*值($P<0.05$)用粗体字表示。[0700] ^b*P*值根据威尔科克森秩和检验计算。[0701] ^e*P*值根据ANOVA计算。[0702] ^d*P*值根据时序检验计算。

[0703] 安全性评价

[0704] 化合物(1)是充分耐受的且不存在因化合物(1)-相关不良反应(AE)导致的中断,也没有任何严重的不良反应。呈现了在任意治疗组中 $\geq 10\%$ 的受试者中发生不良反应的列表(表29)。流感样疾病是最频繁报道的不良反应且由安慰剂和化合物(1)组中接近等比例的受试者报告。化合物(1)组与安慰剂接受者之间发生 $\geq 10\%$ 的发生率差异的不良反应为:血磷水平降低(18.1%,化合物(1);0%,安慰剂)、鼻漏(化合物(1),4.2%;18.8%,安慰剂)和鼻充血(1.4%,化合物(1);15.6%,安慰剂)。此外,在安慰剂和化合物(1)接受者中观察到丙氨酸氨基转移酶(ALT)升高。在单剂量达到1600mg且多剂量达到每日800mg 10天的化合物(1)的首次人体内剂量按比例上升研究中,既没有观察到肝功能异常,也没有观察到血清磷酸盐下降;在先使用上呼吸道病毒感染报道了ALT升高和血清磷酸盐降低。

[0705] 表29:在任意治疗组中 $\geq 10\%$ 的受试者中发生不良反应列表。

优选的条目	汇集的 安慰剂	化合物(1)				汇集的
		100 mg	400 mg	900/600mg ^a	1200/600mg ^b	
	N=32 n (%)	N=16 n (%)	N=19 n (%)	N=19 n (%)	N=18 n (%)	N=72 n (%)
流感样疾病 ^c	12 (37.5)	8 (50.0)	10 (52.6)	9 (47.4)	7 (38.9)	34 (47.2)
[0706] 丙氨酸氨基转移酶升高	5 (15.6)	3 (18.8)	1 (5.3)	0	6 (33.3)	10 (13.9)
血磷降低	0	3 (18.8)	0	6 (31.6)	4 (22.2)	13 (18.1)
肺量测定异常	2 (6.3)	2 (12.5)	4 (21.1)	0	4 (22.2)	10 (13.9)
鼻漏	6	0	2	0	1 (5.6)	3 (4.2)

优选的条目	汇集的 安慰剂	化合物 (1)				汇集的
		100 mg	400 mg	900/600mg ^a	1200/600mg ^b	
		N=32 n (%)	N=16 n (%)	N=19 n (%)	N=19 n (%)	
	(18.8)		(10.5)			
头痛	2 (6.3)	1 (6.3)	4 (21.1)	0	2 (11.1)	7 (9.7)
接触性皮炎	3 (9.4)	3 (18.8)	0	0	0	3 (4.2)
鼻充血	5 (15.6)	0	0	0	1 (5.6)	1 (1.4)
天冬氨酸氨基转 移酶升高	1 (3.1)	1 (6.3)	1 (5.3)	0	2 (11.1)	4 (5.6)
口咽痛 (Oropharyngeal pain)	1 (3.1)	2 (12.5)	0	1 (5.3)	0	3 (4.2)
紧张性头痛	1 (3.1)	0	2 (10.5)	1 (5.3)	0	3 (4.2)
不适感	1 (3.1)	2 (12.5)	0	0	0	2 (2.8)
恶心	0	0	2 (10.5)	1 (5.3)	0	3 (4.2)

[0707] [0708] 注意：一旦处于AE中，则统计具有多种不良反应的受试者。受试者可能出现多个类型。

[0709] ^a第1天时的900mg单一负荷剂量和第2-5天时的600mg qd。

[0710] ^b第1天时的1200mg单一负荷剂量和第2-5天时的600mg qd。

[0711] ^c流感样疾病，如效能分析中所确定的，基于文本中列出的参数评价。流感样疾病的AE由临床医师确定。

[0712] 讨论

[0713] 在健康志愿者中进行的流感攻击研究中，化合物 (1) 通过TCID₅₀细胞培养和qRT-PCR显示鼻拭子中的AUC病毒滴度的剂量响应趋势，且评价的最高剂量的化合物 (1) 导致AUC病毒滴度和AUC和流感症状期限显著下降。尽管在第二最高剂量组900/600mg (表27) 中未观察到超过安慰剂的类似改善量级，但是该剂量确实显示与1200/600mg剂量在复杂临床症状和流感样症状终点的平均AUC方面 (表28) 类似的结果；这种偏差的原因尚未得到完全的理解。尽管在POC试验中未遇到明确的安全性趋势，但是观察到的磷酸盐降低和ALT升高启示两种参数的适当监测需要用于未来的研究。

[0714] 总之,流感攻击模型的局限在于用于本研究的流感病毒是特别选择的株,以便不产生流感病毒感染的最严重临床症状。此外,施用的病毒接种物可能大于天然流感暴露。暴露后24h定时施用化合物(1)对于启动社区开始的疗法可能并非现实的期限,其中患者通常不会寻求诊断或治疗,直到他们发生显著性症状为止,可能是在暴露后24h以上。然而,由于天然感染的受试者最初接种远低的病毒滴度,所以时间尺度并非直接是可相比较的。

[0715] 概括地,化合物(1)是有效的A型流感PB2抑制剂,其代表了卓越的和新的类型的抗病毒剂。如前期临床和临床数据所述的这种抑制剂的特性表明化合物(1)是进一步评价的令人鼓舞的候选物,其中的几个潜在优点超过了用于治疗流感感染的目前的抗病毒剂。

[0716] 本文提供的所有参考通过引用全部并入本文。如本文使用的所有缩写、符号和惯例与当代科学文献中使用那些一致。见,例如,Janet S.Dodd等,The ACS Style Guide:A Manual for Authors and Editors,第2版,Washington,D.C.:American Chemical Society,1997。

[0717] 其它实施方案

[0718] 应了解,虽然已经连同其详细说明描述了本发明,但上述说明旨在说明并不限制本发明的范围,而是由所附权利要求的范围限制。其它方面、优点和修改在以下权利要求的范围之内。

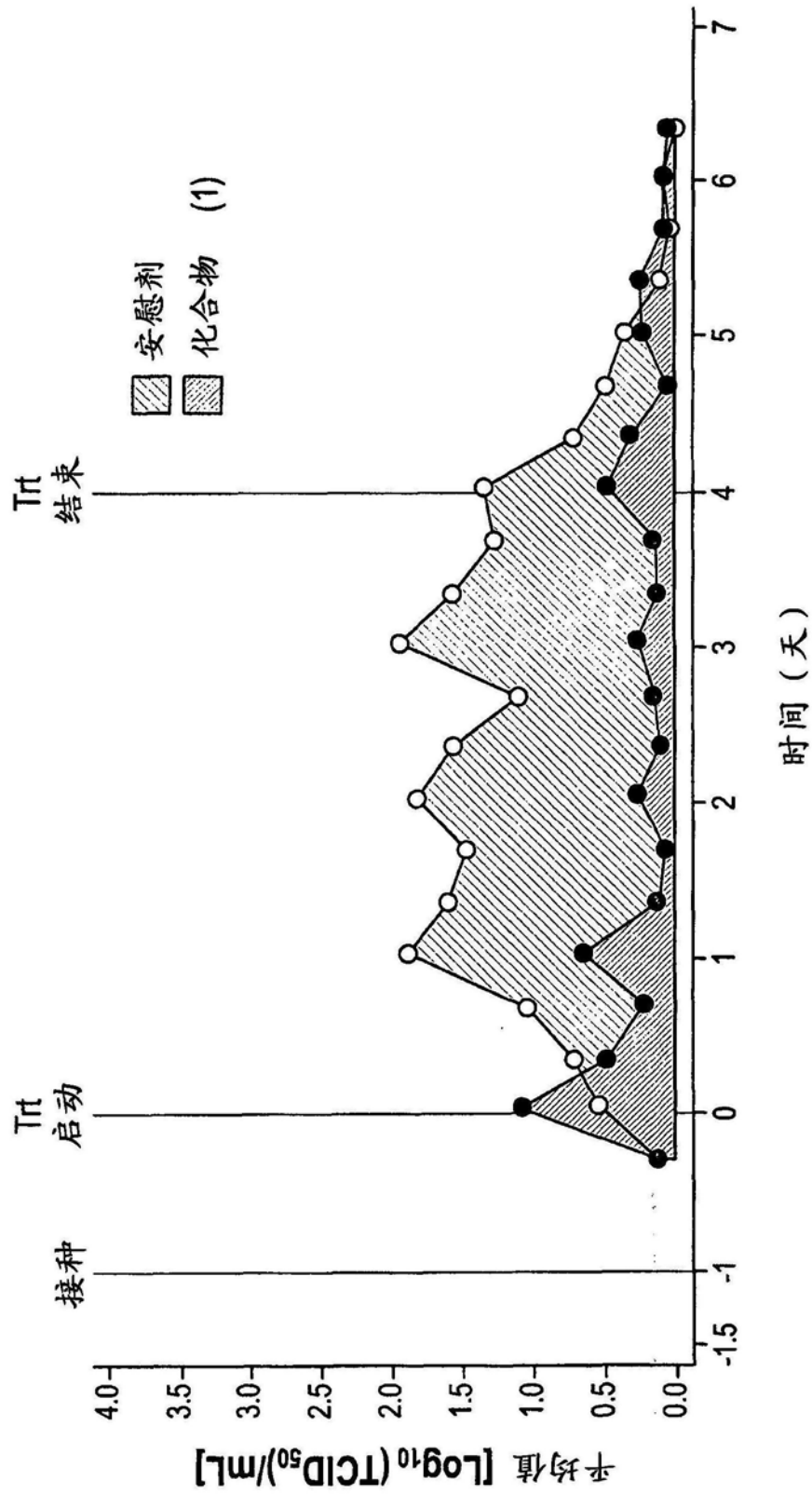


图1