

二芳基硫代乙内酰脲化合物结晶

相关申请的引用：

本申请要求于 2019 年 02 月 01 日向中华人民共和国国家知识产权局提交的第 CN201910104953.5 号中国发明专利申请的权益和优先权，在此将其全部内容以援引的方式整体并入本文中。

技术领域

本申请属于医药领域，具体而言涉及二芳基硫代乙内酰脲化合物的结晶、其制备方法以及其在制备治疗雄激素介导的相关疾病的药物的用途。

背景技术

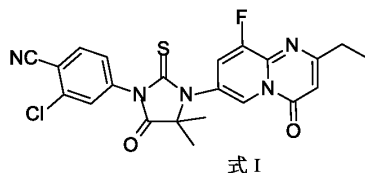
雄激素受体(AR) 属于核受体超家族中的类固醇受体，当与雄激素(如睾酮和二氢睾酮等)结合后，AR 从热休克蛋白形成的复合体中被释放出来，进行磷酸化反应，形成二聚体，并转移到细胞核内，结合到与它相关的 DNA 片段上，从而刺激其目标基因的转录。配体结合所激活的雄激素受体的转录活性由共活化子(co-activators)的蛋白质协调而完成。AR 拮抗剂的主要作用是直接阻止睾酮或二氢睾酮与雄激素受体结合，阻断雄激素对细胞的作用，起到抗雄激素和抑制细胞增长的作用，最终促使细胞凋亡，达到治疗前列腺癌的重要作用。由 Medivation& Astell as 公司开发的雄激素受体拮抗剂恩杂鲁胺(Enzalutamide)已经上市。

鉴于雄激素受体拮抗剂的重要作用，开发适合作治疗药物的雄激素受体拮抗剂显得尤为重要。

发明内容

本申请提供了用作雄激素受体拮抗剂的二芳基硫代乙内酰脲化合物 2-氯-4-(3-(2-乙基-9-氟-4-氧代-4H-吡啶并[1,2-a]嘧啶-7-基)-4,4-二甲基-5-氧代-2-硫代咪唑烷-1-基)苯甲腈(式 I 化合物)的结晶，其在生物活性、安全性、药代动力学、生物利用度、吸湿性、稳定性、溶解性、纯度、易制备等至少一方面具有优异的性质，进而满足药物在生产、储存和制剂等方面的需求。

一方面，本申请提供了式 I 化合物的结晶，



另一方面，本申请提供式 I 化合物的结晶，其特征在于，使用 Cu K α 辐射的 X-射线粉末衍射图谱中，在 $2\theta=13.47^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.32^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.98^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $18.68^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $23.11^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $26.41^\circ\pm0.2^\circ$ 处有衍射峰。

在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物的结晶，其特征在于，使用 Cu K α 辐射的 X-射线粉末衍射图谱中，在 $2\theta=13.01^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.47^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $14.00^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.32^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.98^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $18.68^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $22.78^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $23.11^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $24.49^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $26.41^\circ\pm0.2^\circ$ 处有衍射峰；在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物的结晶，其特征在于，使用 Cu K α 辐射的 X-射线粉末衍射图谱中，在 $2\theta=9.34^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.01^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.47^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $14.00^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.32^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.98^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $18.68^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $22.78^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $23.11^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $24.49^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $25.85^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $26.41^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $30.73^\circ\pm0.2^\circ$ 处有衍射峰；在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物的结晶，其特征在于，使用 Cu K α 辐射的 X-射线粉末衍射图谱中，在 $2\theta=9.34^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.01^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.47^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.78^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $14.00^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.32^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.72^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.98^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $18.68^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $22.31^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $22.78^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $23.11^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $24.49^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $25.85^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $26.05^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $26.41^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $26.65^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $30.73^\circ\pm0.2^\circ$ 处有衍射峰；在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物的结晶，其特征在于，使用 Cu K α 辐射的 X-射线粉末衍射图谱中，在 $2\theta=9.34^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.01^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.47^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $13.78^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $14.00^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.32^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.72^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $15.98^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $18.68^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $19.12^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $21.69^\circ\pm0.2^\circ$ 、 $22.31^\circ\pm0.2^\circ$ 、

22.78°±0.2°、23.11°±0.2°、23.39°±0.2°、24.49°±0.2°、24.83°±0.2°、25.38°±0.2°、25.85°±0.2°、26.05°±0.2°、26.41°±0.2°、26.65°±0.2°、30.73°±0.2°、31.08°±0.2°、32.15°±0.2°、32.75°±0.2°、35.50°±0.2°、35.87°±0.2°处有衍射峰。

在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物的结晶的使用 Cu K α 辐射的 X-射线粉末衍射图谱中，衍射峰的峰位置及相对强度由下表 1 表示：

表 1 式 I 化合物的结晶的 X 射线粉末衍射图谱的衍射峰的峰位置及相对强度

编号	2 θ ±0.2 (°)	相对强度 (%)	编号	2 θ ±0.2 (°)	相对强度 (%)
1	9.34	9.7	15	23.39	4.5
2	13.01	15.8	16	24.49	15.6
3	13.47	43.6	17	24.83	4.6
4	13.78	7.6	18	25.38	6.4
5	14.00	21.3	19	25.85	13.8
6	15.32	100.0	20	26.05	14.2
7	15.72	9.0	21	26.41	37.0
8	15.98	32.0	22	26.65	11.4
9	18.68	38.5	23	30.73	14.1
10	19.12	7.2	24	31.08	5.7
11	21.69	4.9	25	32.15	6.4
12	22.31	7.6	26	32.75	4.7
13	22.78	19.7	27	35.50	6.7
14	23.11	39.3	28	35.87	4.3

在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物结晶的 X-射线粉末衍射 (XRPD) 图谱如图 1 所示。

在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物结晶，其差示扫描量热 (DSC) 在 238.92°C 处有吸收峰。

在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物结晶，其差示扫描量热 (DSC) 图谱如图 2 所示。

在本申请的一些实施方案中，本申请的式 I 化合物结晶，其热重分析 (TGA) 图谱如图 3 所示。

另一方面，本申请提供了式 I 化合物的结晶的制备方法，所述方法包括将式 I 化合物和溶剂混合，析出结晶。

在本申请的一些实施方案中，上述制备式 I 化合物的结晶的方法，其中混合时间不小于 48 小时。

在本申请的一些实施方案中，上述制备式 I 化合物的结晶的方法，其中混合在振荡或搅拌的条件下进行。在本申请的一些具体实施方案中，混合在搅拌的条件下进行。

在本申请的一些实施方案中，上述制备式 I 化合物的结晶的方法，其中所述方法为：将式 I 化合物加入到溶剂中制备成混悬液，然后通过混合混悬液析出结晶。

在本申请的一些实施方案中，上述式 I 化合物的结晶的制备方法，其中溶剂选自甲醇、乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙腈、丙酮、甲醇和水的组合、乙醇和水的组合、或者丙酮和水的组合。

在本申请的一些实施方案中，上述式 I 化合物的结晶的制备方法，其中溶剂选自甲醇。

在本申请的一些实施方式中，以式 I 化合物为 1g 计，则所需溶剂的体积为 5-50mL。

在本申请的一些实施方式中，以式 I 化合物为 1g 计，则所需溶剂的体积为 40 mL。

在本申请的一些实施方案中，上述制备式 I 化合物的结晶的方法，其中所述方法在加热的条件下进行，例如加热温度为 35~70℃；在本申请一些实施方案中，加热温度为 40~60℃；在本申请的一些具体实施方案中，加热温度为 40℃。

在本申请的一些实施方案中，上述制备式 I 化合物的结晶的方法，其中混合步骤在避光条件下进行。

在本申请的一些实施方式中，上述制备式 I 化合物的结晶的方法，其中所述方法还包括将析出的结晶进行分离，例如通过过滤或离心进行分离；在本申请的一些具体的实施方式中，还包括将分离的结晶进行干燥。

另一方面，本申请提供了结晶组合物，其包含占所述结晶组合物的重量的 50wt% 以上，优选 80wt% 以上，更优选 90wt% 以上，最优选 95wt% 以上的式 I 化合物的结晶。

另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含治疗有效量的式 I 化合物的结晶或其结晶组合物。在一些实施方案中，本申请的药物组合物还包括药学上可接受的辅料。

再一方面，本申请提供了治疗哺乳动物由雄激素介导的疾病的方法，包括对需要该治疗的哺乳动物，优选人类，给予治疗有效量的式 I 化合物结晶或其结晶组合物、或它们的药物组合物；所述疾病包括但不限于细胞增殖性疾病（例如癌症）。

还一方面，本申请提供了式 I 化合物结晶或其结晶组合物、或它们的药物组合物在制备治疗由雄激素介导的疾病的药物中的用途，所述疾病包括但不限于细胞增殖性疾病（例如癌症）。

又一方面，本申请提供了式 I 化合物结晶或其结晶组合物、或它们的药物组合物治疗由雄激素介导的疾病的用途，所述疾病包括但不限于细胞增殖性疾病（例如癌症）。

又一方面，本申请提供了用于治疗由雄激素介导的疾病的式 I 化合物结晶或其结晶组合物、或它们的药物组合物，所述疾病包括但不限于细胞增殖性疾病（例如癌症）。

在本申请的一些实施方案中，所述疾病为前列腺癌。

本申请中，X-射线粉末衍射光谱测定的仪器型号为 Bruker D8 Advance 射线衍射仪，光管：Cu, K-Alpha, (u, K- $\text{Alp}\text{\AA}$)。

本申请中，DSC 光谱在下述条件下测定：仪器：TA Q2000 差示扫描量热仪；温度范围：30~300℃；升温速率：10℃/min，在 50mL/min N_2 条件下。

本申请中，TGA 热重分析在下述条件下测定：仪器：TA Q5000IR 热重分析仪；温度范围：室温到 300℃ 或失重 20%；升温速率：10℃/min，在 50mL/min N_2 条件下。

对于任何给定的结晶形式而言，由于例如结晶形态等因素引起的优选取向，衍射峰的相对强度可以改变，这在结晶学领域中是公知的。存在优选取向影响的地方，峰强度是改变的，但是晶型的衍射峰位置是无法改变的。此外，对任何给定的晶型而言，峰的位置可能存在轻微误差，这在结晶学领域中也是公知的。例如，由于分析样品时温度的变化、样品的移动、或仪器的标定等，峰的位置可以移动，2 θ 值的测量误差有时约为 ± 0.2 度，因此，本领域技术人员公知在确定每种结晶结构时，应该将此误差考虑在内。

DSC 测定当结晶由于其结晶结构发生变化或结晶熔融而吸收或释放热时的转变温度。对于同种化合物的同种晶型，在连续的分析中，热转变温度和熔点误差典型的在约 5℃ 之内，当我们说一个化合物具有给定的 DSC 峰或熔点时，这是指该 DSC 峰或熔点 $\pm 5^\circ\text{C}$ 。DSC 提供了一种辨别不同晶型的辅助方法。不同的结晶形态可根据其不同的转变温度特征而加以识别。需要指出的是对于混合物而言，其 DSC 峰或熔点可能会在更大的范围内变动。此外，由于在物质熔化的过程中伴有分解，因此熔化温度与升温速率相关。

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、过敏性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”，作为药学上可接受的盐，例如，可以提及金属盐、铵盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或者酸性氨基酸形成的盐等。

所述“药学上可接受的辅料”是指与活性成份一同给药的、有利于活性成份给药的惰性物质，包括但不限于国家食品药品监督管理局许可的可接受的用于人或动物（例如家畜）的任何助流剂、增甜剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、矫味增强剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、崩解剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。所述辅料的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各类淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

术语“药物组合物”是指一种或多种本申请的化合物或其盐与药学上可接受的辅料组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。

本申请的药物组合物可通过将本申请的化合物与适宜的药学上可接受的辅料组合而制备，例如可配制成固态、半固态、液态或气态制剂，如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、膏剂、乳剂、悬浮剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球及气溶胶等。

给予本申请所述晶型或其药物组合物的典型途径包括但不限于口服、直肠、局部、吸入、肠胃外、舌下、阴道内、鼻内、眼内、腹膜内、肌内、皮下、静脉内给药。

本申请的药物组合物可以采用本领域众所周知的方法制造，如常规的混合法、溶解法、制粒法、制糖衣丸法、磨细法、乳化法、冷冻干燥法等。

在一些实施方案中，药物组合物是口服形式。对于口服给药，可以通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的辅料混合，来配制该药物组合物。这些辅料能使本申请的化合物被配制成片剂、丸剂、锭剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、浆剂、悬浮剂等，用于对患者的口服给药。

本申请化合物的治疗剂量可根据例如以下而定：治疗的具体用途、给予化合物的方式、患者的健康和状态，以及签处方医师的判断。本申请化合物在药用组合物中的比例或浓度可不固定，取决于多种因素，它们包括剂量、化学特性(例如疏水性)和给药途径。

术语“治疗”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以改善或消除疾病或与所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：

- (i) 抑制疾病或疾病状态，即遏制其发展；
- (ii) 缓解疾病或疾病状态，即使该疾病或疾病状态消退。

术语“预防”意为将本申请所述化合物或制剂进行给药以预防所述疾病相关的一个或多个症状，且包括：预防疾病或疾病状态在哺乳动物中出现，特别是当这类哺乳动物易患有该疾病状态，但尚未被诊断为已患有该疾病状态时。

本申请所述晶型的治疗有效量为从约 0.0001 到 20mg/Kg 体重/天，例如从 0.001 到 10mg/Kg 体重/天。

本申请所述晶型的剂量频率由患者个体的需求决定，例如，每天 1 次或 2 次，或每天更多次。给药可以是间歇性的，例如，其中在若干天的期间内，患者接受晶型的每日剂量，接着在若干天或更多天的期间，患者不接受晶型的每日剂量。

术语“治疗有效量”意指(i)治疗或预防特定疾病、病况或障碍，(ii)减轻、改善或消除特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状，或(iii)预防或延迟本文中所述的特定疾病、病况或障碍的一种或多种症状发作的本申请化合物的用量。构成“治疗有效量”的本申请化合物的量取决于该化合物、疾病状态及其严重性、给药方式以及待被治疗的哺乳动物的年龄而改变，但可例行性地由本领域技术人员根据其自身的

知识及本公开内容而确定。

在以下的说明中,包括某些具体的细节以对各个公开的实施方案提供全面的理解。然而,相关领域的技术人员会认识到,不采用一个或多个这些具体的细节,而采用其它方法、部件、材料等的情况下可实现实施方案。

除非本申请中另外要求,在整个说明书和其后的权利要求书中,词语“包括(comprise)”及其英文变体例如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”应解释为开放式的、含括式的意义,即“包括但不限于”。

在整个本说明书中提到的“一实施方案”或“实施方案”或“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”意指在至少一实施方案中包括与该实施方案所述的相关的具体参考要素、结构或特征。因此,在整个说明书中不同位置出现的短语“在一实施方案中”或“在实施方案中”或“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”不必全部指同一实施方案。此外,具体要素、结构或特征可以任何适当的方式在一个或多个实施方案中结合。

应当理解,在本申请说明书和附加的权利要求书中用到的单数形式的冠词“一”(对应于英文“a”、“an”和“the”)包括复数的对象,除非文中另外明确地规定。因此,例如提到的包括“催化剂”的反应包括一种催化剂,或两种或多种催化剂。还应当理解,术语“或”通常以其包括“和/或”的含义而使用,除非文中另外明确地规定。

附图说明

图1 实施例2制备的式I化合物的结晶的XRPD图;

图2 实施例2制备的式I化合物的结晶的DSC图;

图3 实施例2制备的式I化合物的结晶的TGA图;

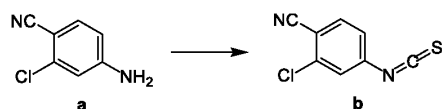
图4 实施例2制备的式I化合物的结晶的DVS图。

具体实施方式

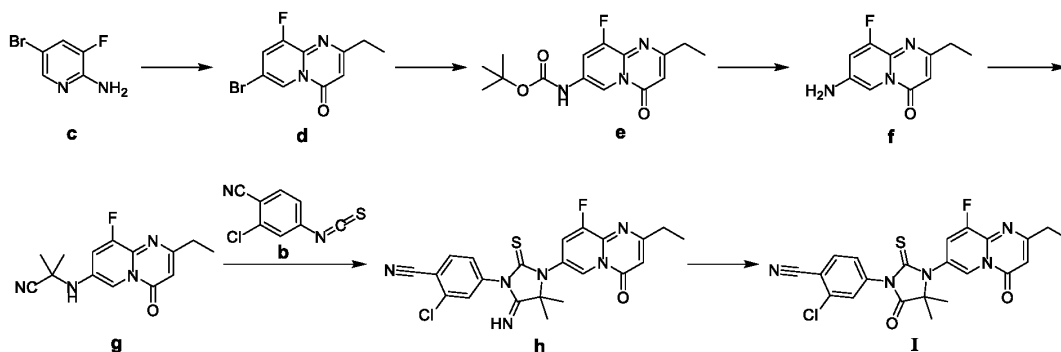
下面的具体实施例,其目的是使本领域的技术人员能更清楚地理解和实施本申请。它们不应该被认为是对本申请范围的限制,而只是本申请的示例性说明和典型代表。本领域技术人员应该理解:还有形成本申请化合物的其它合成途径,下面提供的是非限制性的实施例。

除非另有说明,本申请使用的原料都是市场上直接买到未经进一步纯化直接使用的。本申请使用的溶剂都是市场上直接买到未经特殊处理直接使用的。

实施例1: 式I化合物的制备



步骤1: 向单口瓶中加入水(10mL), 然后逐滴加入硫光气(1.13g), 氮气保护, 25 °C 搅拌 0.5 小时后, 分批加入化合物 a (1.00g), 25 °C 继续反应 2 小时。反应液用二氯甲烷 (10mL×3) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (15mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩, 浓缩残留物使用柱层析纯化得到化合物 b。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.67 (d, J=8.38Hz, 1H), 7.37 (d, J=1.98Hz, 1H) 7.21 (dd, J=8.38, 1.98Hz, 1H)。



步骤 2: 向化合物 c (4.00g) 的乙酸 (40mL) 溶液中加入丙酰乙酸甲酯 (4.00g)。加热到 110℃ 搅拌 94 小时。向反应液中补加丙酰乙酸甲酯 (8.26g), 继续搅拌 16 小时。反应液浓缩。浓缩物经乙酸乙酯 (80mL) 稀释, 加入饱和碳酸氢钠水溶液 (80mL), 分液, 有机相经饱和食盐水 (80mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩。浓缩残留经硅胶柱纯化得到化合物 d。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm 8.89 (s, 1H), 7.45 (dd, J=2.0, 8.0 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 2.70 (q, J=7.5 Hz, 2H), 1.25 (t, J=7.5 Hz, 3H)。

步骤 3: 向微波管中加入化合物 d (500mg)、氨基甲酸叔丁酯 (324mg)、碳酸铯 (1.50g)、4,5-二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 (107mg)、双(二亚苄基丙酮) 钼 (170mg) 和甲苯 (6mL)。封管, 120℃ 下微波反应 30 分钟。反应液过滤, 乙酸乙酯 (20mL) 洗涤, 滤液减压浓缩。浓缩残留经硅胶柱纯化, 得到化合物 e。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm 8.90 (s, 1H), 8.15 (br s, 1H), 7.57 (br s, 1H), 6.32 (s, 1H), 2.71 (q, J=7.5Hz, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.26 (t, J=7.5Hz, 3H)。

步骤 4: 向化合物 e (200mg) 的二氯甲烷 (2mL) 溶液中加入三氟乙酸 (0.4mL), 所得反应液 26℃ 下搅拌 4 小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠水溶液 (pH 约为 7), 二氯甲烷 (20mL) 萃取。有机相经饱和食盐水 (15mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到化合物 f。LCMS (ESI) m/z: 208 (M+1)。

步骤 5: 在干燥的反应瓶中加入化合物 f (300mg)、氯化锌 (59mg)、硫酸钠 (823mg)、丙酮 (505mg)、三甲基氧硅烷 (431mg) 和四氢呋喃 (3mL), 氮气保护, 25℃ 反应 4 小时。将反应液直接浓缩, 浓缩残留物使用制备 TLC 方法纯化得到化合物 g。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.52 (s, 1H), 7.33 (dd, J=9.98, 2.32Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 2.78 (q, J=7.65Hz, 2H), 1.78 (s, 6H), 1.33 (t, J=7.59Hz, 3H)。

步骤 6: 在干燥反应瓶中加入化合物 g (200mg)、化合物 b (568mg) 和甲苯 (2mL) 以及 DMF (0.5mL), 氮气保护, 加入氢化钠 (44mg, 60% 纯度), 25℃ 反应 0.5 小时。将反应液浓缩, 浓缩残留物使用柱层析方法纯化得到化合物 h。

步骤 7: 在干燥的反应瓶中加入化合物 h (110mg) 和甲苯 (1.1mL) 以及冰乙酸 (1.1mL), 氮气保护, 110℃ 反应 16 小时。将反应液浓缩, 浓缩残留物使用制备 HPLC 纯化得式 I 化合物, X 射线粉末衍射显示为无定形物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm 8.83 (s, 1H), 7.84 (d, J=8.16Hz, 1H), 7.68 (d, J=1.98Hz, 1H), 7.51 (dd, J=8.27, 2.09Hz, 1H), 7.41 (dd, J=8.71, 2.09Hz, 1H), 6.49 (s, 1H), 2.82 (q, J=7.57Hz, 2H), 1.68 (s, 6H), 1.36 (t, J=7.61Hz, 3H)。LCMS (ESI) m/z: 470 (M+1)。

实施例 2 式 I 化合物的结晶的制备

取 50.1 mg 根据实施例 1 制备得到的 式 I 化合物加入到 4.0 mL 反应瓶中, 加入 2.0mL 的甲醇, 形成悬浊液。将上述悬浊液置于磁力加热搅拌器上 (40℃) 进行搅拌 (避光), 40℃ 下搅拌 2 天后离心, 分离固体, 将固体干燥过夜得式 I 化合物的结晶。所得结晶的 XRPD 结果如图 1 所示, DSC 结果见图 2, TGA 结果见图 3。

实施例 3 式 I 化合物对雄激素受体 (AR) 核转运的拮抗作用

1. 将 PathHunter NHR 细胞株复苏并培养扩增。

2. 将细胞在测试前种到384孔板上,并在37℃条件下孵育。培养用血清用炭-葡萄糖过滤过的以降低其中的荷尔蒙水平。
3. 在拮抗功能检测时,化合物加到细胞中孵育60分钟,式I化合物的工作浓度为从10 μ M以3 倍浓度梯度稀释,分别为:10000、3333.3、1111.1、370.4、123.5、41.2、13.7、4.67nM,随后加入激动剂6 α -Fluorotestosterone 0.06 μ M(浓度为EC₈₀,即80%激动的化合物浓度)在37℃或室温下孵育3-16小时。
4. 信号检测:加入12.5 μ L或者15 μ L(50%, v/v) PathHunter检测混合液(试剂盒: DiscoverX产品目录号: 93-0001系列),并在室温下孵育1小时。PerkinElmer Envision™仪器读取化学发光信号。
5. 数据分析:化合物活性使用CBIS数据分析软件(ChemInnovation, CA)进行分析,拮抗剂的抑制百分比计算公式如下: IC₅₀抑制率(%)=100% $\times$ (1-(待测化合物平均RLU值-空白对照组平均RLU值)/(EC₈₀对照平均RLU值-空白对照组平均RLU值))。

实施例1的式I化合物对雄激素受体(AR)核转运的拮抗作用测试结果IC₅₀为0.95 μ M。

实施例4 式I化合物的药代动力学测试

1. 摘要

以雄性CD-1小鼠为受试动物,应用LC/MS/MS法测定小鼠静脉和灌胃给与式I化合物后不同时刻血浆中的药物浓度。研究式I化合物在小鼠体内的药代动力学行为,评价其药动学特征。

2. 实验方案

2.1 试验药品: 式I化合物

2.2 试验动物: 健康成年雄性 CD-1 小鼠 4 只,按照体重相近的原则分成 2 组,每组 2 只。动物购买自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号: SCXK(沪)2013-0016。

2.3 药物配制

称取适量样品,按照体积比例 10:40:50 依次加入适量 DMSO、PEG400 和水,搅拌超声后达到 0.4 mg/mL 的澄清状态用于静脉给药。

称取适量样品,加入到 0.5%CMC+0.2%Tween 80 溶液中,搅拌超声后达到 0.4 mg/mL 的混悬状态用于灌胃给药。

2.4 给药

雄性 CD-1 小鼠 4 只,分成 2 组,禁食一夜后,第一组进行静脉给药,给药体积为 2.5mL/kg,剂量为 1mg/kg;第二组进行灌胃给药,给药体积为 5mL/kg,剂量为 2mg/kg。

3. 操作

雄性CD-1小鼠静脉给与式I化合物后,分别在0.0833, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24及48小时交叉采血30 μ L,置于含有2 μ L EDTA-K₂的试管中。灌胃给药组给与式I化合物后,分别在0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24及48小时交叉采血30 μ L,置于含有2 μ L EDTA-K₂的试管中。试管在3000g离心15分钟分离血浆,并于-60℃保存。给药4小时后动物可进食。

用LC/MS/MS 法测定小鼠静脉和灌胃给药后,血浆中的待测化合物含量。方法的线性范围为2.00~6000nmol/L;血浆样品经乙腈沉淀蛋白处理后进行分析。

式I化合物的药代动力学测试结果如下表2所示。

表2 式I化合物药代动力学测试结果

测试化合物	给药方式	给药剂量	血药浓度	达峰时间	半衰期	表观分布容积	清除率	曲线面积(0-t)	曲线面积(0-inf)	生物利用度
			C _{max}	T _{max}	T _{1/2}	V _{dss}	Cl	AUC _{0-last}	AUC _{0-inf}	(%)

			(nM)	(h)	(h)	(L/kg)	(mL/min/kg)	(nM.h)	(nM.h)	
实施例1的式I化合物	静脉给药	1mg/kg	—	—	36.6	0.248	0.0794	271453	447238	—
	灌胃给药	2mg/kg	12850	8.00	ND	—	—	369659	ND	68.1

注：“—”表示该项不用检测；ND表示未检测到该数据。

实施例5 式I化合物的组织分布测试

1. 摘要

以雄性CD-1小鼠为受试动物，应用LC/MS/MS法测定小鼠分别灌胃给与式I化合物后血浆和脑中的药物浓度。

2. 实验方案

2.1 试验药品：式I化合物

2.2 试验动物：健康成年雄性CD-1小鼠2只。动物购买自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。

2.3 药物配制

称取适量样品，用0.5%CMC/0.2%Tween水溶液，搅拌超声后达到0.4mg/mL的混悬状态。

2.4 给药

雄性CD-1小鼠2只，禁食一夜后，灌胃给药，给药体积为5mL/kg，剂量为2mg/kg。

3. 操作

雄性CD-1小鼠灌胃给与式I化合物后，在4小时心脏穿刺采血100μL，置于含有2μL EDTA-K₂的试管中，3000g 离心15分钟分离血浆30μL，并于-60℃保存。同时采集脑组织，冲洗过后，用9倍的15mM PBS/MeOH (v:v, 2:1)匀浆，并于-60℃保存。给药4小时后动物可进食。

用LC/MS/MS 法测定小鼠灌胃给药后，血浆和脑中待测化合物的含量。方法的线性范围为2.00~6000nmol/L；血浆样品经乙腈沉淀蛋白处理后进行分析。

组织分布测试结果如表3所示。

表3 组织分布测试结果

化合物	血浆浓度	脑中浓度	脑血比
	(nM)	(nmol/kg)	
实施例1的式I化合物	8260	265	0.0322

实施例6 式I化合物对人前列腺癌LNCaP-FGC细胞皮下异种移植肿瘤模型的体内药效学研究

1. 实验设计

表4 受试物配制方法

化合物	配制方法	浓度 (mg/mL)	储存条件
Vehicle	5%DMSO+40%PEG400+10%Solutol+45%H ₂ O	—	4℃
实施例1的式I化合物	称取12.6 mg 式I化合物，加入0.63 mL DMSO，涡旋至溶解，加入5.04 mL PEG400，1.26 mL Solutol和5.67 mL H ₂ O涡旋至	1	4℃

10 mg/kg	均一溶液		
实施例1的式I化合物	称取25.2 mg 式I化合物，加入0.63 mL DMSO，涡旋至溶解，加入5.04 mL PEG400，1.26 mL Solutol和5.67 mL H ₂ O涡旋至均一溶液	2	4℃
20 mg/kg	均一溶液		

注：在给动物给药前需要轻轻将药物充分混匀。

表5 体内药效实验动物分组及给药方案

组别	动物数	化合物治疗	剂 量 (mg/kg)	给药体积参数 (μL/g)	给药途径	给药频次
1	6	Vehicle	—	10	PO	QD x 21天
2	6	实施例1的式I化合物	10	10	PO	QD x 21天
3	6	实施例1的式I化合物	20	10	PO	QD x 21天

2. 实验材料

2.1 实验动物

种属：小鼠

品系：CB-17 SCID小鼠

周龄及体重：6-8周龄，体重18-22克

性别：雄性

供应商：北京维通利华实验动物技术有限公司

动物合格证号：11400700184227

3. 实验方法与步骤

3.1 细胞培养

人前列腺癌LNCaP-FGC细胞(ATCC, 马纳萨斯, 弗吉尼亚州)体外单层培养, 培养条件为RPMI1640培养基中加10%胎牛血清, 37℃ 5% CO₂培养。一周两次用胰酶-EDTA进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为80%-90%时, 收取细胞, 计数, 接种。

3.2 肿瘤细胞接种

将0.2 mL (10×10⁶) LNCaP-FGC细胞(10 × 10⁶ + Matrigel, 1:1)皮下接种于每只CB-17 SCID小鼠的右后背。肿瘤平均体积达到100-150mm³时开始分组给药。

3.3 肿瘤测量

每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为： $V = 0.5a \times b^2$, a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短径。化合物的抑瘤疗效用TGI(%)或相对肿瘤增殖率T/C(%)评价。TGI(%)=【(1- (某处理组给药结束时平均瘤体积-该处理组开始给药时平均瘤体积)/(Vehicle对照组治疗结束时平均瘤体积-Vehicle对照组开始治疗时平均瘤体积)】×100%。相对肿瘤增殖率T/C(%)：计算公式如下： $T/C \% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100 \%$ (T_{RTV} : 治疗组RTV; C_{RTV} : 阴性对照组RTV)。根据肿瘤测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV), 计算公式为 $RTV = V_t / V_0$, 其中 V_0 是分组给药时(即 d_0)测量所得平均肿瘤体积, V_t 为某一次测量时的平均肿瘤体积, T_{RTV} 与 C_{RTV} 取同一天数据。

3.4 统计分析

统计分析, 包括每个组的每个时间点的肿瘤体积的平均值和标准误(SEM)。治疗组在试验结束时给药后第21天表现出最好的治疗效果, 因此基于此数据进行统计学分析评估组间差异。两组间比较用T-test进行分析, 三组或多组间比较用one-way ANOVA进行分析, 如果F值有显著性差异, 应用Games-Howell法进行检验。如果F值无显著性差异, 应用Dunnet (2-sided)法进行分析。用SPSS 17.0进行

所有数据分析。p < 0.05认为有显著性差异。

4. 实验结果

给药21天后，式I化合物在10 mg/kg和20mg/kg剂量下与溶剂对照组相比均具有显著的抑瘤作用(T/C分别为T/C=43.93%和32.37%；TGI 分别为TGI=62.75%和76.16%；p值分别为p=0.003和p<0.001)。同时动物对上述受试化合物都具有良好的耐受性。

实施例7：式I化合物的结晶的吸湿性研究

仪器型号：SMS DVS Advantage 动态蒸汽吸附仪

测试条件：取实施例2制备得到的式I化合物结晶样品（10~15 mg）置于DVS样品盘内进行测试。

详细的DVS参数如下：

平衡：dm/dt=0.01 %/min（最短：10 min，最长：180 min）

干燥：0% RH 下干燥 120 min

温度：25℃

RH（%）测试梯级：10%

RH（%）测试梯级范围：0% - 90% - 0%

实验结果：

所得动态蒸汽吸附（DVS）图如图4所示， $\Delta W\% = 1.018\%$ 。

注： $\Delta W\%$ 表示受试品在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $80 \pm 2\%$ RH 下的吸湿增重。

实施例8：式I化合物的结晶的固体稳定性研究实验

结晶稳定性试验的条件和方法根据中国药典（2010版）二部附录XIX C 原料药与药物制剂稳定性试验指导原则的要求进行，以实施例2制备得到的结晶为试验样品，研究不同影响因素条件下的结晶固体的稳定性。

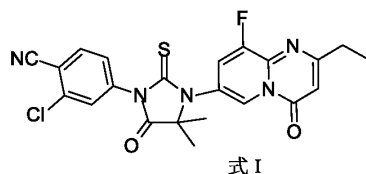
高效液相色谱分析方法（HPLC）：色谱柱：Waters xbridge shiled RP18 (150mm*4.6mm,3.5um) PN:186003045；波长：228nm；流动相A：pH 4.5 5mmol/L 醋酸钠缓冲溶液(磷酸调pH)，流动相B：乙腈，洗脱方式：梯度洗脱。实验结果见表6。

表6 式I化合物结晶稳定性分析

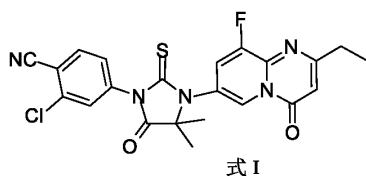
稳定性研究条件	式I化合物结晶纯度
起始试验样品	99.17%
92.5%RH，室温，10天	99.18%
92.5%RH，室温，10天	99.14%
75%RH，40℃，10天，	99.15%
75%RH，40℃，1月	99.17%
75%RH，40℃，2月	99.14%
75%RH，40℃，3月	99.16%
75%RH，60℃，10天	99.16%
75%RH，60℃，1天	99.14%
可见光1200000Lux，紫外200W，用锡箔纸包裹样品，室温完全暴露放样	99.13%

权利要求

1. 式 I 化合物的结晶,



2. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物的结晶, 其特征在于, 使用 Cu K α 辐射的 X-射线粉末衍射图谱中, 在 $2\theta=13.47^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.32^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.98^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $18.68^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $23.11^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $26.41^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 处有衍射峰; 或者, 在 $2\theta=13.01^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $13.47^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $14.00^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.32^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.98^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $18.68^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $22.78^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $23.11^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $24.49^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $26.41^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 处有衍射峰; 或者, 在 $2\theta=9.34^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $13.01^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $13.47^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $14.00^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.32^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.98^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $18.68^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $22.78^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $23.11^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $24.49^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $25.85^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $26.41^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $30.73^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 处有衍射峰; 或者, 在 $2\theta=9.34^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $13.01^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $13.47^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $13.78^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $14.00^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.32^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.72^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $15.98^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $18.68^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $22.31^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $22.78^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $23.11^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $24.49^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $25.85^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $26.05^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $26.41^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $26.65^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 、 $30.73^{\circ}\pm 0.2^{\circ}$ 处有衍射峰。
3. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物的结晶, 其特征在于, 所述结晶的 X-射线粉末衍射 图谱如图 1 所示。
4. 一种式 I 化合物结晶, 其差示扫描量热在 238.92°C 处有吸收峰



5. 如权利要求 7 所述的式 I 化合物的结晶, 其特征在于, 所述结晶的差示扫描量热图谱如图 2 所示。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述式 I 化合物的结晶的制备方法, 所述方法包括将式 I 化合物和溶剂混合, 析出结晶。
7. 如权利要求 6 所述式 I 化合物的结晶的制备方法, 其中溶剂选自甲醇、乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、乙腈、丙酮、甲醇和水的组合、乙醇和水的组合、或者丙酮和水的组合。
8. 如权利要求 6 所述式 I 化合物的结晶的制备方法, 以式 I 化合物为 1g 计, 则所需溶剂的体积为 5-50mL。
9. 结晶组合物, 其包含占所述结晶组合物的重量的 50wt% 以上, 优选 80wt% 以上, 更优选 90wt% 以上, 最优选 95wt% 以上权利要求 1-5 中任一项所述的式 I 化合物的结晶。
10. 药物组合物, 其包含治疗有效量权利要求 1-5 中任一项所述的式 I 化合物的结晶或权利要求 10 所述结晶组合物, 任选地还包括药学上可接受的辅料。
11. 治疗哺乳动物由雄激素介导的疾病的方法, 包括对需要该治疗的哺乳动物, 优选人类, 给予治疗有效量权利要求 1-5 中任一项所述的式 I 化合物结晶或权利要求 9 所述结晶组合物、或权利要求 10 所述的药物组合物, 所述疾病包括细胞增殖性疾病。
12. 权利要求 1-5 中任一项所述的式 I 化合物结晶或权利要求 9 所述结晶组合物、或权利要求 10 所述的药物组合物在制备治疗由雄激素介导的疾病的药物中的用途, 所述疾病包括细胞增殖性疾病。
13. 权利要求 1-8 中任一项所述的式 I 化合物结晶或权利要求 9 所述结晶组合物、或权利要求 10 所述的药物组合物治疗由雄激素介导的疾病的用途, 所述疾病包括细胞增殖性疾病。

14. 用于治疗由雄激素介导的疾病的权利要求 1-5 中任一项所述的式 **I** 化合物结晶或权利要求 9 所述结晶组合物、或权利要求 10 所述的药物组合物，所述疾病包括细胞增殖性疾病。
15. 权利要求 11 所述的方法、权利要求 12-13 所述的用途或权利要求 14 所述的结晶、结晶组合物或药物组合物，其中所述细胞增殖性疾病选自前列腺癌。