一种异丁酸酯核苷化合物的晶型及制备方法

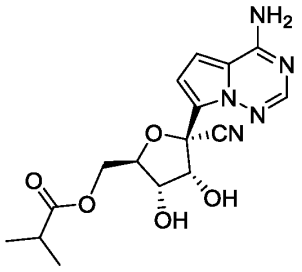
技术领域

本发明属于医药技术领域，涉及一种异丁酸酯核苷化合物的晶型及制备方法。

背景技术

2019 新型冠状病毒（严重急性呼吸综合征冠状病毒 2，SARS-CoV-2）是一种具有包膜的单链 RNA 病毒，为 β 属冠状病毒。与 SARS 和 MERS 类似，SARS-CoV-2 基因组编码非结构蛋白：3C 样蛋白酶(3-chymotrypsin-like protease，3CLpro)、木瓜蛋白酶样蛋白酶(papain-likeprotease，PLpro)、解旋酶(helicase)和 RNA 依赖 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase，RdRp)；结构蛋白：如棘突糖蛋白(spike glycoprotein)和附属蛋白(accessory proteins)。新冠病毒的表面棘突糖蛋白与人体细胞表面血管紧张素转换酶(ACE2)受体的结合从而感染人的呼吸道上皮细胞。病毒在进入宿主细胞后解体，将核衣壳和病毒 RNA 释放到细胞质中，病毒 RNA 5′末端开放阅读框(ORF1a/b)将编码多聚蛋白质(pp1a 和 pp1ab)，它们对病毒复制所需酶的加工、成熟起重要作用。pp1a 和 pp1ab 可被木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)和 3C 样蛋白酶(3CLpro)裂解，产生非结构蛋白，包括 RNA 依赖性 RNA 聚合酶和解螺旋酶等，它们对于新冠病毒的转录和复制的起着关键的作用。目前，冠状病毒识别受体的表面棘突糖蛋白、参与复制及转录过程的重要蛋白 3CLpro、PLpro 与 RdRp 是四个十分具有抗病毒药物研发吸引力的靶点。

式 A 所示化合物是作用于 RdRp 的具有良好口服生物利用度和良好体内外抗冠状病毒活性的核苷类似物，申请人已经申请了描述该化合物治疗病毒感染的应用专利和合成工艺专利详见中国专利申请：CN202111083730.9 和 CN202110621245.6



A

药物多晶型是药品研发中的常见现象，是影响药品质量的重要因素。同一药物的不同晶型在外观、溶解度、熔点、溶出度、生物有效性等方面可能会有显著不同，也会对药物的稳定性、生物利用度及疗效产生不同的影响。因此，在药品研发中，应全面考虑药品的多晶型问题。

发明人对式 A 所示化合物的晶型进行了相关研究，发现了制备工艺简单、稳定性好和溶解度高的晶型。

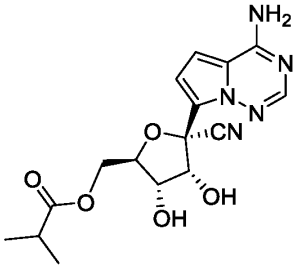
发明内容

本发明主要涉及式 A 所示化合物的晶型 III。本发明提供的部分晶型具有制备工艺简单、

制备重现性高有利于工业化生产，物理和化学稳定性好适合于制剂中使用、。

另一方面，本发明还提供了式 A 所示化合物晶型 IIII 的制备方法、组合物和用途等。

第一方面，本发明提供一种式 A 所示化合物的晶型。



A

一种式 A 所示化合物的晶型 III，，

在一些实施例中，所述式 A 所示化合物晶型 III 的 X 射线粉末衍射图谱在衍射角 2θ 为 8.47±0.2°、16.87±0.2°、17.47±0.2°、22.13±0.2°和 28.66±0.2°处有特征峰。

在一些实施例中，所述式 A 所示化合物晶型 I 的 X 射线粉末衍射图谱在衍射角 2θ 为 8.47±0.2°、16.87±0.2°、17.47±0.2°、22.13±0.2°、28.66±0.2°、10.52±0.2°、11.80±0.2°、14.04±0.2°处有特征峰。

在一些实施例中，所述式 A 所示化合物晶型 III 的 X 射线粉末衍射图谱在衍射角 2θ ±0.2°为 8.475、10.523、11.808、14.043、15.331、16.878、17.470、20.293、21.106、22.131、23.733、24.074 、24.545、24.915、 25.688、26.147、26.528、26.778、27.526、28.079、28.669、 30.126、30.783、31.044、 31.689、32.110、32.793、 33.304、 34.868、35.431 35.746 、36.494、37.007、37.887 处有特征峰。

在一些实施例中，所述式 A 所示化合物晶型 III 的 X 射线粉末衍射图谱基本如图 1 所示，所述式 A 所示化合物晶型 III 的差示扫描量热曲线(DSC)基本上如图 4 所示，热重分析曲线(TGA)基本上如图 5 所示；在一些实施例中，所述晶型 III 是基本上纯净的，所述晶型 III 基本上不含有一种或多种其它晶型。

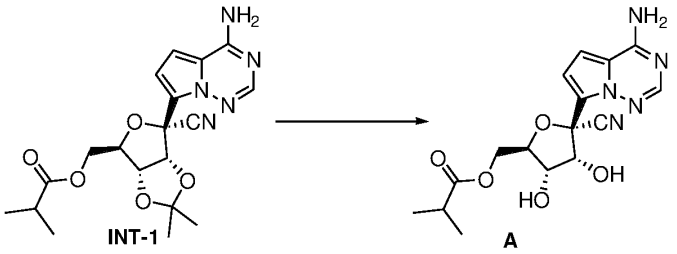
第二方面，本发明提供一种制备第一方面所述式 A 所示化合物晶型 III 的方法。

一种制备第一方面所述式 A 所示化合物晶型 III 的方法，其包括：

取式 A 所示化合物，室温下溶解于水中，冷却至-5.0℃-5.0℃，加入酯类溶剂，析出固体，过滤，滤饼挥干溶剂，得到所述晶型；

每 100 克所述式 A 所示化合物，所述水的用量可以为 200ml-500ml，酯类溶剂的用量为 100ml-200ml。在一些实施例中，每一克所述式 A 所示化合物，所述水的用量为 50-300ml，酯类溶剂的用量为 50-200ml。在一些实施例中，所述酯类溶剂选自甲酸甲酯、乙酸乙酯或乙酸异丁酯等。

在一些实施例中，所述晶型 III 的方法，其包括：在 20℃-30℃下，往反应容器中加入水，加入有机酸，再加入 INT-1，室温下搅拌 24 小时以上，取样检测（INT-2 的峰面积小于 0.5%）视为反应结束，冷却至-5.0℃-5.0℃，加入酯类溶剂，加入碱性水溶液调节至 pH 7-8，搅拌 1 小时以上，过滤，滤饼水洗



在一些实施例中，所述有机酸为甲酸或乙酸，所述有机酸与水的体积比为 3:1 至 1:1，优选为约 2:1；所述酯类溶剂选自甲酸甲酯、乙酸乙酯或乙酸异丁酯等。

第三方面，本发明提供一种组合物。

一种组合物，其包含第一方面所述的晶型和药学上可接受的辅料。

按照质量比计算，所述晶型为组合物总质量的至少 0.05%-95%。

第四方面，本发明提供一种前述晶型或前述组合物的用途。

所述药物组合物包含中药成分和/或西药成分。所述西药成分包括：阿匹莫德、R 82913、DS-6930、ONO 5334、瑞德西韦、磷酸奥司他韦、汉防己甲素、氯法齐明、阿司咪唑、重组人源血管紧缩素转换酶 2 或法匹拉韦和/或它们的药学上可接受的盐中的至少一种。

第一方面所述的晶型或第三方面所述的组合物在制备预防、缓解和/或治疗病毒感染，或病毒的复制或繁殖及其所产生的细胞病变效应的产品中的用途。

第一方面所述的晶型或第三方面所述的组合物在制备预防、缓解和/或治疗冠状病毒感染，或其同源变异病毒的复制或繁殖及其所产生的细胞病变效应的产品中的用途。

所述冠状病毒包括：MHV-A59、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV，MERS-CoV、SARS-CoV-2、小鼠肝炎病毒、猫传染性腹膜炎病毒、犬冠状病毒、牛冠状病毒、禽传染性支气管炎病毒或猪冠状病毒。

有益效果

相比现有技术，本发明具有以下技术效果：本发明所提供的式 A 所示化合物的晶型 III 物理和化学稳定性良好，有利于储存，从而符合药物稳定性的要求，溶解性好，生物利用度高；生产工艺简单，有利于工业化生产。

术语定义

除非另外说明，否则如本文使用的以下术语和短语意图具有以下含义：

“本发明所述化合物”意指式 A 所示化合物或其药学上可接受的盐、互变异构体、多晶型物、异构体和溶剂合物。同样地，短语“式 A 所示化合物”意指该式的化合物和其药学上可接受的盐、互变异构体、多晶型物、异构体和溶剂合物。

本发明中，如“化合物 A”和“式 A 所示化合物”的表述，表示的是同一个化合物。

术语“晶型”是指因分子内或分子间键合方式不同，致使分子在晶格空间排列不同，形成不同的晶体结构。

术语“基本上纯净的”是指一种晶型基本上不含有一种或多种其它晶型，其晶型纯度至少 60%，或至少 70%，或至少 80%，或至少 85%，或至少 90%，或至少 93%，或至少 95%，或至少 98%，或至少 99%，除此主要晶型，还可以混合少量的其它晶型，其他晶型的重量

百分比少于 20%，或少于 10%，或少于 5%，或少于 3%，或少于 1%，或少于 0.5%，或少于 0.1%，或少于 0.01。

术语“基本上不含有一种或多种其它晶型”是指其它晶型的含量在总重量中百分比少于 20%，或少于 10%，或少于 5%，或少于 3%，或少于 1%，或少于 0.5%，或少于 0.1%，或少于 0.01。

术语“基本上如图所示”是指 X-射线粉末衍射图中至少 50%，或至少 60%，或至少 70%，或至少 80%，或至少 90%，或至少 95%，或至少 99%的峰出现在所给出的 X-射线粉末衍射图中。

在本发明上下文中，无论是否使用“大约”或“约”等字眼，所有在此公开了的数字均为近似值。每一个数字的数值有可能会出现 1%、2%、5%、7%、8%、10%、15%或 20%等差异。每当公开一个具有 N 值的数字时，任何具有 N+/-1%，N+/-2%，N+/-3%，N+/-5%，N+/-7%，N+/-8%，N+/-10%，N+/-15%或 N+/-20%值的数字会被明确地公开，其中“+/-”是指加或减。每当公开一个数值范围中的一个下限，RL，和一个上限，RU，时，任何处于该公开了的范围之内的数值会被明确地公开。特别是，包含了该范围内的以下数值：R=RL+K*(RU-RL)，其中 K 是一个按 1%的增量增加的从 1%到 100%的变量。如：1%、2%、3%、4%、5%...50%、51%、52%……95%、96%、97%、98%、99%或 100%。另外，还特别包含了在此公开了的上述以两个 R 数字定义的数值范围。

在本发明的上下文中，X-射线粉末衍射图中的 2θ 值均以度(°)为单位。

“V/V”表示体积比。IC_{50}表示半数抑制浓度。

“wt%”表示该组分占混合物总质量的质量百分比。

本发明中“室温”指的是环境温度，温度由大约 10℃到大约 40℃。在一些实施例中，“室温”指的是温度由大约 20℃到大约 30℃；在另一些实施例中，“室温”指的是温度由大约 25℃到大约 30℃；在又一些实施例中，“室温”指的是 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃等。

本文使用的术语“治疗”，除非另外表明，否则意指逆转、减轻该术语所适用的病症或疾患或这样的病症或疾患的一个或多个症状、抑制所述病症或疾患或其一个或多个症状的进展或防止所述病症或疾患或其一个或多个症状。如本文使用的术语“治疗”是指治疗行为，如“治疗”在上文刚定义的。

仪器参数

除非参数中另行规定，以下所有分析都在室温下进行。

X-射线粉末衍射研究

在装配有自动化 3*15 零背景样品架的透射反射样品台的荷兰 PANalytical Empyrean X-射线衍射仪上收集 X-射线粉末衍射图谱。所用辐射源为(Cu，kα，Kα1(Å)：1.540598；Kα2(Å)：1.544426；Kα2/Kα1 强度比例：0.50)，其中电压设定在 45KV，电流设定在 40mA.X-射线的束发散度，即样品上 X-射线约束的有效尺寸，为 6.6mm.采用 θ - θ 连续扫描模式，得到 3° -40° 的有效 2θ 范围。取适量样品在环境条件(约 18℃-32℃)下于零背景样品架圆形凹槽处，用洁净的载玻片轻压，得到一个平整的平面，并将零背景样品架固定。将样品以 0.013° 的扫描步长在 3-40° 2θ ±0.2° 范围内产生传统的 X 射线粉末衍射图谱。用于数据收集的软件为 Data Collector ，数据用 Data Viewer 和 HighScore Plus 分析和展示。

晶型的高效液相色谱（HPLC）检测

液相色谱分析所用到的仪器为安捷伦 HPLC 1260 系列，用于样品固态稳定性研究的分析。

附图说明

图 1 示本发明实施例制备的晶型 III 的 X 射线粉末衍射检测谱图，

图 2 示本发明实施例制备的晶型 III 放置在不同条件下的样品的 X 射线粉末衍射检测谱图，

图 3 示本发明实施例制备的晶型 III 溶解在不同溶媒中的 X 射线粉末衍射检测谱图，

图 4 示本发明实施例制备的晶型 III 的差示扫描量热曲线(DSC)，

图 5 示本发明实施例制备的晶型 III 的热重分析曲线(TGA)。

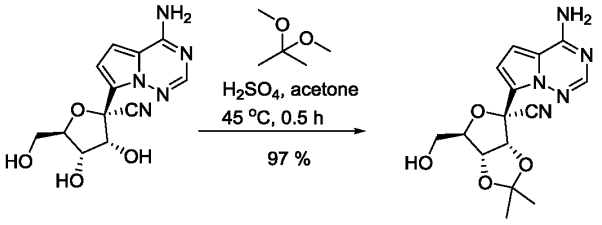
具体实施方式

为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案，下面进一步披露一些非限制实施例以对本发明作进一步的详细说明。

本发明所使用的试剂均可以从市场上购得或者可以通过本发明所描述的方法制备而得。

本发明中，μM 表示微摩尔每升；mmol 表示毫摩尔；equiv 表示当量；aw 表示水分活度。

实施例 1. (3a*R*,4*R*,6*R*,6a*R*)-4-(4-氨基吡咯[2,1-*f*][1,2,4] 三嗪-7-基)-6-(羟甲基-2,2-二甲基四氢呋喃[3,4-*d*][1,3] 间二氧杂环戊烷基-4-甲腈 (化合物 5)的合成



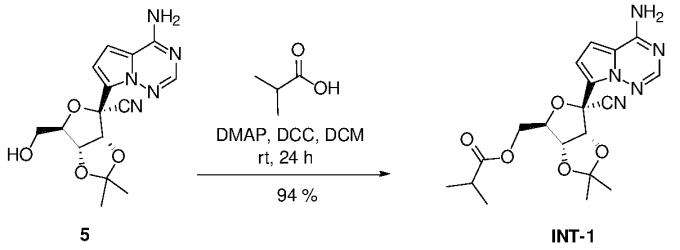
69-0 **5**

将 5.62 g 的化合物 69-0 溶于 30 mL 丙酮中，再加入 11.50 mL 的 2,2-二甲氧基丙烷和 1.34 mL 的 98%的硫酸，45℃搅拌半小时，冷却至室温，旋转蒸发除去有机溶剂。用 100 mL 的乙酸乙酯和 100 mL 的饱和碳酸氢钠溶液萃取，重复萃取三次，合并乙酸乙酯层，加入无水硫酸钠干燥，过滤除去硫酸钠。旋转蒸发除去有机溶剂，经过柱层析分离（洗脱液为：石油醚/乙酸乙酯（v/v）= 1/2）得到 6.20 g 化合物 **5**（白色固体，产率 97%）。取所得化合物 **5** 检测氢谱，结果如下：

氢谱：^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.95 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 4.8, 2.4 Hz, 1H), 5.77 (s, 2H), 5.42 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 5.24 (dd, *J* = 6.6, 2.4 Hz, 1H), 4.67 (q, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J* = 12.5, 1.9 Hz, 1H), 3.84 (dd, *J* = 12.5, 1.7 Hz, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.40 (s, 3H)。

实施例 2. ((3a*R*,4*R*,6*R*,6a*R*)-6-(4-氨基吡咯[2,1-*f*][1,2,4] 三嗪-7-基)-6-氰基-2,2-二甲基四氢呋喃[3,4-d][1,3] 间二氧杂环戊-4-基) 甲基异丁酸酯(化合物 INT-1)

的合成



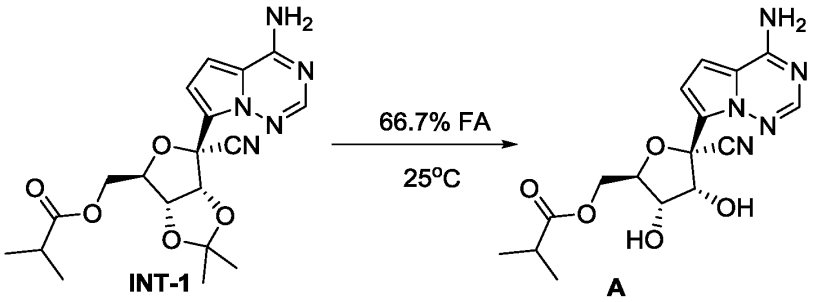
5 INT-1

将 1.50 g 的化合物 **5** 溶于 15 ml 的二氯甲烷中，再加入 0.42 mL 异丁酸和 55.40 mg 的 4-二甲氨基吡啶，搅拌 10 min 后，加入 1.02 g 的二环已基碳二亚胺，室温搅拌 24 h。经过柱层析分离（洗脱液为：石油醚/乙酸乙酯（v/v）= 1/1），得到 1.71 g 化合物 **INT-1**（白色固体，产率 94%）。取得到的化合物 **INT-1** 检测氢谱和碳谱，结果如下：

氢谱：^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, ZQF-RD01-2) δ (ppm): 7.99 (s, 1H), 6.99 (d, *J*=4.6 Hz, 1H), 6.62 (d, *J*=4.6 Hz, 1H), 5.72 (br, 2H), 5.49 (d, *J*=6.8 Hz, 1H), 4.93-4.90 (dd, *J*=6.8 Hz, 4.3 Hz, 1H), 4.61-4.58 (q, *J*=4.4 Hz, 1H), 4.44-4.26 (m, 2H), 2.61-2.50 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.17-1.14 (q, *J*=3.8 Hz, 6H)。

碳谱：^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, ZQF-RD01-2) δ (ppm): 176.7, 155.2, 147.3, 123.5, 117.2, 116.7, 115.6, 112.6, 100.0, 83.8, 83.0, 82.0, 81.4, 63.1, 33.8, 26.4, 25.6, 18.9。

实施例 3：((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-5-(4-氨基吡咯[2,1-*f*][1,2,4] 三嗪-7-基)-5-氰基-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲基异丁酸酯(化合物 A)的合成



INT-1 A

在 20℃-30℃下，往反应容器中加入水（310ml），加入甲酸（620mL），再加入 INT-1 (1.0eq,93g)，室温下搅拌 24 小时以上，取样检测（INT-1 的峰面积小于 0.5%）视为反应结束，冷却至-5.0℃-5.0℃，加入乙酸乙酯（186ml），加入 50%碳酸钠水溶液调节至 pH 7-8，搅拌 1 小时以上，过滤，滤饼水洗（288ml x 3）得到化合物 A。

实施例 4：晶型表征检测

取实施例 1 制备得到的化合物，分别进行 X 射线粉末衍射检测、差示扫描量热检测和热重分析检测，结果分别见图 1-图 3，获得一种化合物 A 的新晶型，命名为晶型 III。

实施例 5：晶型 III 的动态水蒸气吸附检测

动态水蒸气吸附检测结果显示晶型 III 不具有吸湿性，在 80%RH，25℃的条件下，增重<0.2%，且测试后晶型未发生改变，证明晶型 III 的晶型稳定性好。

实施例 6：晶型 III 的研磨实验

取晶型 III 用研钵和研杵手动研磨 5 分钟，并对研磨后固体进行 XRPD 测试。研磨五分钟后，晶型没有改变，说明晶型 III 的晶型物理稳定性好。

实施例 7：固态稳定性测试

将一定量化合物 A 晶型 III 样品放置于 40 °C/75% RH （开口）和 60 °C（闭口）条件下一周，样品进行 XRPD 和 HPLC 测试，结果如下表。晶型 III 在两种加速条件下 14 天，物理化物稳定。

表 1 固态稳定性测试结果

样品	初始纯度（峰面积%）	纯度-1 周 （峰面积%）		晶型-1 周	
		60 °C&闭口	40 °C/75%RH 开口	60 °C&闭口	40 °C/75%RH 开口
样品 1	99.71%	99.71%	99.68%	未改变	未改变
样品 2		99.65%	99.71%	未改变	未改变

实施例 8：溶解度测试结果

化合物 A 晶型 III 在生物媒介（SGF，FaSSIF 和 FeSSIF）和水中 37 °C 溶解度测试结果见下表。晶型 III 在 SGF 中具有最高的溶解度（> 7 mg/mL）。在纯水，FeSSIF 和 FaSSIF 中的溶解度均大于 1 mg/mL。溶解度测试后溶液 pH 没有明显变化。

表 2 溶解度测试结果

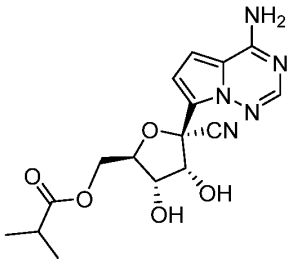
溶媒	溶解度 (mg/mL)			XRPD (24 h)	pH (24 h)
	0.5 h	2 h	24 h		
SGF (pH=1.20)	>7*			N/A	1.37
FeSSIF (pH=4.97)	1.63	1.66	1.68	晶型 III	4.96
FaSSIF (pH=6.53)	1.22	1.26	1.19	晶型 III	6.50
Water (pH=6.67)	1.11	1.22	1.24	晶型 III	6.43

*肉眼观察

本发明的方法已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明内。

权利要求书

1. 式 A 所示化合物的晶型，



A ，

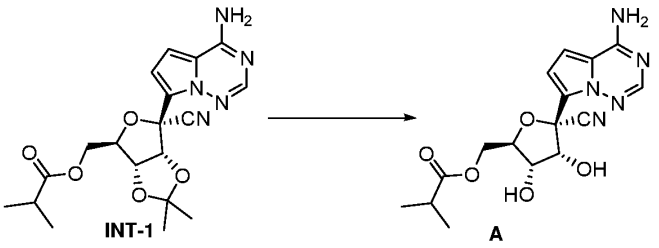
其特征在于，晶型 III 的 X 射线粉末衍射图谱在衍射角 2θ 为 8.47±0.2°、16.87±0.2°、17.47±0.2°、22.13±0.2°和 28.66±0.2°处有特征峰。

2. 根据权利要求 1 所述的晶型，所述晶型 III 的 X 射线粉末衍射图谱在衍射角 2θ 为 8.47±0.2°、16.87±0.2°、17.47±0.2°、22.13±0.2°、28.66±0.2°、10.52±0.2°、11.80±0.2°、14.04±0.2°处有特征峰。

3. 根据权利要求 1 所述的晶型，所述晶型 III 的 X 射线粉末衍射图谱在衍射角 2θ ±0.2°为 8.475、10.523、11.808、14.043、15.331、16.878、17.470、20.293、21.106、22.131、23.733、24.074 、24.545、24.915、 25.688、26.147、26.528、26.778、27.526、28.079、28.669、 30.126、30.783、31.044、 31.689、32.110、32.793、 33.304、 34.868、35.431 35.746 、36.494、37.007、37.887 处有特征峰。

4. 根据权利要求 1 所述的晶型，所述晶型 III 的 X 射线粉末衍射图谱基本如图 1 所示。

5. 一种制备权利要求 1-8 任一项所述晶型 III 的方法，其包括：在 20℃-30℃下，往反应容器中加入水，加入有机酸，再加入 INT-1，室温下搅拌 24 小时以上，反应结束，冷却至-5.0℃-5.0℃，加入酯类溶剂，加入碱性水溶液调节至 pH 7-8，搅拌 1 小时以上，过滤，滤饼水洗，干燥,



INT-1 A

。

6. 如权利要求 5 所述的方法，所述所述有机酸为甲酸或乙酸，所述有机酸与水的体积比为 3:1 至 1:1。

7. 如权利要求 5 所述的方法，所述酯类溶剂选自甲酸甲酯、乙酸乙酯或乙酸异丁酯中的一种或多种。
8. 一种组合物，其包含权利要求 1-5 任一项所述的晶型和药学上可接受的辅料。
9. 如权利要求 1-5 任一所述的晶型或权利要求 8 所述的组合物在制备预防、缓解和/或治疗冠状病毒感染，或其同源变异病毒的复制或繁殖及其所产生的细胞病变效应的产品中的用途。
10. 如权利要求 9 所述的用途，所述冠状病毒包括：MHV-A59、HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV，MERS-CoV、SARS-CoV-2、小鼠肝炎病毒、猫传染性腹膜炎病毒、犬冠状病毒、牛冠状病毒、禽传染性支气管炎病毒或猪冠状病毒。