



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103664893 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 26

(21) 申请号 201210327012. 6

(22) 申请日 2012. 09. 07

(71) 申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眼大道
639 号

(72) 发明人 孙宏斌 赖增伟 柳军 张陆勇

(51) Int. Cl.

C07D 401/14 (2006. 01)

A61K 31/517 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

A61P 3/06 (2006. 01)

A61P 3/00 (2006. 01)

A61P 3/04 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 25/00 (2006. 01)

A61P 37/00 (2006. 01)

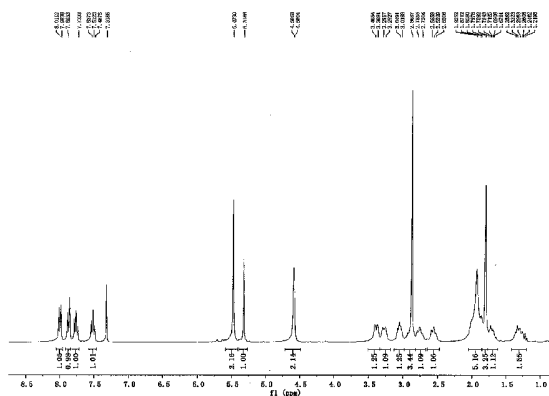
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

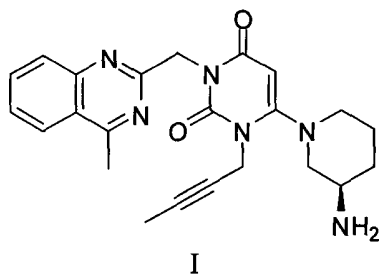
一种新型 DPP-4 抑制剂、其制备方法及其医药用途

(57) 摘要

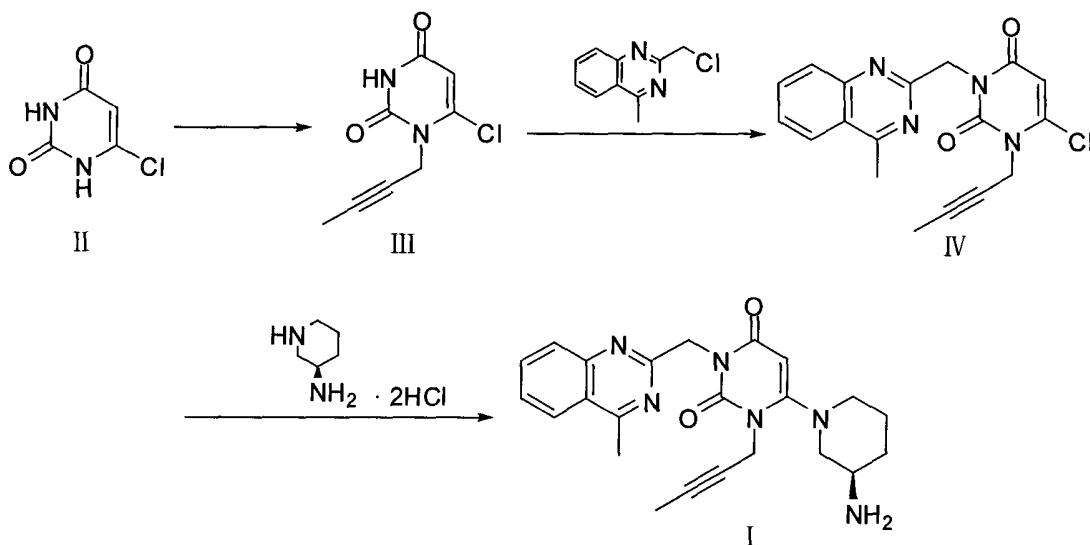
本发明涉及药物领域,具体涉及式 I 化合物、其制备方法及其作为新型 DPP-4 抑制剂的医药用途,特别是在制备抗糖尿病药物的应用。体内外药效学实验结果表明,本发明式 I 化合物对 DPP-4 具有显著的抑制作用,显示了优越的降糖效果,而且较同类药物利拉利汀的作用效果更强。同时本发明化合物制备路线简短,原料易得,工艺简单,适合工业化大规模生产,具有极大的开发前景。



1. 式 I 所示的 1-(2-丁炔-1-基)-6-[3(R)-氨基哌啶-1-基]-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮及其药学上可接受的盐：



2. 一种权利要求 1 所述式 I 化合物的制备方法,如下反应式：



包括下列步骤：

(1) 式 II 化合物与 1-溴-2-丁炔在碱存在下反应,得到式 III 化合物,所采用的碱选自三乙胺、吡啶、二异丙基乙胺、氢化钾、氢化钠、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸氢钾;所采用的反应溶剂选自乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、二氯甲烷、四氢呋喃、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中的一种或多种混合溶剂,优选 N,N-二甲基甲酰胺和二甲亚砜;反应温度为 0℃至 120℃,优选温度 0℃至 50℃;

(2) 式 III 化合物与 2-氯甲基-4-甲基喹唑啉在惰性气体保护下进行烷基化反应,得到式 IV 化合物,所采用的碱选自氢化钾、氢化钠、碳酸钾、碳酸钠、甲醇钠、甲醇钾、乙醇钠、乙醇钾、叔丁醇钠、叔丁醇钾、氢氧化钾、氢氧化钠;所采用的催化剂选自氯化锂、溴化锂、碘化钠、碘化钾;所采用的溶剂选自丙酮、乙醇、甲醇、叔丁醇、异丙醇、四氢呋喃、乙腈、水、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中的一种或多种混合溶剂;反应温度为 0℃至 160℃,优选 50℃至 100℃;

(3) 式 IV 化合物与 (R)-3-氨基哌啶双盐酸盐进行取代反应,得到式 I 化合物,所采用的碱选自碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸氢钾、氢氧化钠、氢氧化钾;所采用的催化剂选自分子筛、硅藻土、无水硫酸镁,优选分子筛;所采用的溶剂选自丙酮、正丁醇、正丙醇、乙醇、甲醇、叔丁醇、异丙醇、二氧六环、四氢呋喃、乙腈、水、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中的一种或多种混合溶剂;反应温度为 50℃至 160℃,优选 80℃至 120℃。

3. 如权利要求 1 所述式 I 化合物或其盐在制备治疗或预防收益于 DPP-4 抑制的疾病的

药物中的用途,所述的收益于 DPP-4 抑制的疾病选自糖尿病、糖尿病性酯血异常、葡萄糖耐量减低 (IGT) 症、禁食血浆葡萄糖减低 (IFG) 症、代谢性酸中毒、酮症、食欲调节、肥胖症、各种癌症、神经系统疾病、免疫系统疾病。

4. 如权利要求 3 所述,其中糖尿病是 2 型糖尿病。

5. 一种药物组合物,其包括权利要求 1 所述式 I 化合物或其药学上可接受的盐,和一种或几种药学上可接受的辅料。

6. 一种药物固体制剂,其包括权利要求 1 所述式 I 化合物或其药学上可接受的盐,和一种或几种药物制剂领域通常使用的添加剂。

一种新型 DPP-4 抑制剂、其制备方法及其医药用途

技术领域

[0001] 本发明涉及制药领域,具体涉及 1-(2-丁炔-1-基)-6-[3(R)-氨基哌啶-1-基]-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮,本发明还公开了此化合物的制备方法和医药用途,特别是作为 DPP-4 抑制剂,用于制备抗糖尿病及其并发症药物方面的用途。

背景技术

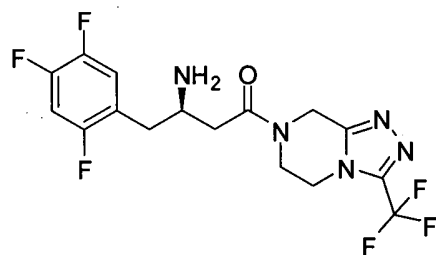
[0002] 糖尿病是一种缓慢进展性疾病,据估计,目前全世界约有糖尿病患者 2.4 亿,其发病率迅猛增加,预计到 2025 年将达到 3.8 亿,另外,每年约有 380 万人死于糖尿病,与死于艾滋患者数目相当,已成为仅次于肿瘤、心血管病之后的第三大危害人类健康的疾病。糖尿病患者中 90% 以上为 2 型糖尿病,因此目前主要的抗糖尿病药物研究都是针对 2 型糖尿病展开的。2 型糖尿病是一种主要由于胰岛素抵抗伴随相对胰岛素不足,胰岛素分泌缺陷伴有或不伴有胰岛素抵抗而导致慢性高血糖的代谢疾病。传统的降糖药主要有胰岛素增敏剂、胰岛素促分泌剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂 3 大类。这些药物主要存在体重增加、低血糖以及药效逐渐降低等不良反应,因此迫切需要研发新型降血糖药物。

[0003] 二肽基肽酶 (DPP-4) 抑制剂属于最新一代的抗糖尿病药物,是基于胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的治疗药物,具有控制血糖而不增加体重,且不会引起低血糖等优点。目前, DPP-4 抑制剂的研究已引起世界各大制药公司的关注,不同类型的小分子 DPP-4 抑制剂不断涌现。最具代表性的是已上市西他列汀 (sitagliptin)、沙格列汀 (saxagliptin)、利拉利汀 (linagliptin)、阿格列汀 (alogliptin)。

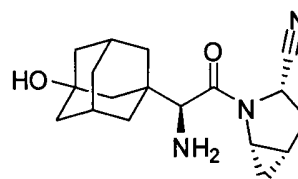
[0004] 利拉利汀是由勃林格殷格翰公司设计合成的一个 8-(3-氨基哌啶)-黄嘌呤衍生物 (WO 2004018468/CN 1675212),为活性很强的 DPP-4 抑制剂 ($IC_{50} = 1\text{nmol/L}$),具有高选择性、长效和口服有效的特点,同时具有良好的安全性和耐受性,已于 2011 年 5 月获 FDA 批准上市,用于治疗 2 型糖尿病。

[0005] 阿格列汀则是由武田公司开发的嘧啶二酮类 DPP-4 抑制剂 (WO 2005095381/CN 1926128),其 DPP-4 抑制活性 IC_{50} 为 7nmol/L 。已于 2010 年 4 月在日本上市,用于饮食控制加体育锻炼或饮食控制加 α -糖苷酶抑制剂治疗血糖控制仍不佳的成年 2 型糖尿病患者的单药治疗或者与噻唑烷二酮类联合治疗。由于其 DPP-4 抑制活性相对利拉利汀较差,临床用量也较大为每日 12.5-25mg。另外,该药的安全性还有待证实,2009 年 6 月, FDA 曾以心血管安全性数据不充分为由拒绝武田公司关于阿格列汀的上市申请,该公司于 2011 年 7 月再次递交了阿格列汀以及其与吡格列酮联合制剂的上市申请。近日, FDA 发布声明,暂时拒绝日本武田公司研发的阿格列汀以及其与吡格列酮联合制剂的上市申请,要求提供更多有效性和安全性证据。因而,阿格列汀的应用前景还有待观察。

[0006]

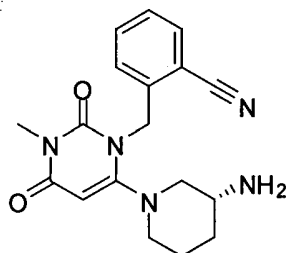


[0007] Sitagliptin(西他列汀)

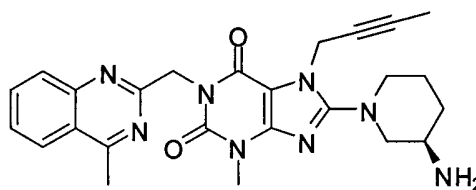


Saxagliptin(沙格列汀)

[0008]



[0009] Alogliptin(阿格列汀)



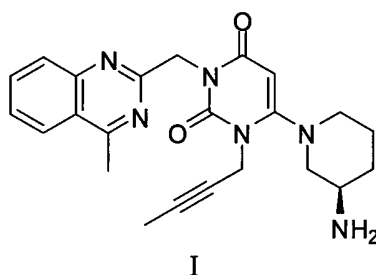
Linagliptin(利拉利汀)

[0010] 本发明的目的是开发活性更高、选择性更强、且心血管安全风险更低的新型降糖药。

发明内容

[0011] 本发明人惊奇地发现,所设计、合成的如式 I 所示的 1-(2-丁炔-1-基)-6-[3(R)-氨基哌啶-1-基]-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H)嘧啶二酮,其药效和安全性都优于阿格列汀和利拉利汀,有望开发成为一个可以应用于治疗糖尿病的新药。

[0012]



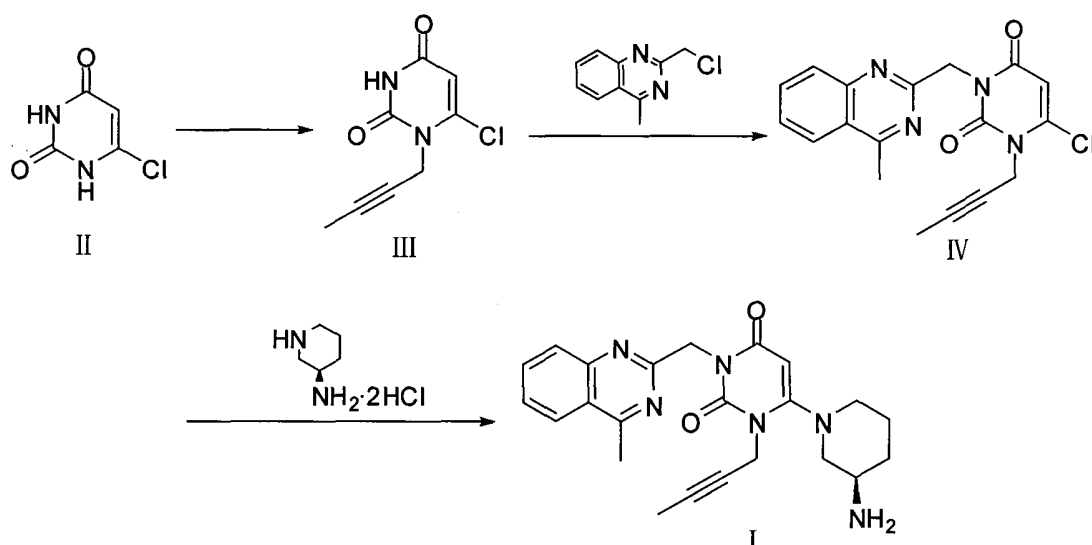
I

[0013] 本发明公开了式 I 化合物,其互变异构体、对映异构体、其混合物、前体药物及其盐,特别是与其无机或有机的酸生理学上可接受的盐,溶剂化物,多晶型物,其对于二肽基肽酶-4(DPP-4)活性具有显著的抑制作用,其在预防或治疗与增加 DPP-4 活性形式有关的疾病或症状或能通过降低 DPP-4 活性而防止或减轻疾病或症状的用途,特别是 I 型或 II 型糖尿病。

[0014] 本发明所包括的式 I 化合物的盐的形式为药学上可接受的盐,包括但不限于本发明化合物与下列酸形成的酸加成盐:盐酸、氢溴酸、三氟乙酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、乙酸、马来酸、富马酸、苹果酸、杏仁酸、樟脑磺酸、甲磺酸、苯磺酸、草酸、苯甲酸、琥珀酸。

[0015] 本发明的另一目的是提供了式 I 化合物的制备方法,如下反应式:

[0016]



[0017] 具体包括下列步骤:

[0018] (1) 式 II 化合物与 1-溴-2-丁炔(它们的摩尔比为 1:1.2)在碱(用量为式 II 化合物的 1~5 当量)存在下反应,得到式 III 化合物,所采用的碱选自三乙胺、吡啶、二异丙基乙胺、氢化钾、氢化钠、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸氢钾;所采用的反应溶剂选自乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、二氯甲烷、四氢呋喃、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中的一种或多种混合溶剂,优选 N,N-二甲基甲酰胺和二甲亚砜;反应温度为 0℃至 120℃,优选温度 0℃至 50℃;

[0019] (2) 式 III 化合物与 2-氯甲基-4-甲基喹啉(它们的摩尔比为 1:1.1)在惰性气体保护下进行烷基化反应,得到式 IV 化合物,所采用的碱选自氢化钾、氢化钠、碳酸钾、碳酸钠、甲醇钠、甲醇钾、乙醇钠、乙醇钾、叔丁醇钠、叔丁醇钾、氢氧化钾、氢氧化钠;所采用的催化剂选自氯化锂、溴化锂、碘化钠、碘化钾;所采用的溶剂选自丙酮、乙醇、甲醇、叔丁醇、异丙醇、四氢呋喃、乙腈、水、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中的一种或多种混合溶剂;反应温度为 0℃至 160℃,优选 50℃至 100℃;

[0020] (3) 式 IV 化合物与 (R)-3-氨基哌啶双盐酸盐(它们的摩尔比为 1:1.1)进行取代反应,得到化合物 I,所采用的碱选自碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸氢钾、氢氧化钠、氢氧化钾;所采用的催化剂选自分子筛、硅藻土、无水硫酸镁,优选分子筛;所采用的溶剂选自丙酮、正丁醇、正丙醇、乙醇、甲醇、叔丁醇、异丙醇、二氧六环、四氢呋喃、乙腈、水、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜中的一种或多种混合溶剂;反应温度为 50℃至 160℃,优选 80℃至 120℃;

[0021] 本发明提供的上述方法来制备式 I 化合物,制备路线简短,原料廉价易得,工艺简单,非常适合工业化大规模生产。

[0022] 本发明的又一目的是提供了 1-(2-丁炔-1-基)-6-[3(R)-氨基哌啶-1-基]-3-[(4-甲基喹啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H)嘧啶二酮即式 I 化合物作为 DPP-4 抑制剂在制备治疗糖尿病药物中的应用。

[0023] 药效学和毒理学研究表明,式 I 化合物对 DPP-4 具有超强的抑制活性,高于阿

格列汀和利拉利汀,并显示显著的降糖和增加胰岛素敏感性的作用。毒理学研究结果表明,式 I 化合物具有良好的安全性,毒副作用小于阳性对照药。可以预见本发明化合物开发成药后,其药效和安全性都将强于阿格列汀和利拉利汀。

附图说明

- [0024] 图 1 是式 III 化合物的核磁共振氢谱;
[0025] 图 2 是式 IV 化合物的核磁共振氢谱;
[0026] 图 3 是式 I 化合物的核磁共振氢谱;
[0027] 图 4 是式 I 化合物的 L-苹果酸盐核磁共振氢谱。

具体实施方式

[0028] 下面通过实施例具体说明本发明的内容。在本发明中,以下所述的实施例是为了更好的阐述本发明,并不是用来限制本发明的范围。凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均落入本发明的保护范围。

[0029] 实施例 1:1-(2-丁炔-1-基)-6-氯-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮 (III) 的合成

[0030] 将 6-氯尿嘧啶 (71g,480mmol),加入 200ml DMF,DIPEA(110ml,624mmol),冷却至 0℃,滴加 1-溴-2-丁炔 (48ml,528mmol),室温搅拌过夜,加入水 200ml 析出固体,过滤,水洗,乙酸乙酯洗,干燥得灰白色固体 81g,收率 85%。mp:216-217℃;¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 9.36(s,1H),5.90(s,1H),4.75(s,2H),1.81(s,3H). HRMS-ESI(m/z) calcd for C₈H₈N₂O₂Cl [M+H]⁺:199.0274, found 199.0276

[0031] 实施例 2:1-(2-丁炔-1-基)-6-氯-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮 (IV)

[0032] 取 1-(2-丁炔-1-基)-6-氯-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮 (III) (14.6g,73.5mmol), 2-氯甲基-4-甲基喹唑啉 (15.6g,80.8mmol),溴化锂 (5.69g,58.8mmol),60% 氢化钠 (3.82g,95.6mmol),加入 DMF 150ml 后,氮气环境下 80℃ 反应过夜,减压蒸馏除去 DMF,加入乙酸乙酯 100ml,200ml 异丙醚,冷却至 -20℃ 析出固体,过滤,乙酸乙酯洗,异丙醚洗,得淡黄色固体 21g,收率 80%。mp:153℃;¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 8.08(d, J = 8.3Hz, 1H),7.94(d, J = 8.2Hz,1H),7.85(ddd, J = 8.4,6.9,1.3Hz,1H),7.60(ddd, J = 8.1,6.9,1.2Hz,1H),6.12(s,1H),5.54(s,2H),4.89(dd, J = 4.5,2.2Hz,2H),2.95(s,3H),1.89(t, J = 2.3Hz,3H). HRMS-ESI(m/z) calcd for C₁₈H₁₆N₄O₂Cl [M+H]⁺:355.0962, found 355.0965

[0033] 实施例 3:1-(2-丁炔-1-基)-6-[3(R)-氨基哌啶-1-基]-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮 (I)

[0034] 取 1-(2-丁炔-1-基)-6-氯-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮 (IV) (8g,22.5mmol),NaHCO₃(9.45g,112.5mmol),4A 分子筛 (2.6g), (R)-3-氨基哌啶双盐酸盐 (4.67g,27mmol),加入 150ml 异丙醇,100℃ 下反应 2 小时,冷却至室温,过滤除去固体,减压浓缩,柱层析(二氯甲烷/甲醇/三乙胺 100:0.5:0.5)得淡黄色固体 8g,收率 85%。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 8.00(d, J = 8.2Hz,1H),7.87(d, J = 8.3Hz,1H),7.76(t, J = 7.5Hz,1H),7.51(t, J = 7.5Hz,1H),5.47(s,2H),5.32(s,1H),4.58(d, J = 1.9Hz,2H),3.39(d, J = 10.9Hz,1H),3.27(d, J = 11.7Hz,1H),3.13-2.98(m,1H),2.98-2.82(m,

3H), 2.76 (dd, $J = 15.4, 6.2$ Hz, 1H), 2.65–2.47 (m, 1H), 2.05–1.86 (m, 5H), 1.80 (s, 3H), 1.76–1.62 (m, 1H), 1.41–1.20 (m, 1H). HRMS-ESI (m/z) calcd for $C_{23}H_{27}N_6O_2 [M+H]^+$: 419.2195, found 419.2199

[0035] 实施例 4: 1-(2-丁炔-1-基)-6-[3(R)-氨基哌啶-1-基]-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮的 L-苹果酸盐

[0036] 取 1-(2-丁炔-1-基)-6-[3(R)-氨基哌啶-1-基]-3-[(4-甲基喹唑啉-2-基)甲基]-2,4-(1H,3H) 嘧啶二酮 (I) (1g, 2.39mmol), L-苹果酸 (336mg, 2.5mmol), 加入 20ml 乙醇溶解, 室温搅拌, 1 小时后逐渐析出固体, 搅拌过夜后, 过滤, 乙醇洗得 1.08g 黄色固体, 收率 82%。 1H NMR (500MHz, DMSO) δ 8.31–8.18 (m, 1H), 7.93 (m, 1H), 7.80 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.76–7.60 (m, 1H), 5.34 (s, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.70–4.43 (m, 2H), 3.87 (dd, $J = 10.2, 3.8$ Hz, 1H), 3.32 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 3.15 (s, 1H), 3.01 (s, 1H), 2.91–2.78 (m, 4H), 2.51–2.48 (dd, $J = 15.5, J = 10.2$, 2H), 2.32 (dd, $J = 15.5, 3.8$ Hz, 1H), 1.92 (d, $J = 22.7$ Hz, 2H), 1.83–1.73 (m, 3H), 1.68 (dd, $J = 9.1, 3.8$ Hz, 1H), 1.56 (s, 1H).

[0037] 实施例 5: 体外活性测试实验

[0038] 用于测量 DPP-4 活性和待测化合物的抑制作用的体外测定法是已知的, 借助本领域普通技术人员可以很容易地测定 DPP-4 抑制剂的蛋白酶抑制活性。

[0039] 1 实验目的

[0040] 测定式 I 化合物对 DPP-4 酶的抑制活性。

[0041] 2 实验材料

[0042] DPP-4 酶 (Cat:SE434-9090, Biomol), GP-AMC (Cat:P189-9090, Biomol), 黑色 96 孔板, 超级酶标仪, DPP-4 的分析缓冲液 (50mM Tris, pH = 7.5), AMC 标准品 (7-amino-4-methylcoumarin) (Cat:KI-107, Biomol)

[0043] 3 实验方法

[0044] (1) DPP-4 酶活性测定

[0045] 将 96 孔黑板平衡到室温, 使用反应缓冲液 1 : 50 倍稀释 500 μ M AMC 底物, 使得 AMC 底物的反应终浓度为 5 μ M, 每个孔需要 50 μ l 稀释好的底物溶液。向所有对照 I 孔, DPP-4 样品孔以及对照 II 孔中分别加入 50 μ l, 35 μ l 和 85 μ l 的反应缓冲液。使用反应缓冲液 1 : 50 倍稀释 DPP-4 酶, 向所有反应孔中除了对照 I 孔, 加入 15 μ l 稀释好的 DPP-4, 使得反应孔中 DPP-4 的酶量为 0.26MU/孔。向除了对照 II 孔外的所有反应孔中加入 50 μ l 稀释好的 AMC 底物溶液来起始反应。在超级酶标仪上连续读数 Ex : 380nm/Em : 460nm, 整个动态读数时间为 20 分钟, 每间隔 1 分钟读数 1 次。

[0046] (2) AMC 标准曲线的测定

[0047] 将 96 孔黑板平衡到室温, 使用反应缓冲液将 AMC 标准品 2 倍稀释, 得到的浓度依次为 15 μ M, 7.5 μ M, 3.75 μ M, 1.875 μ M, 0.938 μ M, 0.469 μ M, 0.235 μ M, 0.117 μ M, 0 μ M。然后向所有反应孔中依次加入不同稀释浓度的 AMC 标准品。向所有反应孔加入 35 μ l 反应缓冲液, 使用反应缓冲液 1 : 50 倍稀释 DPP-4 酶, 向所有反应孔中加入 15 μ l 稀释好的 DPP-4, 使得反应孔中 DPP-4 酶量为 0.26MU/孔。常温孵育 5 分钟后, 在超级酶标仪上读数 Ex : 380nm/Em : 460nm。

[0048] (3) DPP-4 抑制剂酶活性测试

[0049] 将 96 孔黑板平衡到室温,使用反应缓冲液 1 : 50 倍稀释 500 μ M AMC 底物,使得 AMC 底物的反应终浓度为 5 μ M,每个孔需要 50 μ l 稀释好的底物溶液。用反应缓冲液稀释 3 个待测化合物(本发明化合物、利拉利汀、阿格列汀),使其最终的筛选浓度为 10 μ M 开始,4 倍梯度稀释,共 10 个浓度点,每个稀释度做一个复孔。向 96 孔反应板上所有不同浓度的待测化合物测定孔中加入 25 μ l 反应缓冲液,并依次加入 10 μ l 稀释好的不同浓度的化合物到对应的反应孔中。对于阴性对照孔,加入 25 μ l 反应缓冲液和 10 μ l P32/98,所有的参考化合物孔和对照孔做一个复孔。使用反应缓冲液 1 : 50 倍稀释 DPP-4 酶,向所有反应孔中除了空白对照孔外,加入 15 μ l 稀释好的 DPP-4,使得反应孔中的 DPP-4 酶量为 0.26MU/孔。向所有反应孔中加入 50 μ l 稀释好的 AMC 底物溶液来起始反应。常温孵育 10 分钟后,在超级酶标仪上读数,Ex :380nm/Em :460nm。

[0050] (4) 数据分析:用 GraphPad-Prism 软件分析

[0051] 式 I 化合物抑制率的计算:计算每个样本的平均信号值,每个样本浓度的信号值减去平均背景信号值。计算每个样本的抑制率,将 100%活性孔读数分别减去每个待测化合物不同浓度对应孔读数后,除以 100%活性孔读数,再乘以 100 分别得到每个待测化合物不同浓度的抑制率。最后,将计算好的抑制率针对不同待测化合物浓度作图。抑制率 = $[100\% \text{ 活性孔} - \text{样本孔}] / 100\% \text{ 活性孔} \times 100$ 。

[0052] 4 实验结果和讨论

[0053] 实验结果见表 1,利拉利汀 $IC_{50} = 0.43nM$,阿格列汀 $IC_{50} = 2.6nM$,式 I 化合物 $IC_{50} = 0.27nM$,可见其对 DPP-4 的抑制活性强于阿格列汀和利拉利汀。

[0054] 表 1 测试化合物对 DPP-4 的抑制活性

[0055]

| | 利拉利汀 | 阿格列汀 | 式 I 化合物 |
|-------------------------|------|------|---------|
| DPP-4 IC_{50} (nM) | 0.43 | 2.6 | 0.27 |

[0056] 实施例 6:体内活性测试实验

[0057] 1 实验目的

[0058] 利用小鼠葡萄糖耐量模型,比较本发明化合物和阳性对照药利拉利汀的降糖作用。

[0059] 2 实验材料

[0060] 昆明小鼠,雄性,18-22g,由扬州大学比较医学动物中心提供,随机分组。许可证号:SCXK(苏)2007-0001;葡萄糖试剂盒购自南京威特曼生物科技有限公司。

[0061] 3 实验方法

[0062] 3.1 化合物对正常小鼠糖耐量影响

[0063] 按照体重随机分为 6 组,每组 10 只。给药前动物禁食过夜,阳性对照组为 1mg/kg,受试化合物高、中、低剂量组分别为 1mg/kg,0.3mg/kg 和 0.1mg/kg,而空白对照组和模型组小鼠为等体积的溶媒(0.5% CMCNa)。给药后立刻采血记为第 0min。给药后第 45min 给各组灌胃 2g/kg(5ml/kg)葡萄糖溶液。然后分别在第 30min、60min、120min 采血。将采得的各个时间点的血离心取上清用葡萄糖试剂盒测定其中的血糖含量。

[0064] 3.2 化合物对糖尿病小鼠糖耐量影响

[0065] 建立糖尿病模型：小鼠禁食不禁水过夜后，按照 75mg/kg 剂量尾静脉注射 2% 四氧嘧啶溶液，7 天后采集小鼠空腹血测定其血清血糖含量，以血糖 $\geq 11.0\text{mmol/L}$ 且 $\leq 33.0\text{mmol/L}$ 视为造模成功。造模成功后分组进行糖耐量实验，方法同正常小鼠糖耐量实验。

[0066] 4 实验结果

[0067] 4.1 化合物对正常小鼠糖耐量影响

[0068] 结果表明，正常对照组小鼠给予葡萄糖后，30min 血糖值显著升高，60min 血糖值开始下降。与正常对照组比较，阳性药组、受试化合物高、中、低剂量组在 30min 时，血糖显著降低 ($P < 0.01$)。受试化合物对正常小鼠口服葡萄糖耐量的影响见表 2。

[0069] 表 2：受试化合物对正常小鼠口服葡萄糖耐量的影响

[0070]

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | 血糖浓度 (mmol/L) | | | |
|---------|---------------|---------------|-------------------------|-----------|-----------|
| | | 0 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| 对照组 | - | 2.73±0.67 | 4.41±0.80 | 6.20±2.49 | 3.91±1.22 |
| 利拉利汀 | 1 | 2.27±0.34 | 2.62±0.55 ^{##} | 5.22±0.24 | 3.25±0.57 |
| 式 I 化合物 | 0.1 | 1.98±0.16 | 2.30±0.32 ^{##} | 4.31±0.98 | 3.74±1.19 |
| 式 I 化合物 | 0.3 | 2.21±0.20 | 3.01±0.24 ^{##} | 4.07±0.27 | 4.39±1.32 |
| 式 I 化合物 | 1 | 2.42±0.60 | 2.69±0.48 ^{##} | 4.53±0.45 | 3.32±0.61 |

[0071] 4.2 受试化合物连续给药对糖尿病小鼠糖耐量的影响

[0072] 由表 3 可以看出，受试化合物连续给药 7 天，对四氧嘧啶所致糖尿病小鼠糖耐量在 30min, 120min 时具有显著改善作用。

[0073] 表 3 受试化合物连续给药 7 天对糖尿病小鼠糖耐量的影响

[0074]

| 组别 | 剂量 (mg/kg) | 血糖浓度 (mmol/L) | | | |
|---------|---------------|---------------|--------------------------|------------|-------------------------|
| | | 0 min | 30 min | 60 min | 120 min |
| 对照组 | - | 5.21±0.28 | 11.94±3.86 | 8.81±0.94 | 4.64±0.54 |
| 模型组 | - | 14.36±2.44 | 17.44±1.34 | 14.07±2.59 | 12.64±1.93 |
| 利拉利汀 | 1 | 13.19±3.19 | 14.78±3.81 | 10.14±4.20 | 6.63±1.95 ^{##} |
| 式 I 化合物 | 1 | 13.72±1.52 | 13.17±3.05 ^{##} | 11.60±5.05 | 4.72±3.30 ^{##} |

[0075] 实施例 7：毒理学实验

[0076] 1 实验目的

[0077] 根据《化学药物急性毒性试验技术指导原则》的要求观察本发明化合物 I 一次给予 ICR 小鼠后的急性毒性反应和死亡情况。

[0078] 2 实验材料

[0079] 受试样品：受试样品化合物为淡黄色粉状固体，常温保存，由中国药科大学新药研究中心提供，使用 0.5% CMC-Na 溶解，现配现用。受试动物：ICR 小鼠，购自扬州大学比较医学中心实验动物中心，实验动物生产许可证：SCXK(苏)2007-0001；日龄：6-8w；体重：18-22g；性别：雌雄各半；动物数：每组 10 只，共 80 只。

[0080] 3 实验方法

[0081] 预实验及结果

[0082] 分别以受试样品 4g/kg、2g/kg、1g/kg 给 4 只雄性 ICR 小鼠灌胃。实验结果表明：4g/kg 死亡 3 只，2g/kg 死亡 1 只，1g/kg 未有死亡。

[0083] 急毒实验组别与剂量

[0084] 根据预实验结果，进行如下分组：以剂距 0.7 设置 5 个剂量，分别为 4g/kg、3g/kg、2.25g/kg、1.69g/kg、1.27g/kg。

[0085] 实验分组与观察

[0086] 试验时，随机将动物分为 10 组，每组 10 只，给药前动物禁食 12h，按体重给予灌胃，给药后即观察小鼠的皮肤、眼、粘膜、活动、摄食、饮水、排便，呼吸变化及中毒表现和死亡情况共 7 天。

[0087] 4 结果

[0088] 式 I 化合物给予小鼠一次灌胃，4g/kg 组所有小鼠都出现昏厥性抽搐，缩瞳，俯卧不动，约 5min 后，抽搐消失，但仍有喘息，俯卧不动现象，5-30min 内死亡 8 只，24h 10 只全部死亡；3g/kg 组，所有小鼠出现出现，喘息现象，俯卧不动，其中有 4 只伴有昏厥性抽搐，30min 内 5 只死亡，24h 时死亡 7 只，48h 时共死亡 7 只，7 天后存活 3 只；2.25g/kg 组，所有小鼠出现出现喘息现象，俯卧不动，其中有 2 只伴有昏厥性抽搐，30min 内 4 只死亡，24h 时死亡 6 只，48h 时共死亡 6 只，72h 时共死亡 6 只，7 天后存活 4 只；1.69g/kg 给药后 30min 内死亡 4 只 24h 内死亡 7 只，7 天后存活 3 只，1.27g/kg，毒理反应不明显，24h 死亡 3 只。根据上述研究结果并结合 FDA 提供的利拉利汀毒理学实验数据表明，式 I 化合物的急性毒性小于利拉利汀。

[0089] 实施例 7：含有 5mg 式 I 化合物的包衣片剂

[0090] 1 个片剂核芯含

| | | | |
|----------------|-----|---------|------|
| [0091] 式 I 化合物 | 5mg | 羟丙甲基纤维素 | 15mg |
|----------------|-----|---------|------|

| | | | |
|------------|------|------|-------|
| [0092] 磷酸钙 | 90mg | 硬脂酸镁 | 1.5mg |
|------------|------|------|-------|

| | | | |
|-------------|------|----------|------|
| [0093] 玉米淀粉 | 35mg | 聚乙烯基吡咯烷酮 | 10mg |
|-------------|------|----------|------|

[0094] 总量 166.5mg

[0095] 制备：

[0096] 将式 I 化合物与磷酸钙、玉米淀粉、聚乙烯基吡咯烷酮、羟丙甲基纤维素及指定量一半的硬脂酸镁混合。在制片机中制造 13 毫米直径的片，然后使用适当机器，使其摩擦经过具有筛孔尺寸 1.5 毫米的筛网，并与其他硬脂酸镁混合。于制片机中压制此颗粒，以形成所要形状的片剂。

[0097] 核芯重量：166.5mg 冲头：9 毫米，凸型

[0098] 将如此制成的片剂核芯使用基本上由羟丙甲基纤维素构成的薄膜包衣。将最后完成的薄膜包衣片以蜂蜡抛光。

[0099] 包衣片剂的重量：175mg。

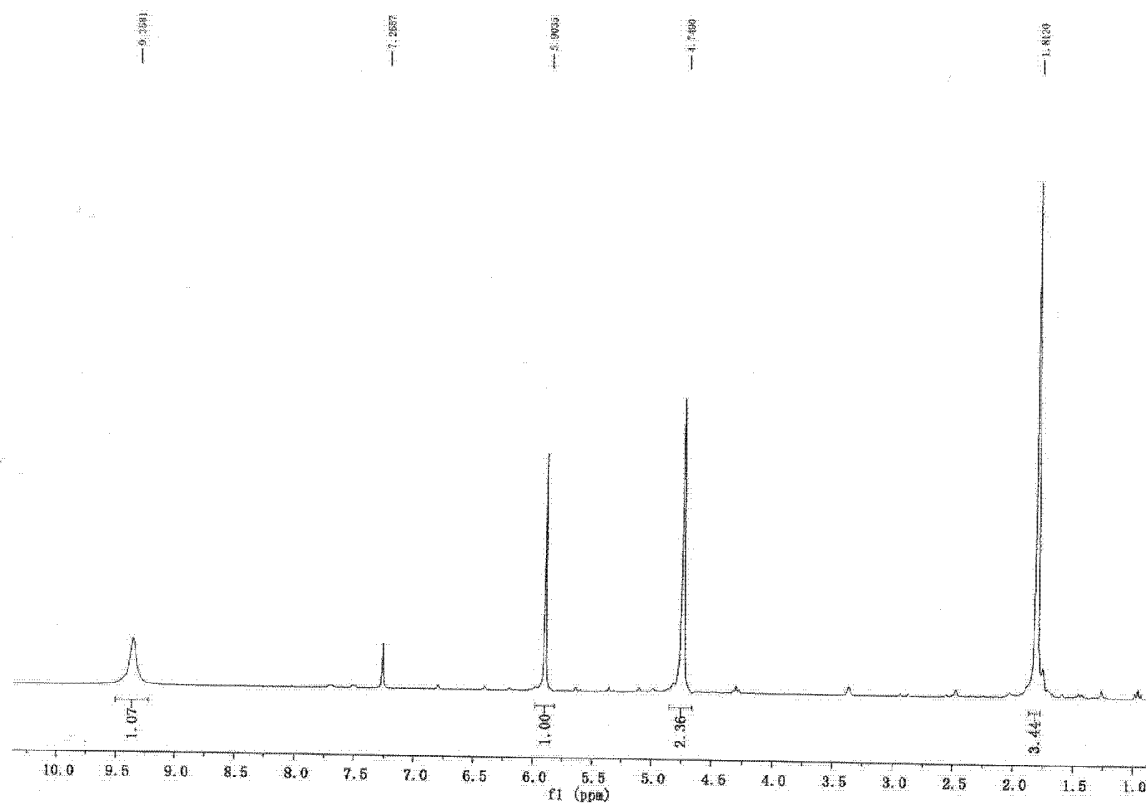


图 1

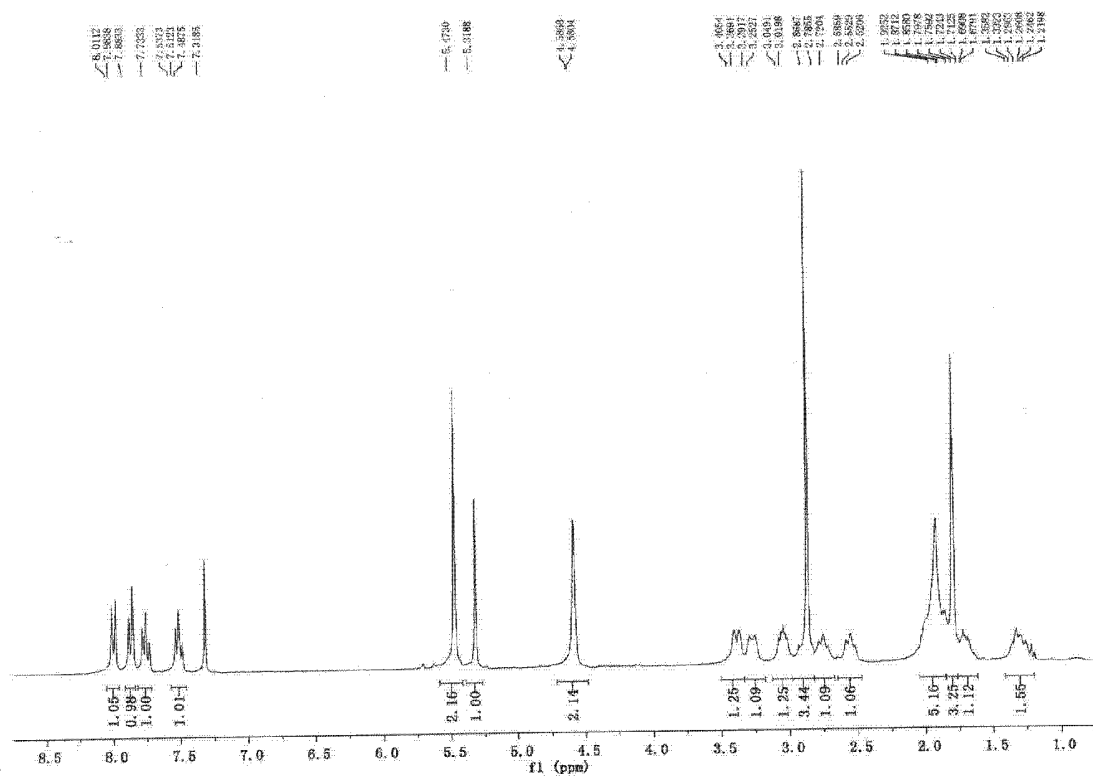


图 3

