

一种P2X3抑制剂化合物及其盐、多晶型和用途

本申请要求享有下述在先申请的优先权权益：2022年3月29日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为202210326113.5，发明名称为“一种P2X3抑制剂化合物及其盐、多晶型和用途”的在先申请；以及2023年3月21日向中国国家知识产权局提交的，专利申请号为202310281376.3，发明名称为“一种P2X3抑制剂化合物及其盐、多晶型和用途”的在先申请。所述在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

技术领域

本发明属于医药领域，涉及一种 P2X3 抑制剂化合物及其盐、多晶型，及它们的制备方法和应用。

背景技术

P2X 受体是一种非选择性的 ATP 门控离子通道受体，即嘌呤能受体，可与胞外的 ATP 结合，这些 ATP 主要来源于受损或发炎的组织。该受体广泛表达在神经、免疫、心血管、骨骼、胃肠、呼吸、内分泌等系统，并参与心律和收缩力调节，血管张力的调节，伤害感受尤其是慢性疼痛的调节，射精时输精管收缩，排尿期间膀胱的收缩，血小板的聚集，巨噬细胞的激活，细胞凋亡以及神经元-神经胶质相互作用等多种生理过程。上述 P2X 受体包括七种同源性受体：P2X1、P2X2、P2X3、P2X4、P2X5、P2X6 和 P2X7，三种异源性受体：P2X2/3、P2X4/6、P2X1/5。

P2X3 是 P2X 受体家族的一个亚型，选择性地表达在神经末梢的背根神经节、脊髓和脑神经元中，即中小直径的初级感觉神经元中。

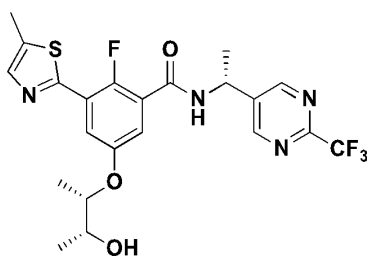
大量研究表明，在初级感觉神经元中表达的 P2X3 和 P2X2/3 的激活对啮齿类动物的急性损伤、痛觉过敏和超敏反应起重要作用。许多研究表明，P2X3 受体表达上调可导致痛觉过敏形成，参与疼痛的信号传递。P2X3 基因敲除小鼠表现出疼痛反应减轻，在疼痛和炎性疼痛模型中，P2X3 受体拮抗剂显示出减轻伤害感受的作用。

P2X3 分布于气道周围的初级传入神经中，能够调节咳嗽。研究表明，气道受损或发炎的组织释放的 ATP 作用于初级神经元的 P2X3 受体，触发去极化和动作电位，这些电位传递引起咳嗽冲动，引发咳嗽。P2X3 受体在咳嗽反射超敏反应中起重要作用，通过拮抗与 P2X3 受体结合，可以抑制咳嗽反射的超敏反应，从而抑制慢性咳嗽患者的过度咳嗽。另外，有研究表明 P2X3 拮抗剂可以治疗慢性阻塞性肺病，肺纤维化，肺动脉高压或者是哮喘，因此 P2X3 拮抗剂也有望成为治疗上述疾病的新药物。

据报道，P2X3 涉及控制膀胱容量反射的传入通路，P2X3 基因敲除小鼠的排尿频率显著降低、膀胱容量显著增加。因此，抑制 P2X3 受体拮抗剂与 P2X3 受体结合具有治疗储尿和排尿障碍的病症，如膀胱过度活动症的作用。因此，P2X3 拮抗剂可能是治疗膀胱过动症等相关疾病的潜在药物。

P2X3 拮抗剂显示出巨大前景，目前临床常用的咳嗽药物加巴喷丁、吗啡和阿米替林或者是采用言语病理学进行治疗，这些疗法可以改善许多患者的咳嗽，但是却不适用于所有患者，而且加巴喷丁等中枢性药物可能会产生不良副作用，不适合长期用药，临床急需开发可长期用药的慢性难治性咳嗽药物给医生提供用药选择，因此开发 P2X3 拮抗剂对于临床具有重要意义。

中国专利申请 CN202111165441.3 公开了式 I 化合物的结构：

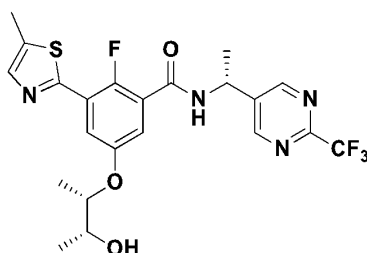


式 I 化合物

该式 I 化合物能够有效拮抗 P2X₃ 受体活性, 在制备治疗与 P2X₃ 相关疾病的药物方面具有广阔的应用前景, 因此, 进一步研究式 I 化合物及其盐型、晶型对于开发有效的治疗药物具有重要意义。

发明内容

为解决现有技术中存在的问题, 一方面, 本发明提供一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐的晶型, 其中, 式 I 化合物的结构如下所示:



式 I。

在一些实施方案中, 本发明提供所述式 I 化合物的游离碱晶型 A, 所述游离碱晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.44° 、 14.87° 、 15.77° 、 17.81° 、 18.61° 处有衍射峰; 进一步地, 所述游离碱晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.44° 、 11.14° 、 11.36° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 处有衍射峰; 更进一步地, 所述游离碱晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 3.75° 、 7.44° 、 11.14° 、 11.36° 、 11.98° 、 12.25° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 、 22.36° 处有衍射峰; 还进一步地, 所述游离碱晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 3.75° 、 5.99° 、 7.44° 、 9.01° 、 9.93° 、 11.14° 、 11.36° 、 11.98° 、 12.25° 、 13.88° 、 14.20° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 、 22.36° 、 24.07° 处有衍射峰; 还更进一步地, 所述游离碱晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 3.75° 、 5.99° 、 7.44° 、 9.01° 、 9.93° 、 11.14° 、 11.36° 、 11.98° 、 12.25° 、 13.88° 、 14.20° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 、 19.39° 、 20.26° 、 21.14° 、 22.36° 、 23.34° 、 24.07° 、 26.33° 、 26.78° 、 27.18° 、 28.17° 、 30.20° 、 33.88° 、 34.35° 、 37.23° 、 37.70° 处有衍射峰; 还更进一步地, 所述游离碱晶型 A 具有基本如图 1-1 所示的 XRPD 谱图。

在一些实施方案中, 所述游离碱晶型 A 具有以下的一个、两个或三个特征:

- (1) 游离碱晶型 A 的 TGA 曲线在 $150.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $1.28 \pm 1\%$;
- (2) 游离碱晶型 A 的 DSC 曲线在 $175.6 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (3) 游离碱晶型 A 的 DSC 曲线在 $176.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

在一些实施方案中, 所述游离碱晶型 A 的 TGA/DSC 图如图 1-2 所示; 所述游离碱晶型 A 的 ^1H NMR 图如图 1-3 所示。

根据本发明的实施方案, 所述游离碱晶型 A 为无水晶型。

在一些实施方案中, 所述游离碱晶型 A 呈团聚的针状晶体。

在一些实施方案中, 本发明提供所述式 I 化合物的游离碱晶型 B, 所述游离碱晶型 B 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 19.09° 、 19.56° 、 22.09° 、 26.49°

处有衍射峰；进一步地，所述游离碱晶型 B 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 16.72° 、 19.09° 、 19.56° 、 20.90° 、 22.09° 、 26.49° 处有衍射峰；进一步地，所述游离碱晶型 B 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 8.35° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 15.05° 、 16.72° 、 17.80° 、 18.39° 、 19.09° 、 19.56° 、 20.90° 、 21.67° 、 22.09° 、 22.97° 、 25.16° 、 26.49° 、 27.49° 处有衍射峰；更进一步地，所述游离碱晶型 B 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 8.35° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 15.05° 、 16.72° 、 17.80° 、 18.39° 、 19.09° 、 19.56° 、 20.90° 、 21.67° 、 22.09° 、 22.97° 、 25.16° 、 25.45° 、 26.49° 、 27.49° 、 28.66° 、 29.10° 、 29.35° 、 31.71° 、 32.00° 、 32.85° 、 33.70° 、 34.23° 、 36.78° 、 38.26° 、 38.70° 处有衍射峰；还更进一步地，所述游离碱晶型 B 具有基本如图 2-1 所示的 XRPD 谱图。

在一些实施方案中，所述游离碱晶型 B 具有以下的一个、两个或三个特征：

- (1) 游离碱晶型 B 的 TGA 曲线在 $150.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $2.36 \pm 1\%$ ；
- (2) 游离碱晶型 B 的 DSC 曲线在 $177.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点；
- (3) 游离碱晶型 B 的 DSC 曲线在 $179.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

在一些实施方案中，所述游离碱晶型 B 的 TGA/DSC 图如图 2-2 所示；所述游离碱晶型 B 的 ^1H NMR 图如图 2-3 所示。

根据本发明的实施方案，所述游离碱晶型 B 为无水晶型。

另一方面，本发明提供所述式 I 化合物的药学上可接受的盐，可以选自式 I 化合物与无机酸或有机酸形成的盐，例如所述无机酸包括：盐酸、硫酸、磷酸、硝酸、氢溴酸；例如，所述有机酸包括：马来酸、L-天冬氨酸、富马酸、L-酒石酸、柠檬酸、D-葡萄糖醛酸、L-苹果酸、马尿酸、D-葡萄糖酸、DL-乳酸、琥珀酸、L-抗坏血酸、己二酸、乙酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、苯磺酸、草酸、2-羟基乙磺酸、丙二酸、龙胆酸、苯甲酸；

根据本发明优选的实施方案，所述式 I 化合物的药学上可接受的盐为式 I 化合物的盐酸盐、马来酸盐、对甲苯磺酸盐、苯磺酸盐或丙二酸盐。

根据本发明的实施方案，本领域技术人员可以理解，当所述式 I 化合物与酸形成盐时，所述式 I 化合物与酸的摩尔比可以为 5:1~1:5，例如 3:1、2:1、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3。优选地，所述式 I 化合物与酸的摩尔比为 1:1 或 2:1。

另一方面，本发明提供所述式 I 化合物的药学上可接受的盐的晶型。

在一些实施方案中，本发明提供所述式 I 化合物的盐酸盐晶型 A，所述盐酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.77° 、 9.01° 、 10.10° 、 15.54° 、 17.51° 、 19.24° 、 24.49° 处有衍射峰；进一步地，所述盐酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.77° 、 9.01° 、 10.10° 、 15.54° 、 17.51° 、 18.01° 、 19.24° 、 20.05° 、 21.28° 、 23.38° 、 23.79° 、 24.49° 、 26.07° 、 28.33° 处有衍射峰；进一步地，所述盐酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.77° 、 9.01° 、 10.10° 、 15.54° 、 17.51° 、 18.01° 、 19.24° 、 20.05° 、 21.28° 、 21.59° 、 22.67° 、 23.38° 、 23.79° 、 24.49° 、 26.07° 、 27.17° 、 28.33° 处有衍射峰；更进一步地，所述盐酸盐晶型 A 具有基本如图 3-1 所示的 XRPD 谱图。

在一些实施方案中，所述盐酸盐晶型 A 中式 I 化合物与盐酸的摩尔比为 2:1。

根据本发明的实施方案，所述盐酸盐晶型 A 具有基本如图 9-4 所示的 VT-XRPD 图谱。

根据本发明的实施方案，所述盐酸盐晶型 A 为无水晶型。

在一些实施方案中，所述盐酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个、三个、四个、五个或六个特征：

- (1) 盐酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $100.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $2.19 \pm 1\%$ ；
- (2) 盐酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $100.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 至 $160.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 温度区间内失重约 $3.90 \pm 1\%$ ；
- (3) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $143.6 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点；
- (4) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $157.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰；
- (5) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $176.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰；

(6) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $179.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰。

在一些实施方案中,所述盐酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图如图 9-2 所示;所述盐酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图如图 3-2 所示。

在一些实施方案中,所述盐酸盐晶型 A 中无溶剂残留。

在一些实施方案中,所述盐酸盐晶型 A 呈无规则颗粒状。

在一些实施方案中,本发明提供所述式 I 化合物的马来酸盐晶型 A,所述马来酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 6.73° 、 10.84° 、 14.68° 、 16.26° 、 18.23° 、 18.44° 处有衍射峰;进一步地,所述马来酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.43° 、 6.73° 、 10.84° 、 14.68° 、 16.26° 、 16.82° 、 18.23° 、 18.44° 处有衍射峰;进一步地,所述马来酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.43° 、 6.73° 、 9.95° 、 10.84° 、 11.75° 、 13.50° 、 14.68° 、 16.26° 、 16.82° 、 18.23° 、 18.44° 、 20.17° 、 22.79° 、 23.22° 、 24.00° 、 26.07° 、 27.72° 、 28.86° 处有衍射峰;更进一步地,所述马来酸盐晶型 A 具有基本如图 4-1 所示的 XRPD 谱图。

在一些实施方案中,所述马来酸盐晶型 A 中式 I 化合物与马来酸的摩尔比为 2:1。

根据本发明的实施方案,所述马来酸盐晶型 A 具有基本如图 10-4 所示的 VT-XRPD 图谱。

根据本发明的实施方案,所述马来酸盐晶型 A 为无水晶型。

在一些实施方案中,所述马来酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个、三个或更多个特征:

- (1) 马来酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $110.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处失重约 $1.65\pm 1\%$;
- (2) 马来酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在在 $110.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 至 $220.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 温度区间内失重约 $11.88\pm 1\%$;
- (3) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $107.8\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (4) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $143.4\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (5) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $144.1\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (6) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $160.2\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰。

在一些实施方案中,所述马来酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图如图 10-2 所示;所述马来酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图如图 4-2 所示。

在一些实施方案中,本发明提供所述式 I 化合物的对甲苯磺酸盐晶型 A,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 、 7.26° 、 8.70° 、 8.87° 、 15.40° 、 17.73° 、 21.01° 、 24.13° 处有衍射峰;进一步地,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 、 7.26° 、 8.70° 、 8.87° 、 15.20° 、 15.40° 、 16.68° 、 17.73° 、 19.71° 、 21.01° 、 24.13° 处有衍射峰;进一步地,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 、 7.26° 、 8.70° 、 8.87° 、 14.45° 、 14.88° 、 15.20° 、 15.40° 、 16.41° 、 16.68° 、 17.45° 、 17.73° 、 19.16° 、 19.71° 、 20.66° 、 21.01° 、 21.76° 、 22.41° 、 24.13° 、 25.76° 、 26.18° 、 27.25° 处有衍射峰;进一步地,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 、 7.26° 、 8.70° 、 8.87° 、 14.45° 、 14.88° 、 15.20° 、 15.40° 、 16.41° 、 16.68° 、 17.45° 、 17.73° 、 19.16° 、 19.71° 、 20.66° 、 21.01° 、 21.76° 、 22.41° 、 24.13° 、 25.76° 、 26.18° 、 27.25° 、 27.95° 、 29.23° 、 30.69° 、 31.00° 、 31.78° 、 38.41° 处有衍射峰;更进一步地,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 具有基本如图 5-1 所示的 XRPD 谱图。

在一些实施方案中,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 中式 I 化合物与对甲苯磺酸的摩尔比为 1:1。

根据本发明的实施方案,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 为无水晶型。

在一些实施方案中,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个或三个特征:

- (1) 对甲苯磺酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $150.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处失重约 $0.73\pm 1\%$;
- (2) 对甲苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $157.1\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (3) 对甲苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $159.2\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰。

在一些实施方案中,所述对甲苯磺酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图如图 11-2 所示;所述对甲苯磺酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图如图 5-2 所示。

在一些实施方案中,本发明提供所述式 I 化合物的苯磺酸盐晶型 A,所述苯磺酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.36° 、 7.28° 、 8.34° 、 9.64° 、 16.20° 、 18.55° 、 21.49° 处有衍射峰;进一步地,所述苯磺酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.36° 、 7.28° 、 8.34° 、 9.64° 、 16.20° 、 18.55° 、 19.28° 、 21.49° 、 21.81° 、 23.21° 、 25.05° 、 25.74° 处有衍射峰;进一步地,所述苯磺酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.36° 、 7.28° 、 8.34° 、 9.64° 、 10.66° 、 14.55° 、 15.00° 、 16.20° 、 16.93° 、 17.85° 、 18.55° 、 19.28° 、 19.74° 、 20.80° 、 21.49° 、 21.81° 、 23.21° 、 23.68° 、 23.98° 、 25.05° 、 25.74° 、 26.65° 、 27.82° 处有衍射峰;更进一步地,所述苯磺酸盐晶型 A 具有基本如图 6-1 所示的 XRPD 谱图。

在一些实施方案中,所述苯磺酸盐晶型 A 中式 I 化合物与苯磺酸的摩尔比为 1:1。

根据本发明的实施方案,所述苯磺酸盐晶型 A 为无水晶型。

在一些实施方案中,所述苯磺酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个或三个特征:

- (1) 苯磺酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $120.0\pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $1.35\pm 1\%$;
- (2) 苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $159.6\pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (3) 苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $160.9\pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

在一些实施方案中,所述苯磺酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图如图 6-2 所示;所述苯磺酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图如图 6-3 所示。

在一些实施方案中,本发明提供所述式 I 化合物的丙二酸盐晶型 A,所述丙二酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 6.75° 、 9.96° 、 10.67° 、 14.48° 、 16.04° 、 16.88° 、 18.04° 、 18.29° 处有衍射峰;进一步地,所述丙二酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.34° 、 6.75° 、 9.96° 、 10.67° 、 11.83° 、 13.49° 、 14.48° 、 16.04° 、 16.88° 、 17.04° 、 18.04° 、 18.29° 、 27.38° 处有衍射峰;进一步地,所述丙二酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.34° 、 6.75° 、 9.96° 、 10.67° 、 11.83° 、 13.49° 、 14.48° 、 16.04° 、 16.88° 、 17.04° 、 18.04° 、 18.29° 、 20.27° 、 22.57° 、 22.95° 、 27.38° 、 28.83° 处有衍射峰;进一步地,所述丙二酸盐晶型 A 以 $20\pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.34° 、 6.75° 、 9.96° 、 10.67° 、 11.83° 、 13.49° 、 14.48° 、 16.04° 、 16.88° 、 17.04° 、 18.04° 、 18.29° 、 18.63° 、 20.27° 、 21.57° 、 22.57° 、 22.95° 、 24.11° 、 24.83° 、 26.02° 、 27.38° 、 28.83° 处有衍射峰;更进一步地,所述丙二酸盐晶型 A 具有基本如图 7-1 所示的 XRPD 谱图。

在一些实施方案中,所述丙二酸盐晶型 A 中式 I 化合物与丙二酸的摩尔比为 2:1。

根据本发明的实施方案,所述丙二酸盐晶型 A 具有基本如图 7-4 所示的 VT-XRPD 图谱。

根据本发明的实施方案,所述丙二酸盐晶型 A 为无水晶型。

在一些实施方案中,所述丙二酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个、三个、四个或五个特征:

- (1) 丙二酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $120.0\pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $2.99\pm 1\%$;
- (2) 丙二酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $120.0\pm 3^\circ\text{C}$ 至 $200.0\pm 3^\circ\text{C}$ 温度区间内失重约 $11.02\pm 1\%$;
- (3) 丙二酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $155.6\pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (4) 丙二酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $156.4\pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (5) 丙二酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $172.4\pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

在一些实施方案中,所述丙二酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图如图 7-2 所示;所述丙二酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图如图 7-3 所示。

另一方面,本发明提供所述式 I 化合物的游离碱晶型 A 的制备方法,其包括如下几种方法:

方法一、将式 I 化合物加入有机溶剂 I 中,溶解后过滤,于室温下挥发;

优选地,所述有机溶剂 I 选自丙酮、四氢呋喃、二氯甲烷、乙腈和乙酸乙酯中的一种或多种;

方法二、将式 I 化合物在有机溶剂 II 中完全溶解,搅拌条件下向澄清溶液中滴加反溶剂,至有固体析出;若无固体析出,则采用悬浮搅拌;若仍无固体析出,则降温悬浮搅拌后,澄清溶液在室温下挥发;

所述有机溶剂 II 可以选自甲醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三氯甲烷、N,N-二甲基乙酰胺和 N-甲基吡咯烷酮中的一种或多种；

所述反溶剂可以选自水、间二甲苯、正己烷、异丙苯、甲苯、环己烷、正庚烷、正戊烷和对异丙基甲苯中的一种或多种，例如选自水、水和间二甲苯的混合物、水和正己烷的混合物、水和异丙苯的混合物、水和甲苯的混合物、环己烷和对异丙基甲苯的混合物。

方法三、将盛有式 I 化合物的第一样品瓶敞口置于盛有溶剂的第二样品瓶中，密封第二样品瓶，室温静置；所述溶剂不没过第一样品瓶的瓶口；

所述溶剂选自乙醇、二氯甲烷、乙腈、丙酮、甲苯、N,N-二甲基乙酰胺和正己烷中的一种或多种；
优选地，静置时间为 1~8 天。

方法四、将盛有式 I 化合物溶液的第一样品瓶敞口置于盛有反溶剂的第二样品瓶中，密封第二样品瓶，室温静置；所述反溶剂不没过第一样品瓶的瓶口；

所述式 I 化合物溶液中的溶剂选自异丙醇、甲基异丁基酮、1,4-二氧六环和二甲基亚砷中的一种或多种，优选为二甲基亚砷；

所述反溶剂选自正戊烷、甲基丁基醚、水和间二甲苯中的一种或多种，优选为正戊烷和甲基丁基醚的混合物、水和间二甲苯的混合物。

方法五、向式 I 化合物溶液中加入聚合物，置于室温下挥发；

所述式 I 化合物溶液中的溶剂选自甲醇、2-丁酮、乙酸甲酯、乙酸异丙酯、乙醇、二氯甲烷和 2-甲基四氢呋喃中的一种或多种；

所述聚合物选自聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯酯、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、聚己酸内酯、聚乙二醇、聚甲基丙烯酸甲酯、海藻酸钠和羟乙基纤维素中的一种或多种；

优选地，所述聚合物选自混合聚合物 A 或混合聚合物 B；所述混合聚合物 A 由聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯酯、羟丙基甲基纤维素和甲基纤维素组成，所述混合聚合物 B 由聚己酸内酯、聚乙二醇、聚甲基丙烯酸甲酯、海藻酸钠和羟乙基纤维素组成；

优选地，所述聚合物与式 I 化合物的质量比为 1: (5-20)。

方法六：将盛有式 I 化合物的第一样品瓶敞口置于盛有饱和盐溶液或水的第二样品瓶中，密封第二样品瓶，室温静置；溶剂不没过第一样品瓶的瓶口；

优选地，所述饱和盐溶液为无机盐饱和溶液，例如可以选自饱和乙酸钾溶液、饱和碳酸钾溶液、饱和溴化钠溶液或饱和溴化钾溶液；

优选地，体系的湿度为 15~100% RH。

方法七、式 I 化合物的悬浮液在温度循环下搅拌、离心，收集固体；

所述悬浮液中的溶剂选自正庚烷、甲基丁基醚、苯甲醚、二环己胺、丙酮、乙醇、乙酸乙酯、甲基环己烷、三氯甲烷、2-丁酮、间二甲苯和水中的一种或多种，例如选自正庚烷、甲基丁基醚、苯甲醚、丁酮和水的混合物、乙醇和水的混合物、乙酸乙酯和甲基环己烷的混合物、三氯甲烷和正庚烷的混合物、或 2-丁酮和间二甲苯的混合物；

优选地，所述温度循环的条件包括：50 ℃~5 ℃, 0.1~0.5 ℃/min，循环至少 2 次。

方法八、将式 I 化合物在正溶剂中完全溶解，搅拌条件下向澄清溶液中滴加反溶剂，至有固体析出；若无固体析出，则采用悬浮搅拌；若仍无固体析出，则降温悬浮搅拌后，澄清溶液在室温下挥发；

所述正溶剂可以选自乙醇、乙酸乙酯、2-甲基四氢呋喃、2-丁酮、乙腈、二氯甲烷和 1,4-二氧六环中的一种或多种；

所述反溶剂选自正庚烷、四氢呋喃和水中的一种或多种。

方法九、式 I 化合物的浑浊液置于室温磁力搅拌，离心，收集固体；

所述浑浊液的溶剂选自异丁醇、甲基叔丁基醚、环己烷、甲苯、乙酸异丙酯、水、甲基环己烷、四氢呋喃、正戊烷、丙酮、异丙醇、环戊基甲醚、甲醇、对异丙基甲苯、二氯甲烷、正庚烷、乙腈、

1,4-二氧六环和 N-甲基吡咯烷酮中的一种或多种；例如，所述浑浊液的溶剂选自异丁醇、甲基叔丁基醚、环己烷、甲苯、乙酸异丙酯和甲苯的混合物、水、甲基环己烷、四氢呋喃和正戊烷的混合物、丙酮和异丙醇的混合物、异丙醇和环戊基甲醚的混合物、二氯甲烷和正庚烷的混合物、乙腈和水的混合物、1,4-二氧六环和水的混合物、或者 N-甲基吡咯烷酮和水的混合物；

优选地，所述磁力搅拌的转速为 700-1200rpm。

方法十、称取式 I 化合物于 HPLC 瓶中，向 HPLC 瓶中加入溶剂，加热搅拌平衡后过滤取上清液；将所述上清液放置在生物培养箱中，以 0.05 ℃/分钟从 50 ℃ 降温至 5 ℃ 后并在 5 ℃ 保持恒温，澄清溶液转移至 -20 ℃ 下恒温，收集析出的固体，转移未析出固体的样品至室温下进行挥发；

所述溶剂选自异丙醇、苯甲醚、乙酸异丙酯、四氢呋喃和水中的一种或多种；

加热至的温度为 45-55 ℃，优选为 50 ℃。

方法十一、将式 I 化合物的悬浮液搅拌，离心，收集固体；

所述悬浮液中的溶剂选自正丁醇（n-BuOH）、甲苯、二异丙基醚（Isopropyl ether）、甲基环己烷、异丙苯、苯甲醚、水、石油醚、二环己胺、2-甲基四氢呋喃、正己烷、2-丁酮、乙酸异丙酯、三氯甲烷、间二甲苯、四氢呋喃、甲基异丁基酮、环戊基甲醚和苄醇中的一种或多种；例如为正丁醇和甲苯的混合物、二异丙基醚、甲基环己烷、异丙苯、苯甲醚、水、PET、二环己胺、2-丁酮和异丙苯的混合物、乙酸异丙酯和甲苯的混合物、三氯甲烷和间二甲苯的混合物、乙酸异丙酯和水的混合物、四氢呋喃和水的混合物、甲基异丁基酮和环戊基甲醚的混合物、或者苄醇和甲苯的混合物；

所述悬浮液在 45-55℃ 下搅拌，优选为 50 ℃；

优选地，所述搅拌为磁力搅拌，例如所述磁力搅拌的转速为 700-1200rpm。

另一方面，本发明提供所述式 I 化合物的游离碱晶型 B 的制备方法，其包括如下步骤：

将式 I 化合物的游离酸晶型 A 溶解于 1,4-二氧六环后在正己烷气氛中气液扩散获得所述式 I 化合物的游离碱晶型 B。

本发明还提供了所述式 I 化合物的药学上可接受的盐的制备方法，其包括如下步骤：将式 I 化合物或式 I 化合物的游离碱晶型 A 与成盐试剂（例如相应的酸）在合适的溶剂中混合得到混合液。

在一些实施方案中，所述制备方法还包括步骤：将所述混合液进行搅拌或打浆，分离固体，真空干燥得到所述式 I 化合物的药学上可接受的盐；优选地，所述搅拌、打浆、真空干燥在室温条件下进行。

在一些实施方案中，所述制备方法还包括步骤：提高所述混合液的过饱和度（例如加入反溶剂）。

在一些实施方案中，所述溶剂选自乙醇、庚烷、乙酸乙酯、MTBE、乙腈、水和丙酮中的一种或几种混合。

又一方面，本发明提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含所述式 I 化合物游离碱晶型（例如游离碱晶型 A、游离碱晶型 B）、式 I 化合物药学上可接受的盐（包括其晶型形式）中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述药物组合物还包含药学上可以接受的赋形剂或载体。

又一方面，本发明提供了所述式 I 化合物游离碱晶型（例如游离碱晶型 A、游离碱晶型 B）、式 I 化合物药学上可接受的盐（包括其晶型形式）或者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 and/或预防 P2X3 相关疾病。

根据本发明的实施方案，利用本发明所述式 I 化合物游离碱晶型（例如游离碱晶型 A、游离碱晶型 B）、式 I 化合物药学上可接受的盐（包括其晶型形式）或者所述的药物组合物，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。

本发明还提供治疗和/或预防与 P2X3 相关疾病的方法，该方法包括向患者施用治疗有效剂量的包含如上所述式 I 化合物的晶型、如上所述式 I 化合物药学上可接受的盐、如上所述盐的晶型、或者如上所述药物组合物；优选地，包括如上所述式 I 化合物游离碱晶型（例如游离碱晶型 A、游离酸晶型

B)、式 I 化合物药学上可接受的盐(包括其晶型形式)或者所述的药物组合物的药物制剂。

在一些优选实施方案中,所述式 I 化合物药学上可接受的盐包括式 I 化合物与选自下列的酸形成的盐:盐酸、硫酸、马来酸、L-天冬氨酸、磷酸、富马酸、L-酒石酸、柠檬酸、D-葡萄糖醛酸、L-苹果酸、马尿酸、D-葡萄糖酸、DL-乳酸、琥珀酸、L-抗坏血酸、己二酸、乙酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、苯磺酸、草酸、2-羟基乙磺酸、丙二酸、龙胆酸、苯甲酸。

优选地,所述式 I 化合物药学上可接受的盐包括所述的盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A、对甲苯磺酸盐晶型 A、苯磺酸盐晶型 A、丙二酸盐晶型 A,或其任意多种盐的组合。

根据本发明的实施方案,所述 P2X3 相关疾病包括:疼痛、生殖泌尿系统疾病或呼吸系统疾病。

优选地,所述疼痛包括:炎性疼痛、手术疼痛、内脏疼痛、牙痛、经前期疼痛、中枢性疼痛、由灼伤所致疼痛、偏头痛或簇性头痛;优选地,所述的生殖泌尿系统疾病包括:尿失禁、膀胱过度活动症、排尿困难、膀胱炎、子宫内膜异位症、子宫内膜异位症相关疼痛;优选地,所述呼吸系统疾病包括:咳嗽、特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病(COPD);优选地,所述咳嗽包括亚急性或慢性咳嗽、治疗抗性咳嗽、特发性慢性咳嗽、病毒感染后咳嗽、医源性咳嗽、与呼吸系统疾病(例如 COPD、哮喘和支气管痉挛)相关的咳嗽。

根据本发明的实施方案,所述 P2X3 相关疾病包括选自下列疾病中的至少之一:慢性咳嗽,尤其是难治性慢性咳嗽(RCC)、不明原因慢性咳嗽(UCC)。

本发明还提供一种式 I 化合物或其药学上可接受的盐的晶型的质量检测方法,包括如下步骤:使用高效液相色谱法检测所述晶型的含量;所述高效液相色谱法采用的流动相包括流动相 A 和流动相 B;所述流动相 A 为甲酸(FA)和乙腈(ACN)的水溶液;所述流动相 B 为乙腈。

优选地,所述流动相 A 为 0.05-0.15%甲酸和 2-7%乙腈的水溶液,示例性为 0.1%甲酸和 5%乙腈的水溶液。

优选地,所述质量检测方法包括:纯度检测方法、溶解度检测方法、稳定性检测方法。

优选地,所述高效液相色谱法采用梯度洗脱。

优选地,所述流动相的流速为 $1 \pm 0.2 \text{ mL/min}$;所述梯度洗脱的时间为 5-60min;更优选为 10-30min。

优选地,所述梯度洗脱中流动相 A 与流动相 B 的体积比=1:9-9:1。

术语定义和解释

本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义,即便如此,本发明仍然希望在此对这些术语和短语作更详尽的说明和解释,提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。

除非另有说明,本说明书和权利要求书记载的数值范围相当于至少记载了其中每一个具体的整数数值。例如,两种以上代表 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种。当某些数值范围被定义或理解为“数”时,应当理解为记载了该范围的两个端点、该范围内的每一个整数以及该范围内的每一个小数。例如,“0~10 的数”应当理解为不仅记载了 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 的每一个整数,还至少记载了其中每一个整数分别与 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 的和。

本说明书和权利要求书记载“约”某个数值时,包括了该数值本身,以及本领域可接受的该数值前后范围内的数值,例如该数值 $\pm 5\%$ 范围内的数值,该数值 $\pm 10\%$ 范围内的数值,该数值 $\pm 5\%$ 范围内的数值等。例如,约 10,代表了包括: 10 ± 1.5 范围内、即 8.5~11.5 范围内的数值; 10 ± 1.0 范围内、即 9.0~11.0 范围内的数值;以及 10 ± 0.5 范围内、即 9.5~10.5 范围内的数值。

本发明的式 I 化合物的盐、多晶型物可以与其它活性成分组合使用,只要它不产生其他不利作用,例如过敏反应。

本发明所用的术语“组合物”意指包括包含指定量的各指定成分的产品,以及直接或间接从指定量的各指定成分的组合产生的任何产品。

术语“患者”是指包括哺乳动物在内的任何动物,优选小鼠、大鼠、其它啮齿类动物、兔、狗、猫、

猪、牛、羊、马或灵长类动物，最优选人。

术语“治疗有效剂量”是指研究人员、兽医、医师或其他临床医师正在组织、系统、动物、个体或人中寻找的引起生物学或医学反应的活性化合物或药物的量，它包括以下一项或多项：（1）预防疾病：例如在易感染疾病、紊乱或病症但尚未经历或出现疾病病理或症状的个体中预防疾病、紊乱或病症；（2）抑制疾病：例如在正经历或出现疾病、紊乱或病症的病理或症状的个体中抑制疾病、紊乱或病症（即阻止病理和/或症状的进一步发展）；（3）缓解疾病：例如在正经历或出现疾病、紊乱或病症的病理或症状的个体中缓解疾病、紊乱或病症（即逆转病理和/或症状）。

术语“药理学上可接受的”是指处方组分或活性成分对一般治疗目标的健康没有过分的有害影响。

术语“药理学上可以接受的赋形剂或载体”意指一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质，它们适合于人使用，而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能与本发明的化合物以及它们之间相互掺和，而不明显降低化合物的药效。药理学上可以接受的赋形剂或载体部分例子有纤维素及其衍生物（如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等）、明胶、滑石、固体润滑剂（如硬脂酸、硬脂酸镁）、硫酸钙、植物油（如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等）、多元醇（如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等）、乳化剂、润湿剂（如十二烷基硫酸钠）、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。所述药物组合物可特别专门配制成为以固体或液体形式供口服给药、供胃肠外注射或供直肠给药。所述的药物组合物可配制成为多种剂型，便于给药，例如，口服制剂（如片剂、胶囊剂、溶液或混悬液），可注射的制剂（如可注射的溶液或混悬液，或者是可注射的干燥粉末，在注射前加入药物溶媒后可立即使用）。

当用于上述治疗和/或预防用途时，本发明式 I 化合物的盐、多晶型物和药物组合物的总日用量须由主治医师在可靠的医学判断范围内作出决定。对于任何具体的患者，具体的治疗有效剂量水平须根据多种因素而定，所述因素包括所治疗的障碍和该障碍的严重程度；所采用的具体化合物的活性；所采用的具体组合物；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；所采用的具体化合物的给药时间、给药途径和排泄率；治疗持续时间；与所采用的具体化合物组合使用或同时使用的药物；及医疗领域公知的类似因素。例如，本领域的做法是，化合物的剂量从低于为得到所需治疗效果而要求的水平开始，逐渐增加剂量，直到得到所需的效果。

术语“API”指游离碱，亦即式 I 化合物。

有益效果

1) 本发明提供了式 I 化合物的晶型，具有良好的药用性质。其中，游离碱晶型 A，具有较低的引湿性、良好的溶解度和理化稳定性，所述游离碱晶型 A 在室温和 50°C 条件下为热力学稳定晶型，有利于药物的储存、质量稳定性以及进一步成药。

2) 本发明通过优化试验筛选得到了式 I 化合物的可药用盐，并进一步得到盐的晶型产品，例如盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A、对甲苯磺酸盐晶型 A、苯磺酸盐晶型 A、丙二酸盐晶型 A，其中，对甲苯磺酸盐晶型 A 几乎无引湿性和良好的理化稳定性，在生物溶媒中溶解度更高，具有更好的成药价值。

附图说明

图 1-1 为式 I 化合物游离碱晶型 A 的 XRPD 图谱；

图 1-2 为式 I 化合物游离碱晶型 A 的 TGA/DSC 图；

图 1-3 为式 I 化合物游离碱晶型 A 的 ¹H NMR 图；

图 1-4 为式 I 化合物游离碱晶型 A 的 PLM 图；

图 2-1 为式 I 化合物游离碱晶型 B 的 XRPD 图谱；

图 2-2 为式 I 化合物游离碱晶型 B 的 TGA/DSC 图；

图 2-3 为式 I 化合物游离碱晶型 B 的 ¹H NMR 图；

图 2-4 为游离碱晶型 A/B 混悬竞争试验样品的 XRPD 叠图；

图 3-1 为式 I 化合物盐酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；

图 3-2 为式 I 化合物盐酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 4-1 为式 I 化合物马来酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；
图 4-2 为式 I 化合物马来酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 5-1 为式 I 化合物对甲苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；
图 5-2 为式 I 化合物对甲苯磺酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 6-1 为式 I 化合物苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；
图 6-2 为式 I 化合物苯磺酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图；
图 6-3 为式 I 化合物苯磺酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 7-1 为式 I 化合物丙二酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；
图 7-2 为式 I 化合物丙二酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图；
图 7-3 为式 I 化合物丙二酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 7-4 为式 I 化合物丙二酸盐晶型 A 的 VT-XRPD 图谱；
图 8-1 为样品 1 和 2 的 XRPD 叠图；
图 8-2 为样品 3、4、5 和 6 的 XRPD 叠图；
图 9-1 为重复制备的式 I 化合物盐酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；
图 9-2 为重复制备的式 I 化合物盐酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图；
图 9-3 为重复制备的式 I 化合物盐酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 9-4 为重复制备的式 I 化合物盐酸盐晶型 A 的 VT-XRPD 图谱；
图 9-5 为重复制备的式 I 化合物盐酸盐晶型 A 的 PLM 图；
图 10-1 为重复制备的式 I 化合物马来酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；
图 10-2 为重复制备的式 I 化合物马来酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图；
图 10-3 为重复制备的式 I 化合物马来酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 10-4 为重复制备的式 I 化合物马来酸盐晶型 A 的 VT-XRPD 图谱；
图 10-5 为重复制备的式 I 化合物马来酸盐晶型 A 的 PLM 图；
图 11-1 为重复制备的式 I 化合物对甲苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 图谱；
图 11-2 为重复制备的式 I 化合物对甲苯磺酸盐晶型 A 的 TGA/DSC 图；
图 11-3 为重复制备的式 I 化合物对甲苯磺酸盐晶型 A 的 ^1H NMR 图；
图 11-4 为重复制备的式 I 化合物对甲苯磺酸盐晶型 A 的 PLM 图；
图 12 为 37 $^{\circ}\text{C}$ 动态溶解度曲线图；
图 13 为游离碱晶型 A 在 H_2O 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 14 为游离碱晶型 A 在 SGF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 15 为游离碱晶型 A 在 FaSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 16 为游离碱晶型 A 在 FeSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 17 为盐酸盐晶型 A 在 H_2O 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 18 为盐酸盐晶型 A 在 SGF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 19 为盐酸盐晶型 A 在 FaSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 20 为盐酸盐晶型 A 在 FeSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 21 为马来酸盐晶型 A 在 H_2O 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 22 为马来酸盐晶型 A 在 SGF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 23 为马来酸盐晶型 A 在 FaSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 24 为马来酸盐晶型 A 在 FeSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 25 为对甲苯磺酸盐晶型 A 在 H_2O 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 26 为对甲苯磺酸盐晶型 A 在 SGF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；

图 27 为对甲苯磺酸盐晶型 A 在 FaSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 28 为对甲苯磺酸盐晶型 A 在 FeSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图；
图 29 为游离碱晶型 A 的 DVS 图；
图 30 为游离碱晶型 A 的 DVS 测试前后的 XRPD 叠图；
图 31 为盐酸盐晶型 A 的 DVS 图；
图 32 为盐酸盐晶型 A 的 DVS 测试前后的 XRPD 叠图；
图 33 为马来酸盐晶型 A 的 DVS 图；
图 34 为马来酸盐晶型 A 的 DVS 测试前后的 XRPD 叠图；
图 35 为对甲苯磺酸盐晶型 A 的 DVS 图；
图 36 为对甲苯磺酸盐晶型 A 的 DVS 测试前后的 XRPD 叠图；
图 37 为游离碱晶型 A 稳定性评估样品的 XRPD 叠图；
图 38 为盐酸盐晶型 A 稳定性评估样品的 XRPD 叠图；
图 39 为马来酸盐晶型 A 稳定性评估样品的 XRPD 叠图；
图 40 为对甲苯磺酸盐晶型 A 稳定性评估样品的 XRPD 叠图；
图 41 为对应化合物给药动物的水/水奎宁摄取倍数的试验结果；
图 42 为豚鼠施予对应化合物后组胺/柠檬酸刺激的咳嗽次数的试验结果；
图 43 为豚鼠施予对应化合物后 ATP/柠檬酸刺激的咳嗽次数的试验结果。

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解，下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明，而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

除非另有说明，以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品，或者可以通过已知方法制备。
本发明所采用的仪器和检测方法如下：

一、X射线粉末衍射(XRPD)

XRPD 图在 PANalytical 生产的 X 射线粉末衍射分析仪上采集，扫描参数如下表 A-1 所示。

表 A-1 XRPD 测试参数

型号	X' Pert3/Empyrean	Empyrean (VT)
X 射线	Cu, K α , K α 1 (Å):1.540598, K α 2 (Å):1.544426 K α 2/K α 1 intensity ratio:0.50	Cu, K α , K α 1 (Å):1.540598, K α 2 (Å):1.544426 K α 2/K α 1 intensity ratio:0.50
X 射线光管设定	45 kV, 40 mA	45 kV, 40 mA
发散狭缝	1/8°	1/8°
扫描模式	Continuous	Continuous
扫描范围 (2Theta)	3-40	3-40
每步扫描时间(s)	46.7	46.7
扫描步长 (2Theta)	0.0263	0.0167
测试时间	~5 min	~10 min

二、热重分析(TGA)和差示扫描量热(DSC)

TGA 和 DSC 图分别在 TA 5500 热重分析仪和 TA 2500 差示扫描量热仪上采集，下表 A-2 列出了

测试参数。

表 A-2 DSC 和 TGA 测试参数

参数	TGA	DSC
方法	线性升温	线性升温
样品盘	铝盘，敞开	铝盘，压盖/不压盖
温度范围	室温-设置终点温度	25 ℃-设置终点温度
吹扫速率 (℃/min)	10	10
保护气体	氮气	氮气

三、动态水分吸附(DVS)

动态水分吸附(DVS)曲线在 SMS (Surface Measurement Systems)的 DVS IntrInsic 上采集。在 25 ℃ 时的相对湿度用 LiCl, Mg(NO₃)₂ 和 KCl 的潮解点校正。DVS 测试参数列于下表 A-3。

表 A-3 DVS 测试参数

参数	设定值
温度	25 ℃
样品量	10-20 mg
保护气体及流量	N ₂ , 200 mL/min
dm/dt	0.002%/min
最小 dm/dt 平衡时间	10 min
最大平衡时间	180 min
RH 范围	0%RH-95%RH
RH 梯度	10%RH (0%RH ~ 90%RH & 90%RH ~ 0%RH) 5%RH (90%RH ~ 95%RH & 95%RH ~ 90%RH)

四、偏光显微镜(PLM)

偏光显微镜照片使用蔡司 Axio Scope.A1 显微镜在室温下拍摄。

五、液态核磁(¹H NMR)

液态核磁谱图在 Bruker 400M 核磁共振仪上采集，DMSO-*d*₆作为溶剂。

六、高效液相色谱 (HPLC)

试验中纯度测试、动态溶解度和稳定性测试是由安捷伦 1260 高效液相色谱仪测试，离子的成盐摩尔比测试是由离子色谱测试，分析条件如下表 A-4 和 A-5。

表 A-4 高效液相色谱测试条件

液相色谱仪	Agilent 1260/1290 检测器			
色谱柱	ACE 3 C18-AR, 4.6 mm/150 mm/3 μm			
流动相	A: 0.1% FA & 5% ACN in H ₂ O			
	B: 乙腈			
洗脱梯度	溶解度		纯度	
	时间 (min)	%B	时间 (min)	%B

液相色谱仪		Agilent 1260/1290 检测器		
	0.0	10	0.0	10
	6.0	90	24.0	90
	7.0	90	27.0	90
	7.1	10	27.1	10
	10.0	10	30.0	10
运行时间	10 min		30 min	
流动相流速	1.0 mL/min			
进样体积	10 μL			
检测波长	UV at 220&254 nm			
柱温	30 ℃			
进样器温度	RT			
稀释剂	乙腈			

表 A-5 离子色谱测试条件

离子色谱仪	ThermoFisher ICS-1100
色谱柱	IonPac AS18 Analytical Column, 250*4 mm
流动相	25 mM NaOH
进样体积	25 µL
流速	1.0 mL/min
温度	35 ℃
柱温	35 ℃
电流	80 mA
运行时间	Cl ⁻ : 7 min

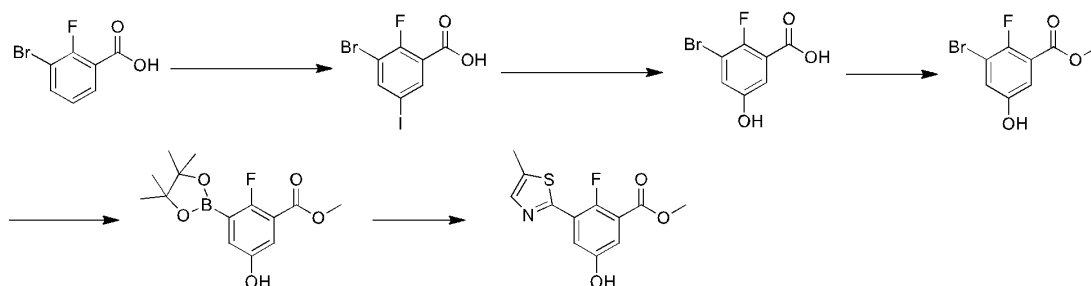
本发明使用的试剂如下表 A-6。

表 A-6 试验中选用溶剂的中英文名称对照表

英文	中文	英文	中文
MeOH	甲醇	1,4-dioxane	1,4-二氧六环
EtOH	乙醇	ACN	乙腈
IPA	异丙醇	DCM	二氯甲烷
Acetone	丙酮	CHCl ₃	三氯甲烷
MIBK	甲基异丁基酮	Toluene	甲苯
EtOAc	乙酸乙酯	n-Heptane	正庚烷
IPAc	乙酸异丙酯	DMSO	二甲基亚砷
MTBE	甲基叔丁基醚	DMAc	N,N-二甲基乙酰胺

THF	四氢呋喃	NMP	N-甲基吡咯烷酮
2-MeTHF	2-甲基四氢呋喃	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
CPME	环戊基甲醚	H ₂ O	水
m-Xylene	间二甲苯	n-Pentane	正戊烷
p-Cymene	对异丙基甲苯	Cyclohexane	环己烷
n-Hexane	正己烷	MEK	2-丁酮
Methyl butyl ether	甲基丁基醚	Cumene	异丙苯
Methylcyclohexane	甲基环己烷	Anisole	苯甲醚
Butyl acetate	乙酸丁酯	Dicyclohexylamine	二环己胺
TFE	三氟乙醇	IBA	异丁醇
Methyl butyl ether	甲基丁基醚	PTE	石油醚
Methyl acetate	乙酸甲酯	Benzyl alcohol	苄醇

实施例 1 中间体 A-1 的合成



第一步：3-溴-2-氟-5-碘苯甲酸的合成

将 3-溴-2-氟苯甲酸(10 g, 45.7 mmol)溶于浓硫酸 (40 mL)中, 0 °C 下分批加入 NIS (10.27 g, 45.7 mmol), 室温下搅拌三小时。用冰水(200 mL)淬灭, 过滤, 滤饼用水(200 mL)洗涤五次后, 真空干燥得到 3-溴-2-氟-5-碘苯甲酸(10.9 g, 白色固体, 产率 69.2 %)。

第二步：3-溴-2-氟-5-羟基苯甲酸的合成

在 3-溴-2-氟-5-碘苯甲酸(10.9 g, 31.6 mmol), 氢氧化钠(6.32 g, 158 mmol)的水(100 mL)溶液中加入氧化亚铜(0.656 g, 4.74 mmol), 100 °C 下反应过夜。冷却至室温后过滤, 滤液用 2M 盐酸溶液调节 pH=1, 用乙酸乙酯(60 mL×3)萃取, 有机相浓缩干得到 3-溴-2-氟-5-羟基苯甲酸, (7.2 g, 黄色固体, 产率 96.8 %)。

第三步：3-溴-2-氟-5-羟基苯甲酸甲酯的合成

将 3-溴-2-氟-5-羟基苯甲酸(7.2 g, 30.6 mmol)的甲醇(120 mL)溶液中加入二氯亚砷(10.9 g, 91.8 mmol), 55 °C 下搅拌 16 小时。随后减压下除去溶剂, 浓缩得到固体化合物 3-溴-2-氟-5-羟基苯甲酸甲酯 (3.1 g, 收率 40.8 %), 其不经进一步纯化即用于下一步骤。

第四步：2-氟-5-羟基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯甲酸甲酯的合成

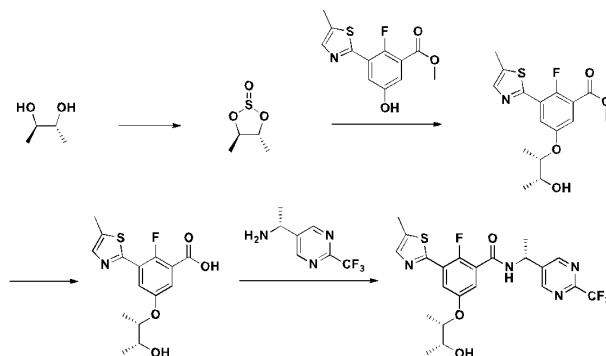
将 3-溴-2-氟-5-羟基苯甲酸甲酯(3.1 g, 12.45 mmol)、联硼酸频哪醇酯 (3.48 g, 13.69 mmol)和乙酸钾 (3.67 g, 37.3 mmol)溶解在 1,4-二氧六环(50 mL)中, 并将溶液用氮气流脱气 2 分钟。加入 Pd(dppf)Cl₂ (0.455 g, 0.622 mmol), 并将所得溶液用氮气流脱气另外 2 分钟, 然后将反应混合物在 100 °C 下搅拌 16 小时。将反应混合物通过过滤并真空浓缩, 残留物用硅胶柱分离纯化得 2-氟-5-羟基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯甲酸甲酯(3.4 g, 白色固体, 收率 92%)。

第五步：2-氟-5-羟基-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸甲酯(中间体 A-1)的合成

室温下，在2-氟-5-羟基-3-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苯甲酸甲酯(3.4 g, 11.48 mmol)，2-溴-5-甲基噻唑(2.453 g, 13.78 mmol)，碳酸钾(3.81 g, 27.6 mmol)的THF (30 mL)和水 (10 mL)的混合溶液中加入Pd(dppf)Cl₂ (1.260 g, 1.722 mmol)，真空换氮气三次后90 °C下反应16 h。加入水(30 mL)稀释，用乙酸乙酯(40 mL×3)萃取，有机相浓缩干，残留物用硅胶柱分离纯化得到2-氟-5-羟基-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸甲酯(中间体A-1，1.41 g，黄色固体，产率 45.9%)。

LC-MS, M/Z: 268.2 [M+H]⁺。

实施例 2 式 I 化合物的制备



第一步：(4R,5R)-4,5-二甲基-1,3,2-二氧杂硫杂环戊烷-2-氧化物的合成

将(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇(2 g, 22.19 mmol)，吡啶(3.86 g, 48.8 mmol)，溶于干燥的四氢呋喃(20 mL)中，调节反应温度至 0-5°C，缓慢加入二氯亚砷(2.9 g, 24.41 mmol)，升至室温搅拌 16 h，加入水(30 mL)淬灭反应，加入 20 mL 乙酸乙酯，分液，有机相用饱和的氯化铵(20 mL)及饱和氯化钠水溶液 (20 mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，减压浓缩得到 (4R,5R)-4,5-二甲基-1,3,2-二氧杂硫杂环戊烷-2-氧化物(2.4 g，无色液体，收率 79%)。

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 4.63 (dq, J=9.0, 6.1 Hz, 1H), 4.07 (dq, J=9.0, 6.1 Hz, 1H), 1.52 (d, J=6.2 Hz, 3H), 1.43 (d, J=6.1 Hz, 3H).

第二步：2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸甲酯的合成

氮气保护下，向 2-氟-5-羟基-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸甲酯(中间体 A-1，500 mg, 1.871 mmol)的 N,N-二甲基甲酰胺(5 mL)溶液中，加入碳酸铯(1.22g, 3.74 mmol)，室温搅拌 30 min。加入(4R,5R)-4,5-二甲基-1,3,2-二氧杂硫杂环戊烷-2-氧化物(382 mg, 2.81 mmol)，升温至 80°C 反应 16 h，冷却至室温。反应液减压浓缩干，加入氯仿(20 mL)以及 4M 的硫酸溶液(20 mL)，混合溶液在 70 °C 下搅拌 5 h，分液，水相用碳酸氢钠调节 pH 至 7-8，二氯甲烷萃取(20 mL×3)，合并有机相，无水硫酸钠干燥，浓缩，残余物用硅胶柱纯化(石油醚:乙酸乙酯(V/V)=2:1)得到 2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸甲酯(380 mg，白色固体，收率 60%)。

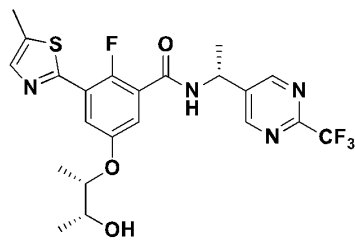
LC-MS, M/Z: 340.1 [M+H]⁺。

第三步：2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸的合成

将 2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸甲酯 (200 mg, 0.589 mmol)溶于甲醇(4 mL)中，再加入一水合氢氧化锂(70.7 mg, 1.765 mmol)和水(0.4 mL)，室温继续搅拌反应 16 h。反应液直接浓缩干，加入水(5 mL)，用 1M 的盐酸水溶液调节 pH 至 2-3，水相用二氯甲烷萃取(5 mL×3)，合并有机相，无水硫酸钠干燥，浓缩得到 2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸 (190 mg，白色固体，收率 99%)。

LC-MS, M/Z: 326.1 [M+H]⁺。

第四步：2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)-N-((R)-1-(2-(三氟甲基)噻唑-5-基)乙基)苯甲酰胺



式 I 化合物

氮气保护下，向反应瓶中依次加入 2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)苯甲酸(190 mg, 0.584 mmol)，(R)-1-(2-(三氟甲基)嘧啶-5-基)乙-1-胺盐酸盐(160 mg, 0.701 mmol)，N,N-二异丙基乙胺(226 mg, 1.752 mmol)和 N,N-二甲基甲酰胺(5 mL)，冷却至 0°C 左右，滴加 1-丙基磷酸酐的 N,N-二甲基甲酰胺溶液(50%，557 mg, 0.876 mmol)，加完恢复至室温反应 16 h，加入饱和碳酸氢钠溶液(5 mL)淬灭，乙酸乙酯萃取(10 mL×3)，合并有机相，有机相用饱和食盐水洗涤(30 mL×2)，无水硫酸钠干燥，浓缩，残余物用硅胶板分离纯化(石油醚:乙酸乙酯(V/V)=1:1)得白色固体 2-氟-5-(((2S,3R)-3-羟基丁-2-基)氧基)-3-(5-甲基噻唑-2-基)-N-((R)-1-(2-(三氟甲基)嘧啶-5-基)乙基)苯甲酰胺(式 I 化合物，110 mg，收率 37.8%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.94 (s, 2H), 7.86 (dd, J=5.9, 3.3 Hz, 1H), 7.63–7.58 (m, 1H), 7.50 (dd, J=5.8, 3.4 Hz, 1H), 7.10 (dd, J=12.3, 6.5 Hz, 1H), 5.38 (ddd, J=7.7, 4.4, 1.5 Hz, 1H), 4.40 (qd, J=6.3, 3.3 Hz, 1H), 4.01 (ddd, J=6.5, 4.8, 3.3 Hz, 1H), 2.56 (d, J=1.2 Hz, 3H), 2.07 (d, J=4.9 Hz, 1H), 1.72 (d, J=7.1 Hz, 3H), 1.26 (d, J=6.3 Hz, 3H), 1.23 (d, J=6.5 Hz, 3H)。

LC-MS, M/Z: 499.1 [M+H]⁺。

实施例 3 式 I 化合物游离碱晶型 A 的制备

称取约 20 mg 的式 I 化合物样品至 HPLC 玻璃小瓶中，加入 0.5 mL 甲苯，得到的悬浮液在室温下磁力搅拌(1000 rpm)约 4 天后，离心(10000 rpm, 2min)收集固体并进行 XRPD 测试，如图 1-1 所示，根据测试结果将固体产物记为游离碱晶型 A。TGA/DSC 结果(图 1-2)显示样品加热至 150 °C 时有 1.28% 的失重，在 175.6 °C (起始温度)有 1 个吸热峰。游离碱晶型 A 的 ¹H NMR 结果如图 1-3 所示。PLM (图 1-4)显示样品呈团聚的针状晶体。

所获得的式 I 化合物的游离碱晶型 A 的 XRPD 解析数据如下表 3-1 所示：

表 3-1 游离碱晶型 A 的 XRPD 衍射峰数据

峰编号	2θ [°]	相对强度[%]
1	3.7545	9.64
2	5.9913	4.63
3	7.4445	100.00
4	9.0114	5.32
5	9.9288	7.15
6	11.1445	15.10
7	11.3633	23.38
8	11.9815	8.28
9	12.2464	9.84
10	13.8765	2.53
11	14.2009	4.26
12	14.8698	70.17
13	15.7733	39.36
14	16.9721	11.87
15	17.8126	81.62
16	18.6098	48.69
17	19.3928	5.09

峰编号	2 θ [°]	相对强度[%]
18	20.2599	2.75
19	21.1401	2.78
20	22.3632	8.68
21	23.3375	1.73
22	24.0748	4.12
23	26.3329	1.47
24	26.7755	2.41
25	27.1851	3.26
26	28.1700	2.41
27	30.2016	0.59
28	33.8787	0.87
29	34.3489	2.54
30	37.2273	1.82
31	37.7008	1.64

实施例 4 式 I 化合物游离碱晶型 B 的制备

将式 I 化合物的游离碱晶型 A 溶于 1,4-dioxane 后在 n-Hexane 气氛中气液扩散，固体于室温下晾干后获得游离碱晶型 B。

游离碱晶型 B 的 XRPD 如图 2-1 所示。TGA/DSC 结果(图 2-2)显示样品加热至 150 ℃ 时有 2.36% 的失重，在 177.0 ℃ (起始温度)有 1 个吸热峰。游离碱晶型 B 的 ¹H NMR 结果如图 2-3 所示。

所获得的式 I 化合物的游离碱晶型 B 的 XRPD 解析数据如下表 4-1 所示：

表 4-1 游离碱晶型 B 的 XRPD 衍射峰数据

峰编号	2 θ [°]	相对强度[%]
1	7.2097	100.00
2	8.3529	3.38
3	12.4780	14.58
4	13.1747	12.05
5	14.4127	12.91
6	15.0523	4.87
7	16.7188	6.47
8	17.8033	2.47
9	18.3882	3.46
10	19.0885	15.72
11	19.5650	30.76
12	20.8990	6.02
13	21.6739	3.31
14	22.0914	10.60
15	22.9694	2.81
16	25.1648	2.13
17	25.4470	3.96
18	26.4880	11.92
19	27.4871	2.77
20	28.6571	0.93
21	29.0977	1.10
22	29.3475	1.31
23	31.7143	1.05

峰编号	2θ [°]	相对强度[%]
24	31.9962	1.21
25	32.8508	2.20
26	33.6989	1.04
27	34.2326	2.22
28	36.7810	0.69
29	38.2619	0.40
30	38.6957	1.33

为确认游离碱无水晶型 A 和 B 在不同温度条件下的热力学转化关系，设置了室温和 50 ℃ 下 n-heptane 和 toluene 中的混悬竞争试验。具体步骤如下：1)首先配制起始样品游离碱晶型 A 在相应温度和溶剂下的饱和溶液；2)称取适量混晶样品加入到过滤后的饱和溶液中形成悬浊液；3)分别在对应温度条件下悬浮搅拌。结果汇总于表 4-2，XRPD 结果汇总于图 2-4，结果表明，在 n-heptane 体系中 50 ℃ 和 toluene 体系中室温/50 ℃ 条件下的混悬竞争后均转为游离碱晶型 A，在 n-heptane 体系中室温条件混悬竞争 42 天后转为游离碱晶型 A。实验表明，游离碱晶型 A 在室温和 50℃条件下为热力学稳定晶型。

表 4-2 混悬竞争试验总结表

起始晶型	溶剂	温度	时间(d)	结果
游离碱晶型 A+B	n-Heptane	RT	42	游离碱晶型 A
		50 ℃	2	游离碱晶型 A
	Toluene	RT	5	游离碱晶型 A
		50 ℃	2	游离碱晶型 A

实施例 5 式 I 化合物盐型的制备与筛选

称取约 20 mg 式 I 化合物和等摩尔量的不同成盐制剂（即与游离碱成盐的酸）至 HPLC 小瓶中，加入 0.5 mL 溶剂混合得到悬浊液，成盐制剂先用相应溶剂稀释后再与起始样品混合。室温悬浮搅拌约 5 天后，离心分离固体并在室温下真空干燥过夜。对于室温澄清体系，加入 0.5~1.0 mL 反溶剂 n-heptane 提高溶液的过饱和度加速析晶。所得固体 XRPD 表征结果显示，在盐型筛选试验中共得到 5 种盐型（表 5-1）。

表 5-1 盐型筛选试验结果总结

序号	酸 [#]	A IPA/H ₂ O (19:1, v/v)	B EtOAc	C MTBE	D Acetone/ n-heptane (1:3, v/v)
0	空白	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
1	盐酸	游离碱晶型 A+ 盐酸盐晶型 A	盐酸盐晶型 A	盐酸盐晶型 A	盐酸盐晶型 A
2	马来酸	游离碱晶型 A	马来酸盐晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
3	L-天冬氨酸	游离碱晶型 A+ L-天冬氨酸	天冬氨酸	游离碱晶型 A+ L-天冬氨酸	游离碱晶型 A+ L-天冬氨酸
4	磷酸	游离碱晶型 A	成胶*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A

序号	酸 [#]	A IPA/H ₂ O (19:1, v/v)	B EtOAc	C MTBE	D Acetone/ n-heptane (1:3, v/v)
5	富马酸	游离碱晶型 A+ 富马酸	富马酸	游离碱晶型 A+ 富马酸	游离碱晶型 A+ 富马酸
6	L-酒石酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
7	柠檬酸	游离碱晶型 A+ 多峰	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
8	D-葡萄糖醛酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
9	L-苹果酸	游离碱晶型 A+ 多峰	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
10	马尿酸	游离碱晶型 A+ 马尿酸	马尿酸	游离碱晶型 A+ 马尿酸	游离碱晶型 A+ 马尿酸
11	D-葡萄糖酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
12	DL-乳酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
13	琥珀酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A+ 琥珀酸*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A+ 琥珀酸
14	L-抗坏血酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A+ L-抗坏血酸	游离碱晶型 A+ L-抗坏血酸	游离碱晶型 A+ L-抗坏血酸
15	己二酸	游离碱晶型 A+ 己二酸	游离碱晶型 A+ 己二酸*	游离碱晶型 A+ 己二酸	游离碱晶型 A+ 己二酸
16	乙酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
17	对甲苯磺酸	游离碱晶型 A+ 对甲苯磺酸盐晶型 A	对甲苯磺酸盐晶型 A	对甲苯磺酸盐晶型 A	对甲苯磺酸盐晶型 A
18	苯磺酸	游离碱晶型 A+ 苯磺酸盐晶型 A	苯磺酸盐晶型 A	苯磺酸盐晶型 A	苯磺酸盐晶型 A
19	草酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
20	2-羟基乙磺酸	游离碱晶型 A	成胶*	成胶	成胶
21	丙二酸	游离碱晶型 A+ 丙二酸盐晶型 A	丙二酸盐晶型 A*	游离碱晶型 A+ 丙二酸盐晶型 A	丙二酸盐晶型 A
22	龙胆酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A
23	苯甲酸	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A*	游离碱晶型 A	游离碱晶型 A

[#]: 酸/碱投料摩尔比为 1:1。

*: 室温搅拌 3 小时后获得澄清溶液, 加入 0.5~1.0 mL n-heptane 后观察到有固体析出。

实施例 6 式 I 化合物的盐酸盐晶型 A 的制备

将式 I 化合物样品和等摩尔量的盐酸在 MTBE 中室温打浆 5 天后, 离心分离固体在室温下真空干燥后, 获得盐酸盐晶型 A。

盐酸盐晶型 A 样品的 XRPD 图如图 3-1 所示。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得, 结果如图 3-2 显示, 在样品中未观察到 MTBE 溶剂残留。HPLC/IC 结果表明, 盐酸与 API (即游离碱) 的摩尔比为 0.5:1。

所获得的式 I 化合物的盐酸盐晶型 A 的 XRPD 解析数据如下表 6-1 所示:

表 6-1 盐酸盐晶型 A 的 XRPD 衍射峰数据

峰编号	2 θ [°]	相对强度[%]
1	7.7663	49.07
2	9.0069	50.47
3	10.0998	31.02
4	15.5379	100.00
5	17.5063	37.22
6	18.0142	19.02
7	19.2387	54.04
8	20.0478	16.17
9	21.2801	17.11
10	21.5911	12.54
11	22.6674	5.31
12	23.3757	15.53
13	23.7874	23.21
14	24.4926	58.16
15	26.0709	16.71
16	27.1737	13.31
17	28.3293	15.22
18	35.2229	3.84

实施例 7 式 I 化合物的马来酸盐晶型 A 的制备

将式 I 化合物样品和等摩尔量的马来酸在 EtOAc 中室温搅拌~3 小时后, 在所得澄清液中加入 0.5 mL n-heptane 后于室温下搅拌 5 天后, 离心分离固体在室温条件下真空干燥后获得式 I 化合物的马来酸盐晶型 A。

马来酸盐晶型 A 样品的 XRPD 图如图 4-1 所示。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得, 结果见图 4-2。结果显示, 马来酸与 API (即游离碱) 的摩尔比为 0.5:1, 未观察到 EtOAc 和 n-heptane 的溶剂残留。

所获得的式 I 化合物的马来酸盐晶型 A 的 XRPD 解析数据如下表 7-1 所示:

表 7-1 马来酸盐晶型 A 的 XRPD 衍射峰数据

峰编号	2 θ [°]	相对强度[%]
1	5.4321	19.42
2	6.7257	41.00
3	9.9534	13.14
4	10.8368	62.03
5	11.7493	15.92
6	13.5038	5.30
7	14.6787	29.08
8	16.2629	32.26
9	16.8228	19.46
10	18.2265	47.35
11	18.4373	100.00
12	20.1675	12.97
13	22.7918	9.47
14	23.2244	8.74
15	24.0043	5.29
16	26.0738	7.60
17	27.7169	14.37
18	28.8575	4.11

实施例 8 式 I 化合物的对甲苯磺酸盐晶型 A 的制备

将式 I 化合物样品和等摩尔量的对甲苯磺酸在 EtOAc 中室温搅拌搅拌 5 天后，离心分离固体在室温下真空干燥后获得式 I 化合物的对甲苯磺酸盐晶型 A。

对甲苯磺酸盐晶型 A 样品的 XRPD 图如图 5-1 所示。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得，结果见图 5-2。结果显示，对甲苯磺酸与 API（即游离碱）的摩尔比为 1.0:1，未观察到 EtOAc 的溶剂残留。

所获得的式 I 化合物的对甲苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 解析数据如下表 8-1 所示：

表 8-1 对甲苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 衍射峰数据

峰编号	2θ [°]	相对强度[%]
1	4.9941	39.49
2	7.2577	75.74
3	8.6957	100.00
4	8.8744	44.39
5	14.4540	8.41
6	14.8759	9.94
7	15.1964	15.95
8	15.4025	46.78
9	16.4086	6.89
10	16.6812	17.13
11	17.4469	9.26
12	17.7319	31.06
13	19.1595	7.57
14	19.7137	14.34
15	20.6559	9.00
16	21.0073	36.67
17	21.7628	10.35
18	22.4064	4.05
19	24.1341	23.76
20	25.7570	8.40
21	26.1807	5.08
22	27.2494	11.37
23	27.9548	2.34
24	29.2297	2.06
25	30.6914	4.29
26	31.0030	4.48
27	31.7790	3.65
28	38.4148	1.51

实施例 9 式 I 化合物的苯磺酸盐晶型 A 的制备

将式 I 化合物样品和等摩尔的苯磺酸在 MTBE 中室温搅拌搅拌 5 天后，离心分离固体在室温下真空干燥后获得式 I 化合物的苯磺酸盐晶型 A。

苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 图如图 6-1 所示。TGA/DSC 结果详见图 6-2。TGA 结果显示样品加热至 120 ℃ 时有 1.35% 的失重；DSC 结果显示样品在有 1 个吸热峰，起始温度 159.6 ℃，峰值温度 160.9 ℃。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得，结果见图 6-3。结果显示，苯磺酸与 API（即游离碱）的摩尔比为 0.9:1，未观察到 MTBE 的溶剂残留。

所获得的式 I 化合物的苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 解析数据如下表 9-1 所示：

表 9-1 苯磺酸盐晶型 A 的 XRPD 衍射峰数据

峰编号	2θ [°]	相对强度[%]
-----	--------	---------

峰编号	2 θ [°]	相对强度[%]
1	5.3558	26.25
2	7.2756	83.67
3	8.3412	100.00
4	9.6394	42.23
5	10.6572	9.46
6	14.5488	4.68
7	14.9996	10.49
8	16.1998	64.25
9	16.9296	9.92
10	17.8527	10.59
11	18.5500	45.94
12	19.2801	16.96
13	19.7376	9.51
14	20.8009	9.33
15	21.4919	43.27
16	21.8091	23.06
17	23.2128	28.08
18	23.6766	9.48
19	23.9838	7.85
20	25.0545	17.37
21	25.7390	16.38
22	26.6532	12.85
23	27.8195	8.88
24	30.3976	2.24
25	37.3507	3.73

实施例 10 式 I 化合物的丙二酸盐晶型 A 的制备

将式 I 化合物和等摩尔量的丙二酸在 EtOAc 中室温搅拌~3 小时后，在所得澄清液中加入 0.5 mL n-heptane 后于室温下搅拌 5 天后，离心分离固体在室温下真空干燥后获得式 I 化合物的丙二酸盐晶型 A。

丙二酸盐晶型 A 的 XRPD 图如图 7-1 所示。TGA/DSC 结果详见图 7-2。TGA 结果显示样品加热至 120 ℃ 时有 2.99% 的失重，从 120 ℃ 加热至 200 ℃ 时样品失重 11.02%；DSC 结果显示样品在 156.4 ℃ (峰值温度)有吸热峰。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得，结果见图 7-3。结果显示，丙二酸与 API（即游离碱）的摩尔比为 0.7:1，未观察到 EtOAc 的溶剂残留。

通过 VT-XRPD(图 7-4)对丙二酸盐晶型 A 进行晶型鉴定，结果表明，将样品在 N₂ 下吹扫 20min，加热至 120℃并降至室温，未观察到晶型变化。

所获得的式 I 化合物的丙二酸盐晶型 A 的 XRPD 解析数据如下表 10-1 所示：

表 10-1 丙二酸盐晶型 A 的 XRPD 衍射峰数据

峰编号	2 θ [°]	相对强度[%]
1	5.3387	14.95
2	6.7490	50.46
3	9.9633	30.98
4	10.6723	45.47
5	11.8272	22.10
6	13.4912	20.74
7	14.4786	34.67
8	16.0367	32.39

峰编号	2θ [°]	相对强度[%]
9	16.8794	32.98
10	17.0411	24.12
11	18.0448	48.14
12	18.2855	100.00
13	18.6272	15.50
14	20.2750	17.74
15	21.5729	3.68
16	22.5685	10.00
17	22.9536	12.73
18	24.1081	5.50
19	24.8272	3.44
20	26.0170	2.91
21	27.3799	23.14
22	28.8258	13.77

实施例 11 式 I 化合物的多晶型的重复制备

(一) 游离碱晶型 B 的重复制备

表 11-1 游离碱晶型 B 重复制备结果汇总

样品	规模	制备方法	结果
1	100 mg	溶清于 TFE 后，在室温下缓慢挥发。	游离碱晶型 A
2			
3	50 mg	溶清于 1,4-二恶烷后，在正己烷气氛中气液渗透。	游离碱晶型 A+B
4			游离碱晶型 A+B
5			游离碱晶型 A+B
6			游离碱晶型 A+B

如表 11-1 所示，将游离碱晶型 A 在 TFE 中没有得到游离碱晶型 B，仍然为游离碱晶型 A（样品 1 和 2 的 XRPD 图谱如图 8-1 所示）；在 1,4-二恶烷中得到了游离碱晶型 A+B 的混晶（样品 3、4、5、6 的 XRPD 图谱如图 8-2 所示）。

(二) 盐型的重复制备

选择了盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A 和对甲苯磺酸盐晶型 A 进行 300 mg 重复制备。结果表明，三种盐型均重复制备成功，盐型样品的重复制备步骤汇总于表 11-2。

表 11-2 盐型重复制备步骤小结

盐型	制备步骤
盐酸盐晶型 A	1. 称取 301.2 mg 式 I 化合物样品于 20-mL 玻璃小瓶中，加入 7 mL MTBE 获得悬浮液。 2. 加入 50 μL 12N HCl (投料摩尔比 1:1)于室温条件下搅拌~4 天，分离固体于室温条件下真空干燥~3 小时，共收得~276 mg 样品。
马来酸盐晶型 A	1. 称取 300.6 mg 式 I 化合物样品和 70.5 mg 马来酸(投料摩尔比 1:1)于 20-mL 玻璃小瓶中。 2. 加入 5 mL EtOAc 于室温条件下搅拌，~10 min 后观察到样品几乎溶清。 3. 后向小瓶中加入 10 mL n-heptane，有大量固体析出，后室温搅拌~4 天，分离固体于室温条件下真空干燥~3 小时，共收得~290 mg 样品。

盐型	制备步骤
对甲苯磺酸盐 晶型 A	1. 称取 299.9 mg 式 I 化合物样品和 103.5 mg 对甲苯磺酸(投料摩尔比 1:1)于 20-mL 玻璃小瓶中, 加入 7 mL EtOAc 获得悬浮液。 2. 室温条件下搅拌~4 天, 分离固体于室温条件下真空干燥~3 小时, 共收得~321 mg 样品。

1. 盐酸盐晶型 A

重复制备的盐酸盐晶型 A 样品的 XRPD 图如图 9-1 所示。TGA/DSC 结果见图 9-2, TGA 结果显示样品加热至 100 ℃ 时有 2.2% 的失重, 从 100 ℃ 加热至 160 ℃, 失重为 3.9%; DSC 结果显示样品在 157.4 ℃ 和 179.0 ℃ (峰值温度)有吸热峰。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得, 结果如图 9-3 所示, 未观察到 MTBE 溶剂残留。HPLC/IC 结果表明盐酸盐晶型 A 样品的摩尔比为 0.5:1 (盐酸:API)。PLM (图 9-5) 显示盐酸盐晶型 A 呈无规则小颗粒。通过 VT-XRPD (图 9-4) 对盐酸盐晶型 A 进行晶型鉴定, 结果表明, 将样品在 N₂ 下吹扫 20min, 加热至 100℃并降至室温, 未观察到晶型变化。

2. 马来酸盐晶型 A

重复制备的马来酸盐晶型 A 样品的 XRPD 图如图 10-1 所示。TGA/DSC 结果见图 10-2。TGA 结果显示样品加热至 110 ℃ 时有 1.65% 的失重, 从 110 ℃ 加热至 220 ℃, 失重为 11.88%; DSC 结果显示样品在 144.1 ℃ (峰值温度)有吸热峰。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得, 结果见图 10-3。结果显示, 该样品中马来酸与 API 的摩尔比为 0.5:1, 并观察到 0.3 wt% 的 EtOAc 溶剂残留。PLM (图 10-5) 显示马来酸盐晶型 A 为不规则颗粒部分呈团聚。通过 VT-XRPD (图 10-4) 对马来酸盐晶型 A 进行晶型鉴定, 结果表明, 将样品在 N₂ 下吹扫 20min, 加热至 120℃并降至室温, 未观察到晶型变化。

3. 对甲苯磺酸盐晶型 A

重复制备的对甲苯磺酸盐晶型 A 样品的 XRPD 图如图 11-1 所示。TGA/DSC 结果见图 11-2。TGA 结果显示样品加热至 150 ℃ 时有 0.73% 的失重; DSC 结果显示样品在有 1 个吸热峰, 起始温度为 157.1 ℃, 峰值温度为 159.2 ℃。¹H NMR 在 DMSO-*d*₆ 中测得, 结果见图 11-3。结果显示, 该样品中对甲苯磺酸与 API 的摩尔比为 1.0:1, 未观察到 EtOAc 溶剂残留。PLM (图 11-4) 显示对甲苯磺酸盐晶型 A 呈不规则状颗粒。

实施例 12 动态溶解度实验

以 10 mg/mL (以游离碱计)的固体投料浓度在 37 ℃ 下旋转混合, 并在不同时间点(1、4 和 24 小时)测定各样品在水、SGF、FaSSIF 和 FeSSIF¹四种体系中的溶解度。每个时间点取样后经离心(10000 rpm)过滤(0.45 μm PTFE 过滤头), 测定滤液的 HPLC 浓度和 pH 值。溶解度试验结果总结于表 12-1, 溶解度曲线见图 12, 结果显示, 马来酸盐晶型 A 在 H₂O 中溶解度最高, 对甲苯磺酸盐晶型 A 在 H₂O 以外三种生物溶媒中的 1 小时的溶解度最高。图 13-28 分别为游离碱晶型 A、盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A、对甲苯磺酸盐晶型 A 在 H₂O 中、在 SGF 中、在 FaSSIF 中、在 FeSSIF 中溶解度样品的 XRPD 叠图, 晶型变化如表 12-1 中所示, 游离碱晶型 A 在动态溶解度测试中晶型未发生变化, 表现出了很高的稳定性。

表 12-1 37 ℃ 动态溶解度测试结果总结

起始物料	溶剂	1 小时			4 小时			24 小时		
		S	pH	晶型变化	S	pH	晶型变化	S	pH	晶型变化
游离碱晶型 A	H ₂ O	0.003	8.8	否	0.003	8.9	否	0.003	9.0	否

起始物料	溶剂	1 小时			4 小时			24 小时		
		S	pH	晶型变化	S	pH	晶型变化	S	pH	晶型变化
	SGF	0.013	1.8	否	0.013	1.8	否	0.012	1.8	否
	FaSSIF	0.010	6.5	否	0.008	6.5	否	0.009	6.5	否
	FeSSIF	0.023	5.0	否	0.023	5.0	否	0.025	5.0	否
盐酸盐晶型 A	H ₂ O	0.004	2.1	是 ^a	0.003	2.1	是 ^a	0.004	2.1	是 ^a
	SGF	0.014	1.6	是 ^a	0.011	1.6	是 ^a	0.011	1.6	是 ^a
	FaSSIF	0.009	5.2	是 ^a	0.009	5.2	是 ^a	0.014	5.2	是 ^a
	FeSSIF	0.030	4.9	是 ^a	0.027	4.9	是 ^a	0.023	4.9	是 ^a
马来酸盐晶型 A	H ₂ O	0.007	2.3	是 ^a	0.007	2.3	是 ^a	0.008	2.2	是 ^a
	SGF	0.010	1.7	是 ^a	0.010	1.7	是 ^a	0.009	1.7	是 ^a
	FaSSIF	0.006	4.9	是 ^a	0.007	4.7	是 ^a	0.007	4.5	是 ^a
	FeSSIF	0.020	4.9	是 ^a	0.020	4.9	是 ^a	0.021	4.9	是 ^a
对甲苯磺酸盐晶型 A	H ₂ O	0.006	1.8	是 ^a	0.005	1.8	是 ^a	1.8	0.005	是 ^a
	SGF	0.037	1.5	是 ^{b'}	0.033	1.5	是 ^{a+b'}	1.5	0.012	是 ^{a'}
	FaSSIF	0.028	2.6	是 ^{b'}	0.013	2.6	是 ^{a'}	2.6	0.006	是 ^{a'}
	FeSSIF	0.095	4.8	是 ^{b'}	0.081	4.8	是 ^b	4.8	0.028	是 ^{a'}

S: 溶解度(mg/mL); ^a: 转为游离碱晶型 A; ^b: 转为游离碱晶型 B;
^{a'}: 转为游离碱晶型 A+额外衍射峰; ^{b'}: 转为游离碱晶型 B+额外衍射峰;
^{a+b'}: 转为游离碱晶型 A+游离碱晶型 B+额外衍射峰。

生物溶媒的配制说明:

模拟胃液的配制(SGF):

称取 100.2 mg NaCl 和 50.3 mg 曲纳通 X-100 至 50-mL 容量瓶中,加入纯化水溶清。加入 816 μL1M 盐酸,用 1M 的盐酸或 1M 的 NaOH 溶液调节 pH 至 1.8。加纯化水定容。

模拟禁食状态肠液的配制(FaSSIF):

称取 170.5 mg 无水 NaH₂PO₄, 22.2 mg NaOH 和 310.9 mg NaCl 至 50-mL 容量瓶中。加入纯化水溶清,用 1M 的盐酸或 1M 的 NaOH 溶液调节 pH 至 6.5。加纯化水定容。后称 55.1 mg SIF 粉末至 25-mL 容量瓶中,用上述溶液溶清并定容。

模拟喂食状态肠液的配制(FeSSIF):

取 0.21 mL 冰醋酸, 101.6 mg NaOH 和 295.4 mg NaCl 至 25-mL 容量瓶中。加入约 20 mL 纯化水溶清,用 1M 的盐酸或 1M 的 NaOH 溶液调节 pH 至 5.0。加纯化水定容,并称入 280.8 mg SIF 粉末溶清。

实施例 13 引湿性

通过动态水分吸附仪(DVS)对实施例 3 制备的游离碱晶型 A、以及实施例 11 重复制备的盐酸盐晶

型 A、马来酸盐晶型 A 和对甲苯磺酸盐晶型 A 进行引湿性评估。以 0%RH 为起始，测试收集了 25 ℃ 恒温条件下，随湿度变化(0%RH-95%RH-0%RH)时，样品的质量变化百分比。DVS 测试结果及 DVS 测试前后样品的 XRPD 结果如图 29-36 所示。结果显示游离碱晶型 A 在 25 ℃/80%RH 时的水分吸附为~0.91%，表明其略有引湿性；盐酸盐晶型 A 在 25 ℃/80%RH 时的水分吸附为~0.49%，表明其略有引湿性；马来酸盐晶型 A 在 25 ℃/80%RH 的水分吸附为~0.41%，表明其略有引湿性，当湿度>80%RH 时，观察到马来酸盐晶型 A 快速吸湿；对甲苯磺酸盐晶型 A 样品在 25 ℃/80%RH 的水分吸附为~0.12%，表明其几乎无引湿性。游离碱晶型 A、盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A 和对甲苯磺酸盐晶型 A 样品在 DVS 测试后晶型均不变。

实施例 14 固态稳定性

将实施例 3 制备的游离碱晶型 A、以及实施例 11 重复制备的盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A 和对甲苯磺酸盐晶型 A 分别在 60 ℃ 闭口放置 1 天、25 ℃/60%RH 和 40 ℃/75%RH 条件下敞口放置 1 周和 1 月后(其中盐酸盐晶型 A 和马来酸盐晶型 A 仅放置 1 周)，通过 XRPD 和 HPLC 检测样品的物理和化学稳定性。纯度数据列于表 14-1，XRPD 结果列于图 37-图 40。结果显示游离碱晶型 A、盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A 和对甲苯磺酸盐晶型 A 在对应条件下放置后的 HPLC 纯度无明显变化。

表 14-1 固态稳定性评估总结

晶型	条件		HPLC 结果		
			纯度(area%)	相对于起始 (%)	晶型
游离碱晶型 A	起始		99.37	--	--
	60 ℃/闭口	1 天	99.44	100.07	游离态晶型 A
	25 ℃/60%RH/敞口	1 周	99.38	100.01	
		1 月	99.33	99.96	
		1 周	99.51	100.14	
	40 ℃/75%RH/敞口	1 月	99.43	100.06	
盐酸盐晶型 A	起始		99.59	--	--
	60 ℃/闭口	1 天	99.58	99.99	盐酸盐晶型 A
	25 ℃/60%RH/敞口	1 周	99.57	99.98	
	40 ℃/75%RH/敞口	1 周	99.58	99.99	
马来酸盐晶型 A	起始		99.71	--	--
	60 ℃/闭口	1 天	99.60	99.89	马来酸盐晶型 A
	25 ℃/60%RH/敞口	1 周	99.71	100.00	
	40 ℃/75%RH/敞口	1 周	99.65	99.94	
对甲苯磺酸盐晶型 A	起始		99.92	--	--
	60 ℃/闭口	1 天	99.92	100.00	对甲苯磺酸盐晶型 A
	25 ℃/60%RH/敞口	1 周	99.92	100.00	

晶型	条件	HPLC 结果	
		纯度(area%)	相对于起始 (%)
40 °C/75%RH/敞口	1 月	99.92	100.00
	1 周	99.92	100.00
	1 月	99.92	100.00

实施例 15 式 I 化合物的游离碱晶型的不同制备工艺

根据实施例 2 的工艺方法制备得到式 I 化合物，并按照以下方法，可制备得到游离碱晶型 A 或游离碱晶型 B（经 XRPD 鉴定）。

方法一、缓慢挥发

采用不同的溶剂体系共设置了 6 个缓慢挥发试验。分别称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品至 5mL 小瓶中，分别加入 0.4-0.6 mL 表 15-1 中的溶剂，溶解后过滤，用封口膜封住小瓶，并在上面扎 2 个针孔，放置在室温下缓慢挥发。收集所得固体并进行 XRPD 测试。试验结果如表 15-1 所示，得到游离碱晶型 A/B。

表 15-1 缓慢挥发试验小结

溶剂	结果
TFE	游离碱晶型 B
Acetone	游离碱晶型 A
THF	游离碱晶型 A
DCM	游离碱晶型 A
ACN	游离碱晶型 A
EtOAc	游离碱晶型 A

方法二、气固渗透

采用不同的溶剂共设置了 8 个气固渗透试验。称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品于 3 mL 小瓶中，另在 20 mL 小瓶中加入约 3 mL 溶剂，将 3mL 小瓶敞口置于 20 mL 小瓶中后，将 20 mL 小瓶密封。室温下静置 1~8 天后收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果如表 15-2 所示，得到游离碱晶型 A 和游离碱晶型 A+B。

表 15-2 气固扩散试验小结

溶剂	结果
EtOH	游离碱晶型 A
DCM	游离碱晶型 A
ACN	游离碱晶型 A
THF	游离碱晶型 A+B*
Acetone	游离碱晶型 A
Toluene	游离碱晶型 A

DMF	游离碱晶型 A
n-Hexane	游离碱晶型 A

*：澄清后转室温挥发得到。

方法三、气液渗透

采用不同的溶剂共设置了 8 个气液渗透试验。称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品至 3 mL 小瓶中，加入 0.4~2.2 mL 溶剂溶解(使用 0.45 μm 的 PTFE 滤头过滤)，另取 20 mL 的小瓶向其中加入约 3 mL 的反溶剂，将装有清液的 3 mL 小瓶敞口置于 20 mL 小瓶后，密封 20-mL 的小瓶并于室温下静置。收集得到的固体并进行 XRPD 测试。试验结果如表 15-3 所示，得到游离碱晶型 A/B 和低结晶度。

表 15-3 气液扩散试验小结

溶剂	反溶剂	结果
IPA	n-Pentane	游离碱晶型 A*
	Methyl butyl ether	游离碱晶型 A*
MIBK	Cyclohexane	游离碱晶型 B
	CPME	游离碱晶型 A*
1,4-dioxane	Ether	游离碱晶型 A*
	n-Hexane	游离碱晶型 B
DMSO	H ₂ O	游离碱晶型 A
	m-Xylene	低结晶度*

*：转室温挥发得到。

方法四、高聚物诱导

采用 2 种混合高聚物在不同溶剂共设置了 8 个高聚物诱导试验。称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品于 3 mL 小瓶中，加入 0.4~1.0 mL 溶剂溶解，溶解后过滤，加入~2 mg 混合聚合物，用封口膜封住小瓶，并在上面扎 2 个小孔，放置在室温下缓慢挥发。试验结果如表 15-4 所示，得到游离碱晶型 A 和游离碱晶型 A+B。

表 15-4 高聚物诱导试验小结

溶剂	高聚物	结果
MeOH	A	游离碱晶型 A
MEK		游离碱晶型 A
Methyl acetate		游离碱晶型 A
THF		游离碱晶型 A+B
IPAc	B	游离碱晶型 A
EtOH		游离碱晶型 A
DCM		游离碱晶型 A
2-McTHF		游离碱晶型 A

混合高聚物 A：聚乙烯吡咯烷酮，聚乙烯醇，聚氯乙烯，聚醋酸乙烯酯，羟丙基甲基纤维素和甲基纤维素(等质量混合)

混合高聚物 B：聚己酸内酯，聚乙二醇，聚甲基丙烯酸甲酯，海藻酸钠和羟乙基纤维素(等质量混合)

方法五、湿度诱导

采用不同的溶剂共设置了 5 个湿度诱导试验。分别称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品至 3 mL 小瓶中，另在 20 mL 小瓶中配置室温下的饱和盐溶液，将 3 mL 小瓶敞口置于 20 mL 小瓶中后，将 20 mL 小瓶密封。室温下静置 8 天后收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果如表 15-5 所示，得到游离碱晶型 A。

表 15-5 湿度诱导试验小结

条件	结果
饱和乙酸钾溶液，~22.5% RH	游离碱晶型 A
饱和碳酸钾溶液，~43.2% RH	游离碱晶型 A
饱和溴化钠溶液，~57.6% RH	游离碱晶型 A
饱和溴化钾溶液，~80.9% RH	游离碱晶型 A
H ₂ O，~100% RH	游离碱晶型 A

方法六、循环升降温

采用不同的溶剂共设置了 9 个循环升降温试验。称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品至 HPLC 玻璃小瓶中，分别加入 0.5 mL 表 15-6 中所列的溶剂，得到的悬浮液在温度循环下(50 ℃~5 ℃, 0.1 ℃/min, 2 个循环)磁力搅拌(1000 rpm)，离心(10000 rpm, 2min)后收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果见表 15-6，得到游离碱晶型 A。

表 15-6 循环升降温试验小结

溶剂(v/v)	结果
n-Heptane	游离碱晶型 A
甲基丁基醚	游离碱晶型 A
Anisole	游离碱晶型 A
Dicylohexylamine	游离碱晶型 A
Acetone/H ₂ O (1:4)	游离碱晶型 A
EtOH/H ₂ O (1:4)	游离碱晶型 A
EtOAc/Methylcyclohexane (1:9)	游离碱晶型 A
CHCl ₃ /n-Heptane (1:7)	游离碱晶型 A
MEK/m-Xylene(1:9)	游离碱晶型 A

方法七、反溶剂添加

采用不同的溶剂共设置了 12 个反溶剂添加试验。分别称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品加至 20 mL 的小瓶内，用 0.4~0.6 mL 的溶剂(见表 15-7)将固体完全溶解。向该澄清溶液中边搅拌(1000 rpm)边滴加表 15-7 中的反溶剂，直至有固体析出，或当反溶剂总体积加至 5 mL 后，无固体析出的样品在 5 ℃ 下悬浮搅拌，若仍无固体析出，则在 -20 ℃ 下悬浮搅拌，最后的澄清样品在室温下挥发。分离析出的固体并进行 XRPD 测试，结果如表 15-7 所示，反溶剂添加试验得到游离碱晶型 A 和澄清溶液。

表 15-7 反溶剂添加试验小结

溶剂	反溶剂	结果
MeOH	H ₂ O	游离碱晶型 A
	m-Xylene	澄清
Acetone	H ₂ O	游离碱晶型 A
	n-Heptane	游离碱晶型 A
EtOAc	n-Pentane	游离碱晶型 A
	Cumene	游离碱晶型 A
THF	H ₂ O	游离碱晶型 A
DMAc	H ₂ O	游离碱晶型 A
NMP	H ₂ O	游离碱晶型 A
CHCl ₃	Cyclohexane	游离碱晶型 A
	p-Cymene	游离碱晶型 A

*：反溶剂添加后获得澄清液，后转至 5 ℃ 下搅拌。

方法八、反-反溶剂添加

采用不同的溶剂共设置了 8 个反-反溶剂添加试验。分别称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品加至 20 mL 的小瓶内，用 0.4~0.6 mL 的溶剂(见表 15-8)将固体完全溶解。将该澄清溶液边搅拌(1000 rpm)边滴加到表 15-8 中的 5 mL 反溶剂中，无固体析出的样品在 5 ℃ 下悬浮搅拌，若仍无固体析出，则在 -20 ℃ 下悬浮搅拌，最后的澄清样品在室温下挥发。分离析出的固体并进行 XRPD 测试，结果如表 15-8 所示，反溶剂添加试验得到游离碱晶型 A。

表 15-8 反-反溶剂添加试验小结

反溶剂	溶剂	结果
n-Heptane	EtOH	游离碱晶型 A
	EtOAc	游离碱晶型 A
	2-MeTHF	游离碱晶型 A
Toluene	MEK	游离碱晶型 A [#]
	ACN	游离碱晶型 A [#]
	DCM	游离碱晶型 A [*]
H ₂ O	1,4-dioxane	游离碱晶型 A
	EtOH	游离碱晶型 A

*：样品由 5 ℃ 下搅拌得到；[#]：样品由 -20 ℃ 下搅拌得到。

方法九、室温悬浮搅拌

采用不同的溶剂共设置了 15 个室温悬浮搅拌试验。称量约 20~40 mg 每份的式 I 化合物样品至 HPLC 玻璃小瓶中，分别加入 0.5 mL 表 15-9 中所列的溶剂，得到的浑浊液置于室温下磁力搅拌(1000 rpm)约 4 天后，离心(10000 rpm, 2min)收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果见表 15-9，得到游离碱晶型 A。

表 15-9 室温悬浮搅拌试验小结

溶剂(v/v)	结果
IBA	游离碱晶型 A

MTBE	游离碱晶型 A
Cyclohexane	游离碱晶型 A
Toluene	游离碱晶型 A
IPAc/Toluene (1:1)	游离碱晶型 A
H ₂ O	游离碱晶型 A
Methylcyclohexane	游离碱晶型 A
THF/n-Pentane (1:3)	游离碱晶型 A
Acetone/n-Pentane (1:4)	游离碱晶型 A
IPA/CPME (1:4)	游离碱晶型 A
MeOH/p-Cymene (1:4)	游离碱晶型 A
DCM/n-Heptane (1:5)	游离碱晶型 A
ACN/H ₂ O (1:1)	游离碱晶型 A
1,4-dioxane/H ₂ O (1:1)	游离碱晶型 A
NMP/H ₂ O (1:3)	游离碱晶型 A

方法十、缓慢降温

采用不同的溶剂体系共设置了 5 个缓慢降温试验。称取约 20 mg 每份的式 I 化合物样品于 HPLC 小瓶中, 加入 1.0 mL 表 15-10 中的溶剂, 在 50 ℃ 下搅拌平衡约 2 小时后过滤(使用 0.45 μm 的 PTFE 滤头过滤)取上清液。将所得上清液放置在生物培养箱中, 以 0.05 ℃/分钟从 50 ℃ 降温至 5 ℃ 后并在 5 ℃ 保持恒温, 澄清溶液转移至 -20 ℃ 下恒温。收集析出的固体并进行 XRPD 测试, 转移未析出固体的样品至室温下进行挥发。试验结果见表 15-10, 缓慢降温试验得到游离碱晶型 A 和游离碱晶型 B+多峰。

表 15-10 缓慢降温试验小结

溶剂 (v/v)	结果
IPA	游离碱晶型 A*
Anisole	游离碱晶型 A
IPAc	游离碱晶型 A*
MeOH/MTBE (1:4)	游离碱晶型 B+多峰*
THF/H ₂ O (1:1)	游离碱晶型 A*

*: 样品由室温下挥发得到。

方法十一、50 ℃ 悬浮搅拌

采用不同的溶剂共设置了 16 个 50 ℃ 悬浮搅拌试验。称取约 20~40 mg 每份的式 I 化合物样品至 HPLC 玻璃小瓶中, 分别加入 0.5 mL 表 15-11 中所列的溶剂, 得到的悬浮液在 50 ℃ 下磁力搅拌(1000 rpm)约 3 天后, 离心(10000 rpm, 2min)收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果见表 15-11, 得到游离碱晶型 A。

表 15-11 50 ℃ 悬浮搅拌试验小结

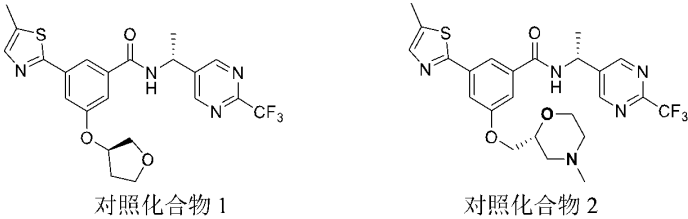
溶剂(v/v)	结果
n-BuOH/Toluene (1:3)	游离碱晶型 A
Isopropyl ether	游离碱晶型 A
Methylcyclohexane	游离碱晶型 A
Cumene	游离碱晶型 A

Anisole	游离碱晶型 A
H ₂ O	游离碱晶型 A
PET	游离碱晶型 A
Dicyclohexylamine	游离碱晶型 A
2 MeTHF/n-Hexane (1:5)	游离碱晶型 A
MEK/Cumene (1:5)	游离碱晶型 A
IPAc/Toluene (1:5)	游离碱晶型 A
CHCl ₃ /m-Xylene (1:4)	游离碱晶型 A
IPA/H ₂ O (1:2, v/v)	游离碱晶型 A
THF/H ₂ O (1:3, v/v)	游离碱晶型 A
MIBK/CPME (1:5)	游离碱晶型 A
Benzyl alcohol/Toluene (1:3)	游离碱晶型 A*

*: 样品在 50 ℃ 下澄清, 转室温下搅拌得到。

实施例16

对照化合物 1 和对照化合物 2 参考专利申请 WO 2016/091776A1 合成



一、FLIPR 法测定 hP2X3 拮抗剂对 hP2X3 的拮抗活性

人源 P2X3 受体(hP2X3)拮抗剂对 hP2X3 的拮抗活性的评价, 是采用 FLIPR Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices, R8141)和 FLIPR TETRA instrument(Molecular Devices, 0296), 对钙流信号进行检测。在实验前 24h, 将稳定转染 hP2X3 受体的人源细胞以 2×10^5 cells/mL 的密度铺于 384 孔板中, 每孔 50 μ L 细胞悬液, 于 5%CO₂, 37℃培养箱中培养 16-24h。用 DMSO 配制 180 倍所需浓度供试化合物(20-50mM DMSO 储备液), 每孔取 500nL 加到 384 孔板中, 补充 30 μ L FLIPR Assay buffer(含 1.26mM Ca²⁺的 1×HBSS+2mM CaCl₂ 20mM HEPES), 振荡 20-40min 以混匀。用 FLIPR Assay buffer 配制 3 倍所需浓度激动剂(α , β -meATP)(所需终浓度 400nM), 每孔加 45 μ L 激动剂到另一块 384 孔板中。取一日前所铺细胞培养板, 吸弃细胞上清, 每孔加入 30 μ L Dye(FLIPR® Calcium 4 Assay Kit, FLIPR buffer 稀释), 孵育 1h。向每孔细胞中加 15 μ L 化合物(FLIPR 仪器加样), 15 分钟后, 每孔加 22.5 μ L 激动剂, 检测荧光信号(激发光波长 470 nm-495 nm, 发射波长 515 nm-575 nm)。取信号峰值和谷值的差值作为基础数据, 以阳性药最高浓度数据作为 100%抑制率, DMSO 数据作为 0%抑制率, 在软件 GraphpadPrism6 上拟合化合物的抑制效应曲线并计算 IC₅₀ 值。

表 16-1 测试化合物对 hP2X3 的拮抗活性

测试化合物	hP2X3 IC ₅₀ (nM)
对照化合物 1	241
式 I 化合物	67

二、小鼠药代动力学试验

小鼠药代动力学试验, 使用雄性 ICR 小鼠, 20-25g, 禁食过夜。取 3 只小鼠, 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。血液样品 6800g, 2-8℃离心 6 分钟,

收集血浆，于-80℃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。

试验结果表明，在小鼠模型中，与对照化合物 1 和 2 相比，本发明式 I 化合物的药代动力学性质表现出一定的改善。

表 16-2 测试化合物的小鼠药代动力学

测试化合物	小鼠药代动力学参数(口服灌胃给药)			
	Cmax (ng/mL)	Tmax (hr)	AUC0-t (h*ng/mL)	T1/2 (hr)
对照化合物 1	1246.6	0.50	5201.3	2.41
对照化合物 2	845.3	0.50	3186.1	2.66
式 I 化合物	3377.5	0.50	14974.5	2.89

三、大鼠味觉试验

SD 大鼠经过 3 天的隔夜禁水训练后进行给药，在给药后半小时每只动物分别给予 1 瓶水和 1 瓶 0.3 mM 奎宁水溶液，给水 15min 后撤离水瓶，分别测定大鼠对摄入水量和摄入 0.3 mM 奎宁水量，根据摄入量与摄入奎宁水量的差异（图 41）评定化合物对 SD 大鼠的味觉影响。

表 16-3 对应化合物给药动物的水/水奎宁摄取倍数

化合物	水/奎宁水
溶媒	34.7
对照化合物 1 30mg/kg i.p	11.4
式 I 化合物 30mg/kg i.p	29.4

四、豚鼠组胺/柠檬酸咳嗽药效试验

入组前，动物适应性饲养 3-7 天，体重达标(300-400g)后进行编号并随机分组。

在咳嗽评估开始前 0.25~24 小时，通过滴鼻向豚鼠施用化合物或赋形剂。供试品施用剂量范围为 0.17mg/kg-1.5mg/kg。咳嗽评估中，动物放入全身体积扫描箱适应后，进行组胺雾化，再给予柠檬酸雾化。从组胺雾化开始直到观察期结束，共记录 22 min 内动物的咳嗽次数和咳嗽潜伏期。

实验数据统计采用单因素方差分析方法(one-way ANOVA)将各组数据进行分析比较。统计分析结果 $p < 0.05$ 认为有显著差异。两两比较采用 t-test 方法比较差异性。

表 16-4 豚鼠施予对应化合物后组胺/柠檬酸刺激的咳嗽次数

化合物	15 分钟内咳嗽次数均值	咳嗽抑制率 vs. 溶媒 (%)
溶媒	26.6	--
对照化合物 1	11.4	57.1
式 I 化合物	8.9	66.5

数据显示，与对照化合物 1 相比，本发明化合物在柠檬酸/组胺刺激豚鼠咳嗽模型中显著减少了动物的咳嗽次数，延长了咳嗽潜伏期，具有良好的镇咳效果(图 42)。

五、豚鼠 ATP/柠檬酸咳嗽药效试验

入组前，动物适应性饲养 3-7 天，体重达标(300-400g)后进行编号并随机分组。在咳嗽评估开始前 0.25~24 小时，通过滴鼻向豚鼠施用化合物或赋形剂。供试品施用剂量范围为 0.17mg/kg-1.5mg/kg。咳嗽评估中，动物放入全身体积扫描箱适应后，进行 ATP 雾化，间隔几分钟，再给予柠檬酸雾化。

从柠檬酸雾化开始，记录 15min 内动物的咳嗽次数和咳嗽潜伏期。

采用单因素方差分析方法(one-way ANOVA)对各组数据进行分析比较。统计分析结果 $p < 0.05$ 认为有显著差异。两两比较采用 t-test 方法比较差异性。

表 16-5 豚鼠施予对应化合物后 ATP/柠檬酸刺激的咳嗽次数

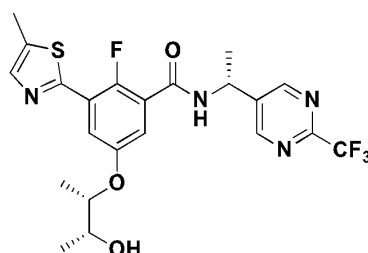
化合物	15 分钟内咳嗽次数均值	咳嗽抑制率 vs. 溶媒(%)
溶媒	19.8	--
对照化合物 1	8.1	59.1
式 I 化合物	6.3	68.2

数据显示，与对照化合物 1 相比，本发明化合物在柠檬酸/ATP 刺激豚鼠咳嗽模型中显著减少了动物的咳嗽次数，延长了咳嗽潜伏期，具有良好的镇咳效果(图 43)。

以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1. 式 I 化合物或其药学上可接受的盐的晶型，其中，所述式 I 化合物的结构如下所示：



式 I。

2. 根据权利要求 1 所述的晶型，其中，所述晶型为式 I 化合物的游离碱晶型 A，所述游离碱晶型 A 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.44° 、 14.87° 、 15.77° 、 17.81° 、 18.61° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 A 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.44° 、 11.14° 、 11.36° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 A 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 3.75° 、 7.44° 、 11.14° 、 11.36° 、 11.98° 、 12.25° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 、 22.36° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 A 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 3.75° 、 5.99° 、 7.44° 、 9.01° 、 9.93° 、 11.14° 、 11.36° 、 11.98° 、 12.25° 、 13.88° 、 14.20° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 、 22.36° 、 24.07° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 A 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 3.75° 、 5.99° 、 7.44° 、 9.01° 、 9.93° 、 11.14° 、 11.36° 、 11.98° 、 12.25° 、 13.88° 、 14.20° 、 14.87° 、 15.77° 、 16.97° 、 17.81° 、 18.61° 、 19.39° 、 20.26° 、 21.14° 、 22.36° 、 23.34° 、 24.07° 、 26.33° 、 26.78° 、 27.18° 、 28.17° 、 30.20° 、 33.88° 、 34.35° 、 37.23° 、 37.70° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 A 具有基本如图 1-1 所示的 XRPD 谱图；

优选地，所述游离碱晶型 A 具有以下的一个、两个或三个特征：

(1) 游离碱晶型 A 的 TGA 曲线在 $150.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $1.28 \pm 1\%$ ；

(2) 游离碱晶型 A 的 DSC 曲线在 $175.6 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点；

(3) 游离碱晶型 A 的 DSC 曲线在 $176.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

优选地，所述游离碱晶型 A 的 TGA/DSC 图如图 1-2 所示；

优选地，所述游离碱晶型 A 的 ^1H NMR 图如图 1-3 所示。

3. 根据权利要求 1 所述的晶型，其中，所述晶型为式 I 化合物的游离碱晶型 B，其中，所述游离碱晶型 B 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 19.09° 、 19.56° 、 22.09° 、 26.49° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 B 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 16.72° 、 19.09° 、 19.56° 、 20.90° 、 22.09° 、 26.49° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 B 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 8.35° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 15.05° 、 16.72° 、 17.80° 、 18.39° 、 19.09° 、 19.56° 、 20.90° 、 21.67° 、 22.09° 、 22.97° 、 25.16° 、 26.49° 、 27.49° 处有衍射峰；

优选地，所述游离碱晶型 B 以 $20 \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.21° 、 8.35° 、 12.48° 、 13.17° 、 14.41° 、 15.05° 、 16.72° 、 17.80° 、 18.39° 、 19.09° 、 19.56° 、 20.90° 、 21.67° 、 22.09° 、 22.97° 、 25.16° 、 25.45° 、 26.49° 、 27.49° 、 28.66° 、 29.10° 、 29.35° 、 31.71° 、 32.00° 、 32.85° 、 33.70° 、 34.23° 、 36.78° 、 38.26° 、 38.70° 处有衍射峰；

优选地, 所述游离碱晶型 B 具有基本如图 2-1 所示的 XRPD 谱图;

优选地, 所述游离碱晶型 B 具有以下的一个、两个或三个特征:

- (1) 游离碱晶型 B 的 TGA 曲线在 $150.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处失重约 $2.36\pm 1\%$;
- (2) 游离碱晶型 B 的 DSC 曲线在 $177.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (3) 游离碱晶型 B 的 DSC 曲线在 $179.4\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰。

4. 根据权利要求 1 所述的晶型, 其中, 所述式 I 化合物的药学上可接受的盐包括式 I 化合物与无机酸或有机酸形成的盐;

所述无机酸包括: 盐酸、硫酸、磷酸、硝酸、氢溴酸;

所述有机酸包括: 马来酸、L-天冬氨酸、富马酸、L-酒石酸、柠檬酸、D-葡萄糖醛酸、L-苹果酸、马尿酸、D-葡萄糖酸、DL-乳酸、琥珀酸、L-抗坏血酸、己二酸、乙酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、苯磺酸、草酸、2-羟基乙磺酸、丙二酸、龙胆酸、苯甲酸;

优选地, 所述式 I 化合物的药学上可接受的盐为式 I 化合物的盐酸盐、马来酸盐、对甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、丙二酸盐。

5. 根据权利要求 1 所述的晶型, 其中, 所述式 I 化合物的药学上可接受的盐的晶型为式 I 化合物的盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A、对甲苯磺酸盐晶型 A、苯磺酸盐晶型 A、丙二酸盐晶型 A。

6. 根据权利要求 5 所述的晶型, 其中, 所述盐酸盐晶型 A 以 $2\theta\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.77° 、 9.01° 、 10.10° 、 15.54° 、 17.51° 、 19.24° 、 24.49° 处有衍射峰;

优选地, 所述盐酸盐晶型 A 以 $2\theta\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.77° 、 9.01° 、 10.10° 、 15.54° 、 17.51° 、 18.01° 、 19.24° 、 20.05° 、 21.28° 、 23.38° 、 23.79° 、 24.49° 、 26.07° 、 28.33° 处有衍射峰;

优选地, 所述盐酸盐晶型 A 以 $2\theta\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 7.77° 、 9.01° 、 10.10° 、 15.54° 、 17.51° 、 18.01° 、 19.24° 、 20.05° 、 21.28° 、 21.59° 、 22.67° 、 23.38° 、 23.79° 、 24.49° 、 26.07° 、 27.17° 、 28.33° 处有衍射峰;

优选地, 所述盐酸盐晶型 A 具有基本如图 3-1 所示的 XRPD 谱图;

优选地, 所述盐酸盐晶型 A 中式 I 化合物与盐酸的摩尔比为 2:1;

优选地, 所述盐酸盐晶型 A 具有基本如图 9-4 所示的 VT-XRPD 图谱;

优选地, 所述盐酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个、三个、四个、五个或六个特征:

- (1) 盐酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $100.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处失重约 $2.19\pm 1\%$;
- (2) 盐酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $100.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 至 $160.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 温度区间内失重约 $3.90\pm 1\%$;
- (3) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $143.6\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (4) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $157.4\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (5) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $176.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (6) 盐酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $179.0\pm 3^{\circ}\text{C}$ 处有一个吸热峰。

7. 根据权利要求 5 所述的晶型, 其中, 所述马来酸盐晶型 A 以 $2\theta\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 6.73° 、 10.84° 、 14.68° 、 16.26° 、 18.23° 、 18.44° 处有衍射峰;

优选地, 所述马来酸盐晶型 A 以 $2\theta\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.43° 、 6.73° 、 10.84° 、 14.68° 、 16.26° 、 16.82° 、 18.23° 、 18.44° 处有衍射峰;

优选地, 所述马来酸盐晶型 A 以 $2\theta\pm 0.2^{\circ}$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.43° 、 6.73° 、 9.95° 、 10.84° 、 11.75° 、 13.50° 、 14.68° 、 16.26° 、 16.82° 、 18.23° 、 18.44° 、 20.17° 、 22.79° 、 23.22° 、 24.00° 、 26.07° 、 27.72° 、 28.86° 处有衍射峰;

优选地, 所述马来酸盐晶型 A 具有基本如图 4-1 所示的 XRPD 谱图;

优选地, 所述马来酸盐晶型 A 中式 I 化合物与马来酸的摩尔比为 2:1;

优选地, 所述马来酸盐晶型 A 具有基本如图 10-4 所示的 VT-XRPD 图谱;

优选地, 所述马来酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个、三个或更多个特征:

- (1) 马来酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $110.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $1.65 \pm 1\%$;
- (2) 马来酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $110.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 至 $220.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 温度区间内失重约 $11.88 \pm 1\%$;
- (3) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $107.8 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (4) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $143.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (5) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $144.1 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (6) 马来酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $160.2 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

8. 根据权利要求 5 所述的晶型, 其中, 所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 7.26° 8.70° 8.87° 15.40° 17.73° 21.01° 24.13° 处有衍射峰;

优选地, 所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 7.26° 8.70° 8.87° 15.20° 15.40° 16.68° 17.73° 19.71° 21.01° 24.13° 处有衍射峰;

优选地, 所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 7.26° 8.70° 8.87° 14.45° 14.88° 15.20° 15.40° 16.41° 16.68° 17.45° 17.73° 19.16° 19.71° 20.66° 21.01° 21.76° 22.41° 24.13° 25.76° 26.18° 27.25° 处有衍射峰;

优选地, 所述对甲苯磺酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 4.99° 7.26° 8.70° 8.87° 14.45° 14.88° 15.20° 15.40° 16.41° 16.68° 17.45° 17.73° 19.16° 19.71° 20.66° 21.01° 21.76° 22.41° 24.13° 25.76° 26.18° 27.25° 27.95° 29.23° 30.69° 31.00° 31.78° 38.41° 处有衍射峰;

优选地, 所述对甲苯磺酸盐晶型 A 具有基本如图 5-1 所示的 XRPD 谱图;

优选地, 所述对甲苯磺酸盐晶型 A 中式 I 化合物与对苯磺酸的摩尔比为 1:1;

优选地, 所述对甲苯磺酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个或三个特征:

- (1) 对甲苯磺酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $150.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $0.73 \pm 1\%$;
- (2) 对甲苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $157.1 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (3) 对甲苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $159.2 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

9. 根据权利要求 5 所述的晶型, 其中, 所述苯磺酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.36° 7.28° 8.34° 9.64° 16.20° 18.55° 21.49° 处有衍射峰;

优选地, 所述苯磺酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.36° 7.28° 8.34° 9.64° 16.20° 18.55° 19.28° 21.49° 21.81° 23.21° 25.05° 25.74° 处有衍射峰;

优选地, 所述苯磺酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.36° 7.28° 8.34° 9.64° 10.66° 14.55° 15.00° 16.20° 16.93° 17.85° 18.55° 19.28° 19.74° 20.80° 21.49° 21.81° 23.21° 23.68° 23.98° 25.05° 25.74° 26.65° 27.82° 处有衍射峰;

优选地, 所述苯磺酸盐晶型 A 具有基本如图 6-1 所示的 XRPD 谱图;

优选地, 所述苯磺酸盐晶型 A 中式 I 化合物与苯磺酸的摩尔比为 1:1;

优选地, 所述苯磺酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个或三个特征:

- (1) 苯磺酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $120.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $1.35 \pm 1\%$;
- (2) 苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $159.6 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (3) 苯磺酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $160.9 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

10. 根据权利要求 5 所述的晶型, 其中, 所述丙二酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 6.75° 9.96° 10.67° 14.48° 16.04° 16.88° 18.04° 18.29° 处有衍射峰;

优选地, 所述丙二酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.34° 6.75° 9.96° 10.67° 11.83° 13.49° 14.48° 16.04° 16.88° 17.04° 18.04° 18.29° 27.38° 处有衍射峰;

优选地, 所述丙二酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.34° 6.75° 9.96° 10.67° 11.83° 13.49° 14.48° 16.04° 16.88° 17.04° 18.04° 18.29° 20.27° 22.57° 22.95° 27.38° 28.83° 处有衍射峰;

优选地,所述丙二酸盐晶型 A 以 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 衍射角表示的 X-射线粉末衍射谱图在 5.34° 、 6.75° 、 9.96° 、 10.67° 、 11.83° 、 13.49° 、 14.48° 、 16.04° 、 16.88° 、 17.04° 、 18.04° 、 18.29° 、 18.63° 、 20.27° 、 21.57° 、 22.57° 、 22.95° 、 24.11° 、 24.83° 、 26.02° 、 27.38° 、 28.83° 处有衍射峰;

优选地,所述丙二酸盐晶型 A 具有基本如图 7-1 所示的 XRPD 谱图;

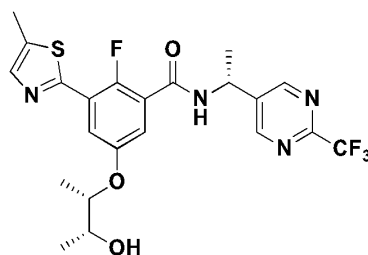
优选地,所述丙二酸盐晶型 A 中式 I 化合物与丙二酸的摩尔比为 2:1;

优选地,所述丙二酸盐晶型 A 具有基本如图 7-4 所示的 VT-XRPD 图谱;

优选地,所述丙二酸盐晶型 A 具有以下的一个、两个、三个或四个特征:

- (1) 丙二酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $120.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 处失重约 $2.99 \pm 1\%$;
- (2) 丙二酸盐晶型 A 的 TGA 曲线在 $120.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 至 $200.0 \pm 3^\circ\text{C}$ 温度区间内失重约 $11.02 \pm 1\%$;
- (3) 丙二酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $155.6 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰的起始点;
- (4) 丙二酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $156.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰;
- (5) 丙二酸盐晶型 A 的 DSC 曲线在 $172.4 \pm 3^\circ\text{C}$ 处有一个吸热峰。

11. 式 I 化合物的盐,其中,所述式 I 化合物的药学上可接受的盐包括式 I 化合物与无机酸或有机酸形成的盐;式 I 化合物的结构如下所示:



式 I

所述无机酸包括:盐酸、硫酸、磷酸、硝酸、氢溴酸;

所述有机酸包括:马来酸、L-天冬氨酸、富马酸、L-酒石酸、柠檬酸、D-葡萄糖醛酸、L-苹果酸、马尿酸、D-葡萄糖酸、DL-乳酸、琥珀酸、L-抗坏血酸、己二酸、乙酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、苯磺酸、草酸、2-羟基乙磺酸、丙二酸、龙胆酸、苯甲酸;

优选地,所述式 I 化合物的药学上可接受的盐为式 I 化合物的盐酸盐、马来酸盐、对甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、丙二酸盐;

优先地,所述式 I 化合物与酸的摩尔比为 5:1~1:5,例如 3:1、2:1、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3。优选地,所述式 I 化合物与酸的摩尔比为 1:1 或 2:1。

12. 权利要求 2 所述式 I 化合物的游离碱晶型 A 的制备方法,其中,选自下述方法中的任意一种:

方法一、将式 I 化合物加入有机溶剂 I 中,溶解后过滤,于室温下挥发;

优选地,所述有机溶剂 I 选自丙酮、四氢呋喃、二氯甲烷、乙腈、乙酸乙酯中的一种或多种;

方法二、将式 I 化合物在有机溶剂 II 中完全溶解,搅拌条件下向澄清溶液中滴加反溶剂,至有固体析出;若无固体析出,则采用悬浮搅拌;若仍无固体析出,则降温悬浮搅拌后,澄清溶液在室温下挥发;

所述有机溶剂 II 选自甲醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三氯甲烷、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮中的一种或多种;

所述反溶剂选自水、间二甲苯、正己烷、异丙苯、甲苯、环己烷、正庚烷、正戊烷、对异丙基甲苯中的一种或多种;

方法三、将盛有式 I 化合物的第一样品瓶敞口置于盛有溶剂的第二样品瓶中,密封第二样品瓶,室温静置;所述溶剂不没过第一样品瓶的瓶口;

所述溶剂选自乙醇、二氯甲烷、乙腈、丙酮、甲苯、N,N-二甲基乙酰胺、正己烷中的一种或多种;

方法四、将盛有式 I 化合物溶液的第一样品瓶敞口置于盛有反溶剂的第二样品瓶中，密封第二样品瓶，室温静置；所述反溶剂不没过第一样品瓶的瓶口；

所述式 I 化合物溶液中的溶剂选自异丙醇、甲基异丁基酮、1,4-二氧六环、二甲基亚砜中的一种或多种；

所述反溶剂选自正戊烷、甲基丁基醚、水、间二甲苯中的一种或多种；

方法五、向式 I 化合物溶液中加入聚合物，置于室温下挥发；

所述式 I 化合物溶液中的溶剂选自甲醇、2-丁酮、乙酸甲酯、乙酸异丙酯、乙醇、二氯甲烷、2-甲基四氢呋喃中的一种或多种；

所述聚合物选自聚乙烯吡咯烷酮，聚乙烯醇，聚氯乙烯，聚醋酸乙烯酯，羟丙基甲基纤维素，甲基纤维素，聚己酸内酯，聚乙二醇，聚甲基丙烯酸甲酯，海藻酸钠和羟乙基纤维素中的一种或多种；

方法六：将盛有式 I 化合物的第一样品瓶敞口置于盛有饱和盐溶液或水的第二样品瓶中，密封第二样品瓶，室温静置；所述溶剂不没过第一样品瓶的瓶口；

优选地，所述饱和盐溶液为无机盐饱和溶液；

优选地，所述无机盐饱和溶液为饱和乙酸钾溶液、饱和碳酸钾溶液、饱和溴化钠溶液、饱和溴化钾溶液；

优选地，体系的湿度为 15~100% RH；

方法七、式 I 化合物的悬浮液在温度循环下搅拌、离心，收集固体；

所述悬浮液中的溶剂选自正庚烷、甲基丁基醚、苯甲醚、二环己胺、丙酮、乙醇、乙酸乙酯、甲基环己烷、三氯甲烷、2-丁酮、间二甲苯、水中的一种或多种；

优选地，所述温度循环的条件包括：50 ℃~5 ℃，0.1~0.5 ℃/min，循环至少 2 次；

方法八、将式 I 化合物在正溶剂中完全溶解，搅拌条件下向澄清溶液中滴加反溶剂，至有固体析出；若无固体析出，则采用悬浮搅拌；若仍无固体析出，则降温悬浮搅拌后，澄清溶液在室温下挥发；

所述正溶剂选自乙醇、乙酸乙酯、2-甲基四氢呋喃、2-丁酮、乙腈、二氯甲烷、1,4-二氧六环中的一种或多种；

所述反溶剂选自正庚烷、四氢呋喃和水中的一种或多种；

方法九、式 I 化合物的浑浊液置于室温磁力搅拌，离心，收集固体；

所述浑浊液的溶剂选自异丁醇、甲基叔丁基醚、环己烷、甲苯、乙酸异丙酯、水、甲基环己烷、四氢呋喃、正戊烷、丙酮、异丙醇、环戊基甲醚、甲醇、对异丙基甲苯、二氯甲烷、正庚烷、乙腈、1,4-二氧六环、N-甲基吡咯烷酮中的一种或多种；

方法十、称取式 I 化合物于 HPLC 瓶中，向 HPLC 瓶中加入溶剂，加热搅拌平衡后过滤取上清液；将所述上清液放置在生物培养箱中，以 0.05 ℃/分钟从 50 ℃降温至 5 ℃后并在 5 ℃保持恒温，澄清溶液转移至-20 ℃下恒温，收集析出的固体，转移未析出固体的样品至室温下进行挥发；

所述溶剂选自异丙醇、苯甲醚、乙酸异丙酯、四氢呋喃和水中的一种或多种；

优选地，加热至的温度为 45-55 ℃，优选为 50 ℃；

方法十一、将式 I 化合物的悬浮液搅拌，离心，收集固体；

所述悬浮液中的溶剂选自正丁醇、甲苯、二异丙基醚、甲基环己烷、异丙苯、苯甲醚、水、石油醚、二环己胺、2-甲基四氢呋喃、正己烷、2-丁酮、乙酸异丙酯、三氯甲烷、间二甲苯、四氢呋喃、甲基异丁基酮、环戊基甲醚和苄醇中的一种或多种；

优选地，所述悬浮液在 45-55 ℃下搅拌。

13. 权利要求 3 所述式 I 化合物的游离碱晶型 B 的制备方法，其中，包括如下步骤：

将式 I 化合物的游离酸晶型 A 溶解于 1,4-二氧六环后在正己烷气氛中气液扩散，获得所述式 I 化合物的游离碱晶型 B。

14. 权利要求 11 所述式 I 化合物的药学上可接受的盐的制备方法，其包括如下步骤：将式 I 化合

物或式 I 化合物的游离碱晶型 A 与成盐试剂在合适的溶剂中混合得到混合液；

优选地，所述成盐试剂为权利要求 4 中的无机酸或有机酸；

所述式 I 化合物的游离碱晶型 A 为权利要求 2 所述晶型中的游离碱晶型 A。

15. 一种药物组合物，其中，药物组合物包含权利要求 1-10 任一项所述式 I 化合物或其药学上可接受的盐的晶型、权利要求 11 所述式 I 化合物药学上可接受的盐中的一种或多种；

优选地，所述式 I 化合物药学上可接受的盐为式 I 化合物的盐酸盐、马来酸盐、对甲苯磺酸盐、苯磺酸盐、丙二酸盐；

优选地，所述盐的晶型为式 I 化合物的盐酸盐晶型 A、马来酸盐晶型 A、对甲苯磺酸盐晶型 A、苯磺酸盐晶型 A、丙二酸盐晶型 A。

16. 权利要求 1-10 任一项所述式 I 化合物或其药学上可接受的盐的晶型、权利要求 11 所述式 I 化合物药学上可接受的盐、或者权利要求 15 所述药物组合物在制备治疗药物中的用途；

优选地，所述用于治疗 and/or 预防 P2X3 相关疾病；

优选地，所述 P2X3 相关疾病包括：疼痛、生殖泌尿系统疾病或呼吸系统疾病；

优选地，所述疼痛包括：炎性疼痛、手术疼痛、内脏疼痛、牙痛、经前期疼痛、中枢性疼痛、由灼伤所致疼痛、偏头痛或簇性头痛；优选地，所述的生殖泌尿系统疾病包括：尿失禁、膀胱过度活动症、排尿困难、膀胱炎、子宫内膜异位症、子宫内膜异位症相关疼痛；优选地，所述呼吸系统疾病包括：咳嗽、特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺疾病；

优选地，所述咳嗽包括亚急性或慢性咳嗽、治疗抗性咳嗽、特发性慢性咳嗽、病毒感染后咳嗽、医源性咳嗽、与呼吸系统疾病相关的咳嗽。

17. 一种治疗和/或预防与 P2X3 相关疾病的方法，该方法包括向患者施用治疗有效剂量的包含如权利要求 1-10 任一项所述式 I 化合物或其药学上可接受的盐的晶型、权利要求 11 所述式 I 化合物药学上可接受的盐、或者权利要求 15 所述药物组合物。

18. 一种权利要求 1-10 任一项所述晶型的质量检测方法，包括使用高效液相色谱法检测所述晶型的含量；所述高效液相色谱法采用的流动相包括流动相 A 和流动相 B；

所述流动相 A 为甲酸（FA）和乙腈（ACN）的水溶液；所述流动相 B 为乙腈；

优选地，所述流动相 A 为 0.05-0.15% 甲酸和 2-7% 乙腈的水溶液，示例性为 0.1% 甲酸和 5% 乙腈的水溶液；

优选地，所述质量检测方法包括：纯度检测方法、溶解度检测方法、稳定性检测方法；

优选地，所述高效液相色谱法采用梯度洗脱；

优选地，所述流动相的流速为 1 ± 0.2 mL/min；所述梯度洗脱的时间为 5-60min；更优选为 10-30min；

优选地，所述梯度洗脱中流动相 A：流动相 B 的体积比=1:9-9:1。