

吡咯并嘧啶衍生物及其用途

技术领域

本发明属于生物医药领域，具体地，本发明涉及吡咯并嘧啶衍生物，更具体地，本发明涉及吡咯并嘧啶衍生物及其制备方法，以及其在制备药物中的用途。

5

背景技术

自分泌运动因子(Autotaxin, 缩写为 ATX)是一种分泌型糖蛋白，具有磷酸二酯酶(PDE)活性，是胞外焦磷酸酶/磷酸二酯酶(ENPP)家族的一员，因此也称作 ENPP2。ATX 还具有溶血磷脂酶 D(LysoPLD)活性，能够将溶血磷脂酰胆碱(LPC)水解为具有生物活性的溶血磷脂酸(LPA)。LPA 是影响许多生物和生物化学过程的细胞内脂质介质。

研究表明，在病理条件下，抑制 ATX 可降低 LPA 水平，从而为未满足的临床需求提供治疗效益，包括癌症、淋巴细胞归巢、慢性炎症、神经性疼痛、纤维化、血栓形成、胆汁淤积性瘙痒，或通过 LPA 水平升高和/或 ATX 激活而诱导、介导和/或传播的纤维化疾病。

在各种炎症性病症中观察到 ATX-LPA 信号传导途径的上调。例如，LPA 的促炎作用包括肥大细胞脱颗粒、平滑肌细胞收缩和细胞因子从树突细胞中释放。作为其在炎症中的一般作用的表现，在小鼠角叉菜胶气囊模型（该模型用于开发抗炎药，包括用于关节炎的环氧化酶抑制剂）中观察到 ATX-LPA 信号传导途径的上调（Hidenobu Kanda, Rebecca Newton, Russell Klein et al., Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs[J] Nature Immunology. 2008, 9(4):415-423.）。此外，已观察到在使用 ATX 抑制剂的大鼠角叉菜胶气囊模型中血浆和气囊中 LPA 减少，证实在炎症期间 ATX 作为 LPA 主要来源的作用。作为在炎症性疾病中的另一种一般性的作用，已经证实 LPA 与淋巴细胞迁移趋化因子之间存在“协同作用”。在慢性炎症部位发现 ATX 高表达。已经证实静脉内注射酶失活的 ATX 抑制了 T-细胞归巢至淋巴组织，可能是通过与内源性 ATX 竞争并且发挥显性负效应来实现。在一些情况中，ATX 有利于淋巴细胞进入淋巴样器官。因此，ATX 抑制剂可以阻断淋巴细胞迁移入次级淋巴样器官并且在自身免疫疾病中具有有益性。

在类风湿性关节炎中，证实 ATX 在来自类风湿性关节炎（RA）患者的滑膜纤维母细胞中的表达增加，并且消除间质细胞(包括滑膜纤维母细胞)中的 ATX 表达导致类风湿性关节炎小鼠模型中的症状减弱。照此，充分地确立了自分泌运动因子在类风湿性关节炎中的作用。

LPA 还可以通过其同源受体之一 LPA₁上调疼痛相关蛋白质，ATX 介导的 LPA 生物合成的靶向抑制可提供预防神经损伤引起的神经性疼痛的机制，如骨关节炎相关的疼痛。已

经观察到,自分泌运动因子抑制剂减少 LPA 和 PGE2 并且还减轻了炎性痛。还有研究表明, ATX 介导的 LPA 生物合成的靶向抑制可能是预防神经损伤引起的神经性疼痛的新机制。

在炎症消退和组织损伤修复之后,组织通常恢复至其最初的状态。过度的不受控制的组织修复会导致通常所称纤维变性的情形。纤维变性的特征在于细胞外基质成分的过度沉积和成纤维细胞的过度生长。纤维变性可发生于所有组织,但是在经常受到化学和生物损伤的器官包括肺、皮肤、消化道、肾和肝中尤其普遍。纤维变性常常严重危害器官的正常功能。

在某些情形下, LPA 刺激肝星形细胞增殖,同时抑制肝细胞中的 DNA 合成。LPA 水平和血清 ATX 活性在患有慢性丙型肝炎的患者中有所升高。在具有不同肝损伤的兔血液中, 血浆 LPA 浓度和血清 ATX 活性在四氯化碳诱发的肝纤维化中相对较高。血浆 LPA 浓度和血清 ATX 活性在不同肝损伤中随其严重程度有所升高。

肺纤维化是以成纤维细胞增殖及大量细胞外基质聚集并伴炎症损伤、组织结构破坏为特征的一大类肺疾病的终末期改变,也就是正常的肺泡组织被损坏后经过异常修复导致结构异常(疤痕形成)。多种原因引起肺脏损伤时,间质会分泌胶原蛋白进行修补,如果过度修复,即成纤维细胞过度增殖和细胞外基质大量聚集,就会形成肺纤维化。

LPA 信号特异性的通过 LPA₁ 受体对上皮细胞、内皮细胞和成纤维细胞具有促纤维化作用:该受体的遗传缺失降低了肺纤维化模型中的上皮细胞凋亡、血管渗漏和成纤维细胞的积累。

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种病因不明,以弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱为特征的慢性、进行性、纤维化性间质性肺炎,在影像学 and 病理组织学中主要表现为普通型间质性肺炎。随着病程进展它会使肺组织纤维化,患者肺部组织会变厚、变硬,以致形成永久疤痕,或使患者的肺呈蜂巢状,又被形象地称为“蜂窝肺”或“丝瓜筋肺”。这种慢性进行性病变会导致肺功能不可逆性持续下降。有 50% 的患者在确诊后,平均生存期仅 2.8 年,因此特发性肺纤维化又被称为“类肿瘤疾病”。目前已有的药物治疗存在不良反应多、治疗效果差的问题;非药物治疗手段主要是肺移植手术,但器官移植价格昂贵且资源有限,并且存在一定的临床风险。

有证据表明,由 LPA 刺激的纤维母细胞增殖和收缩以及细胞外基质分泌促进其它气道疾病的纤维增殖,例如慢性支气管炎和间质肺疾病以及重度哮喘中存在的细支气管周纤维变性。LPA 在纤维变性间质肺疾病和闭塞性细支气管炎中起作用,其中胶原和肌纤维母细胞均增加。与 IPF(特发性肺纤维变性)相关的研究表明患者的支气管肺泡灌洗液中 LPA 水平增加。进一步的 LPA₁ 敲除和抑制剂研究揭露了 LPA 在肺中纤维变性过程中的关键作用,并且由使用支气管上皮细胞和巨噬细胞中缺乏 ATX 的细胞特异性敲除小鼠的研究补充。已

显示这些小鼠对肺纤维变性模型敏感性较小。LPA 在其它纤维变性疾病(肾和皮肤)中的作用基于类似类型的观察。LPA 在肺重塑中的作用与 LPA 对肺纤维母细胞(通过 LPA1)和上皮细胞(通过 LPA2)两者的作用有关,已显示 LPA2 在纤维变性病症下在上皮细胞中的 TGF β 活化中起关键作用。LPA 在重塑和纤维变性中的作用与 COPD、IPF 和哮喘有关,其中肺重
5 塑作为长期结果的疾病将限制肺功能。最后,在对肺疾病的关注中,在小鼠中,ATX 是似乎与肺功能差异相关的三种主要定量性状位点之一。

已有研究发现 LPA 在卵巢癌患者早期和晚期的血浆和腹水中浓度升高。LPA 水平升高、LPA 受体表达和反应的改变可能是卵巢癌发病、进展或结果的原因之一。LPA 还与前列腺癌、乳腺癌、黑素瘤癌、头颈癌、肠癌、脑癌和甲状腺癌有关。LPA 参与肿瘤细胞的增殖
10 和侵袭邻近组织,导致转移。这些生物学和病理生物学过程是由 G 蛋白偶联受体的 LPA 激活而启动的。可以通过抑制与 LPA 生物合成有关的酶,如 ATX,来降低 LPA 水平,从而治疗肿瘤患者。

在血管生成过程中,ATX 与其他血管生成因子共同导致血管形成。血管生成在肿瘤生长过程中为肿瘤提供营养。因此,抑制血管生成可以说是癌症和肿瘤治疗的重要出发点。
15 专利申请 WO2014202458A1 中公开了 ATX-LPA 信号传导在不同病理生理学情况中的作用,例如增殖性疾病、神经性疼痛、炎症、自身免疫疾病、纤维化、淋巴结中的淋巴细胞追踪、肥胖、糖尿病或胚胎血管形成。

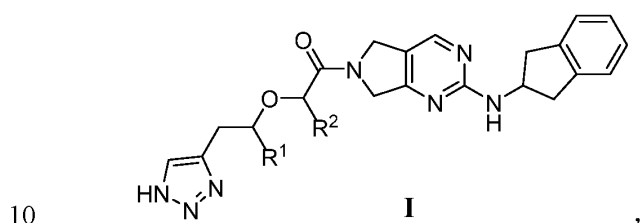
目前癌症、纤维变性疾病、增殖性疾病、炎症性疾病、自身免疫疾病、呼吸系统疾病、心血管疾病、神经变性疾病、皮肤病学障碍和/或异常血管生成相关疾病领域的治疗取得了一定的进展但仍存在不足。目前已上市的 IPF 治疗药有吡非尼酮和尼达尼布。吡非尼酮存在
20 肝功能损害(如肝功能衰竭、黄疸)、过敏反应(如面部肿胀、喉头水肿、呼吸困难、喘憋等)、严重的胃肠道反应,光遗传毒性试验显示可能引起染色体结构异常、光照后有导致皮肤致癌的可能。尼达尼布存在腹泻、恶心、腹痛的不良反应,胃肠道反应的发生率高达 50%,常见不良反应还有体重下降、食欲减退、肝损伤、出血等。接受吡非尼酮和尼达尼布治疗的
25 患者中,因严重不良事件导致停药的概率分别为 20.9%和 26.3%(Toby M Maher, et al. Rationale, design and objectives of two phase III, randomised, placebocontrolled studies of GLPG1690, a novel autotaxin inhibitor, in idiopathic pulmonary fibrosis (ISABELA 1 and 2)[J]. BMJ Open Respiratory Research. 2019, 21;6(1).)。IPF 患者的生活质量会受到严重影响,而临床试验中吡非尼酮和尼达尼布都不能改善患者生活质量。虽然这两种药物都可能改善整体
30 结果,但只能延缓病程却不能逆转肺纤维化,因此重度特异性肺纤维化患者可能无法受益。目前治疗 IPF 药物开发进展较快的 GLPG-1690,虽然表现出逆转病程的趋势,但是存在酶活性低、临床用药量大、用药依从性差的问题。

因此，目前的疗法并不令人满意，仍有大量的患者需要新的活性更高、药效更好的治疗方法，在更大程度上减缓甚至逆转疾病进程，提高用药依从性，让更多的特发性肺纤维化患者受益。

5 发明内容

本发明旨在提出一种能够有效抑制 ATX 的化合物，其能够作为目前药物或者 ATX 抑制剂的改进或者替换。

在本发明的第一方面，本发明提出了一种化合物，其为式 I 所示化合物，或者式 I 所示化合物的内消旋体、外消旋体、互变异构体、立体异构体、水合物、溶剂化物、盐或前药：



其中：

R^1 和 R^2 分别独立地选自 -H 或者 -CH₃，

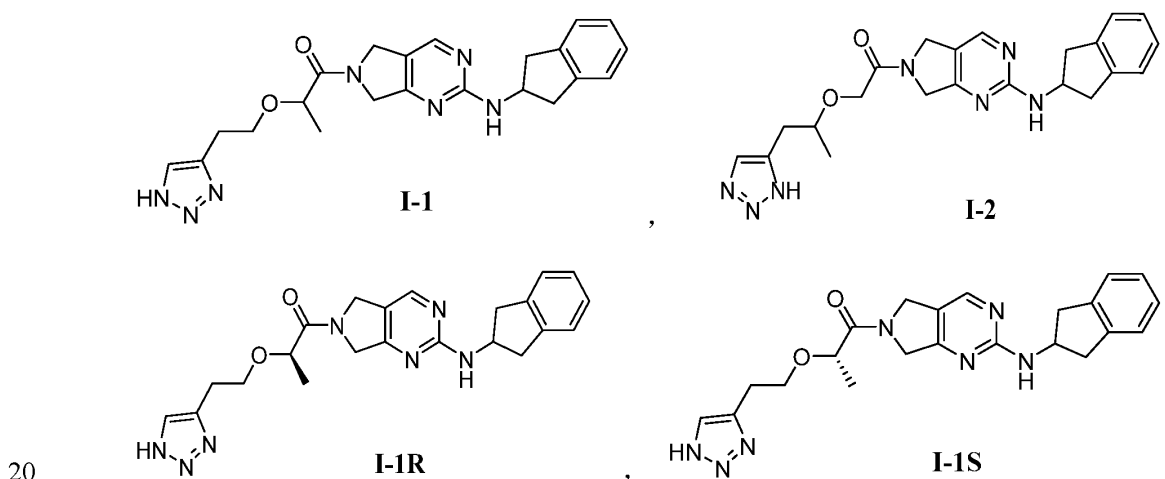
前提是， R^1 和 R^2 不同时为 -H 或者不同时为 -CH₃。

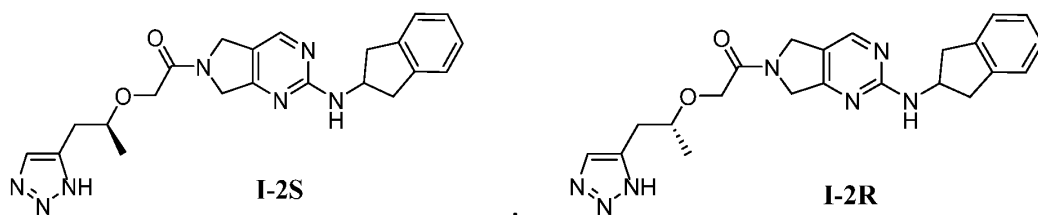
根据本发明的实施例，上述化合物还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

15 根据本发明的实施例， R^1 为 -H， R^2 为 -CH₃。

根据本发明的实施例， R^1 为 -CH₃， R^2 为 -H。

根据本发明的实施例，所述化合物为下列化合物之一或者下列化合物之一的内消旋体、外消旋体、互变异构体、立体异构体、水合物、溶剂化物、盐或前药：





根据本发明的实施例，所述盐包括药学上可以接受的盐，选自下列的至少之一：硫酸、磷酸、硝酸、氢溴酸、盐酸、甲酸、乙酸、丙酸、苯磺酸、苯甲酸、苯乙酸、水杨酸、褐藻酸、氨基葡萄糖、樟脑酸、柠檬酸、乙磺酸、蚁酸、富马酸、糠酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、谷氨酸、乙醇酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、粘液酸、双羟萘酸、泛酸、硬脂酸、琥珀酸、磺胺酸、酒石酸、对甲苯磺酸、丙二酸、2-羟基丙酸、草酸、羟乙酸、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、枸橼酸、赖氨酸、精氨酸、门冬氨酸、肉桂酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、乙磺酸或三氟甲磺酸。本领域技术人员能够理解的是，除了药学可接受的盐外，本发明还可以采用其他的盐类型，可以用于在化合物纯化中或在制备其它药学上可以接受的盐中充当中间体或可用于本发明化合物的鉴别、表征或纯化。

在本发明的第二方面，本发明提出了一种药物组合物。根据本发明的实施例，所述药物组合物包含：前面所述的化合物作为活性成分。

在本发明的第三方面,本发明提出了前面所述的化合物或者前面所述的药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或者预防 ATX 相关疾病。

根据本发明的实施例，所述用途还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一：

根据本发明的实施例，所述 ATX 相关疾病包括选自下列的至少之一：癌症、代谢疾病、肾脏疾病、肝脏疾病、纤维变性疾病、间质性肺病、增殖性疾病、炎症性疾病、疼痛、自身免疫疾病、呼吸系统疾病、心血管疾病、神经变性疾病、皮肤病学障碍和/或异常血管生成相关疾病。

根据本发明的实施例，所述 ATX 相关疾病包括选自下列的至少之一：间质性肺病、肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化。

根据本发明的实施例，所述 ATX 相关疾病包括特发性肺纤维化。

根据本发明的实施例，所述 ATX 相关疾病包括 II 型糖尿病、非酒精性脂肪肝。

根据本发明的实施例，所述 ATX 相关疾病包括神经性疼痛、炎症性疼痛。

根据本发明的实施例，所述 ATX 相关疾病包括骨关节炎相关的疼痛。

在本发明的第四方面，本年发明提出了一种药物联合。根据本发明的实施例，所述药物联合包括：前面所述的化合物或者前面所述的药物组合物；以及其他治疗或者预防 ATX 相关疾病的药物。

根据本发明的实施例,利用本发明的化合物或者药物组合物,可以为有需要的患者提供

更优、更有效的临床治疗药物或方案。根据本发明的实施例，本发明提出了一系列结构新颖、药代动力学性质更优良、药效更好、成药性好的 ATX 抑制剂，能够有效治疗 ATX 相关的疾病或病症。

5 本发明还涉及治疗与 ATX 有关的疾病方法，该方法包括给以患者治疗上有效剂量的包含本发明所述化合物或其药学上可接受的盐的药物制剂。

术语定义和说明

除非另有说明，本申请说明书和权利要求书中记载的基团和术语定义，包括其作为实例的定义、示例性的定义、优选的定义、表格中记载的定义、实施例中具体化合物的定义等，可以彼此之间任意组合和结合。这样的组合和结合后的基团定义及化合物结构，应当属于
10 本申请说明书记载的范围内。

术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

术语“药学上可接受的盐”或者“其药学上可接受的盐”是指药学上可接受的无毒酸或
15 碱的盐，包括无机酸和碱、有机酸和碱的盐。衍生自无机碱的盐包括但不限于 Al、Ca、Li、Mg、K、Na 和 Zn 形成的金属盐；衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺、仲胺或叔胺的盐，包括天然存在的取代或未取代的胺、环胺和碱性离子交换树脂，例如铵、异丙基胺、三甲基胺、二乙胺、三乙胺、三丙基胺、二乙醇胺、乙醇胺、二甲基乙醇胺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己基胺、咖啡碱、普鲁卡因、胆碱、甜菜碱、苯明青霉素、乙二胺、
20 葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶或聚胺树脂形成的有机盐；衍生自无机酸和有机酸的盐包括但不限于硫酸、磷酸、硝酸、氢溴酸、盐酸、甲酸、乙酸等形成的有机盐。

除了药学可接受的盐外，本发明还考虑其他盐。它们可以在化合物纯化中或在制备其它药学上可接受的盐中充当中间体或可用于本发明化合物的鉴别、表征或纯化。

25 术语“立体异构体”是指由分子中原子在空间上排列方式不同所产生的异构体。本发明使用的立体化学定义和惯例大体上按照 S.P.Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., “Stereochemistry of Organic Compounds”, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994 来定义。本发明化合物可含有不对称中心或手性中心，因此以不同的立体异构形式存在。所预
30 期的是，本发明化合物的所有立体异构体形式，包括但不限于非对映异构体、对映异构体和阻转异构体 (atropisomer) 和几何 (或构象) 异构体及它们的混合物，如外消旋混合物，均在本发明的范围之内。

许多有机化合物以光学活性形式存在，即它们具有使平面偏振光的平面发生旋转的能力。当描述具有光学活性的化合物时，使用前缀 D 和 L 或 R 和 S 来表示就分子中的手性中心(或多个手性中心)而言分子的绝对构型。前缀 D 和 L 或(+)和(-)是用于指定化合物所致平面偏振光旋转的符号，其中(-)或 L 表示化合物是左旋的。前缀为(+)或 D 的化合物是右旋的。就给定的化学结构而言，除了这些立体异构体互为镜像外，这些立体异构体是相同的。具体的立体异构体也可称为对映异构体，并且所述异构体的混合物通常称作对映异构体的混合物。对映异构体的 50:50 混合物称为外消旋混合物或外消旋体，当在化学反应或方法中没有立体选择性或立体特异性时，可出现所述外消旋混合物或外消旋体。

依据原料和方法的选择，本发明化合物可以以可能的异构体中的一个或它们的混合物的形式存在，例如作为纯旋光异构体，或作为异构体混合物，如作为外消旋和非对映异构体混合物，这取决于不对称碳原子的数量。旋光性的(R)-或(S)-异构体可使用手性合成子或手性试剂制备，或使用常规技术拆分。如果此化合物含有一个双键，取代基可能为 E 或 Z 构型；如果此化合物中含有二取代的环烷基，环烷基的取代基可能为顺式或反式 (cis-或 trans-) 构型。

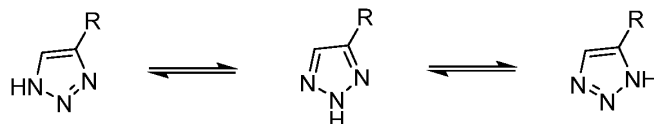
当将本发明式中与手性碳的键描写直成线时，应当理解为，手性碳的(R)和(S)两种构型和由此产生的其对映体纯的化合物和混合物两者包括在该通式范围内。本文中消旋体或者对映体纯的化合物的图示法来自 Maehr, J.Chem.Ed.1985, 62:114-120。除非另有说明，用楔形键和虚线键表示一个立体中心的绝对构型。

含有不对称取代的碳原子的本发明化合物能够以旋光活性形式或外消旋形式分离。化合物的外消旋混合物的拆分可以通过本领域已知的许多方法中的任一种来进行。示例性方法包括使用手性拆分酸的分级重结晶，该手性拆分酸是旋光活性的成盐有机酸。用于分级重结晶方法的适合的拆分剂例如是旋光活性酸，例如酒石酸、二乙酰基酒石酸、二苯甲酰基酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸或各种旋光活性樟脑磺酸如 β -樟脑磺酸的 D 和 L 形式。适合于分级结晶方法的其它的拆分剂包括立体异构纯形式的 α -甲基-苄胺(例如，S 和 R 形式或者非对映异构纯形式)、2-苯基甘氨酸、降麻黄碱、麻黄碱、N-甲基麻黄碱、环己基乙胺、1, 2-二氨基环己烷等。外消旋混合物的拆分还可以通过在填充有旋光活性拆分剂(例如，二硝基苯甲酰基苯基甘氨酸)的柱子上洗脱来进行。可以采用高效液相色谱 (HPLC) 法也可以采用超临界流体色谱法 (SFC) 进行。具体方法的选择以及洗脱条件、色谱柱的选择可以由本领域技术人员根据化合物的结构以及试验结果选择。进一步的，还可以使用已知构型的光学纯的起始原料或试剂，通过立体有机合成，获得本发明所描述化合物的任何对映体或非对映体。

烯烃、C=N 双键等的许多几何异构体也可以存在于本文所述的化合物中，且所有这种稳定的异构体在本发明中均被考虑。当本文所描述化合物含有烯双键时，除非另外说明，否则，这种双键包括 E 和 Z 几何异构体。

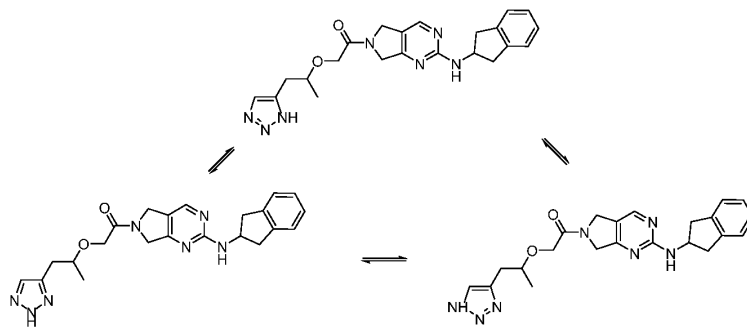
术语“互变异构体”是指因分子中某一原子在两个位置迅速移动而产生的官能团异构体。

- 5 本发明化合物可表现出互变异构现象。互变异构的化合物可以存在两种或多种可相互转化的种类。质子移变互变异构体来自两个原子之间共价键合的氢原子的迁移。互变异构体一般以平衡形式存在，尝试分离单一互变异构体时通常产生一种混合物，其理化性质与化合物的混合物是一致的。平衡的位置取决于分子内的化学特性。例如，在很多脂族醛和酮如乙醛中，酮型占优势；而在酚中，烯醇型占优势。本发明包含化合物的所有互变异构形式。
- 10 本发明的实例中，质子可以占据杂环体系的两个或多个位置的环状形式，例如，1H-和 3H-咪唑，1H-、2H-和 4H-1, 2, 4-三唑，1H-和 2H-异吡唑，以及 1H-和 2H-吡唑。互变异构形式可以通过适当的取代而处于平衡或空间上固定于一种形式。例如：



- 由于共振的原因，三氮唑上氮的氢可以在三个氮的任何一个上，所以命名会有所区别，
15 但这三种形式表示的其实是一种化合物。

以下式所示化合物为例，可能存在以下几种形式的互变异构体，均在本发明化合物的范围内：



- 术语“药物组合物”表示一种或多种文本所述化合物或其生理学/药学上可接受的盐或前
20 体药物与其它化学组分的混合物，其它组分例如生理学/药学上可接受的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进化合物对生物体的给药。

术语“溶剂化物”指本发明化合物或其盐包括以分子间非共价力结合的化学计量或非化学计量的溶剂，当溶剂为水时，则为水合物。

- 术语“前药”是指可以在生理条件下或者通过溶剂解转化为具有生物活性的本发明化
25 合物。本发明的前药通过修饰在该化合物中的功能基团来制备，该修饰可以按常规的操作或

者在体内被除去，而得到母体化合物。前药包括本发明化合物中的一个羟基或者氨基连接到任何基团上所形成的化合物，当本发明化合物的前药被施予哺乳动物个体时，前药被割裂而分别形成游离的羟基、游离的氨基。

本发明的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素标记化合物，比如氚(^3H)，碘-125(^{125}I)或 C-14(^{14}C)。本发明的化合物的所有同位素组成的变换，无论放射性与否，都包括在本发明的范围之内。

术语“辅料”是指可药用惰性成分。术语“赋形剂”的种类实例非限制性地包括粘合剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、稳定剂、填充剂和稀释剂等。赋形剂能增强药物制剂的操作特性，即通过增加流动性和/或粘着性使制剂更适于直接压缩。适用于上述制剂的典型的“药学上可接受的载体”的实例为：糖类，例如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨醇；淀粉类，例如玉米淀粉、木薯淀粉和土豆淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠，乙基纤维素和甲基纤维素；磷酸钙类，例如磷酸二钙和磷酸三钙；硫酸钠；硫酸钙；聚乙烯吡咯烷酮；聚乙烯醇；硬脂酸；硬脂酸碱土金属盐，例如硬脂酸镁和硬脂酸钙；硬脂酸；植物油类，例如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油和玉米油；非离子、阳离子和负离子表面活性剂；乙二醇聚合物；脂肪醇类；和谷物水解固形物以及其它无毒的可相容的填充剂、粘合剂、崩解剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧剂、润滑剂、着色剂等。在药物制剂中常用到的辅料。

根据本发明的实施例，本发明所述化合物和/或其组合物能够有效抑制 ATX 酶活性，具有更为优良的肝代谢稳定性和心脏安全优势，具有更好的药代动力学性质，在体内暴露量更高， $T_{1/2}$ 更长，给药量和给药频次低、顺应性更好。在制备治疗与 ATX 相关疾病的药物方面具有广阔的应用前景。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

图 1 是根据本发明实施例的给药后，动物体重变化结果图；以及
图 2 是根据本发明实施例的给药后肺组织和肺泡灌洗液中 TGF- β 1 的含量变化图。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

如无特别说明，本发明的化合物均是通过核磁共振（NMR）和/或质谱（MS）来确定其结构的。NMR 位移的单位为 10^{-6} (ppm)。NMR 测定的溶剂为氘代二甲基亚砜、氘代氯仿、氘代甲醇等，内标为四甲基硅烷（TMS）。

本发明的缩写定义如下：

5 aq: 水溶液

dioxane: 1,4-二氧六环

DMF: N, N-二甲基甲酰胺

T3P: 丙基磷酸三环酸酐，即 2,4,6-三丙基-1,3,5,2,4,6-三氧杂三磷-2,4,6-三氧化物

N: 当量浓度，例如 1N 盐酸表示 1 mol/L 盐酸溶液

10 NMM: N-甲基吗啡啉

DIPEA: 二异丙基乙胺，即 N, N-二异丙基乙胺

HPLC: 高效液相色谱

SFC: 超临界流体色谱

DMSO: 二甲基亚砜

15 NADPH: 还原型辅酶 II

HEPES: (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)

EGTA: 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸

IC₅₀: 半数抑制浓度，指达到最大抑制效果一半时的浓度。

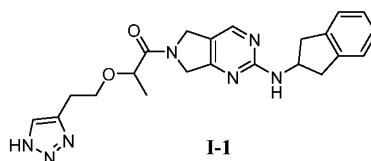
除非作出相反的指示，本文例举的化合物使用 ChemBioDraw Ultra 13.0 命名和编号。

20 实施例 1: 目标化合物 I-1 的制备

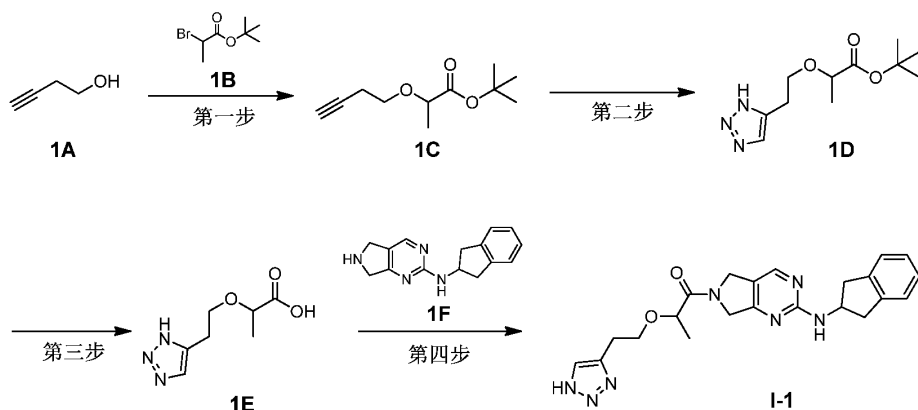
2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮（目标化合物 I-1）

2-(2-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)propan-1-one（目标化合物 I-1）

25

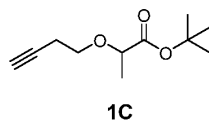


目标化合物 I-1 的合成路线如下所示：



第一步：2-(丁-3-炔-1-基氧基)丙酸叔丁酯 (**1C**) 的合成

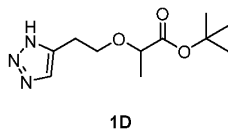
tert-butyl 2-(but-3-yn-1-yloxy)propanoate (**1C**)



- 5 在 0℃ 下，将 3-丁炔-1-醇 (15 g, 214 mmol) 加入二氯甲烷 (300 mL) 中，然后依次加入四丁基硫酸氢铵 (7.27 g, 21.40 mmol)，氢氧化钠 (300 mL, 3.57 mmol, 40% aq)，2-溴丙酸叔丁酯 (49.2 g, 235 mmol)，然后缓慢升到室温，在室温搅拌 2 小时，将反应混合物用水 (300 mL) 稀释，然后用二氯甲烷 (200 mL×3) 萃取，合并有机层，得到粗品。用硅胶柱分离纯化(石油醚)得无色油状化合物 2-(丁-3-炔-1-基氧基)丙酸叔丁酯 (**1C**) (35 g, 10 产率 82%)。

第二步：2-(2-(1H-1,2,3-三唑-5-基)乙氧基)丙酸叔丁酯 (**1D**) 的合成

tert-butyl 2-(2-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)ethoxy)propanoate (**1D**)

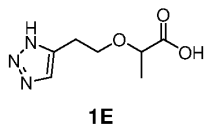


- 15 在氮气保护下，将 2-(丁-3-炔-1-基氧基)丙酸叔丁酯 (50 g, 252 mmol) 和碘化亚铜 (I) (2.4 g, 12.6 mmol) 加入到 N,N-二甲基甲酰胺 (300 mL) / 甲醇 (30 mL) 中的混合溶液中，在 0℃ 下加入叠氮基三甲基硅烷 (43.6 g, 378 mmol)，然后将混合物在 90℃ 下搅拌 18 小时。冷却至室温，减压浓缩，残留物用硅胶柱分离纯化(石油醚：乙酸乙酯 (V/V) = 10:1-5:1)得标题化合物 2-(2-(1H-1,2,3-三唑-5-基)乙氧基)丙酸叔丁酯 (**1D**) (40 g, 166 mmol, 65.7% 产率)。

- 20 LC-MS, M/Z (ESI): 242.2 (M+1)

第三步：2-(2-(1H-1,2,3-三唑-5-基)乙氧基)丙酸 (**1E**) 的合成

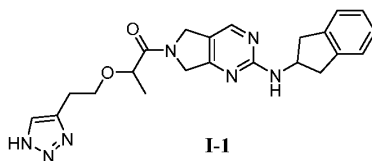
2-(2-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)ethoxy)propanoic acid (**1E**)



在 0℃ 下，向 2-(2-(1H-1,2,3-三唑-5-基)乙氧基)丙酸叔丁酯 (50 g, 207 mmol) 的二氯甲烷 (150 mL) 溶液中加入三氟乙酸 (150 mL)，然后在室温下搅拌 2 小时。浓缩反应混合物，得到粗品 2-(2-(1H-1,2,3-三唑-5-基)乙氧基)丙酸的三氟乙酸盐 (62 g, 207 mmol, 100% 产率)。直接用于下一步反应。

第四步：2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮 (化合物 **I-1**) 的合成

2-(2-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)propan-1-one (化合物 **I-1**)



室温下，将 N-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-2-胺盐酸盐 (参考专利申请 WO2014110000A1 合成) (7 g, 21.5 mmol) 加至 DMF (40 mL) 中，依次加入 2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)丙酸，三氟乙酸盐 (9.66 g, 32.3 mmol) 和 DIEA (27.8 g, 215 mmol)，在 0℃ 加入 2,4,6-三丙基-1,3,5,2,4,6-三氧杂三磷-2,4,6-三氧化物 (10.3 g, 32.3 mmol, 50% DMF 溶液)，然后缓慢升到室温，在室温搅拌 12 小时。TLC 检测反应完全，反应液倒入搅拌的蒸馏水 (150 mL) 中，析出来的固体用乙腈 (50 mL) 打浆，过滤，得固体状化合物 2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮 (8.1 g, 产率 90%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (m, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.19-7.09 (m, 4H), 5.53 (s, 1H), 4.73-4.51 (m, 5H), 4.18-4.15 (m, 1H), 3.73-3.68 (m, 2H), 3.53-3.29 (m, 2H), 3.03-2.77 (m, 4H), 1.19-1.15 (m, 3H)。

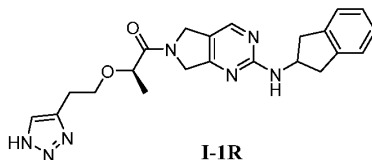
LC-MS, M/Z (ESI): 420.3 (M+1)。

实施例 2：目标化合物 I-1R 的制备

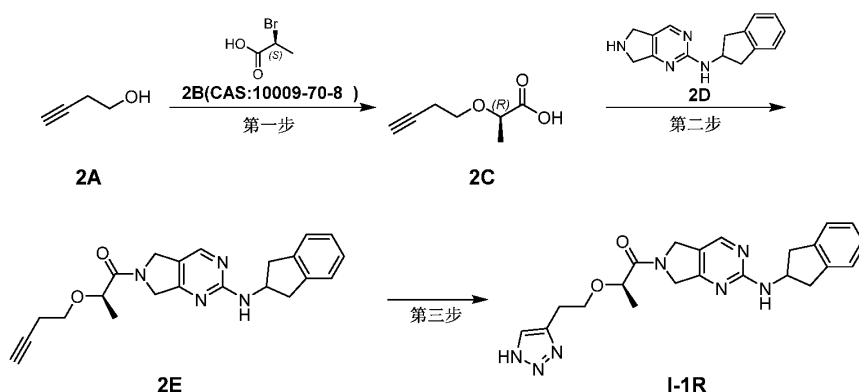
(R)-2-(2-(1H-1,2,3-三氮唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-

吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙烷-1-酮 (目标化合物 **I-1R**)

(R)-2-(2-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)propan-1-one (目标化合物 **I-1R**)

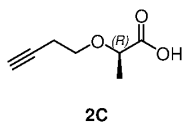


5 目标化合物 **I-1R** 的合成路线如下所示:



第一步: (R)-2-(丁基-3-炔-1-氧基)丙酸 (**2C**) 的合成

(R)-2-(but-3-yn-1-yloxy)propanoic acid (**2C**)



10

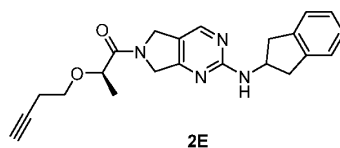
将 3-丁炔-1 醇 (350 mg, 5 mmol) 加入到 DMF (5 mL) 中, 冷却至 0℃, 加入 NaH (400 mg, 10 mmol, 60%), 并搅拌 30 分钟, 0℃ 下加入原料 (S)-2-溴丙酸 (700 mg, 4.5 mmol), 同样温度下搅拌 5 h。0℃ 下将水 (10 mL) 加入到反应液中, 用盐酸 (1N) 调节 pH=1~2, 用乙酸乙酯 (20 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (石油醚: 乙酸乙酯 (V/V)=1:1) 得标题化合物淡黄色液体 (R)-2-(丁基-3-炔-1-氧基)丙酸 (**2C**) (390 mg, 产率 60%)。

15

第二步: (R)-2-(丁基-3-炔-1-氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙烷-1-酮 (**2E**) 的合成

20

(R)-2-(but-3-yn-1-yloxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)propan-1-one (**2E**)



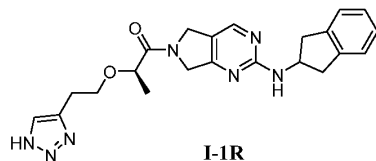
2E

室温下将原料(R)-2-(丁基-3-炔-1-氧基)丙酸 (56 mg, 4 mmol) 加入到 DMF (2 mL)中, 分别加入原料 N-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-2-胺 (100 mg, 4 mmol)、2-(7-氧化苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (180 mg, 4.4 mmol) 和三乙胺 (82 mg, 8 mmol), 将反应液加热至 50℃, 搅拌 15 h。将反应液冷却至室温, 加入水 (6mL), 用乙酸乙酯 (5mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化(二氯甲烷: 甲醇 (V/V) =10:1)得标题化合物黄色固体(R)-2-(丁基-3-炔-1-氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙烷-1-酮 (80 mg, 53.9%)。

10

第三步: (R)-2-(2-(1H-1,2,3-三氮唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙烷-1-酮 (化合物 I-1R) 的合成

(R)-2-(2-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)propan-1-one (化合物 I-1R)



I-1R

15

室温下将原料(R)-2-(丁基-3-炔-1-氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙烷-1-酮 (80 mg, 0.21 mmol) 加入到 DMF (2 mL) 和甲醇 (0.5 mL) 中, 氮气保护下分别加入叠氮基三甲基硅烷 (37 mg, 0.32 mmol)、碘化亚铜 (5 mg, 0.025 mmol), 将反应液加热至 80℃, 搅拌 15h。将反应液冷却至室温, 加入水 (8 mL), 用乙酸乙酯 (5 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化(二氯甲烷: 甲醇 (V/V) =10:1)得标题化合物黄色固体(R)-2-(2-(1H-1,2,3-三氮唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙烷-1-酮 (8 mg, 8.9%)。

20

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.31 (d, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.16 (m, 2H), 4.69-4.61 (m, 4H), 4.55-4.53 (m, 1H), 4.30-4.28 (m, 1H), 3.68-3.64 (m, 2H), 3.33-3.17 (m, 2H), 2.91-2.85 (m, 4H), 1.28-1.19 (m, 3H).

25

LC-MS, M/Z (ESI): 420.2(M+1)

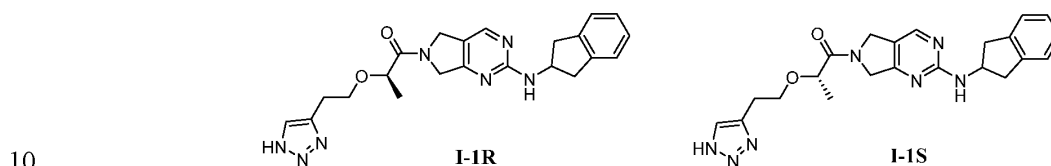
实施例 3: 目标化合物 I-1R 和目标化合物 I-1S 的制备

(R)-2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮 (目标化合物 I-1R)

(R)-2-(2-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)propan-1-one (目标化合物 I-1R)

(S)-2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮 (目标化合物 I-1S)

(S)-2-(2-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)propan-1-one (目标化合物 I-1S)



目标化合物通过 SFC 分离得到:

将消旋体 2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮 (10.1 g, 24.1mmol) 通过 SFC 分离, 分离方法为: 柱型: Chiralpak IC-350 * 4.6mm, 3um, 流动相: 流动相 A 为 CO₂, 流动相 B 为 40%乙醇 (含 0.05%二乙胺); 梯度洗脱: 在 CO₂ 中的 40%乙醇 (含 0.05%二乙胺); 流速: 3mL / min; 波长: 220nm; 柱温: 35℃; 背压: 100Bar。得到单一的异构体(R)-2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮 (目标化合物 I-1R) (3.51 g, 100% ee, 收率 34.7%) 和 (S)-2-(2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)乙氧基)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)丙-1-酮 (目标化合物 I-1S) (3.8 g, 97% ee, 收率 37.6%)。

通过手性 HPLC 对比, 确定 SFC 拆分得到两个化合物的绝对构型。

目标化合物 I-1R:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.7 (bs, 1H), 8.32 (bs, 0.6H), 8.27 (bs, 0.4H), 7.67 (bs, 1H), 7.55 (t, *J* = 12.0Hz, 1H), 7.21-7.13 (m, 4H), 4.72 - 4.59 (m, 3H), 4.55 - 4.49 (m, 1H), 4.45 - 4.44 (m, 1H), 4.33 - 4.27 (m, 1H), 3.70-3.64 (m, 2H), 3.28-3.18 (m, 2H), 2.93 - 2.85 (m, 4H), 1.27 (dd, *J* = 8.0, 4.0Hz, 3H)。

LC-MS, *M/Z* (ESI): 420.3 (*M*+1)。

保留时间: 2.82 min

30 目标化合物 I-1S:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 14.5 (bs, 1H), 8.32 (bs, 0.6H), 8.27 (bs, 0.4H), 7.63 (bs, 1H), 7.55 (t, $J = 12.0\text{Hz}$, 1H), 7.22 - 7.13 (m, 4H), 4.72-4.59 (m, 3H), 4.54 - 4.49 (m, 1H), 4.45-4.44 (m, 1H), 4.33 - 4.27 (m, 1H), 3.68 - 3.64 (m, 2H), 3.32-3.22 (m, 2H), 2.92-2.87 (m, 4H), 1.27 (dd, $J=8.0, 4.0\text{Hz}$, 3H)。

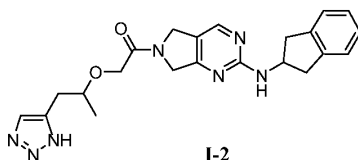
5 LC-MS, M/Z (ESI): 420.3 (M+1)。

保留时间: 4.48 min

实施例 4: 目标化合物 I-2 的制备

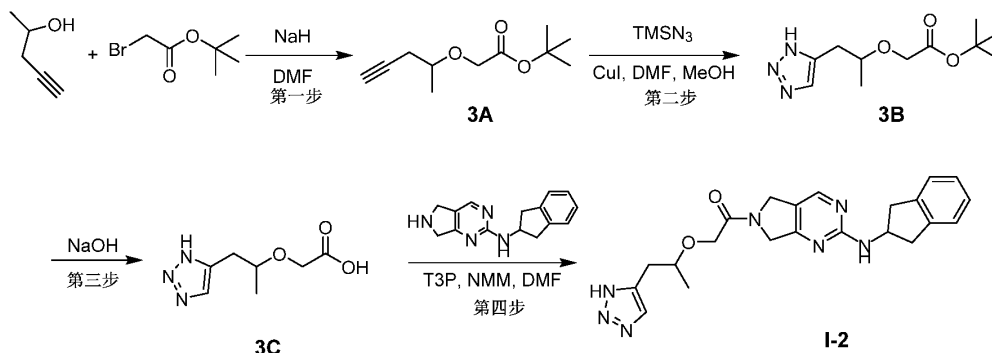
2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基))乙烷-1-酮 (目标化合物 I-2)

2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethan-1-one (目标化合物 I-2)



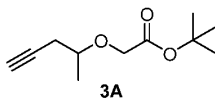
目标化合物 I-2 的合成路线如下所示:

15



第一步: 2-(戊基-4-炔-2-氧基)乙酸叔丁酯 (3A) 的合成

tert-butyl 2-(pent-4-yn-2-yloxy)acetate (3A)

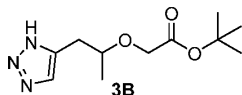


20

将原料 4-戊炔-2-醇 (84.0 g, 1.0 mol) 加入到 1000 mL 干燥的四氢呋喃中, 冷却至 0°C , 加入 60% NaH (80.0 g, 2.0 mol), 并搅拌 30 分钟, 0°C 下加入原料 2-溴乙酸叔丁酯 (234.0 g, 1.2 mol), 自然升至室温, 搅拌 16 h, 0°C 下将水 (2000 mL) 加入到反应液中, 用 1N 盐

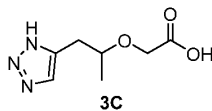
酸调节 pH=1~2, 用乙酸乙酯 (2000 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (石油醚:乙酸乙酯 (V/V)=3:1) 得标题化合物淡黄色液体 2-(戊基-4-炔-2-氧基)乙酸叔丁酯 (**3A**) (180 g, 产率 65%)。

- 5 第二步: 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (**3B**) 的合成
tert-butyl 2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)acetate (**3B**)



- 室温下将原料 2-(戊基-4-炔-2-氧基)乙酸叔丁酯 (40.0 g, 0.2 mol) 加入到 400 mL DMF 和 50 mL 甲醇中, 氮气保护下分别加入叠氮基三甲硅烷 (34.6 g, 0.3 mol)、碘化亚铜 (8 g, 0.4 mol), 将反应液加热至 90℃, 搅拌 15 h。将反应液冷却至室温, 加入水 (1000 mL), 用乙酸乙酯 (1200 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (石油醚:乙酸乙酯 (V/V)=1:1) 得标题化合物黄色液体 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (26.0 g, 53%)。
- 10

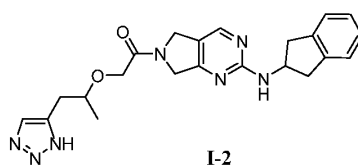
- 15 第三步: 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸 (**3C**) 的合成
2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)acetic acid (**3C**)



- 室温下将原料 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (26.0 g, 0.11 mol) 加入到 300 mL DMF 和 100 mL 水中, 加入 NaOH (8.6 g, 0.22 mol), 室温下搅拌 40 h, 加入水 (300 mL), 将反应液用乙酸乙酯 (150 mL×3) 萃取, 水相浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (二氯甲烷:甲醇 (V/V)=5:1) 得标题化合物黄色液体 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸 (20 g, 85%)。
- 20

- 第四步: 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基))乙烷-1-酮 (目标化合物 **I-2**) 的合成
- 25

2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethan-1-one (目标化合物 **I-2**)



室温下将原料 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸 (20 g, 0.11 mol) 加入到 400 mL DMF 中, 0°C 下加入 N-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-2-胺(参考专利申请 WO2014110000A1 合成) (12 g, 47.6 mmol), T3P(45.4 g, 71.4 mmol, 50% 乙酸乙酯溶液)和 NMM(24 g, 238 mmol), 自然升至室温, 搅拌 16 h, 反应液过滤, 滤液加入水 (300 mL), 用乙酸乙酯 (1500 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (二氯甲烷: 甲醇 (V/V) =10:1) 得标题化合物黄色固体 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基))乙烷-1-酮 (19.3 g, 92%)。

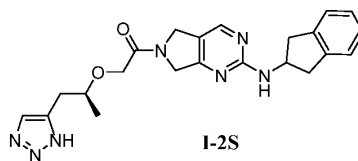
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.30 (d, 1H), 7.64 (b, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.22-7.20 (m, 2H), 7.16-7.12 (m, 2H), 4.65-4.59 (m, 3H), 4.52 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.25-4.17 (m, 2H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.27-3.21 (m, 2H), 2.90-2.85 (m, 4H), 1.19 (t, 3H)

LC-MS, M/Z (ESI): 420.2(M+1)

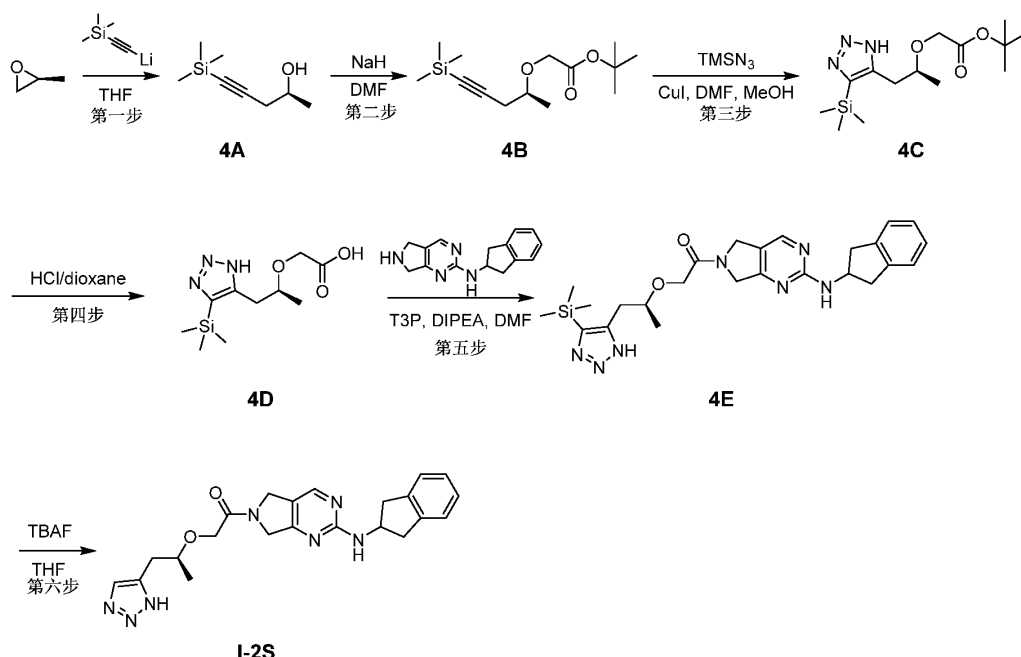
15 实施例 5: 目标化合物 I-2S 的制备

(S)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基))乙烷-1-酮 (目标化合物 I-2S)

(S)-2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethan-1-one (目标化合物 I-2S)

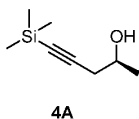


目标化合物 I-2S 的合成路线如下所示:



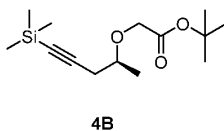
第一步：(S)-5-(三甲基硅基)戊基-4-炔基-2-醇 (**4A**) 的合成

(S)-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-2-ol (**4A**)



- 5 将三甲硅基乙炔锂四氢呋喃溶液 (0.5 M, 52 mL), 加入三口瓶中, 氮气保护下, 冷却至 -70℃, 加入三氟化硼四氢呋喃 (50%, 2.4 mL) 溶液, 然后慢慢滴加(S)-环氧丙烷 (1.5 g), 滴加完毕后, 保持温度搅拌 1 小时, 加入饱和氯化铵水溶液 (10 mL) 淬灭反应。升至室温后, 分液, 有机相干燥。浓缩至干得粗产物 (2.0 g) 直接用于下一步反应。

- 10 第二步：(S)-2-((5-(三甲基硅基)戊基-4-炔基-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (**4B**) 的合成
tert-butyl (S)-2-((5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-2-yl)oxy)acetate (**4B**)

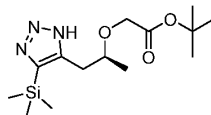


- 将原料(S)-5-(三甲基硅基)戊基-4-炔基-2-醇 (2.0 g, 12.8 mmol) 加入到 10 mL 干燥的四氢呋喃中, 冷却至 0℃, 加入 60%NaH (0.49 g, 12.8 mmol), 并搅拌 30 分钟, 0℃下加入原料 2-溴乙酸叔丁酯 (3.0 g, 15.4 mmol), 自然升至室温, 搅拌 16h。0℃下将水 (20 mL) 加入到反应液中, 用 1N 盐酸调节 pH=1~2, 用乙酸乙酯 (20 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (石油醚:乙酸乙酯 (V/V) =3:1)
- 15

得标题化合物淡黄色液体(S)-2-((5-(三甲硅基)戊基-4-炔-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (**4B**) (2.1 g, 产率 60.7%)。

5 第三步: (S)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (**4C**) 的合成

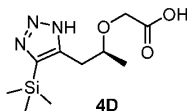
tert-butyl (S)-2-((1-(4-(trimethylsilyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)acetate (**4C**)



4C

室温下将原料(S)-2-((5-(三甲硅基)戊基-4-炔-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (1.0g, 3.7 mmol) 加入到 10 mL DMF 和 5 mL 甲醇中, 氮气保护下分别加入叠氮基三甲基硅烷(0.64g, 5.5 mmol)、
10 碘化亚铜 (0.14 g, 0.74 mmol), 将反应液加热至 90℃, 搅拌 15 h。将反应液冷却至室温, 加入水 (50 mL), 用乙酸乙酯 (20 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (石油醚: 乙酸乙酯 (V/V) =1:1)得标题化合物黄色液体 (S)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (0.6g, 51.8%)。

15 第四步: (S)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸 (**4D**) 的合成 (S)-2-((1-(4-(trimethylsilyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)acetic acid (**4D**)

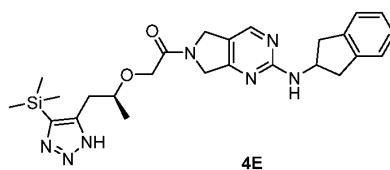


4D

室温下将原料(S)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (0.6 g, 1.9 mmol) 加入到 1,4-二氧六环的氯化氢溶液中 (4M, 10 mL), 室温搅拌 2 小时,
20 浓缩至干得(S)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸粗品直接用于下一步 (0.5 g, 100%)。

第五步: (S)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙烷-1-酮 (**4E**) 的合成

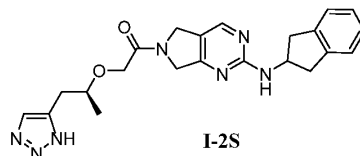
25 (S)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)-2-((1-(4-(trimethylsilyl)-1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)ethan-1-one (**4E**)



室温下将原料(S)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙酸 (0.5 g, 1.9 mmol) 加入到 4 mL DMF 中, 0℃下加入 N-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-2-胺 (0.7 g, 2.1 mmol), T3P (1.5 g, 2.3 mmol, 50% DMF 溶液)和二异丙基乙胺 (0.5 g, 3.8 mmol), 自然升至室温, 搅拌 16h, 反应液过滤, 滤液加入水 (30ml), 用乙酸乙酯 (15 mL×3) 萃取, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品(S)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙烷-1-酮 (0.3 g)。

第六步: (S)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-乙烷-1-酮 (目标化合物 **I-2S**) 的合成

(S)-2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethan-1-one (目标化合物 **I-2S**)



将 (S)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-2-((1-(4-(三甲硅基)-1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)乙烷-1-酮 (0.3 g) 粗品加入四氢呋喃 (10 mL) 中, 再加入四丁基氟化铵三水合物 (0.4 g, 1.2 mmol), 室温搅拌 5 小时, 加入水 (20 mL), 用乙酸乙酯萃取 (20 mL×3), 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 剩余物用制备色谱分离后冻干得(S)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基))乙烷-1-酮 (68.3 mg, 两步收率 8.4%)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.30 (d, 1H), 7.64 (b, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.22-7.20 (m, 2H), 7.16-7.12 (m, 2H), 4.65-4.59 (m, 3H), 4.52 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.25-4.17 (m, 2H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.27-3.21 (m, 2H), 2.90-2.85 (m, 4H), 1.19 (t, 3H)

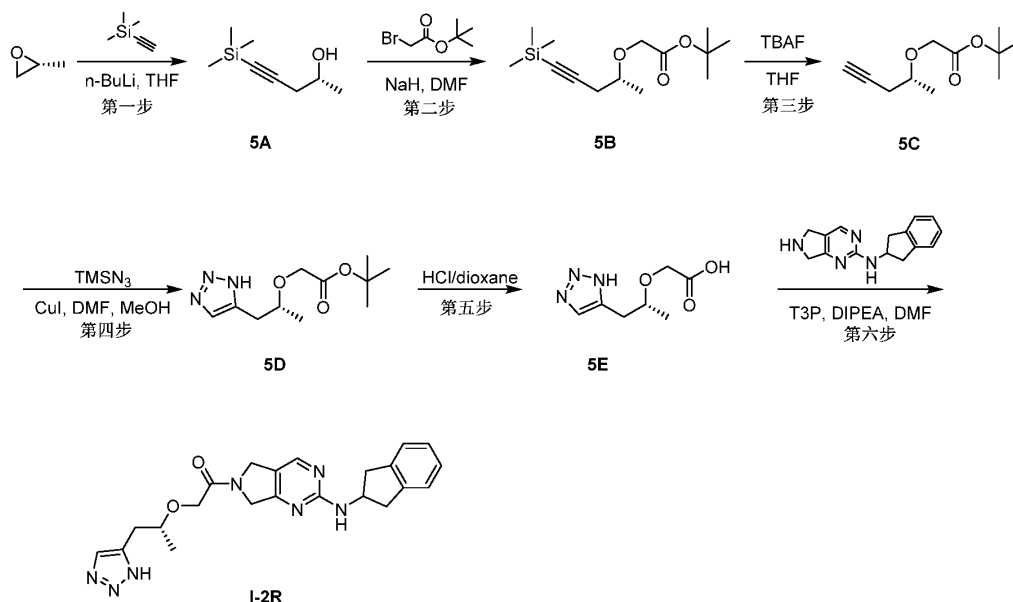
LC-MS, M/Z (ESI): 420.4(M+1)

实施例 6: 目标化合物 **I-2R** 的制备

(R)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基))乙烷-1-酮 (目标化合物 **I-2R**)

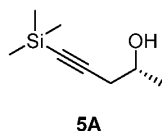
(R)-2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethan-1-one (目标化合物 **I-2R**)

5



第一步: (R)-5-(三甲基硅基)戊基-4-炔基-2-醇 (**5A**) 的合成

(R)-5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-2-ol (**5A**)



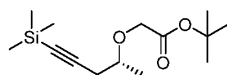
10

将三甲硅基乙炔 (51.7 g), 乙醚 (600 mL) 加入三口瓶中, 氮气保护下, 冷却至 -78°C , 慢慢滴加正丁基锂 (2.5 M, 217 mL), 滴加完毕后, 保温 -78°C 反应 1 小时, 加入三氟化硼四氢呋喃 (50%, 30 mL) 溶液, 缓慢滴加 (R)-环氧丙烷 (30 g), 滴加完毕后, 保持温度搅拌 1 小时, 加入饱和碳酸氢钠水溶液 (300 mL) 淬灭反应。升至室温后, 分液, 有机相干燥, 拌硅胶, 硅胶柱分离纯化 (石油醚:乙酸乙酯(V/V)=10:1) 得淡黄色液体化合物 (R)-5-(三甲基硅基)戊基-4-炔基-2-醇 (**5A**) 得产物 (34 g, 收率 42.1%)。

15

第二步: (R)-2-((5-(三甲基硅基)戊基-4-炔-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (**5B**) 的合成

tert-butyl (R)-2-((5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-2-yl)oxy)acetate (**5B**)

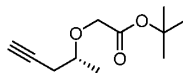


5B

将原料(R)-5-(三甲基硅基)戊基-4-炔基-2-醇 (34 g, 218 mmol) 加入到 340 mL 干燥的四氢呋喃中, 冷却至 0℃, 加入 60%NaH (10.44 g, 261 mmol), 并搅拌 30 分钟, 0℃下加入原料 2-溴乙酸叔丁酯 (46.7 g, 239 mmol), 自然升至室温, 搅拌 16 小时。0℃下将甲醇 (20 mL) 加入到反应液中, 拌硅胶, 浓缩, 硅胶柱分离纯化 (石油醚:乙酸乙酯 (V/V) =10:1) 得淡黄色液体化合物(R)-2-((5-(三甲基硅基)戊基-4-炔-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (5B) (50 g, 产率 85%)。

第三步: (R)-2-(戊-4-炔-2-基氧基)乙酸叔丁酯 (5C) 的合成

tert-butyl(R)-2-(pent-4-yn-2-yloxy)acetate (5C)

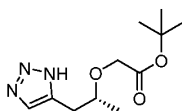


5C

室温下将原料(R)-2-((5-(三甲基硅基)戊基-4-炔-2-基)氧)乙酸叔丁酯 (50 g, 185 mmol) 加入到 500 mL 四氢呋喃中, 再加入四丁基氟化铵 (53.2 g, 203 mmol), 室温反应 15 小时。拌硅胶, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (石油醚:乙酸乙酯 (V/V) =10:1)得标题黄色液体化合物(R)-2-(戊-4-炔-2-基氧基)乙酸叔丁酯 (27 g, 73.7%)。

第四步: (R)-2-((1-(1H-1,2,3-三唑-5-基)丙-2-基)氧基)乙酸叔丁酯 (5D) 的合成

tert-butyl (R)-2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)acetate (5D)

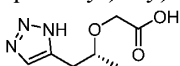


5D

室温下将原料(R)-2-(戊-4-炔-2-基氧基)乙酸叔丁酯(27 g, 136 mmol)加入到 150 mL DMF 和 20 mL 甲醇中, 氮气保护下分别加入叠氮基三甲基硅烷 (23.53 g, 204 mmol)、碘化亚铜 (2.08 g, 10.89 mmol), 将反应液加热至 90℃, 搅拌 15 小时。将反应液冷却至 40℃, 浓缩干, 二氯甲烷稀释拌硅胶, 浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化 (石油醚:乙酸乙酯 (V/V) =1:1) 得黄色油状化合物(R)-2-((1-(1H-1,2,3-三唑-5-基)丙-2-基)氧基)乙酸叔丁酯 (14 g, 42.6%)。

第五步: (R)-2-((1-(1H-1,2,3-三唑-5-基)丙-2-基)氧)乙酸 (5E) 的合成

(R)-2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)acetic acid (5E)

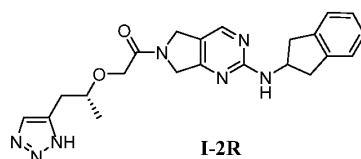


5E

室温下将原料(R)-2-((1-(1H-1,2,3-三唑-5-基)丙-2-基)氧基)乙酸叔丁酯 (14 g, 58 mmol) 加入到 1,4-二氧六环的氯化氢溶液中 (4 mol/L, 70 mL), 室温搅拌 16 小时, 过滤, 固体用甲基叔丁基醚洗涤, 干燥得白色固体(R)-2-((1-(1H-1,2,3-三唑-5-基)丙-2-基)氧基)乙酸 (9.2 g, 86%)。

- 5 第六步: (R)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-乙烷-1-酮 (目标化合物 **I-2R**) 的合成

(R)-2-((1-(1H-1,2,3-triazol-5-yl)propan-2-yl)oxy)-1-(2-((2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)amino)-5,7-dihydro-6H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)ethan-1-one (目标化合物 **I-2R**)

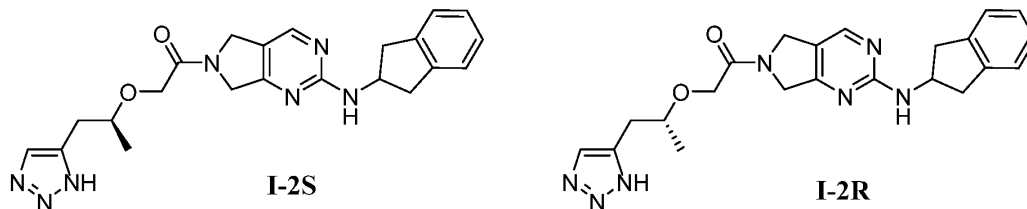


- 10 室温下将原料(R)-2-((1-(1H-1,2,3-三唑-5-基)丙-2-基)氧基)乙酸(9.41 g, 42.5 mmol), N-(2,3-二氢-1H-茚-2-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-2-胺 (9.2 g, 28.3 mmol) 加入到 1000 mL DMF 中, 0℃下加入 T3P (50% DMF 溶液) (27 g, 42.5 mmol)和二异丙基乙胺(21.95 g, 170 mmol), 自然升至室温, 搅拌 16 小时, 反应液过滤, 滤液加入水 (3 mL), 浓缩干, 残留物用硅胶柱分离纯化(二氯甲烷:甲醇 (V/V)=10:1)得 12 g 粗品, 120 mL 乙酸异丙酯打浆 10
- 15 小时, 过滤, 干燥得到(R)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-乙烷-1-酮 (7.8 g, 收率 65.7%)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.30 (d, 1H), 7.64 (b, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.22-7.20 (m, 2H), 7.16-7.12 (m, 2H), 4.65-4.59 (m, 3H), 4.52 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.25-4.17 (m, 2H), 3.87-3.81 (m, 1H), 3.27-3.21 (m, 2H), 2.90-2.85 (m, 4H), 1.19 (t, 3H)

- 20 LC-MS, M/Z (ESI): 420.4(M+1)

实施例 7: 目标化合物 **I-2S** 和目标化合物 **I-2R** 的制备



- 25 目标化合物通过 HPLC 分离得到:
将消旋体 2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-乙烷-1-酮

基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基))乙烷-1-酮(22 g, 52.5 mmol)通过 HPLC 分离, 分离方法为: 柱型: Chiralpak ID (ID00CD-QG003) 4.6mm, I.D. × 15 cm L, 流动相: 100% 甲醇; 流速: 1.0 mL/min; 波长: 254nm; 柱温: 35℃; 背压: 10 MPa。得到单一构型化合物, 记为**峰 1**(7.0 g, 100% ee, 收率 63.6%)和**峰 2**(9.9 g, 97% ee, 收率 90.0%)。

5 通过对比 SFC 分析方法的保留时间, 确定 HPLC 拆分得到两个化合物的绝对构型。

目标化合物 **I-2S**:

SFC 分析方法为: 柱型: Chiralpak AY-3 50×4.6mm I.D., 3μm, 流动相: 乙醇 (含 0.05% 二乙胺); 梯度洗脱: 在 CO₂ 中的 60%乙醇 (含 0.05%二乙胺); 流速: 3.0 mL/min; 波长: 254nm; 柱温: 35℃; 背压: 100Bar;

10 保留时间: 0.964 min。

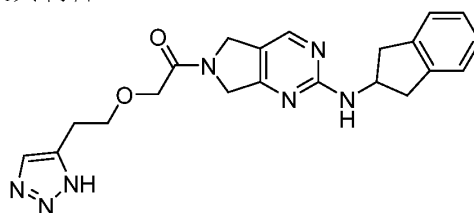
目标化合物 **I-2R**:

SFC 分析方法为: 柱型: Chiralpak AY-3 50×4.6mm I.D., 3μm, 流动相: 乙醇 (含 0.05% 二乙胺); 梯度洗脱: 在 CO₂ 中的 60%乙醇 (含 0.05%二乙胺); 流速: 3.0 mL/min; 波长: 254nm; 柱温: 35℃; 背压: 100Bar;

15 保留时间: 2.118 min。

通过相同的 SFC 分析, 得到峰 1 保留时间为 1.006 min, 峰 2 保留时间为 2.205 min。通过对比保留时间, 确定峰 1 对应的为化合物 **I-2S**, 即(S)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-乙烷-1-酮; 峰
20 2 对应的为化合物 **I-2R**, 即(R)-2-((1-(1H-1,2,3-三氮唑-5-基)丙烷-2-基)氧)-1-(2-((2,3-二氢-1H-茚-2-基)氨基)-5,7-二氢-6H-吡咯并[3,4-d]嘧啶-6-基)-乙烷-1-酮。

实施例 8: 对照化合物及其制备



对照化合物

25 对照化合物参考专利申请 WO2014110000A1 合成。

下文测试例的对照化合物均指实施例 8 所述化合物。

测试例 1: Autotaxin (ATX) 酶活性抑制试验

化合物对 Autotaxin 酶的抑制活性采用 Autotaxin Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman, 700580) 进行检测。首先将待测化合物在 DMSO 溶剂中配制成 10 mM 的储备液, 然后使用 DMSO 梯度稀释 8 个浓度点, 随后以试剂盒提供的 Autotaxin Assay buffer (1×) 将 8 个浓度点稀释成 19×的化合物工作液 (DMSO 的含量为 1.9%)。取出 Autotaxin Assay Reagent (10×) 使用 Autotaxin Assay Buffer (1×) 稀释 10 倍。取出 Autotaxin Substrate, 加入 1.2 mL Autotaxin Assay Buffer(1×)溶解, 混匀后室温静置。在 96 孔板中, 每个浓度点所在的孔中, 每孔加入 150 μL Autotaxin Assay Buffer(1×), 10 μL 稀释好的 19×的化合物工作液, 10 μL Autotaxin Assay Reagent (1×), 20 μL 溶解的 Autotaxin Substrate, 混匀, 37℃恒温震荡摇床, 避光孵育 30 min; 取出 96 孔板, 置于酶标仪上读取 OD405; 实验结果输入 GraphPad Prism 软件, 经拟合计算得到各化合物的 IC₅₀。

表 1 测试化合物对 ATX 酶活性抑制活性结果

测试化合物	IC ₅₀ (nM)
对照化合物	2.60
化合物 I-1	4.24
化合物 I-1R	2.67
化合物 I-1S	28.6
化合物 I-2	1.35
化合物 I-2S	1.40
化合物 I-2R	1.59

实验结果表明, 本发明化合物对 ATX 酶具有很好的抑制活性; 能有效抑制 ATX 酶活性。

测试例 2: 人肝微粒体稳定性试验

人肝微粒体稳定性试验采用化合物与人肝微粒体体外共孵育进行检测。首先将待测化合物在 DMSO 溶剂中配制成 10 mM 的储备液, 随后使用乙腈将化合物稀释至 0.5 mM。使用 PBS 稀释人肝微粒体 (Corning) 成微粒体/缓冲液溶液, 并使用该溶液稀释 0.5 mM 的化合物成为工作溶液, 工作溶液中化合物浓度为 1.5μM, 人肝微粒体浓度为 0.75 mg/ml。取深孔板, 每孔加入 30 μL 工作溶液, 然后加入 15μL 预热好的 6 mM NADPH 溶液启动反应, 37℃孵育。在孵育的 0、5、15、30、45 分钟时, 加入 135 μL 乙腈至相应的孔中终止反应。在最后 45 分钟时间点用乙腈终止反应后, 深孔板涡旋振动 10 分钟 (600 rpm/min), 然后离心 15 分钟。离心后取上清, 1:1 加入纯化水后进行 LC-MS/MS 检测, 获得每个时间点化合物峰面积与内标峰面积比值, 将 5、15、30、45 分钟时化合物的峰面积比值与 0 分钟时的峰面积比值进行比较, 计算每个时间点化合物的剩余百分比, 使用 Excel 计算 T_{1/2}。

表 2：人肝微粒体稳定性试验结果

化合物	孵育 30 分钟后化合物剩余百分比 (%)	T _{1/2} (分钟)
对照化合物	41.2	24.1
化合物 I-1	87.4	
化合物 I-1R	86.0	123
化合物 I-2S	42.9	26.6
化合物 I-2R	63.7	53.6

与对照化合物相比,本发明化合物表现出更为优良的肝代谢稳定性,在人体内代谢更慢,暴露量更高,本发明化合物肝微粒体稳定性的 T_{1/2} 均优于对照化合物,甚至可达到对照化合物的 2 倍,可降低临床给药剂量和给药频次,降低临床给药的毒副作用,提高临床顺应性。

5

测试例 3：全自动电生理膜片钳 QPatch 检测化合物对 hERG 的抑制作用

使用全自动电生理膜片钳 QPatch 检测化合物对 hERG 的抑制作用。本试验所用的细胞为转染有 hERG cDNA 与稳定表达 hERG 通道的 CHO 细胞系（由丹麦 Sophion Bioscience 公司提供），细胞代数 为 P24。细胞培养在含有下列成分的培养基中（皆来源于 Invitrogen 公司）：Ham’s F12 培养基，10% (v/v)灭活的胎牛血清，100 μg/ml 潮霉素 B，100 μg/ml Geneticin。CHO hERG 细胞生长于含上述培养液的培养皿中，并在 37℃、含 5% CO₂ 的培养箱中进行培养。

配制细胞外液（2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、4mM KCl、145mM NaCl、10 mM Glucose、10 mM HEPES，pH 约 7.4，渗透压约 305 mOsm）和细胞内液（5.374 mM CaCl₂、1.75 mM MgCl₂、120 mM KCl、10 mM HEPES、5 mM EGTA、4 mM Na-ATP，pH 约 7.25，渗透压约 295 mOsm）。

将待测化合物在 DMSO 溶剂中配制成 10 mM 的储备液，并使用 DMSO 稀释化合物至 3、1、0.3、0.1 mM，然后使用细胞外液稀释化合物至 30、10、3、1、0.3 和 0.1 μM，除了 30 μM 的化合物 DMSO 的最终浓度为 0.3%外，其它浓度化合物溶液中 DMSO 的最终浓度都为 0.1%。

将 CHO hERG 细胞经消化重悬后，加入全自动 QPatch 系统（Sophion，丹麦）中，按照如下预设的程序进行试验。

在初始阶段达成破膜的全细胞配置状态后，室温环境下（约 25℃），记录全细胞电流，细胞记录至少 120 秒，以达到稳定，选取稳定细胞进行试验。在整个试验过程中，细胞钳制在-80 mV 的电压下，细胞钳制电压去极化到+20 mV 以激活 hERG 钾通道，2.5 秒后再钳

制到-50 mV 以消除失活并产生外向尾电流。尾电流峰值用作为 hERG 电流大小的数值。上述的电压模式每 15 秒被应用到细胞进行电生理试验。加含 0.1%二甲基亚砜（溶剂）的外液到细胞，建立基线，再允许电流稳定 3 分钟。化合物溶液加入后细胞保持在测试环境中，直至该化合物的效果达到了稳定状态或以 4 分钟为限。在化合物不同浓度梯度的测试实验中，化合物由低到高浓度加至所钳制的细胞上。完成化合物测试后用外液清洗细胞直到电流恢复到稳定的状态。

试验数据由 Sophion 提供的 Qpatch 分析软件，Excel 以及 Graphpad Prism 等进行分析。

表 3：化合物对 hERG 的抑制作用结果

化合物	hERG IC ₅₀ (μM)	hERG IC ₅₀ / ATX IC ₅₀
对照化合物	6.69	6.69/2.60=2.6
化合物 I-1	22.3	22.3/4.24=5.26
化合物 I-1R	22.0	22.0/2.67=8.24
化合物 I-2S	8.78	8.87/1.40=6.3
化合物 I-2R	9.48	9.48/1.59=6.0

与对照化合物相比，本发明化合物表现出更弱的 hERG 抑制活性，综合化合物对 ATX 酶活性抑制的 IC₅₀ 值，本发明化合物对 hERG 的抑制表现出更优的安全窗口，具有明显的心脏安全优势。

测试例 4：热力学溶解度试验

配制 pH7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS）、pH5.8 的 FeSSIF 溶液（含牛黄胆酸钠 10 mM，卵磷脂 2 mM，氢氧化钠 81.65 mM，氯化钠 125.5 mM，油酸钠 0.8 mM，单油酸甘油酯 5 mM，马来酸 55.02 mM）、pH1.6 的 FaSSGF 溶液（1L 溶液含牛黄胆酸钠 80 μM，卵磷脂 20 μM，胃蛋白酶 0.1g，氯化钠 34.2 mM）。

精确称取化合物，加入配制好的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液、pH5.8 的 FeSSIF 溶液和 pH1.6 的 FaSSGF 溶液，配制成浓度为 4 mg/mL 的溶液，以 1000 rpm 的转速振摇 1 小时，然后室温孵育过夜。孵育后的溶液以 12000 rpm 转速离心 10 分钟，去除未溶解的颗粒，上清液转移至新的离心管中。将上清液进行适当的稀释后，加入含内标的乙腈溶液，采用相同基质配制的标曲进行定量。

表 4：热力学溶解度试验结果

测试化合物	溶解度 (μg/mL)		
	FaSSGF (pH 1.6)	FeSSIF (pH 5.8)	PBS (pH 7.4)
对照化合物	66.5	18.3	6.3

化合物 I-1R	88.5	20.4	20.4
化合物 I-2S	1240		73.6
化合物 I-2R	1037	260	107

实验结果表明，对照化合物的溶解度比较差，预计胃肠道的吸收会比较差，不利于开发成口服药。与对照化合物相比，本发明化合物在模拟胃液和模拟肠液以及中性条件下的热力学溶解度均显著提高，因而预计在人体内肠道吸收程度会大大提高，口服给药暴露量较高，可降低临床给药剂量，提高临床顺应性。

5

测试例 5：药代动力学试验

大鼠体内药代动力学试验，采用雄性 SD 大鼠 6 只，180-240g，禁食过夜。取 3 只大鼠，口服灌胃给药 10 mg/kg，在给药前和在给药后 15、30 分钟以及 1、2、4、8、24 小时采血。取另外 3 只大鼠，静脉注射给药 1 mg/kg，在给药前和在给药后 5、15、30 分钟以及 1、2、4、8、24 小时采血。血液样品 8000 转/分钟 4℃ 离心 6 分钟，收集血浆，于 -20℃ 保存。取各时间点血浆，加入 3-5 倍量含内标的乙腈溶液混合，涡旋混合 1 分钟，13000 转/分钟 4℃ 离心 10 分钟，取上清液加入 3 倍量水混合，取适量混合液进行 LC-MS/MS 分析。主要药代动力学参数用 WinNonlin 7.0 软件非房室模型分析。

小鼠体内药代动力学试验，使用雄性 ICR 小鼠 18 只，20-25 g，禁食过夜。取 9 只小鼠，口服灌胃给药 10 mg/kg，每个采血时间点 3 只小鼠，共 9 只小鼠交替采血；取另外 9 只小鼠，静脉注射给药 1 mg/kg，每个采血时间点 3 只小鼠，共 9 只小鼠交替采血。其余操作同大鼠药代动力学试验。

表 5：小鼠体内药代动力学试验结果

测试化合物	小鼠体内药代动力学参数							
	静脉注射给药（1 mg/kg）				口服灌胃给药（10 mg/kg）			
	CL (L/h/kg)	Vz (L/kg)	AUC0-t (h*ng/mL)	T _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC0-t (h*ng/mL)	T _{1/2} (h)
对照化合物	3.45	1.67	290	0.34	2042	0.25	2902	0.83
化合物 I-1R	2.09	1.05	495	0.37	6939	0.42	6123	0.67
化合物 I-2R	1.60	0.88	626	0.38	6357	0.25	6368	0.87

表 6：大鼠体内药代动力学试验结果

测试化合物	大鼠体内药代动力学参数							
	静脉注射给药 (1 mg/kg)				口服灌胃给药 (10 mg/kg)			
	CL (L/h/kg)	V _z (L/kg)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)	T _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr)	AUC _{0-t} (h*ng/mL)	T _{1/2} (h)
对照化合物	1.76	1.12	580	0.45	2591	0.42	4874	1.31
化合物 I-1 R	1.28	0.76	828	0.43	3394	0.5	6333	2.51
化合物 I-2 S	1.51	0.74	661	0.34	2416	0.42	3688	1.91
化合物 I-2 R	0.28	0.21	3648	0.50	15844	0.33	20675	2.56

实验结果表明，与对照化合物相比，本发明化合物表现出更为优良的药代动力学性质。特别是大鼠体内，本发明化合物 I-2R 的清除率 (CL) 更低，约为对照化合物的 1/4，说明化合物在体内比较稳定，其口服的 C_{max} 和 AUC_{0-t} 可分别达到对照化合物的 6.1 倍和 4.2 倍。

5

测试例 6：人血浆中 ATX 酶活性抑制试验

采集健康志愿者的全血，使用肝素抗凝，采血管于 3000 rpm 离心 10 分钟，取血浆存储

在-80℃，备用。

化合物按照常规浓度要求使用 DMSO 进行系列稀释，然后取 3 μL 加入 96 孔板，分别取 147 μL PBS 加入含有 3 μL 化合物的孔中，混匀后从中取出 50 μL 加入新的 96 孔板。-80℃冰箱取出人血浆于 37℃水浴锅中快速振荡解冻，取 50 μL 人血浆加入含 50 μL 稀释化合物的 96 孔板中（最终体系为 1% DMSO）。设置不含有化合物的组别为阳性组。将 96 孔板振荡混匀，在 37℃下孵育 3 小时；另设置空白组，空白组血浆保存在-80℃，空白组的作用是测定内源性 LPA 的基线浓度。

孵育结束后，将空白组在冰上解冻，并转移至孵育板中，在孵育板中加入过量的含有内标 LPA17:0 的乙腈沉淀血浆蛋白，涡旋离心后，取上清稀释，采用 LC-MSMS 质谱检测 LPA18:2 和内标 LPA17:0 的峰面积。

计算 LPA18:2 与内标 LPA17:0 的峰面积比，根据如下公式计算 LPA18:2 的生成抑制率：

抑制率（%）=100-（不同浓度化合物组-空白组）/（阳性组-空白组）*100

根据化合物不同浓度的抑制率，计算化合物对人血浆中 ATX 酶活性的抑制 IC₅₀ 值。

表 7： 测试化合物对人血浆中 ATX 酶活性抑制活性结果

测试化合物	IC ₅₀ (nM)
对照化合物	13.0
化合物 I-1R	12.0
化合物 I-2S	2.1
化合物 I-2R	4.73

实验结果表明，本发明化合物对人血浆中 ATX 酶具有很好的抑制活性，能有效抑制 ATX 酶活性，且明显优于对照化合物。

测试例 7：大鼠博来霉素诱导 IPF 模型

采用雄性 BN 大鼠，180-240g，以 5U/kg 的剂量进行博来霉素诱导 IPF 模型（特发性肺纤维化模型）。造模后动物随机分组，溶媒对照组、GLPG-1690 组（Galapagos 公司临床 III 期化合物）、对照化合物组、化合物 I-2S 和化合物 I-2R，造模后第二天开始每天两次口服灌胃给药，给药组一次给药剂量 30 mg/kg，溶媒对照组给予空白溶媒，连续给药 21 天。

给药期间，每三天称量一次体重。在给药第 21 天，第一次给药后 2h 进行肺泡灌洗，进行灌洗液中炎症细胞计数，并检测灌洗液上清中的相关生物标志物；灌洗后取大鼠左肺固定，采用 Masson 三色染色，进行纤维化病理评分，其余肺叶冻存。取化合物 3 组的肺泡灌洗液上清和新鲜冻存的肺组织，使用 ELISA 方法进行 TGF-β1 蛋白含量和总蛋白量的检测，计算每毫克总蛋白中 TGF-β1 的量。

实验结果显示，化合物 I-2S 和化合物 I-2R 的动物体重降低明显少于对照化合物组，本发明化合物的安全性更好(结果如图 1 所示)；化合物 I-2R 的肺泡灌洗液上清和新鲜冻存的肺组织中 TGF- β 1 的含量显著低于溶媒对照组，本发明化合物有显著的抗纤维化形成效果（结果如图 2 所示）。

5

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

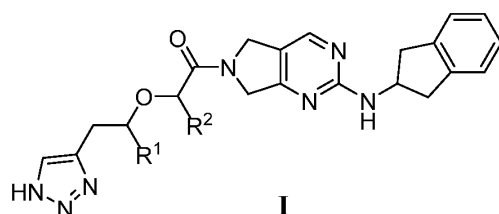
10

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

15

权利要求书

1、一种化合物，其为式 I 所示化合物，或者式 I 所示化合物的互变异构体、立体异构体、水合物、溶剂化物、盐或前药：



5

其中：

R^1 和 R^2 分别独立地选自 -H 或者 -CH₃，

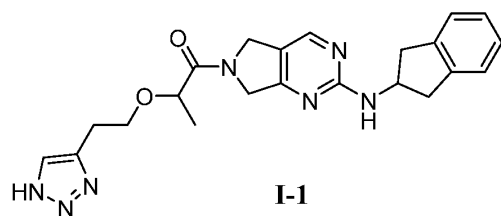
前提是， R^1 和 R^2 不同时为 -H 或者不同时为 -CH₃。

2、根据权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， R^1 为 -H， R^2 为 -CH₃。

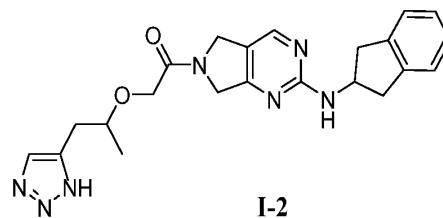
10

3、根据权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， R^1 为 -CH₃， R^2 为 -H。

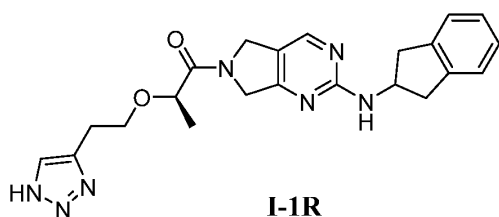
4、根据权利要求 1 所述的化合物，其特征在于，所述化合物为下列化合物之一或者下列化合物之一的互变异构体、立体异构体、水合物、溶剂化物、盐或前药：



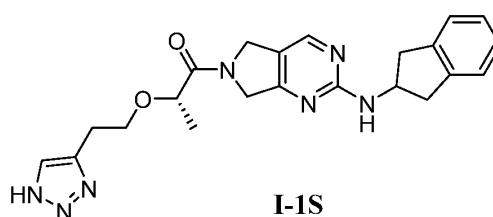
I-1



I-2

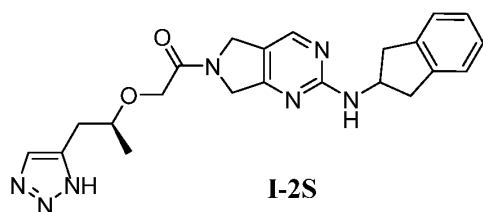


I-1R

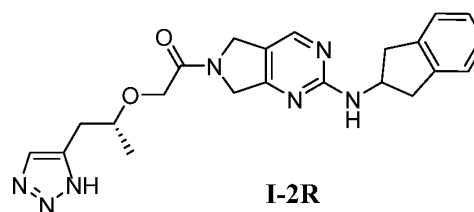


I-1S

15



I-2S



I-2R

5、一种药物组合物，其特征在于，包含：

权利要求 1~4 任一项所述的化合物作为活性成分。

6、权利要求 1~4 任一项所述的化合物或者权利要求 5 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于治疗或者预防 ATX 相关疾病。

5 7、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述 ATX 相关疾病包括选自下列的至少之一：癌症、代谢疾病、肾脏疾病、肝脏疾病、纤维变性疾病、间质性肺病、增殖性疾病、炎症性疾病、疼痛、自身免疫疾病、呼吸系统疾病、心血管疾病、神经变性疾病、皮肤病学障碍和/或异常血管生成相关疾病。

8、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述 ATX 相关疾病包括选自下列的至少之一：间质性肺病、肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化。

9、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述 ATX 相关疾病包括特发性肺纤维化。

10、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述 ATX 相关疾病包括 II 型糖尿病、非酒精性脂肪肝炎。

11、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述 ATX 相关疾病包括神经性疼痛、炎症性疼痛。

12、根据权利要求 6 所述的用途，其特征在于，所述 ATX 相关疾病包括骨关节炎相关的疼痛。

13、一种药物联合，其特征在于，包括：

20 权利要求 1~4 任一项所述的化合物或者权利要求 5 所述的药物组合物；以及
其他治疗或者预防 ATX 相关疾病的药物。

14、一种治疗或者预防 ATX 相关疾病的方法，其特征在于，给患者给予权利要求 1~4 任一项所述的化合物或者权利要求 5 的药物组合物或者权利要求 13 所述的药物联合。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述 ATX 相关疾病包括选自下列的至少之一：癌症、代谢疾病、肾脏疾病、肝脏疾病、纤维变性疾病、间质性肺病、增殖性疾病、炎症性疾病、疼痛、自身免疫疾病、呼吸系统疾病、心血管疾病、神经变性疾病、皮肤病学障碍和/或异常血管生成相关疾病。