



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113105453 A

(43) 申请公布日 2021.07.13

(21) 申请号 202110415666.3

C07C 309/04 (2006.01)

(22) 申请日 2016.02.10

A61P 11/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

1502260.1 2015.02.11 GB

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201680009645.9 2016.02.10

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(71) 申请人 维罗纳制药公司

A61P 17/06 (2006.01)

地址 英国加的夫

A61P 29/00 (2006.01)

(72) 发明人 P·L·斯帕戈 E·J·弗伦奇

A61P 27/02 (2006.01)

J·S·诺森 J·麦克伊图克

A61P 9/10 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

A61P 37/06 (2006.01)

11127

A61K 31/519 (2006.01)

代理人 庞东成 褚瑶杨

权利要求书1页 说明书31页 附图10页

(51) Int.Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

(54) 发明名称

嘧啶并[6,1-A]异喹啉-4-酮化合物的盐

(57) 摘要

本发明涉及嘧啶并[6,1-A]异喹啉-4-酮化合物的盐。本发明涉及下述化合物的药学上可接受的酸加成盐：(i) 9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨基甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(RPL554)；和(ii)乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、盐酸、氢溴酸、磷酸或硫酸。

1. 下述化合物的药学上可接受的酸加成盐或其溶剂化物：
 - (i) 9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨基甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(RPL554)；和
 - (ii) 乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、氢溴酸或硫酸。
2. 如权利要求1所述的药学上可接受的酸加成盐，其中，(ii)为乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸或硫酸。
3. 如权利要求1所述的药学上可接受的酸加成盐，其选自RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐、RPL554甲烷磺酸盐、RPL554乙烷磺酸盐、RPL554硫酸盐及其溶剂化物。
4. 如权利要求1所述的药学上可接受的酸加成盐，其为RPL554甲烷磺酸盐。
5. 如权利要求1所述的药学上可接受的酸加成盐，其为RPL554硫酸盐。
6. 如权利要求1所述的药学上可接受的酸加成盐，其为RPL554乙烷磺酸盐。
7. 一种药用组合物，其包含权利要求1~6中任一项所述的药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。
8. 如权利要求7所述的药用组合物，其配制为通过吸入施用。
9. 一种药用组合物，其为干粉，并且包括：
 - (a) 下述化合物的药学上可接受的酸加成盐或其溶剂化物：(i) 9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨基甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮(RPL554)；和(ii) 乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、盐酸、氢溴酸、磷酸或硫酸；以及
 - (b) 药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。
10. 如权利要求7所述的药用组合物，其能够通过将权利要求1~6中任一项所述的药学上可接受的酸加成盐溶解在水溶液中而获得。
11. 如权利要求10所述的药用组合物，其中，所述水溶液为缓冲水溶液。
12. 如权利要求11所述的药用组合物，其中，所述缓冲水溶液包含磷酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂或柠檬磷酸盐缓冲剂。
13. 如权利要求10所述的药用组合物，其中，所述药用组合物的pH大于或等于2.5。
14. 如权利要求10所述的药用组合物，其中，所述药学上可接受的酸加成盐存在的浓度大于或等于1.0mg/ml。
15. 权利要求1~6中任一项所述的药学上可接受的酸加成盐在制造用于治疗人体或动物体的药物中的用途。
16. 权利要求1~6中任一项所述的药学上可接受的酸加成盐在制造用于治疗或预防选自哮喘、过敏性哮喘、花粉症、过敏性鼻炎、支气管炎、肺气肿、支气管扩张、慢性阻塞性肺病(COPD)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、类固醇抵抗性哮喘、重度哮喘、儿童哮喘、囊性纤维化、肺纤维化、肺间质纤维化、间质性肺病、皮肤病、特应性皮炎、牛皮癣、眼部炎症、脑缺血、炎性疾病和自身免疫疾病的疾病或状况的药物中的用途。
17. 如权利要求16所述的用途，其中，所述疾病或状况为慢性阻塞性肺病(COPD)。

嘧啶并[6,1-A]异喹啉-4-酮化合物的盐

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的申请号为201680009645.9,申请日为2016年2月10日,发明名称为“嘧啶并[6,1-A]异喹啉-4-酮化合物的盐”。

技术领域

[0002] 本发明涉及嘧啶并[6,1-A]异喹啉-4-酮化合物的盐和包含这些盐的药用组合物。还记载了这些盐的医疗用途。

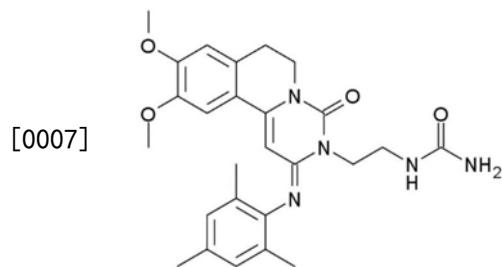
背景技术

[0003] 在开发适当形式的活性药用成分(API)以供配制用于施用于人类受试对象时,必须考虑大量因素。这些因素包括功效、毒性、稳定性、溶解性/溶出和酸性/碱性。通常评价包含大量不同形式的API的不同制剂。该评价的结果是不可预测的。

[0004] 溶解性/溶出、稳定性和酸性/碱性可以是控制API的非常重要的因素。溶解性/溶出必须处在适当的水平以实现足够剂量的活性成分的递送,从而在患者中拥有希望的治疗效果。治疗剂的不同盐形式的溶解性是不可预测的。

[0005] API的稳定性必须足以确保该产品是长期保存稳定的。酸性/碱性对于口服药物和吸入药物是重要的,因为过酸的制剂可能在施用时对受试对象引起不适。

[0006] RPL554(9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨基甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异喹啉-4-酮)是双重PDE3/PDE4抑制剂,描述于WO 00/58308中。作为组合的PDE3/PDE4抑制剂,RPL554具有抗炎和支气管扩张活性,并且可用于治疗诸如哮喘和慢性阻塞性肺病(COPD)等呼吸系统疾病。RPL554的结构如下所示。



[0008] 由于其在治疗呼吸障碍中的适用性,常常优选通过吸入施用RPL554。Franciosi等公开了pH 3.2的RPL554在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲剂中的溶液(The Lancet: Respiratory Medicine 11/2013;1 (9):714-27. DOI:10.1016/S2213-2600(13)70187-5)。没有记载RPL554的盐的制备。

发明内容

[0009] 本发明的发现是,RPL554的某些盐具有高度理想的性质。特别是,已发现RPL554的特定药学上可接受的盐具有改善的水溶性和在适当pH缓冲溶液中改善的溶解性。缓冲溶液中增加的溶解性允许在更温和pH的溶液中更高的药物加载,这可能导致患者对吸入或口服施用有更大的耐受性。还已发现RPL554的某些特定盐为结晶的。结晶盐通常比非晶形式

更稳定，并且如果RPL554作为干粉或以活性成分以固态存在的其他制剂成功递送时，这是特别理想的。

[0010] 而且，已发现RPL554的某些盐具有理想的固有溶出速率，这可引起改善的生物利用度。还已发现RPL554的特定盐很适合加压计量剂量和干粉制剂。

[0011] 还已发现RPL554的某些盐的热稳定性好于其他盐的热稳定性。这样的盐是理想的，因为它们可抵抗温度变化而不改变形式。对湿度变化的稳定性也是理想的。

[0012] 因此，本发明提供了下述化合物的药学上可接受的酸加成盐：

[0013] (i) 9,10-二甲氧基-2-(2,4,6-三甲基苯基亚氨基)-3-(N-氨基甲酰基-2-氨基乙基)-3,4,6,7-四氢-2H-嘧啶并[6,1-a]异唑啉-4-酮(RPL554)；和

[0014] (ii) 乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、盐酸、氢溴酸、磷酸或硫酸。

[0015] 本发明还提供了包含本发明的药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的药用组合物。

[0016] 本发明还提供了用于治疗人体或动物体的本发明的药学上可接受的酸加成盐。

[0017] 本发明还提供用于治疗或预防选自以下疾病或状况的本发明的药学上可接受的酸加成盐：哮喘、过敏性哮喘、花粉症、过敏性鼻炎、支气管炎、肺气肿、支气管扩张、慢性阻塞性肺病(COPD)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、类固醇抵抗性哮喘、重度哮喘、儿童哮喘、囊性纤维化、肺纤维化、肺间质纤维化、间质性肺病、皮肤病、特应性皮炎、牛皮癣、眼部炎症、脑缺血、炎性疾病和自身免疫疾病。

[0018] 本发明还提供了治疗或预防受试对象的选自哮喘、过敏性哮喘、花粉症、过敏性鼻炎、支气管炎、肺气肿、支气管扩张、慢性阻塞性肺病(COPD)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、类固醇抵抗性哮喘、重度哮喘、儿童哮喘、囊性纤维化、肺纤维化、肺间质纤维化、间质性肺病、皮肤病、特应性皮炎、牛皮癣、眼部炎症、脑缺血、炎性疾病和自身免疫疾病的疾病或状况的方法，该方法包括对所述受试对象施用有效量的本发明的药学上可接受的酸加成盐。

附图说明

[0019] 图1显示了从RPL554盐制剂分离的固体的XRPD图谱，其中，使用的酸为：硫酸(A)、磷酸(B)、含水盐酸(C)、乙烷磺酸(D)、氢溴酸(E)、甲烷磺酸(F)和萘-1,5-二磺酸(G)。还显示了RPL554游离碱的XRPD图谱(H)。

[0020] 图2显示了从RPL554盐制剂分离的固体的XRPD图谱，其中，使用的酸为：乙烷-1,2-二磺酸(A)、对甲苯磺酸(B)、苯磺酸(C)、无水盐酸(D)、2-萘磺酸-1当量(E)和2-萘磺酸-4当量(F)。还显示了RPL554游离碱的XRPD图谱(G)。

[0021] 图3显示了从RPL554盐制剂分离的固体的XRPD图谱，其中，使用的酸为：1-羟基-2-萘甲酸-1当量(A)、1-羟基-2-萘甲酸-4当量(B)、均苯四酸-1当量(C)和均苯四酸-4当量(D)。还显示了RPL554游离碱的XRPD图谱(H)。

[0022] 图4显示了RPL554盐酸盐的重量法蒸气吸附(GVS)曲线。

[0023] 图5显示了0%湿度(A)、90%湿度(B)和初始输入(C)的RPL554盐酸盐的XRPD图谱。

[0024] 图6显示了二-RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐的GVS曲线。

[0025] 图7显示了0%湿度(A)、90%湿度(B)和初始输入(C)的二-RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐的XRPD图谱。

[0026] 图8显示了RPL554的硫酸盐(A)、甲烷磺酸盐(B)和乙烷磺酸盐(C)的固有溶出。

[0027] 图9显示了RPL554的游离碱(F)、乙烷-1,2-二磺酸盐(E)、氢溴酸盐(D)、盐酸盐(C)、苯磺酸盐(B)和对甲苯磺酸盐(A)的固有溶出。

[0028] 图10显示了RPL554的硫酸盐在24小时内的固有溶出。

[0029] 图11显示了选择的RPL554碱和盐pMDI制剂的气动评价(平均值,n=3,±SD),其中从左至右的条状图为:游离碱134/227 10%EtOH;乙烷磺酸盐227;甲烷磺酸盐134a;苯磺酸盐134a;硫酸盐134a;乙烷二磺酸盐22710%EtOH。

[0030] 图12显示了RPL554游离碱和盐变体DPI制剂的气动评价,其中从左至右的条状图为:游离碱;乙烷磺酸盐;对甲苯磺酸盐;甲烷磺酸盐;苯磺酸盐;硫酸盐;盐酸盐;乙烷-1,2-二磺酸盐;氢溴酸盐。

具体实施方式

[0031] 本发明的RPL554盐是RPL554和乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、盐酸、氢溴酸、磷酸或硫酸的药学上可接受的酸加成盐,或其溶剂化物。

[0032] 通常,所述酸为乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸、盐酸或硫酸。

[0033] RPL554的酸加成盐是通过RPL554与酸的反应形成的盐。RPL554是弱碱性化合物,可以质子化形成阳离子物种,其与使用的酸的共轭碱形成盐。

[0034] RPL554的酸加成盐可以选自RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐、RPL554乙烷磺酸盐、RPL554甲烷磺酸盐、RPL554苯磺酸盐、RPL554对甲苯磺酸盐、RPL554盐酸盐、RPL554氢溴酸盐、RPL554磷酸盐、RPL554硫酸盐及其溶剂化物。通常,所述盐选自RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐、RPL554磷酸盐、RPL554甲烷磺酸盐、RPL554盐酸盐、RPL554硫酸盐及其溶剂化物。

[0035] 盐的溶剂化物是包含溶剂分子的固体盐。溶剂可以为任何溶剂,不过通常为水或醇,如乙醇。溶剂化物因此可以为水合物或醇化物,如乙醇化物。RPL554盐可以为无水物、一水合物、二水合物或更高水合物或非化学计量比水合物。

[0036] 所述盐的化学计量比可以1比1,或其可以为2比1或1比2,或实际上酸与碱的任何其他比率。

[0037] 本发明的盐可以例如为RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐或其溶剂化物。RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐的化学计量比通常为约2:1 API:抗衡离子。本发明的盐可以例如为RPL554磷酸盐或其溶剂化物。RPL554磷酸盐的化学计量比通常为约1:1的API:抗衡离子。本发明的盐可以例如为RPL554甲烷磺酸盐或其溶剂化物。RPL554甲烷磺酸盐的化学计量比通常为约1:1的API:抗衡离子。本发明的盐可以例如为RPL554盐酸盐或其溶剂化物。RPL554盐酸盐的化学计量比通常为约1:1的API:抗衡离子。本发明的盐可以例如为RPL554硫酸盐或其溶剂化物。RPL554硫酸盐的化学计量比通常为约1:1的API:抗衡离子。盐的化学计量比可以通过本领域技术人员已知的技术确定,如¹H NMR。

[0038] 本发明的盐可以通过任何适合的生产活性药用分子的盐的方法生产。通常,所述盐通过将RPL554溶解在溶剂(例如二氯甲烷或二甲基甲酰胺)中、随后添加希望的酸的溶液(例如该酸的乙醇或THF溶液)而生产。然后可以通过过滤或通过从所得组合物除去溶剂(例

如通过真空干燥)来分离盐。盐浓缩物随后可以用反溶剂(例如甲基叔丁基醚)粉碎并通过过滤收集,或可以将其通过其他手段纯化并分离。

[0039] 本发明的RPL554盐通常纯度大于或等于约90%、大于或等于约95%或大于或等于约97%。百分比可以基于HPLC分离以面积%计算。于是,本发明提供了包含大于或等于约90%、大于或等于约95%或大于或等于约97%的本文定义的RPL554盐的固体组合物。

[0040] 本发明的药用组合物包含本文定义的药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。所述药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂可以为任何合适的药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。这些是技术人员公知的。

[0041] 所述稀释剂可以是任何药学上可接受的稀释剂。所述稀释剂通常适合通过吸入施用。合适的稀释剂的实例包括水、乙醇和甘油。稀释剂优选为水。稀释剂优选是灭菌的。稀释剂可以另外选自固体稀释剂,如乳糖、葡萄糖、蔗糖、纤维素、玉米淀粉和马铃薯淀粉。稀释剂可以含有缓冲剂成分来控制pH。缓冲剂可以源自磷酸盐、柠檬酸盐或乙酸盐。稀释剂可以还含有氯化钠。

[0042] 所述药用组合物可以包含例如:润滑剂,例如二氧化硅、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁或硬脂酸钙和/或聚乙二醇;粘合剂;例如,淀粉、阿拉伯胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯基吡咯烷酮;解聚剂,例如淀粉、藻酸、藻酸盐或羧基乙酸淀粉钠;泡腾混合物;染料;甜味剂;润湿剂,如卵磷脂、聚山梨酸酯、月桂基硫酸酯;以及通常用于药用制剂的无毒性和药理惰性的物质。这样的药用制剂可以以已知方式制造,例如,通过混合、造粒、压片、糖包衣或膜包衣过程。

[0043] 作为口服用液体分散液的组合物可以为糖浆、乳剂和悬浮剂。糖浆可以含有例如蔗糖或蔗糖与甘油和/或甘露醇和/或山梨醇作为载体。

[0044] 作为悬浮剂或乳剂的组合物可以含有例如天然胶、琼脂、藻酸钠、果胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯醇作为载体。肌内注射用悬浮剂或溶液可以含有活性化合物以及药学上可接受的载体,例如,灭菌水、橄榄油、油酸乙酯、二醇(例如丙二醇)和必要时的适量的利多卡因盐酸盐。

[0045] 用于注射或输注或用于吸入的溶液可以含有例如灭菌水作为载体,或优选其可以处于灭菌的等渗盐水溶液形式。

[0046] 优选的是,本发明的组合物配制用于通过吸入施用。

[0047] 药用组合物可以为干粉。通常,作为干粉的药用组合物使用干粉吸入器递送。

[0048] 通常,干粉吸入器为Clickhaler、Novolizer、Certihaler、Diskus、Multihaler、Gyrophaler (Vectura Group plc)、Aerolizer、Handihaler或Tubospin (PH&TS.p.A.)、Acu-Breathe unit (Respirics, Inc.)、Conix (Cambridge Consultants Limited)、Miat Monohaler (Cyclohaler)、Eclipse (Sanofi-Aventis)、e-flex (Microdrug AG)、Flowcaps (Hovione)、Prohaler (Valois Pharm)、DirectHaler (Trimel BioPharma)、Single Dose SDD (Manta technologies)、Monodose (Miat SpA)、TwinCaps (Hovione)、GenX (CCL)、SkyeHaler (SkyePharma)、EasyHaler (Orion Pharma) 或Taifun (Akela Pharma Inc.) , Clickhaler、Novolizer、Diskus 和Aerolizer为优选的干粉吸入器。

[0049] 通常,作为干粉的药用组合物通过盐的研磨、喷雾干燥、流化喷雾干燥、喷雾冷凝、微粉化、控制结晶、共结晶、超声辅助结晶、冷冻干燥或颗粒沉淀制造。通常,所得粉末的粒

径以质量平均气动直径计为约1μm～约10μm、优选约3.5μm～约10μm、更优选约4μm～约5.5μm或约5μm～约10μm或约5.5μm～约10μm或约6μm～约10μm。所得粉末的粒径也可以以质量平均气动直径计为约2μm～约5μm，例如2.5μm～约4.5μm。

[0050] 干粉药用组合物可以包含(a)50.0～99.8重量%的乳糖粉末和(b)0.2～50.0重量%的本发明的RPL554盐。优选的干粉药用组合物包含(a)80.0～99.8重量%的乳糖粉末和(b)0.2～20.0重量%的本发明的RPL554盐。例如，粉末药用组合物可以包含(a)95.0～99.8重量%的乳糖粉末和(b)0.2～5.0重量%的本发明的RPL554盐。在一些情况下，盐的含量可以为约1.0重量%。例如，粉末药用组合物可以包含(a)99.2～99.8重量%的乳糖粉末和(b)0.2～0.8重量%的本发明的RPL554盐。

[0051] 在一些情况下，适合吸入的药用组合物为加压计量吸入器(pMDI)用组合物的形式。通过pMDI施用的药用组合物可以包含(a)本文定义的RPL554盐和(b)一种或多种抛射剂。所述一种或多种抛射剂通常选自氢氟烷烃，如HFA 134a和HFA 227a。制剂可以还包含(c)乙醇。制剂可以还包含(d)表面活性剂，例如Tween80。例如，药用组合物可以包含(a)0.1～1.0重量%的本文定义的RPL554盐，(b)80.0～99.9重量%的氢氟烷烃，(c)0.0～19.0重量%的乙醇和(d)0.0～0.5重量%的Tween 80。在一个实施方式中，药用组合物包含(a)0.1～0.9重量%的本文定义的RPL554盐和(b)全部的HFA 134a 和/或HFA 227a。作为另选，药用组合物可以包含(a)0.1～0.9重量%的本文定义的 RPL554盐，(b)总计88.0～90.0重量%的HFA 134a和/或HFA 227a，(d)0.05～0.15重量%的Tween 80和(c)余量的乙醇。

[0052] 在一些情况下，药用组合物为水溶液。因此，药用组合物通常能够通过将本发明的药学上可接受的盐溶解在水溶液中而得到。溶解该盐可以包括将固体形式的盐添加到水溶液中并搅拌所得混合物以使至少一部分该盐溶解。可以将所得混合物加热以改善溶解。也可以适当调整pH。

[0053] 本发明的盐在作为水溶液的组合物中的浓度通常大于或等于约0.1mg/ml，大于或等于约1mg/ml或大于或等于约2.5mg/ml。例如，本发明的盐在水溶液中的浓度通常为约1mg/ml～约50mg/ml，例如约2mg/ml～25mg/ml或约2.5mg/ml～10mg/ml。

[0054] 通常，作为水溶液的药用组合物还包含一种或多种缓冲剂。所述缓冲剂是药学上可接受的缓冲剂。因此，水溶液可以为缓冲水溶液。药用组合物可以例如通过将该盐溶解在缓冲水溶液中而获得。缓冲剂可以为适合用于药用组合物(例如适合于吸入的药用发明)的任何缓冲剂。所述一种或多种缓冲剂通常选自乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐缓冲剂。缓冲水溶液通常包含磷酸盐缓冲剂和/或柠檬酸盐缓冲剂(例如柠檬磷酸盐缓冲剂)。柠檬酸盐缓冲剂包括柠檬酸、柠檬酸钠及其混合物。磷酸盐缓冲剂包括磷酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠及其混合物。乙酸盐缓冲剂包括乙酸和乙酸盐。

[0055] 不存在RPL554盐的情况下缓冲水溶液的pH通常为约3.0～约7.0，例如约4.0～约5.0。通过将盐溶于缓冲水溶液来配制药用组合物可以使缓冲溶液的pH变化。例如，pH可能在盐溶解时降低。不过，这种变化通常较小。

[0056] 通过将盐溶于水溶液(例如缓冲水溶液)可获得的药用组合物的pH通常大于或等于约2.0。例如，药用组合物的pH可以为大于或等于约3.0或大于或等于约4.0。组合物的pH可以为约3.0～约6.0，或约3.5～约5.5。

[0057] 所述水溶液可以为盐水溶液或缓冲盐水溶液。所述水溶液可以包含约0.1～约2.0

重量%盐水(即NaCl)。

[0058] 药用制剂可以为适合于通过吸入施用的液体药用组合物,其包含稀释剂和本文所述的RPL554盐的颗粒的悬浮液。RPL554盐的悬浮颗粒的粒径分布通常具有约0.2μm~约5μm的D_v50(以体积计的平均粒径)值。D_v50可以使用激光衍射测量。稀释剂可以为水或氢氟烷烃。液体药用组合物可以还包含缓冲剂、溶剂(如乙醇)或表面活性剂(如Tween(例如Tween 20或80))。

[0059] 本发明还提供了包含作为水溶液的本发明的药用组合物的雾化器。该雾化器通常装载有该药用组合物。雾化器通常包含约1mL~约200mL的液体药用组合物,更通常包含1mL~20mL的液体药用组合物。

[0060] 雾化器使用压缩空气将液体药用组合物雾化成吸入到受试对象的呼吸道中的气雾剂。雾化器的实例包括软雾雾化器、振动网雾化器、喷射式雾化器和超声波雾化器。合适的雾化器装置包括Philips I-nebTM(Philips)、Pari LC Sprint(Pari GmbH)、AERx^{RTM}肺部递送系统(Aradigm Corp.)和PariLC Plus可重复利用式雾化器(Pari GmbH)。

[0061] 雾化器通常能够将RPL554盐溶液气溶胶化成为包含颗粒的气溶胶,所述颗粒的MMAD为约1μm~约10μm,优选约3μm~约10μm,更优选约4μm~约5.5μm,或约5μm~约10μm,或约5.5μm~约10μm或约6μm~约10μm。MMAD可以为约2μm~约5μm,例如2.5μm~约4.5μm。

[0062] 本发明还提供了用于治疗人或动物体的本文定义的药学上可接受的酸加成盐。本发明还提供了用于治疗人或动物体的本文定义的药用组合物。

[0063] 人或动物体的治疗通常包括治疗或预防选自哮喘、过敏性哮喘、花粉症、过敏性鼻炎、支气管炎、肺气肿、支气管扩张、慢性阻塞性肺病(COPD)、成人呼吸窘迫综合征(ARDS)、类固醇抵抗性哮喘、重度哮喘、儿童哮喘、囊性纤维化、肺纤维化、肺间质纤维化、间质性肺病、皮肤病、特应性皮炎、牛皮癣、眼部炎症、脑缺血、炎性疾病和自身免疫疾病的疾病或状况。

[0064] 通常,所述疾病或状况是哮喘或慢性阻塞性肺病(COPD)。

[0065] 本发明还提供治疗或预防受试对象的本文限定的疾病或状况的方法,该方法包括对所述受试对象施用有效量的本发明的药学上可接受的酸加成盐。

[0066] 对于单剂量的RPL554的有效量通常为约0.001mg/kg~50mg/kg。对于单剂量的RPL554的有效量通常为约0.001mg/kg~1mg/kg。例如,有效量可以为约0.01mg~约500mg或约0.01mg~100mg、优选约0.1mg~约6mg的剂量。RPL554的单剂量可以为0.05mg~5mg或0.5mg~3mg,例如约1.5mg。剂量可以每日施用。例如,RPL554的剂量可以为0.001mg/kg/日~50mg/kg/日,通常为0.001mg/kg/日~10mg/kg/日或0.01mg/kg/日~1mg/kg/日。这些剂量通常为装入吸入器的标称剂量。液体药用组合物可以一日一次、两次或三次施用,或者可以一周两次、三次、四次或五次施用。所述组合物可以每当患者需要时便施用。

[0067] 本发明还提供了本文定义的药学上可接受的酸加成盐在制造用于治疗本文限定的疾病或状况的药物中的应用。

[0068] 以下实施例阐述本发明。

[0069] 实施例

[0070] 初步研究

[0071] 仪器和方法

[0072] 自动化抗衡离子筛选——API的抗衡离子筛选使用ZinsserAnalytic提供的Crissy 平台进行,其使用Zinsser控制软件7.0.9版。Crissy平台用于分配API、抗衡离子和溶剂的储备液,然后通过涡旋振荡进行混合物搅拌。对于在环境温度进行的筛选,使用样品管用48位区块形式。装有关注的固体的样品管通过过滤分离,并在环境温度下真空干燥。

[0073] HPLC条件——HPLC测量的RPL554化学纯度

[0074] 稀释剂制备——去离子水:乙腈(1:1)。将二者充分混合并使其达到室温备用。

[0075] 空白溶液——空白溶液由稀释剂组成。

[0076] 样品溶液制备——将约7mg样品精确称取到14ml玻璃小瓶中,溶解在约14ml 稀释剂中,充分混合,并将这些溶液用于注射。

[0077] 柱:X-Bridge苯基150 x 4.6mm,3.5μm粒径(Ex-Waters,部件编号186003355);流动相:A-纯水:三氟乙酸(100:0.1);B-乙腈:三氟乙酸(100:0.1);流速:1.0ml·min⁻¹;注入体积:10μl;检测:UV@254nm;柱温:30℃;后运行:5min

梯度:	<u>时间(min)</u>	<u>%A</u>	<u>%B</u>
[0078]	0	95	5
	2	95	5
	15	5	95
	20	5	95
	22	95	5

[0079] RPL554的预期保留时间:11.3分钟

[0080] 溶液质子NMR——¹H NMR谱使用配备有自动进样器的JEOL EX 270MHz谱仪收集。将样品溶解在合适的分析用氘代溶剂中。使用Delta NMR Processing and Control Software 4.3版采集数据。

[0081] X射线粉末衍射(XRPD)——X射线粉末衍射图谱在PANalytical衍射仪上收集,其使用Cu K α 辐射(45kV,40mA),θ-θ测角计,聚焦镜,发散狭缝(1/2”),入射和发散光束两处的索勒狭缝(4mm)和PIXcel检测器。用于数据收集的软件为X' Pert Data Collector 2.2f版,使用X' Pert Data Viewer1.2d版呈现数据。使用PANalytical X' Pert PRO在环境条件下通过透射箔样品台(聚酰亚胺-Kapton,12.7μm厚度膜)在环境条件下采集XRPD图谱。数据收集范围为2.994-35°2θ,连续扫描速度为0.202004° s⁻¹。

[0082] 差示扫描量热计(DSC)——在配备有45位样品架的PerkinElmer Pyris 4000 DSC上收集DSC数据。使用验证的铟验证仪器的能量和温度校正。将0.5~3.0mg的预定量样品放入带销孔铝盘并以20°C·min⁻¹从30℃加热到350℃,或如实验说明改变。在样品上保持60ml·min⁻¹的干燥氮气吹扫。仪器控制、数据采集和分析使用Pyris Software v9.0.1.0203进行。

[0083] 热重分析(TGA)——在配备有20位自动进样器的PerkinElmer Pyris 1 TGA上收集 TGA数据。使用验证的重量和验证的Alumel和Perkalloy对仪器进行温度校正。将1~5mg的预定量样品装到预先配衡的铝坩埚上并以20°C·min⁻¹从环境温度加热到400℃。在样品上保持20ml·min⁻¹的氮气吹扫。仪器控制、数据采集和分析使用Pyris Software

v9.0.1.0203进行。

[0084] Karl Fischer滴定的水含量——通过减重法精确称取约0.2g样品并转移到Karl Fischer容器中。然后将样品混合600秒以确保其完全溶解,然后针对Hydranal Composite 5进行滴定。一式二份地进行分析。

[0085] 重量法蒸气吸附——使用IGAsorp Systems Software V6.50.48控制的Hiden Isochema湿气吸附分析仪(IGAsorp型)获得吸附等温线。通过仪器控制将样品保持在恒定温度(25℃)。通过混合总流量为 $250\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 的干湿氮气流来控制湿度。通过测量三份校准的Rotronic盐溶液(10%-50%-88%)对仪器进行相对湿度含量验证。通过微量天平(精度 $+/-0.005\text{mg}$)监测样品随湿度的重量变化。在环境条件下将限定量的样品放入配衡的网状不锈钢篮。完整的实验循环通常由在恒温(25℃)下以0~90%范围的10%RH间隔(每个湿度水平持续60分钟)进行的三次扫描(吸附、脱附和吸附)组成。这种实验应证明研究的样品在一组明确确定的湿度范围内吸收(或者不吸收)水分的能力。

[0086] 实施例1-RPL554盐的制备和评价

[0087] 装入含有1或4当量如表1所述的抗衡离子的溶液,在40℃的温度搅拌浓度为17.1mg/ml的23.4ml的RPL554的二氯甲烷(DCM)溶液,并使其冷却到环境温度。抗衡离子溶液的组成如表2所示。

[0088] 表1

酸抗衡离子	当量
含水盐酸	4
硫酸	1
磷酸	1
氢溴酸	4
萘-1,5-二磺酸	4
乙烷-1,2-二磺酸	1
乙烷磺酸	1
对甲苯磺酸	4
甲烷磺酸	4
苯磺酸	4
2-萘磺酸	1和4
无水盐酸	4
1-羟基-2-萘甲酸	1和4
均苯四酸	1和4

[0090] 表2

[0091]

酸	溶剂	浓度, M	对于 1 当量使 用的体积, μL	对于 4 当量使用 的体积, μL
盐酸	乙醇	2	12.5	50
硫酸	乙醇	2	12.5	50
磷酸	乙醇	2	12.5	50
氢溴酸	乙醇	2	12.5	50
萘-1,5-二磺酸	THF	1	25	100
乙烷-1,2-二磺酸	乙醇	2	12.5	50
乙烷磺酸	THF	2	12.5	50
对甲苯磺酸	乙醇	2	12.5	50
甲烷磺酸	THF	2	12.5	50
苯磺酸	乙醇	2	12.5	50
2-萘磺酸	THF	1	25	100

[0092] 观察到与磷酸、萘-1,5-二磺酸和乙烷-1,2-二磺酸形成固体。通过氮气流将反应溶剂的体积减少到约2~5ml。然后向混合物装入叔丁基甲基醚(TBME)8ml,得到沉淀和粘性固体,将其搅拌过夜。这在一些情况下得到悬浮液,以及回归粘性的固体和混合物,将其经由研磨用DCM和TBME进一步处理得到悬浮液。将混合物再搅拌4 小时,然后通过过滤分离固体,再将其在45℃真空干燥。

[0093] 分离的固体的化学纯度通过HPLC测定,并详细列于表3。使用硫酸、乙烷磺酸、甲烷磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、均苯四酸和盐酸(无水)分离的固体具有略微降低的化学纯度。在采用的抗衡离子和程序的情况下,RPL554没有显著的降解。

[0094] 表3

[0095]

酸抗衡离子	当量	固体颜色	化学纯度, 面积%	滤液颜色	RPL554 共振 中的 ¹ H NMR 移位	¹ H NMR API 与抗衡离子化 学计量比
硫酸	1	近白色	95.15	无色	有, 盐	N/A
磷酸	1	非常浅的 黄色	98.43	黄色	无	N/A
含水盐酸	4	白色	98.56	茶色	有, 盐	N/A
乙烷磺酸	1	白色	97.94	茶色	有, 盐	1:1
氢溴酸	4	白色	98.15	橙色	有, 盐	N/A
甲烷磺酸	4	白色	97.92	无色	有, 盐	1:2
萘-1,5-二磺酸	4	白色	99.08	琥珀色	有, 盐	1:1
乙烷-1,2-二磺酸	1	白色	98.09	茶色	有, 盐	1:1 (约)
对甲苯磺酸	4	白色	98.37	无色	有, 盐	1:2
苯磺酸	4	浅黄色	98.06	无色	有, 盐	1:2
无水盐酸	4	非常浅的 黄色	96.62	无色	有, 盐	N/A
2-萘磺酸	1	白色	98.99	浅黄色	有, 盐	1:1
2-萘磺酸	4	近白色	98.31	无色	有, 盐	1:2
1-羟基-2-萘甲酸	1	黄色			无	1:0.5
1-羟基-2-萘甲酸	4	黄色			略微移位	1:1.35
均苯四酸	1	浅黄色	96.32		略微移位	1:0.92
均苯四酸	4	浅黄色	95.81		略微移位	1:1.47

[0096] 除了磷酸、1-羟基-2-萘甲酸和均苯四酸之外,固体的¹H NMR谱揭示了与成盐一致的RPL554共振的移位。发现由磺酸抗衡离子得到的盐的化学计量比为1:1或1:2 的RPL554:

抗衡离子。对于1-羟基-2-萘甲酸和均苯四酸，化学计量比变化，成盐不明确。

[0097] 分离的固体的XRPD图谱(图1、图2和图3)揭示使用合适的酸抗衡离子当量产生RPL554的改性版，其具有变化的结晶性，与RPL554游离碱不类似，从1当量的1-羟基-2-萘甲酸分离的固体除外。从1当量的1-羟基-2-萘甲酸分离的固体的XRPD图谱含有RPL554共有的反射以及其他反射，表明此固体也可能为RPL554和1-羟基-2-萘甲酸的混合物。得到的XRPD图谱详细列于表4。对大多数盐观察结晶XRPD图谱。

[0098] 表4

[0099]

酸抗衡离子	RPL554与抗衡离子的化学计量比	形式
硫酸	未测定	结晶
磷酸	未测定	结晶
含水盐酸	未测定	结晶
乙烷磺酸	1:1	结晶
氢溴酸	未测定	结晶
甲烷磺酸	1:2	结晶
萘-1,5-二磺酸	1:1	弱结晶
乙烷-1,2-二磺酸	1:1(约)	结晶
对甲苯磺酸	1:2	结晶
苯磺酸	1:2	结晶
无水盐酸	未测定	非常弱的结晶
2-萘磺酸,1当量	1:1	结晶
2-萘磺酸,4当量	1:2	结晶
1-羟基-2-萘甲酸,1当量	1:0.5	结晶-可能的混合物
1-羟基-2-萘甲酸,4当量	1:1.35	结晶
均苯四酸,1当量	1:0.92	非常弱的结晶
均苯四酸,4当量	1:1.47	结晶

[0100] 测定盐候选物的物理化学特性。这些提供在表5中。

[0101]

表 5

抗衡离子	HPLC 得到的 RPL554 的 CP, 面积%	NMR 或 IC 得到的化学计量比 API : 抗衡离子	盐形式 XRPD/NMR	DSC, °C	TGA, 减重, %	RPL554 在水中的溶解性, mg/ml	水性悬浮液/溶液的 pH	水煮化后的固体形式
硫酸-乙醇溶液	98.82	ND 乙醇溶剂物, 化学计量比	结晶成盐	宽吸热, 130 - 形式变化? 吸热, 193.5, 熔化	2.37%上升至约 85°C - 失水	2.52	3.28 悬浮液	无变化
硫酸-乙醇溶液 重复	ND	ND 乙醇溶剂物, 化学计量比	结晶成盐	ND	NR	ND	ND	ND
硫酸-水溶液	99.35	ND 1:≈1 (0.84)	结晶成盐 推定成盐	宽吸热, 122 - 形式变化? 吸热, 185 - 形式变化? 吸热, 264 -熔化?	0.53%上升至约 55°C - 失水 3.45%与 185°C 的吸热一致 - 脱水	12.17	1.87 悬浮液	无变化
磷酸	98.48	ND 1:≈1 (0.77)	结晶成盐 推定成盐	吸热, 148.9, 熔化 吸热, 145.8, 熔化	2.83%与吸热一致	>22.52	3.08 溶液	未知, 无固体回收
磷酸 重复	ND	ND	结晶成盐	吸热, 156.6, 熔化	NR	ND	ND	ND
含水盐酸源	98.79	1:1	结晶成盐	吸热, 108.9 - 形式变化? 吸热, 219.2, 熔化	4.17%至约 125°C - 失水	4.95	3.84 悬浮液	无变化
含水盐酸源重 复	ND	1:≈1 (0.90)	结晶成盐	吸热, 156.8, 熔化	NR	ND	ND	ND
乙烷磺酸	97.90	ND	结晶成盐	宽吸热, 108.9 - 形式变化? 吸热, 219.2, 熔化	1.54%上升至约 50°C - 失水	>21.69	3.04 溶液	未知, 无固体回收
乙烷磺酸 重复	ND	1:1	结晶成盐	宽吸热, 86.4 - 形式变化? 吸热, 219.6, 熔化	NR	ND	ND	ND
HBr	97.90	ND	结晶	吸热, 174.1, 熔化	3.74%至约 135°C	3.66	3.20	无变化

说 明 书

[0102]

			成盐	- 失水	悬浮液
甲烷磺酸	97.37	1:1	结晶成盐	0.5%上升至约 65°C - 失水	2.69 溶液
萘-1,5-二磺酸	99.29	1:0.5	结晶成盐	2.12%上升至约 110°C - 失水	3.37 悬浮液
乙烷-1,2-二磺酸	98.91	1:0.5	结晶成盐	1.95%上升至约 120°C - 失水	3.72 悬浮液
对甲苯磺酸	96.86	1:1	结晶成盐	1.28%上升至约 85°C - 失水	3.40 悬浮液
苯磺酸	97.61	1:1	结晶成盐	2.43%上升至约 140°C - 失水	3.43 悬浮液
无水盐酸源	96.98	ND	结晶成盐	3.43%至约 120°C - 失水	3.68 悬浮液
萘-2-磺酸	95.88	1:1	结晶成盐	吸热后减重	4.74 悬浮液
1-羟基-2-萘甲酸	97.80	1:≈1.1	结晶较差 未成盐	两个吸热，166.5 和 180.6 – 物种混合物	3.71 悬浮液
均苯四羧酸	97.49	1:≈1.25	结晶较差 未成盐	两个吸热，162.7 和 199.2 – 物种混合物	2.27 悬浮液

ND - 未测定, NR - 未记录

[0103] 实施例2-25℃下RPL554盐在盐水溶液、水和缓冲水溶液中的溶解性

[0104] 在以下条件下检查RPL554盐的行为：

- [0105] • 25°C的0.9重量%盐水中磷酸盐缓冲至pH3.5
- [0106] • 25°C的0.9重量%盐水中乙酸盐缓冲至pH4.5
- [0107] • 25°C的0.9重量%盐水中柠檬磷酸盐缓冲至pH4.5
- [0108] • 25°C的0.9重量%盐水中磷酸盐缓冲至pH6.5
- [0109] • 25°C的0.7、0.9和1.1重量%盐水
- [0110] • 25°C的去离子水
- [0111] 将约50mg的RPL554盐和RPL554悬浮于1ml各种水性介质中,在特定温度下搅拌24小时。分离出固体,并在45°C真空干燥。用HPLC检查保留的滤液。
- [0112] 在25°C和37.5°C将额外约50mg的RPL554甲烷磺酸盐装入所述水混合物从而得到悬浮液。在所有其他情况中,均得到悬浮液。
- [0113] 对于使用的各种条件,使用单点校准通过HPLC测定RPL554的溶解性,并表示为RPL554,而非盐,详细列于表6和表7。

表 6		以 RPL554(mg/ml)计在 25°C 的盐水和水中的溶解性			
	抗衡离子	0.7 重量% 盐水	0.9 重量% 盐水	1.1 重量% 盐水	水
	磷酸盐	7.22	4.78	2.86	41.84
	甲烷磺酸盐	5.01	3.73	2.52	44.52
	乙烷-1,2-二磺酸盐	4.79	4.12	1.03	3.69
	盐酸盐	2.85	1.93	2.48	12.66
[0114]	硫酸盐	2.78	1.94	1.35	12.11
	苯磺酸盐	2.27	2.74	2.94	2.57
	乙烷磺酸盐	1.62	0.79	1.27	21.37
	氢溴酸盐	0.95	0.82	0.66	3.43
	对甲苯磺酸盐	0.83	0.62	0.8	1.01
	萘-2-磺酸盐	0.17	0.09	0.09	0.13
	萘-1,5-二磺酸盐	0.01	0	0.01	0.01
	无(RPL554)	0	0	0	0

表 7		以 RPL554(mg/ml)计在 25°C 的缓冲溶液中的溶解性			
	抗衡离子	pH 3.5, 磷酸盐	pH 4.5, 乙酸盐	pH 4.5, 柠檬磷酸盐	pH 6.5, 磷酸盐
[0115]	乙烷-1,2-二磺酸盐	2.66	1.47	4.14	-
	磷酸盐	1.84	1.67	3.29	0.02
	甲烷磺酸盐	1.72	2.01	3.10	0.02
	盐酸盐	1.07	1.38	1.93	0.02
	硫酸盐	1.22	0.42	1.75	0.00
	苯磺酸盐	1.10	1.39	1.57	0.00
	乙烷磺酸盐	1.18	0.46	1.55	0.00
	氢溴酸盐	0.33	0.71	0.75	0.00
	对甲苯磺酸盐	0.18	0.77	0.61	0.00
	萘-2-磺酸盐	0.08	0.41	0.28	0.00
	无(RPL554)	0.30	0.24	0.22	0.00
	萘-1,5-二磺酸盐	0.00	0.01	0.00	0.00

- [0116] 已显示出,RPL554的乙烷-1,2-二磺酸盐、磷酸盐、甲烷磺酸盐、盐酸盐、硫酸盐、苯

磺酸盐和乙烷磺酸盐具有特别有利的溶解性特性。特别是，在pH4.5的柠檬磷酸盐缓冲剂中的溶解性允许制造更高浓度的制剂，其与其他盐溶液相比具有降低的酸性。

[0117] 实施例3-热处理和对湿度的行为

[0118] 使用热重分析 (TGA) 和重量法蒸气吸附 (GVS) 通过热处理评价水合性质和盐稳健性/多晶性的初步检查。

[0119] RPL554盐酸盐显示出在环境条件下可逆的水吸收，形式上无变化，可能是该盐的稳定版本。熔化吸热下通过盐的热处理未检测到形式变化。

[0120] 通过GVS在如图4所示的脱附、吸附和脱附循环中研究盐酸盐相对于湿度的行为。在湿度范围盐酸盐显示出可逆的吸附和脱附，且无迟滞。盐在0%湿度下为无水物，可逆地吸附水(多达2摩尔当量)，至90%湿度。0%湿度(A)、90%湿度(B)和输入形式(C)的RPL554盐酸盐的XRPD图谱示于图5，由湿度范围上的稳定性和可逆的润湿/水合证实。

[0121] 通过GVS得到的二-RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐在脱附、吸附和脱附循环中相对于湿度的行为如图6所示。乙烷-1,2-二磺酸盐在湿度范围上显示出可逆的吸附和脱附，且无迟滞。该盐在0%湿度下为无水物，吸收水(多达5摩尔当量)，至90%湿度。相对于50%湿度的水吸收相当于4摩尔当量，然后在90%湿度转化为5摩尔当量。

[0122] 二-RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐在0和90%湿度的XRPD图谱(图7)与盐的输入形式相同，由湿度范围上的稳定性和可逆的润湿/水合证实。

[0123] 热学和湿度测试的结果总结提供于表7。

[0124] 表7

抗衡 离子	等温 105 °C, 2 小时	热循环	相对于湿度的行为	备注
[0125]	硫酸 氢盐	无形式变化或 显著减重	XRPD 确认形 式变化。122 °C 和 185 °C 的吸热 取消。新吸热在 219 °C.	30% 湿度之上为四水合物, 0% 湿度为无水物。0 和 30% 湿度之间有迟滞, 且可逆。无水物和四水合物的形式变化。
	磷酸 盐	形式变化 - 与 XRPD 得到的 RPL554 类似但 与 DSC 不相似 -(可能降解)	形式变化 - 与 XRPD 得到的 RPL554 相似但 与 DSC 不相似 -(可能降解)	在湿度范围可逆的吸附和脱附而无迟滞。无盐水合, 润湿除外。湿度极端条件的形式稳定性。
	盐酸 盐	可逆的水吸收。 无形式变化。	稳定的形式	0% 湿度下为无水物, 至 90% 湿度为二水合物, 具有可逆性。无迟滞。湿度极端条件的形式稳定性。
	乙烷 磺酸 盐	无可变水吸收。 无形式变化。	XRPD 确认无 形式变化。86 °C 吸热取消。主吸 热无变化。	40% 湿度之上为一水合物, 0% 湿度下为无水物。0 和 40% 湿度之间有迟滞, 且可逆。无水物和一水合物的形式变化。
	甲烷 磺酸 盐	无可变水吸收。 无形式变化。	未进行	湿度范围的可逆的吸附和脱附。30% 和 70% 湿度之间有迟滞。吸附 - 70% 湿度下为二水合物, 90% 湿度下为四水合物。脱附 - 70% 湿度下为二水合物, 40% 湿度下为一水合物, 在 0% 湿度下转化为无水物。无水物和四水合物的形式变化
	乙烷 -1,2- 二磺 酸盐	无形式变化.	未进行	湿度范围的可逆的吸附和脱附, 无迟滞。0% 湿度下的无水物, 至 50% 湿度下的四水合物, 至 90% 湿度下的五水合物。在湿度极端条件下的形式稳定性和可逆的水合。
	苯磺 酸盐	无形式变化.	未进行	无形式变化证据。

[0126] 结论

[0127] 基于对RPL554的各种盐的溶解性和稳定性的上述研究,发现乙烷-1,2-二磺酸盐、磷酸盐、甲烷磺酸盐、盐酸盐、硫酸盐、苯磺酸盐、乙烷磺酸盐、氢溴酸盐和对甲苯磺酸盐是优选的RPL554盐。特别优选乙烷-1,2-二磺酸盐、磷酸盐、甲烷磺酸盐、盐酸盐、硫酸盐、苯磺酸盐和乙烷磺酸盐。基于溶解性和不同湿度下的热稳定性,发现乙烷-1,2-二磺酸盐和盐酸盐具有最优秀的性质。

[0128] 进一步开发

[0129] 实施例4-RPL554盐的形成和表征

[0130] RPL554成盐

[0131] 成盐在三组选择的酸中进行,将其溶解在溶剂中至2M浓度,添加至DCM中的 7g 碱的当量如表8所示(其阐述了在成盐过程中使用的酸,其中体积和mmol计算是基于添加至DCM中的7g RPL554的2M酸的相关当量)。

表 8				
酸抗衡离子	抗衡离子的溶剂	当量	体积(ml)	酸 mmol
盐酸	EtOH, 2M	4	29.32	58.63
磷酸	EtOH, 2M	1	7.33	14.66
甲烷磺酸	EtOH, 2M	4	29.32	58.63
乙烷磺酸	THF, 2M	1	7.33	14.66
乙烷-1,2-二磺酸	EtOH, 2M	1	7.33	14.66
磺酸	EtOH, 2M	1	7.33	14.66
苯磺酸	EtOH, 2M	4	29.32	58.63
对甲苯磺酸	EtOH, 2M	4	29.32	58.63
氢溴酸	EtOH, 2M	4	29.32	58.63

[0132] 系列1

[0134] 将6.995g、7.005g和7.004g RPL554称取到第一组三个烧瓶中,装入410ml DCM (基于DCM中的碱的溶解性为17mg/ml),加热至40℃,搅拌1小时,然后分别计划添加乙烷磺酸、乙烷-1,2-二磺酸和硫酸。不过,碱并不溶于给定体积的DCM。向各烧瓶添加另外的50ml,在该温度搅拌30分钟,但并不发生溶解,直至再添加50ml 的DCM,搅拌,得到澄清黄色溶液。将三种酸装入合适的烧瓶,对乙烷磺酸和硫酸观察到澄清溶液的颜色变浅,而乙烷-1,2-二磺酸在加入后产生白色沉淀。将三种溶液在环境温度搅拌过夜。

[0135] 将乙烷磺酸盐的澄清浅黄色溶液减少至约20ml,产生澄清黄色溶液,其结晶得到流动固体。添加TBME(叔丁基甲基醚,30ml),将悬浮液搅拌约11/2小时,然后用25ml TBME滤饼清洗进行分离,留下浅黄色固体。

[0136] 将乙烷-1,2-二磺酸盐的白色稀浆状悬浮液减少至约100ml,从而稠化该浆液,然后用25ml TBME滤饼清洗进行分离,留下近白色固体。

[0137] 将硫酸盐的澄清浅黄色溶液减少至约20ml,产生澄清的暗黄色溶液。添加TBME(50ml)最初使胶状物形成,但研磨和搅拌约3小时得到结晶固体,用30ml TBME滤饼清洗进行分离,留下浅黄色固体。

[0138] 将三种盐在60℃真空干燥约40小时。

[0139] 系列2

[0140] 在初次尝试将RPL554溶解于6.5volDCM之后,将6.993g、7.001g和7.003g RPL554称取到第二组三个烧瓶中,然后装入500ml DCM,在40℃搅拌约45分钟实现溶解,然后分别添加苯磺酸、对甲苯磺酸和氢溴酸,使得三种黄色溶液颜色变浅,然后搅拌至环境温度。

[0141] 将苯磺酸盐的澄清浅黄色溶液搅拌过夜,然后减少至约30ml,然后逐渐添加125ml TBME,其引起沉淀,将其搅拌约30分钟,然后用25ml TBME滤饼清洗进行分离,留下浅黄色固体。

[0142] 将对甲苯磺酸盐和氢溴酸盐溶液二者减少至30ml,然后向其分别添加125ml TBME,然后搅拌过夜。对甲苯磺酸盐发展出轻微胶状固体(其能够粉碎),然后搅拌约2 1/2小时,再用25ml TBME清洗进行分离,留下浅黄色固体,而氢溴酸盐产生粘性胶状物(其需要研磨以发展成发源地),然后搅拌约4小时,再用25ml TBME清洗进行分离,得到近白色固体。

[0143] 将三种盐在60℃真空干燥约16小时,然后在45℃真空干燥约60小时。

[0144] 系列3

[0145] 将7.005g、6.993g和6.997g RPL554称取到最后一组三个烧瓶中,然后装入500ml DCM,在40℃搅拌溶解约30分钟,然后分别添加盐酸、磷酸和甲烷磺酸,使得三种黄色溶液颜色变浅,在环境温度搅拌过夜约16小时。将溶液减少至约30ml,然后逐渐添加125ml TBME。

[0146] 盐酸盐和甲磺酸盐溶液二者形成牢固的流动沉淀,将其搅拌1小时,然后用25ml TBME滤饼清洗进行分离,得到近白色固体。

[0147] 磷酸盐溶液在添加TBME后最初产生胶状物,不过将团块物理粉碎并搅拌约2小时产生均匀浆液。用25ml TBME滤饼清洗进行分离得到黄色固体以及亮黄色滤液。将这些固体以及盐酸盐和甲磺酸盐在45℃真空干燥约60小时。

[0148] 在至今获得的其他滤液为无色或非常浅时,将磷酸盐滤液减少,得到黄色固体,其通过过滤分离,并在60℃真空干燥约16小时。

[0149] 关于回收率和归宿的成盐结果归纳在表9中。根据之前的分析,乙烷磺酸盐和两种磷酸盐未进行到水熟化,因此进行完全分析。通过XRPD对盐酸盐进行的初步分析揭示水熟化是不必要的,不过通过DSC的分析揭示了与之前获得的盐略微不同的热学性质,因此盐酸盐进行水熟化。

表 9

盐抗衡离子	质量(g)	回收率(%)*	H ₂ O 熟化
盐酸盐	6.339	84.07	是
磷酸盐	4.812	87.56	否
磷酸盐	2.567		否
甲磺酸盐	12.774	定量	是
乙烷磺酸盐	8.588	99.77	否
乙烷-1,2-二磺酸盐	8.207	97.70	是
硫酸盐	9.634	定量	是
苯磺酸盐	11.327	定量	是
对甲苯磺酸盐	12.246	定量	是
氢溴酸盐	9.008	定量	是

[0150] [0151] *回收率不是活性物含量的指标,也没有针对溶剂进行调整。

[0152] RPL554盐的水熟化

[0153] 将除盐酸盐、磷酸盐和乙烷磺酸盐以外的所有盐在20℃于水(30~60ml)中浆化约21~22小时,将盐酸盐在22℃于水(30ml)中浆化6小时。使用的水的体积的变化是由于得到充分流动的悬浮液所需的水的体积所致。苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和氢溴酸盐最初形成胶状物,但延长搅拌后得到流动的悬浮液(明显的形式/状态变化)。

[0154] 将所有水熟化的盐通过潮湿滤饼水洗分离,然后在60℃真空干燥约19小时。质量输入、回收率和水体积的详细情况列于表10。

盐抗衡离子	质量(g)		回 收 率 (%)	加入的水 (ml)
	输入	输出		
盐酸盐	5.89	5.01	85.06	30
甲磺酸盐	11.77	5.19	44.10	50
乙烷-1,2-二磺酸盐	7.15	6.37	89.10	50
硫酸盐	8.66	6.69	77.25	50
苯磺酸盐	10.25	7.54	73.56	30
对甲苯磺酸盐	11.24	8.24	73.31	60
氢溴酸盐	8.01	6.24	77.90	60

[0155] [0156] 除了保持不变的HCl盐之外,水熟化的盐通常都得到经XRPD确认比输入盐更加结晶的材料或得到与已有图谱匹配的盐(被XRPD所预见,旨在改善热性质)。

[0157] 因此,在22℃下对盐酸盐的小样品(52.1mg)进行约21小时的第二次延长的水浆化(0.2ml),然后分离,进行潮湿滤饼水洗。将样品在60℃真空干燥约18小时,得到37.2mg(71.40%回收率)的盐。不过XRPD、DSC和TGA分析揭示,与输入材料几乎没有区别,因此对剩余RPL554.HCl盐的延长的水熟化看起来不必要。

[0158] 实施例5-RPL554盐的研磨

[0159] 进行测试以鉴定本发明的RPL554盐形式是否可以令人满意地研磨。在微粉化前后对API进行扫描电子显微镜检查法(SEM)和可见光显微镜检查法。

[0160] 在实验规定的研磨压力下使用单程研磨操作进行喷射研磨活动。仅保留从微粉化产品出口回收的材料;即涂覆喷射磨内部的材料未被回收。记录微粉化容易性的定性评价。

[0161] 喷射研磨表现

[0162] 研磨实施例4中制造的8种盐。这些盐为乙烷磺酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐(甲烷磺酸盐)、苯磺酸盐、硫酸盐、盐酸盐、乙烷-1,2-二磺酸盐、半盐和氢溴酸盐。

[0163] 使用Sturtevant喷磨机将所有8批样品盐成功喷射研磨。所有8批均使用以下参数处理:60PSI的研磨压力和80PSI的排出压力。

[0164] 在喷射研磨之前,使用杵和研钵轻度研磨所有样品粉末,乙烷磺酸盐除外。引入此处理步骤以破坏很多样品批料中存在的大聚集体。不过,对于乙烷磺酸盐,研磨没有必要,因为大聚集体可以用刮铲轻易地破坏。

[0165] 观察样品粉末的研磨行为的一些差异。大体上,7种盐在喷射研磨时表现类似,收率为约45%~70%,如表11所示。观察到,乙烷磺酸盐、盐酸盐和氢溴酸盐与其他盐相比最容易研磨。另外,所有8种盐显示出在研磨前后有一定程度的粘合行为。

[0166] 对所有样品在喷射研磨前后进行SEM分析。SEM分析表明,所有材料在喷射研磨后有相当的定性粒径。据估计,粒径为约1至3μm。

表11					
样品盐	输入 (g)	输出 (g)	收率 (%)	研磨时间 (min)	研磨容易 性
乙烷磺酸盐	3.89	2.75	70.7	5.0	容易
对甲苯磺酸盐	7.80	4.26	54.6	12.0	中度
甲磺酸盐	4.94	2.22	44.9	9.5	中度
苯磺酸盐	7.22	4.20	58.2	7.0	中度
硫酸盐	6.21	1.31	21.1	15.0	困难
盐酸盐	4.56	2.60	57.0	6.0	容易
乙烷-1,2-二磺酸盐半 盐	6.12	2.74	44.8	13.2	中度
氢溴酸盐	5.82	3.01	51.8	5.3	容易

[0167] [0168] 实施例6-微粉化盐的表征

[0169] 将微粉化盐通过XRPD、DSC和TGA分析表征。除了预期的粒径减小(其导致通过显微镜观察到所有盐中的细颗粒)之外,大多数盐经微粉化基本上无变化。

[0170] 微粉化盐的¹H NMR分析揭示,与未微粉化盐相比,无组成变化,通常残留溶剂水平降低。

[0171] 通过一些盐观察到DSC曲线上的一些差异。甲烷磺酸盐(甲磺酸盐)、乙烷磺酸盐(乙磺酸盐)和硫酸盐均显示出100°C左右的宽放热,这并不完全关联于TGA的百分比失重,可能表明某些类型的热改性。

[0172] TGA曲线通常显示放热对应的质量损失,尽管在所有盐中从30°C起在初始质量损失的量上有一些变化(盐酸盐和甲磺酸盐除外)。

[0173] [0174] 实施例7-固有溶出速率的测量

测量RPL554的8种盐的固有溶出速率以确定哪种盐具有最有利的溶出性质。

[0175] 溶出研究

[0176] 利用SiriusinForm研究溶出试验(pH相依样品溶出)。

[0177] 在2小时实验中使用UV吸收分光光度计在37°C下监测pH7.0的水性溶出实验(0.15M NaCl)中化合物的压片的溶出。在100kg负载力的重量下压制直径为3mm、需要10mg的大致重量的片剂。该片剂的仅仅一面接触溶解介质,其含有0.01M乙酸盐/磷酸盐缓冲剂体系以使来自药物溶出的实验pH的扰动最小化。

[0178] 在将pH调节至7.0之后,将片剂盘自动降低到40mL水性介质中,使样品一引入就立即进行即时数据收集。溶液搅拌在100rpm的恒定速率持续进行。使用之前测定的pH相依分子消光系数将吸收数据转化为绝对样品重量。选择适当的波长范围以确保分析吸收值<1.3的光谱数据,避免由于UV光源的饱和导致的错误溶出结果。

[0179] 溶出实验的结果如图8和9所示。每种化合物一式二份地测量。注意图8显示了以毫克释放的化合物,而图9显示了以微克释放的化合物。

[0180] 盐的固有溶出速率示于表12。

盐	表 12 2 小时后溶出的盐的质量(μg)		
	测试 1	测试 2	平均值
硫酸盐	5910	6500	6205
乙烷磺酸盐	300	410	355
甲烷磺酸盐	160	290	225
对甲苯磺酸盐	51.2	71.9	61.6
苯磺酸盐	50.0	70.1	60.1
盐酸盐	31.7	39.4	35.6
氢溴酸盐	30.4	40.1	35.3
乙烷-1,2-二磺酸盐	21.1	34.9	28.0
游离碱	10.0	17.0	13.5

[0181] [0182] 溶出图显示,在相同条件下,在2小时实验后所有盐的溶出量大于游离碱。三种盐、即硫酸盐、甲烷磺酸盐和乙烷磺酸盐显示出比其余盐更高的溶出,如图8所示。应注意,最大pH变化(从pH7的标称起始pH起)为硫酸盐的约0.15pH单位降低。甲烷磺酸盐为约0.1pH单位降低。其余盐降低不到0.06pH单位。

[0183] 在图9中,游离碱与5种其他盐(乙烷-1,2-二磺酸盐、HBr、HCl、苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐)绘制在一起,显示出相同试验释放得样品量更小。

[0184] 对于甲烷磺酸盐观察到的具体行为显示出头20分钟的高释放,在8.5分钟溶出3960μg,在11分钟溶出5200μg,然后沉淀(图8)。乙烷磺酸盐显示出在溶出上较不显著的初始峰(5.7分钟的600μg和13分钟的700μg)。

[0185] 硫酸盐最初显示出高释放,预期此样品如果给予足够的时间也将沉淀;于是进行另一次实验,将实验时间增加到24小时(图10)。对于最初2小时,图10中观察到的行为与之前的硫酸盐实验类似。然后,样品确实开始缓慢沉淀,但即使24小时后也仍然保持高度饱和。

[0186] RPL554盐显示出都具有与游离碱相比提高的固有溶出速率,一些盐(硫酸盐、甲烷磺酸盐和乙烷磺酸盐)显示出特别高的溶出速率。

[0187] 盐的提高的溶出速率可以潜在地大大增加肺中来自pMDI、DPI和雾化的悬浮液制剂的药物有效性的速度和程度。这可以促进调节药物的药代动力学以改变活动的起始和持续时间。在不改变缓冲剂体系的pH的情况下更快速的溶出表明此溶出能够在不潜在刺激肺(其可能由于较低pH的制剂引起)的情况下发生。

[0188] 实施例8-pMDI和DPI制剂中RPL554和盐变体的评价。

[0189] 方法

[0190] HPLC试验分析

[0191] 使用经验证的高效液相色谱(HPLC)方法(Intertek Melbourn科学分析方法 AM/358/01)来测定雾化用RPL554悬浮液的气动液滴尺寸分布。

[0192] 使用Agilent(Agilent Technologies Ltd,UK)1200系列HPLC系统进行试验,该系统由以下部件组成:等度泵、可变波长检测器、自动进样器、恒温柱室和使用的Chemstation LC软件B04.02版。

[0193] 使用以下色谱条件:柱:Waters XBridge苯基,3.5μm,150x4.6mm(部件编号

186003335) ;稀释剂:乙腈:水(50:50,v/v);流动相:乙腈:水:三氟乙酸(45:55:1(v/v));流速:1.5mL/min;注射体积:10μL;检测:UV@254nm;柱温:40℃;自动进样器托盘温度:环境温度;运行时间:6分钟。

[0194] HPLC稳定性分析

[0195] 使用经验证的HPLC方法(Onyx-Scientific,RPL554的最终产品测试专著)来通过HPLC测定化学纯度。

[0196] 使用Agilent(Agilent Technologies Ltd,UK)1200系列HPLC系统进行试验,该系统由以下部件组成:四元泵、多波长检测器、自动进样器、恒温柱室、脱气装置和使用的ChemstationLC软件B.04.02版

[0197] 使用以下色谱条件:柱:Waters XBridge苯基,3.5μm,150x4.6mm(部件编号186003335);稀释剂:乙腈:水(50:50,v/v);流动相:A-纯化水:三氟乙酸(100:0.1);B-乙腈:三氟乙酸(100:0.1);流速:1.0mL/min;注射体积:10μl;检测:UV@254 nm;柱温:30℃;后运行:5min;梯度:[时间(min):%A:%B]:[0:95:5],[2:95:5],[15:5:95],[20:5:95],[22:95:5]。

[0198] 一次粒径分析

[0199] 使用配备有Scirocco2000干粉分散单元的Mastersizer2000(Malvern Instruments Ltd,UK)来分析微粉化RPL554和盐变体的一次粒径。盐(50mg)经由振动进料控制以60%的进料器速率自动进样,并分散在3巴压力下的压缩空气中。

[0200] 化合物的目视检查表明,粉末显示出一定程度的粘合行为,小聚集体存在于粉末团中。不过,不需要在分析前使这些进一步解聚。

[0201] pMDI制造

[0202] 在19mL PET瓶中制备含有6mL的HFA 134a、HFA 227或HFA 134a:227的50:50 w/w共混物的装料的pMDI制剂。各PET瓶含有24mg的RPL554或盐变体,用50μL KHFA阀密封,提供200μg盐/促动。由于RPL554盐形式的分子量差异,每次促动发射的RPL554碱等同物的量随每种盐的分子量而变化。在不调节盐的分子量差异的情况下制备制剂。

[0203] 对于各种抛射剂和抛射剂共混物,还将pMDI配制为含有10% (w/w) 无水乙醇,其含有0.1% (w/w) 的Tween®80(称为乙醇/Tween)。制剂成分如下表所示。

[0204] HFA 134a

	每瓶		% w/w	% w/w(除药物外)
	mL	G		
HFA 134a	6.0000	7.3080	99.6727	100.0000
HFA 227ea				
乙醇				0.0000
Tween 80				0.0000
RPL554 盐		0.0240	0.3273	
总计	6.0000	7.3320	100.0000	

[0206] HFA 134a 10%乙醇

	每瓶		% w/w	% w/w (除药物外)
	mL	G		
HFA 134a	5.3940	6.5699	89.6057	89.900
HFA 227ea				
乙醇	0.9276	0.7308	9.9673	10.000
Tween 80	0.0069	0.0073	0.0997	0.100
RPL554 盐		0.0240	0.3273	
总计	6.3216	7.3320	100.0000	

[0208] HFA134a:HFA227a

	每瓶		% w/w	% w/w (除药物外)
	mL	G		
HFA 134a	3.0000	3.6540	46.3823	46.5241
HFA 227ea	3.0000	4.2000	53.3130	53.4759
乙醇				0.0000
Tween 80				0.0000
RPL554 盐		0.0240	0.3046	
总计	6.0000	7.8780	100.0000	

[0210] HFA134a:HFA227a 10%乙醇

	每瓶		% w/w	% w/w (除药物外)
	mL	G		
HFA 134a	2.6970	3.2849	41.6977	41.8251
HFA 227ea	2.6970	3.7758	47.9284	48.0749
乙醇	0.9970	0.7854	9.9695	10.0000
Tween 80	0.0074	0.007854	0.0997	0.1000
RPL554 盐		0.0240	0.3046	
总计	6.3910	7.8780	100.0000	

[0212] HFA 227a

	每瓶		% w/w	% w/w (除药物外)
	mL	G		
HFA 134a				
HFA 227ea	6.0000	8.4000	99.7151	100.0000
乙醇				0.0000
Tween 80				0.0000
RPL554 盐		0.0240	0.2849	
总计	6.0000	8.4240	100.0000	

[0214] HFA 227a 10%乙醇

	每瓶		% w/w	% w/w (除药物外)
	mL	G		
[0215]	HFA 134a			
	HFA 227ea	5.3940	7.5516	89.6439
	乙醇	1.0663	0.8400	9.9715
	Tween 80	0.0079	0.0084	0.0997
	RPL554 盐		0.0240	0.2849
	总计	6.4603	8.4240	100.0000

[0216] 以 1 % w/w 的浓度制备 Tween® 80 的无水乙醇储备溶液。因此制剂所需的少量 Tween® 80 的添加通过使用上表所示的乙醇/Tween 溶液来实现。

[0217] 制备了总计 54 个 pMDI 样品。

[0218] pMDI 制剂的目视评价

[0219] pMDI 制剂的物理性质的初步评价基于目视指标, 即溶解性、絮凝、沉降和乳化。

[0220] 与物理性质评价有关的信息以数码照相图像的形式记录。在振荡制剂之后立即记录 pMDI 瓶的数码照片, 之后以至多 3 分钟时间的间隔, 在将 PET 瓶的内容物静置(不被扰动)超过 5 分钟之后也拍摄图像。另外, 还记录分散、絮凝的容易性和程度以及沉降(或乳化)速率和沉降(或乳化)高度。

[0221] 基于物理评价的结果, 选择 6 种制剂进行气溶胶表征测试。

[0222] RPL554 和盐在选择的 pMDI 制剂中的溶解性测量

[0223] 进行 RPL554 和盐变体在选择的 pMDI 制剂(每种制剂三份) 抛射剂体系中的溶解性的定量评价。

[0224] 将 pMDI 直接连接到配备有 0.20 μm 过滤器单元的适配器, 过滤器单元串联到 21G 针头, 其隔着橡胶隔板插入到冷却的多剂量玻璃小瓶中。将 19G 过滤器针头插过隔板以协助抛射剂从小瓶中蒸发。在过滤过程之前, 将小瓶在干冰和丙酮的混合物中冷却以确保降低小瓶中的压力, 从而促进从 pMDI 收集输出物。pMDI 的 10 次连续促动经过过滤器并收集在小瓶中。在促动之间, 振荡瓶子约 10 秒。在过滤程序前后称量 pMDI 单元。将滤液保存在室温并使其蒸发至干燥。

[0225] 通过用 1 mL 的回收溶液仔细清洗小瓶内部来回收样品, 然后转移到 HPLC 小瓶以供分析。由瓶子中的 RPL554 的起始质量计算瓶子中溶解的 RPL554 的估算值 %, 前者又使用表 13 所示的 RPL554 游离碱和盐变体的理论分子量值计算。盐的理论分子量估算值由 Verona 提供。(均被认为 1:1 化学计量比盐, 但乙烷-1,2-二磺酸盐除外, 其被确认是半盐。)

表 13

RPL554 变体	理论分子量	瓶子中的 RPL554 碱的计算质量(mg)	每次促动的 RPL554 碱计算的计量剂量(μg)
[0226]	游离碱	477.56	*24.0
	乙烷磺酸盐	587.69	19.5
	对甲苯磺酸盐	649.78	17.6
	甲烷磺酸盐	573.67	20.0
	苯磺酸盐	635.74	18.0
	硫酸盐	575.64	19.9
	盐酸盐	514.02	22.3
	乙烷-1,2-二磺酸盐	572.65	20.0
	氢溴酸盐	558.47	20.5

[0227] pMDI制剂的气溶胶表征测试

[0228] 在标准条件(即30L/min流速)下使用Next Generation Impactor (NGI) 进行惯性碰撞测试,并增加最终外部过滤器,以捕获可能已经溶解的RPL554变体。评价发射的剂量(ED, μg)、微粒剂量(FPD, μg)和微粒分数(FPF, %)。在罐装寿命开始时进行评价,使用0.25mm喷嘴直径促动器(NMX)发射5次连续促动到NGI中。在促动之间,将瓶子从NGI入口取出,并振荡约15秒。用10mL的稀释剂从促动器、引入口、各 NGI收集级和外部过滤器回收RPL554。选择用于各样品的稀释剂(HPLC级水中的 50%乙腈)的体积以确保RPL554浓度超出HPLC试验方法的定量极限(0.06μg/mL)。

[0229] 干粉吸入器RPL554游离碱和盐:乳糖粉末混合物

[0230] 使用乳糖作为赋形剂将RPL554和盐变体制备为DPI制剂。

[0231] 制备1重量%的RPL554游离碱或盐变体:乳糖共混物的批料(约5g)。简言之,使RPL554游离碱或盐加少量乳糖经过38μm筛网。将筛分的材料加剩余乳糖在玻璃研钵中混合,然后转移到不锈钢螺帽罐中,并使用Turbula混合器进行进一步混合(在 46rpm下进行10分钟)。干粉混合物的组成为0.05gAPI和4.95g乳糖。

[0232] 为了测定共混物的含量均一性,从各混合物取样粉末的等分试样(约20mg),精确称量,并用稀释剂在10mL容量瓶中稀释定容。将容量瓶超声3分钟,然后将样品转移到HPLC小瓶以供分析。

[0233] DPI制剂的气溶胶性能

[0234] 用20mg的1重量%RPL554游离碱或盐变体:乳糖共混物(即200μg盐每胶囊) 手动填装胶囊,记录各胶囊的装料重量。由于RPL554盐形式的分子量差异,每次促动发射的RPL554的量随分子量而变化。在不调节盐的分子量差异的情况下制备制剂。

[0235] 经由 Cyclohaler® DPI (PCHPharmachemie, BV, The Netherlands) 递送粉末。

Cyclohaler® DPI是低抗性装置,以90L/min的流速运行2.7秒。使用NGI User Guide (MSPCorporation, 2008) 对于90L/min流速计算NGI收集级的截留直径。

[0236] 由滴入5个胶囊的各种制剂到NGI中之后进行的惯性碰撞测试测定ED、FPD和 FPF。对于测试的各胶囊,在操作前后测定Cyclohaler® 和胶囊组合的重量以检查剂量已被递送。对于这些测定,NGI配备有预分离器。预分离器的中心杯装有15mL的稀释剂。滴入后,将溶液

回收在20mL容量瓶中，并用稀释剂补充定容。用10mL 的稀释剂从装置、引入口和各NGI收集级定量回收RPL554。

[0237] 选择用于各样品的稀释剂的体积以确保RPL554浓度超出定量极限。

[0238] RPL554和盐:乳糖粉末共混物的定量评价

[0239] 制备1重量%的RPL554游离碱或盐变体:乳糖共混物的样品并在升高的温度 (70 °C)下储存7天，将对照样品储存在环境条件下并在实验台上避光。将所有样品(约 0.5g)精确称取到螺帽玻璃闪烁管(20mL)中。对于在升高温度下的储存，将样品放入避光的70°C烘箱中。将对照样品管封盖、避光并在台上储存7日。

[0240] 除了RPL554和盐变体共混物以外，还将乳糖本身的样品储存在升高温度条件下(环境下的对照样品)。仅有乳糖的样品充当HPLC分析的基线数据。从曲线减去由仅有乳糖的样品生成的HPLC曲线从而解释非药物相关峰。

[0241] 结果初籽於

[0242] 一次粒径分析

[0243] 表14显示了微粉化RPL554和盐变体的一次粒径分布，其使用激光衍射测量并表示为平均值，n=3次测量。结果表明，盐对于作为呼吸产品的制剂被合适地微粉化，所有D(0.9)值都小于5μm。

表 14			
RPL554 变体	D (0.1) (μm)	D (0.5) (μm)	D (0.9) (μm)
游离碱	0.58	1.37	3.00
乙烷磺酸盐	0.56	1.43	4.18
对甲苯磺酸盐	0.47	1.34	4.53
甲烷磺酸盐	0.45	1.20	3.46
苯磺酸盐	0.46	1.23	3.51
硫酸盐	0.51	1.12	2.30
盐酸盐	0.53	1.37	3.47
乙烷-1,2-二磺酸盐	0.52	1.25	2.78
氢溴酸盐	0.64	1.52	3.23

[0245] 加压计量吸入器评价

[0246] pMDI制剂的目视评价

[0247] 将针对各种组合的抛射剂(HFA 134a、HFA 227或50:50 (w/w) HFA 134a:227)、乙醇/Tween的各种RPL554游离碱和盐变体的pMDI制剂按分散性、絮凝、沉降(或乳化)速率和沉降(或乳化)高度打分，并基于这些观察对适合于作为pMDI的制剂的潜力打分。

[0248] 对于目视评价的变量，许多制剂显示非常相似的特征。

[0249] 除了在含有乙醇/Tween的50:50抛射剂中的RPL554游离碱以外，确定通过惯性膨胀分析进行评价的其余选择的pMDI制剂如下：

[0250] 1.RPL554游离碱HFA 134a/227和乙醇/Tween

[0251] 2.RPL554乙烷磺酸盐HFA 227

[0252] 3.RPL554甲烷磺酸盐HFA 134a

[0253] 4.RPL554苯磺酸盐HFA 134a

[0254] 5.RPL554硫酸盐HFA 134a

[0255] 6.RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐HFA 227和乙醇/Tween

[0256] RPL554游离碱和盐在选择的pMDI体系中的溶解性测量

[0257] RPL554游离碱和8种盐变体在HFA 134a中的溶解性示于表15。根据目视评价,没有制剂显示在抛射剂中溶解的明确信号。不过,根据溶解性测试的结果,乙烷磺酸盐和对甲苯磺酸盐证实有可定量水平的溶解性。

[0258] RPL554游离碱和8种盐变体在HFA 134a和乙醇/Tween中的溶解性示于表16。根据目视评价,一些制剂证实有在抛射剂中溶解的信号。制剂的溶解性测试证实,乙醇/Tween的加入对于RPL554在抛射剂中的溶解性有影响。所有制剂证实有可检测水平的溶解性,从最低的乙烷-1,2-二磺酸盐(5 $\mu\text{g/g}$)至最高的甲烷磺酸盐(298 $\mu\text{g/g}$)。

[0259] 评价RPL554游离碱和8种盐变体在HFA 227中的溶解性,不过在样品中没有可定量的水平(表17)。

[0260] 对于选择作为惯性碰撞测试的候选的经证实有令人关注的物理性质的两种制剂,进行进一步的溶解性测量。表18展示了对于HFA 227和乙醇/Tween中的乙烷-1,2-二磺酸盐和对于HFA 134:227和乙醇/Tween中的游离碱有可定量水平的RPL554溶解性。在两种情况下,溶解的RPL554分数表示存在于制剂中的药物的少于1%。

表 15 – HFA 134 中的溶解性			
RPL554 变体	溶解性 RPL554($\mu\text{g/g}$)	计算的溶解的 RPL554, $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 促动	计算的溶解的 RPL554(%)
游离碱	BLQ	BLQ	BLQ
乙烷磺酸盐	126.81	9.03	5.56
对甲苯磺酸盐	1.56	0.11	0.08
甲烷磺酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
苯磺酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
硫酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
盐酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
乙烷-1,2-二磺酸 盐 半盐	BLQ	BLQ	BLQ
氢溴酸盐	BLQ	BLQ	BLQ

[0262] *BLQ-低于定量极限(0.06 $\mu\text{g/mL}$)

表 16 – HFA 134 与乙醇/Tween 中的溶解性			
RPL554 变体	溶解性 RPL554($\mu\text{g/g}$)	估算的溶解的 RPL554, $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 促动	估算的溶解的 RPL554(%)
游离碱	16.45	1.12	0.56
乙烷磺酸盐	266.59	17.81	10.96
对甲苯磺酸盐	152.85	10.58	7.20
甲烷磺酸盐	298.07	19.38	11.64
苯磺酸盐	90.57	6.05	4.03
硫酸盐	73.19	4.71	2.84
盐酸盐	149.17	9.79	5.27
乙烷-1,2-二磺酸盐 半 盐	5.13	0.34	0.20
氢溴酸盐	96.27	6.40	3.74

表 17 – HFA 227 中的溶解性			
RPL554 变体	溶解性 RPL554(μg/g)	计算的溶解的 RPL554, μg/50 μL 促动	计算的溶解的 RPL554(%)
游离碱	BLQ	BLQ	BLQ
乙烷磺酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
对甲苯磺酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
甲烷磺酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
苯磺酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
硫酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
盐酸盐	BLQ	BLQ	BLQ
乙烷-1,2-二磺酸 盐 半盐	BLQ	BLQ	BLQ
氢溴酸盐	BLQ	BLQ	BLQ

表 18			
RPL554 变体	溶 解 性 RPL554(μg/g)	估 算 的 溶 解 的 RPL554, μg/50 μL 促动	估 算 的 溶 解 的 RPL554(%)
乙烷-1,2-二磺酸盐半盐 – HFA 227:10% 乙 醇 :0.1% Tween	1.69	0.11	0.07
游 离 碱 – HFA 134a:227:10% 乙 醇 :0.1% Tween	16.11	1.06	0.53

[0266] pMDI制剂的惯性碰撞测试

[0267] 图11显示了收集在NGI中之后的pMDI制剂的回收率。沉积物有大量的材料显示适合于吸入的气动性质, FPF值(即离开促动器的<5 μm的颗粒%)为48.2%~81.0%, HFA 134a中的甲烷磺酸盐显示最高FPF, 具有很好的前景。引入口(进料口)沉积物主要小于20%, 游离碱(50:50抛射剂与乙醇/Tween)和乙烷-1,2-二磺酸盐(HFA 227与乙醇/Tween)制剂除外。

[0268] 表19的平均计量剂量(平均值,n=3,±SD)显示了RPL554回收率为表13所示的理论计量剂量(假设无吸附)的53%~75%。

表 19

RPL554 变体	游离碱	乙烷磺酸盐	甲烷磺酸盐
计量重量(mg)	66.18 ± 0.2	77.56 ± 0.2	70.29 ± 0.7
每次促动的计量剂量(µg)	138.60 ± 1.6	105.28 ± 1.4	105.71 ± 2.9
促动器上的游离碱%	6.97 ± 0.6	11.06 ± 1.5	10.29 ± 0.8
每次促动发射的剂量(µg)	128.93 ± 0.8	93.65 ± 2.7	94.84 ± 2.9
FPF (% < 5 µm)	60.22 ± 1.6	79.66 ± 2.0	81.02 ± 1.6
MMAD (µm)	1.35 ± 0.1	2.20 ± 0.1	1.84 ± 0.1
GSD	2.62 ± 0.1	1.99 ± 0.1	2.11 ± 0.02
FPD (µg < 5 µm)	77.63 ± 2.1	74.59 ± 2.5	76.81 ± 1.6
RPL554 变体	苯磺酸盐	硫酸盐	乙烷-1,2-二磺酸盐
计量重量(mg)	72.69 ± 0.1	70.08 ± 0.2	66.71 ± 0.2
每次促动的计量剂量(µg)	112.48 ± 2.6	87.24 ± 1.4	107.41 ± 1.6
促动器上的游离碱%	9.13 ± 0.4	8.03 ± 1.5	6.77 ± 0.2
每次促动发射的剂量(µg)	102.21 ± 2.3	80.25 ± 2.3	100.14 ± 1.2
FPF (% < 5 µm)	76.41 ± 2.0	75.69 ± 3.4	48.15 ± 1.2
MMAD (µm)	2.20 ± 0.2	1.60 ± 0.1	1.84 ± 0.1
GSD	1.99 ± 0.04	2.44 ± 0.03	3.48 ± 0.3
FPD (µg < 5 µm)	78.08 ± 2.3	60.74 ± 3.2	48.21 ± 0.8

[0269] [0270] 50:50抛射剂和乙醇/Tween中的RPL554游离碱;HFA 227中的RPL554乙烷磺酸盐;HFA 134a中的RPL554甲烷磺酸盐、苯磺酸盐和硫酸盐以及HFA 227和乙醇 /Tween中的RPL554乙烷-1,2-二磺酸盐。

[0271] 干粉吸入器评价

[0272] 制备含有1重量%的RPL554游离碱或盐:乳糖的单批料。测试各种共混物的样品以确定RPL554碱含量,还测试各种共混物的气动性质。还将制剂的样品在升高温度(70°C)下储存7日以评价稳定性。

[0273] 干粉吸入器RPL554游离碱和盐:乳糖粉末混合物

[0274] 在17°C和56%RH的温度和湿度条件下制备RPL554:乳糖粉末共混物。对于游离碱、乙烷磺酸盐和甲烷磺酸盐(平均值,n=3,±SD),测量的共混物的RPL554含量证实与表20所示的理论含量(由表13中的分子量计算)紧密一致。剩余共混物(硫酸盐除外)得到理论值的80%至90%的值。硫酸盐的较低值反映输入材料的较低纯度(已知含有经HPLC-UV确认的约15面积%水平的杂质)。不过,所有共混物均发现具有小于5%RSD的含量均一性,因此在假定盐的纯度和水含量在测试日时未知的前提下视为适合于进一步测试。

表 20			
RPL554 变体	回收的总 RPL554 (μg)	理论 RPL554 含量 μg (1% w/w)	回收的 RPL554 含量 (理论%)
碱	194.17 \pm 3.2	201.33 \pm 1.5	96.44 \pm 0.9
乙烷磺酸盐	161.89 \pm 2.4	163.88 \pm 0.5	98.79 \pm 1.3
对甲苯磺酸盐	130.98 \pm 1.9	147.73 \pm 0.7	88.66 \pm 1.1
甲烷磺酸盐	165.05 \pm 2.9	166.49 \pm 0.0	99.13 \pm 1.7
苯磺酸盐	134.89 \pm 1.2	150.99 \pm 0.8	89.34 \pm 0.5
硫酸盐	122.77 \pm 2.8	167.03 \pm 1.0	73.50 \pm 1.3
盐酸盐	158.44 \pm 4.4	187.67 \pm 1.9	84.42 \pm 1.9
乙烷 -1,2- 二 磺酸盐	135.96 \pm 3.0	169.57 \pm 0.5	80.18 \pm 1.6
氢溴酸盐	143.99 \pm 0.6	172.73 \pm 2.3	83.37 \pm 0.8

[0275] [0276] DPI制剂的气溶胶性能

[0277] 在递送每次剂量前后测定 Cyclohaler® 加胶囊的重量, 以估算对于每次NGI测定递送的粉末共混物的总质量。由重量测量估算的总递送剂量示于表21(5个含有20mg 的粉末共混物的胶囊(200 μg 游离碱或盐/胶囊)), 经由 Cyclohaler®; 所有值表示为 RPL554碱,*除外)。该表格还显示了对于各种RPL554变体递送的RPL554碱的质量的计算。调节该值以考虑各共混物的实际RPL554碱含量(即理论%)。还显示了通过来自NGI的样品的HPLC分析测定的回收的RPL554碱的总 μg 。质量平衡, 即实际回收率(HPLC分析)/计算回收率(质量测量)表明, 对于所有9种制剂, 都实现了64%~ 74%的回收率。

表 21				
RPL554 变体	*理论 μg RPL554 变体 /20 mg 的 1 重量%共混物	各胶囊中的理论 μg RPL554/20 mg 的 1 重量%共混物	测量的共混物含量(理论%)	**调节的每个胶囊的 RPL554 含量(μg)
游离碱	200	200.00	96.44	192.87
乙烷碘酸盐	200	162.52	98.79	160.55
对甲苯碘酸盐	200	146.99	88.66	130.33
甲烷碘酸盐	200	166.49	99.13	165.05
苯碘酸盐	200	150.24	89.34	134.22
硫酸盐	200	165.92	73.50	121.95
盐酸盐	200	185.81	84.42	156.86
乙烷-1,2-二碘酸盐	200	166.79	80.18	133.73
氢溴酸盐	200	171.02	83.37	142.58
RPL554 变体	†每个胶囊递送的 1 重量%共混物的测量质量(mg)	每个胶囊的计算 RPL554 含量(μg) (A)	††每个胶囊发射的 RPL554 (μg) (B)	回收率% (B/A)
游离碱	20.12	194.03	133.59	68.85
乙烷碘酸盐	20.18	162.00	111.09	68.57
对甲苯碘酸盐	20.02	130.46	86.84	66.57
甲烷碘酸盐	19.96	164.72	118.69	72.06
苯碘酸盐	20.04	134.49	87.57	65.11
硫酸盐	19.78	120.61	79.35	65.79
盐酸盐	20.14	157.96	102.27	64.75
乙烷-1,2-二碘酸盐	19.90	133.06	87.91	66.07
氢溴酸盐	19.96	142.29	104.28	73.29

[0278] **针对测量的共混物含量进行调节 (理论% - 参见表3.4.1.1)

[0279] †由胶囊加载装置的重量变化测定的质量

[0280] ††由回收样品的HPLC分析测定的质量

[0281] 使用 Cyclohaler® 气溶胶化的游离碱和盐的粒径分布示于图12,关键性能指标的总结示于表22 (配制为1重量%乳糖共混物,经由 Cyclohaler® DPI 递送; 分别含有 20mg的粉末共混物的5个胶囊 (200 μg RPL554变体/胶囊) 用于各测定)。

[0282] 对于氢溴酸盐制剂观察到最小FPP (29.43%) ;对于所有其他共混物,FPP超过30%,最大值为对于盐酸盐测定的46.29%。最小微粒剂量(RPL554碱等同物)为硫酸盐制剂的23.28 μg ,而最大值为游离碱共混物的43.31 μg ,反映计量剂量的差异(并且在硫酸盐的情况下,还有输入材料的较低纯度)。MMAD值在1.72 μm ~2.31 μm 的范围内。

表 22					
RPL554 变体	FB	ES	PT	MS	BS
回收的 RPL554 碱/胶囊(胶囊外) (μg)	133.59	111.09	86.84	118.69	87.57
发射的 RPL554 碱/胶囊的剂量(装置外) (μg)	123.05	100.75	77.79	111.01	77.30
FPF (% < 5 μm)	35.20	38.70	35.37	38.18	36.99
MMAD (μm)	1.99	1.87	1.74	2.00	1.91
GSD	2.63	2.57	2.55	2.40	2.57
FPD RPL554 碱(μg < 5 μm) (装置外)	43.31	38.99	27.52	42.39	28.59
RPL554 变体	SF	HC	ED	HB	
回收的 RPL554 碱/胶囊(胶囊外) (μg)	79.35	102.27	87.91	104.28	
发射的 RPL554 碱/胶囊的剂量(装置外) (μg)	70.71	92.97	79.95	93.20	
FPF (% < 5 μm)	32.93	46.29	40.39	29.43	
MMAD (μm)	2.10	1.72	1.96	2.31	
GSD	2.69	2.42	2.42	2.24	
FPD RPL554 碱(μg < 5 μm) (装置外)	23.28	43.04	32.29	27.43	

[0284] [0285] 关键值:FB-游离碱;ES-乙烷磺酸盐;PT-对甲苯磺酸盐;MS-甲烷磺酸盐;BS-苯磺酸盐;SF-硫酸盐;HC-盐酸盐;ED-乙烷-1,2-二磺酸盐;HB-氢溴酸盐。

[0286] [0286] 对于盐酸盐和乙烷-1,2-二磺酸盐观察到特别有利的微粒分数(FPF)。

[0287] [0287] RPL554变体:乳糖粉末共混物的共混物稳定性评价

[0288] [0288] 未观察到粉末外观的可见变化。在除了硫酸盐以外的所有情况下,在室温和升高温度下储存后,来自不同盐形式的RPL554的峰面积占总面积的96%~99%。硫酸盐仅显示总面积的82%,但这反映输入材料的纯度,且并不表明降解。对于游离碱或任何盐,看起来在室温或在70°C没有任何由储存引起的降解。

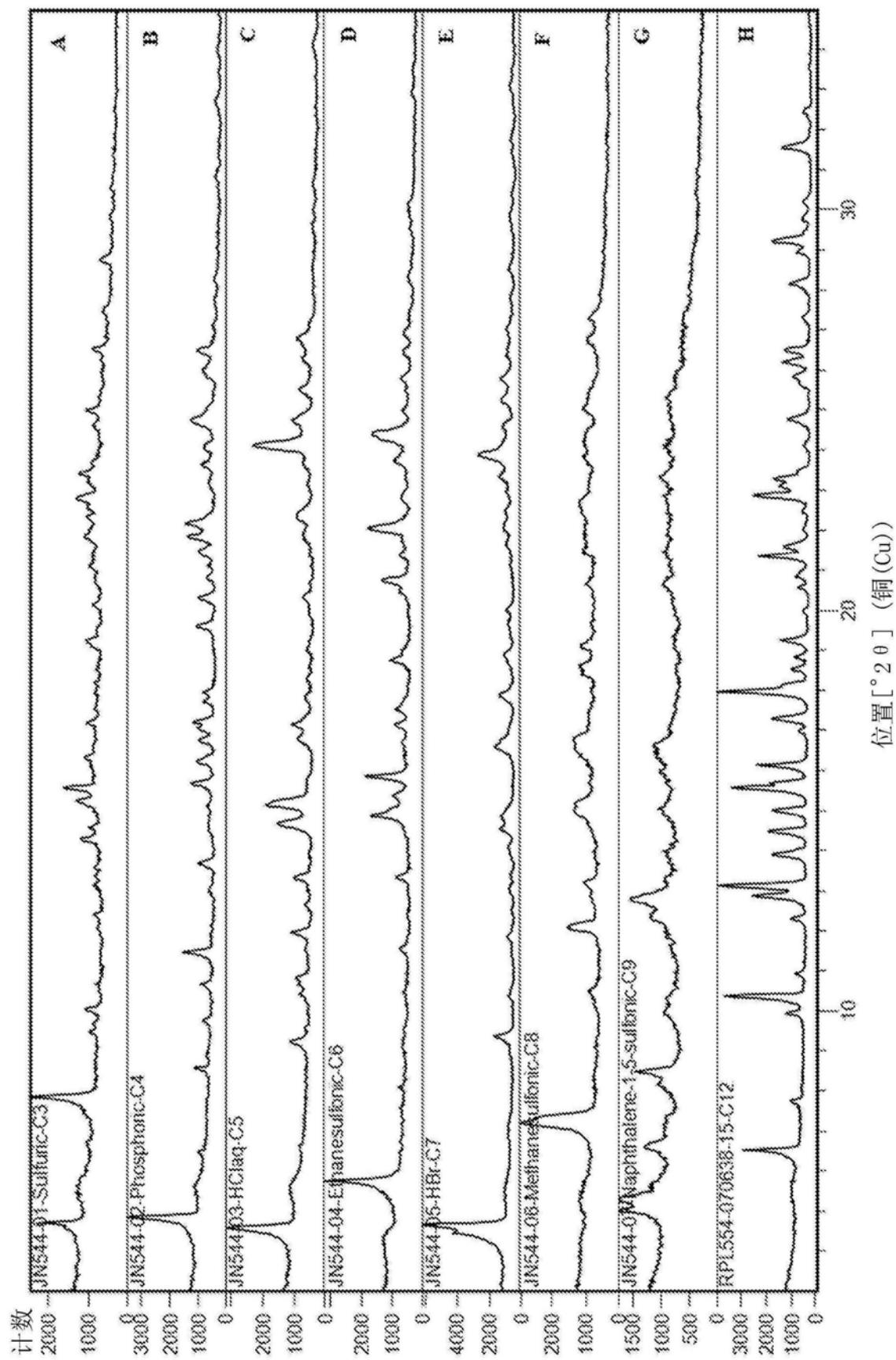


图1

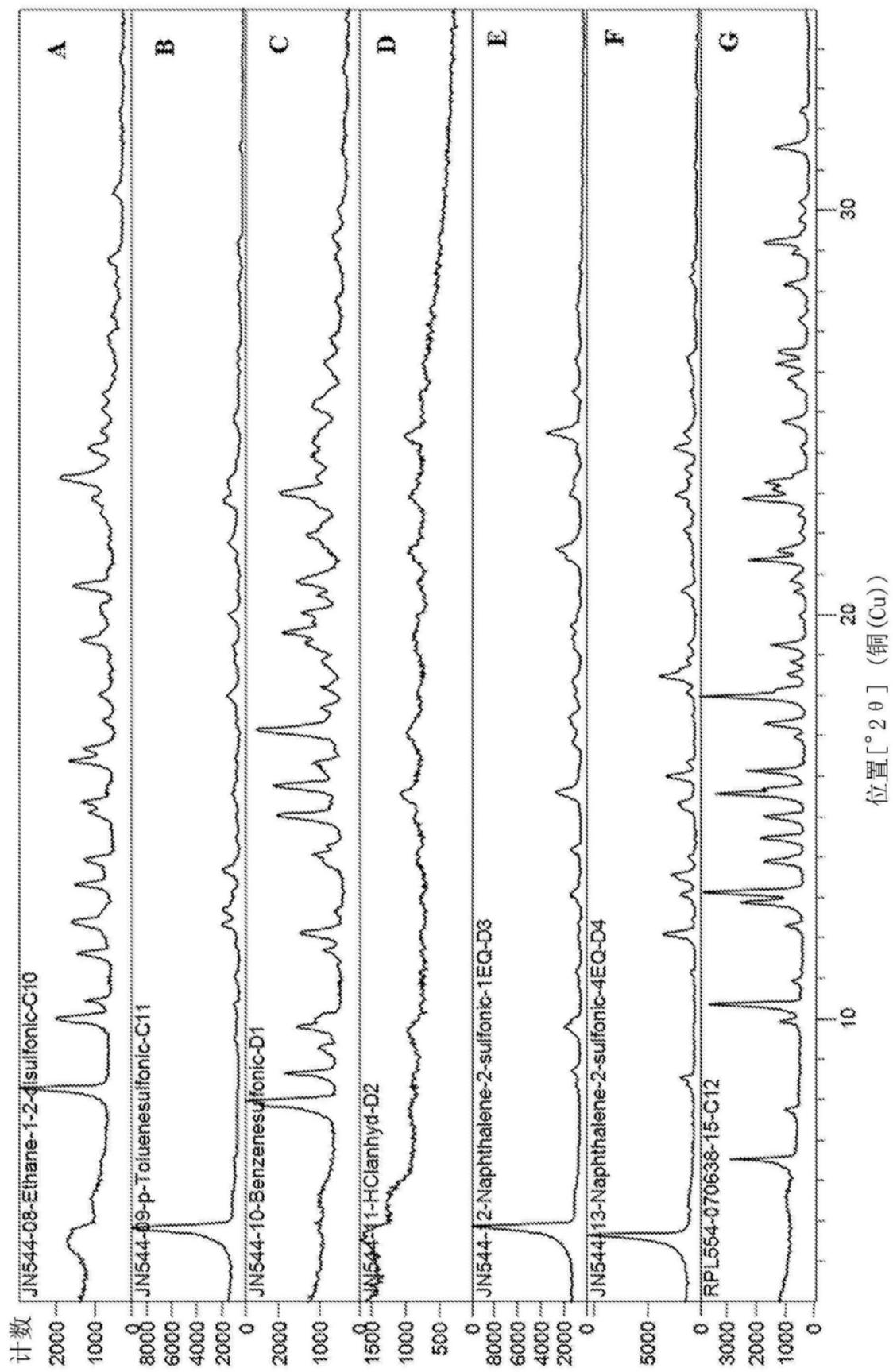


图2

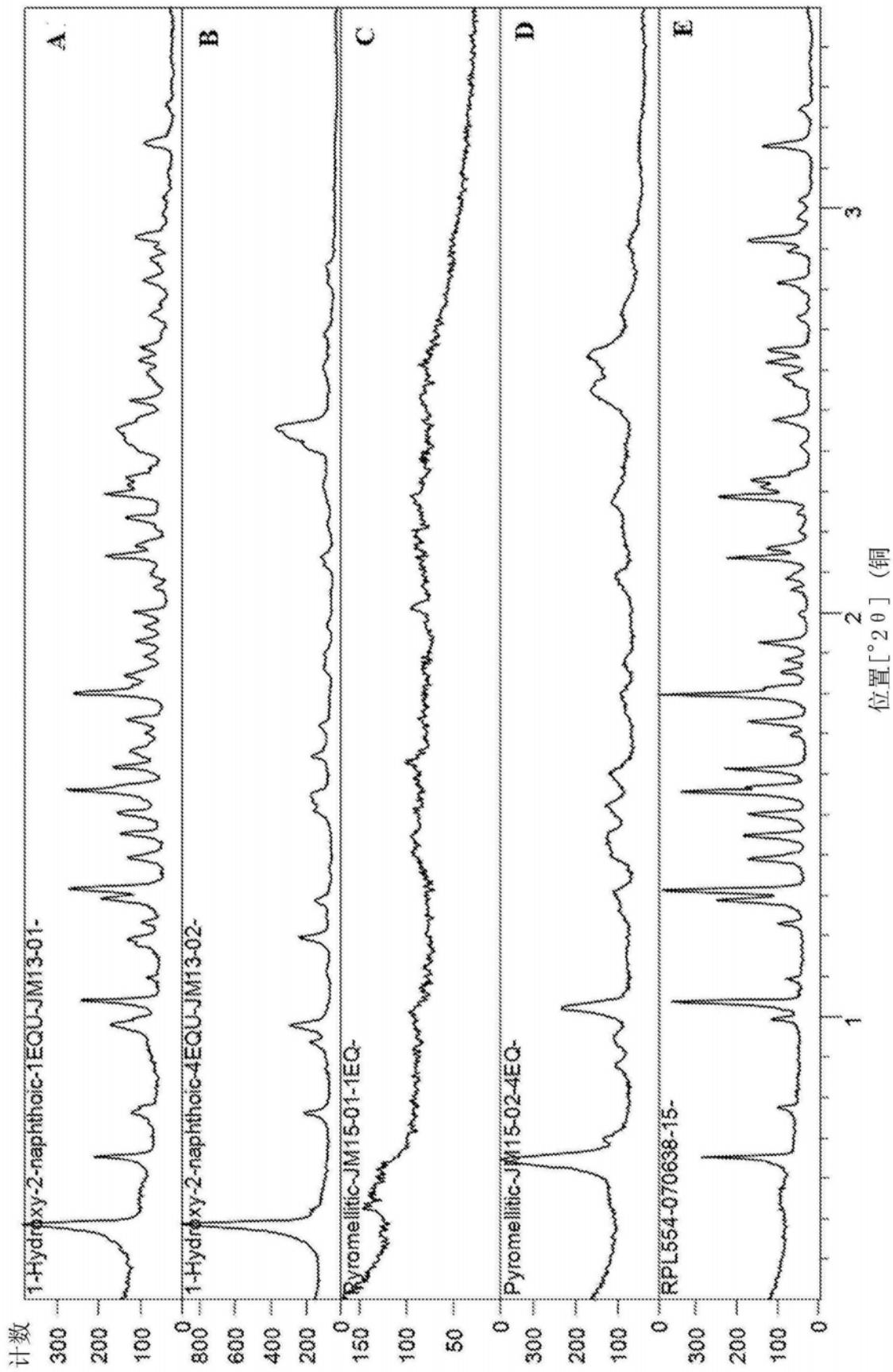


图3

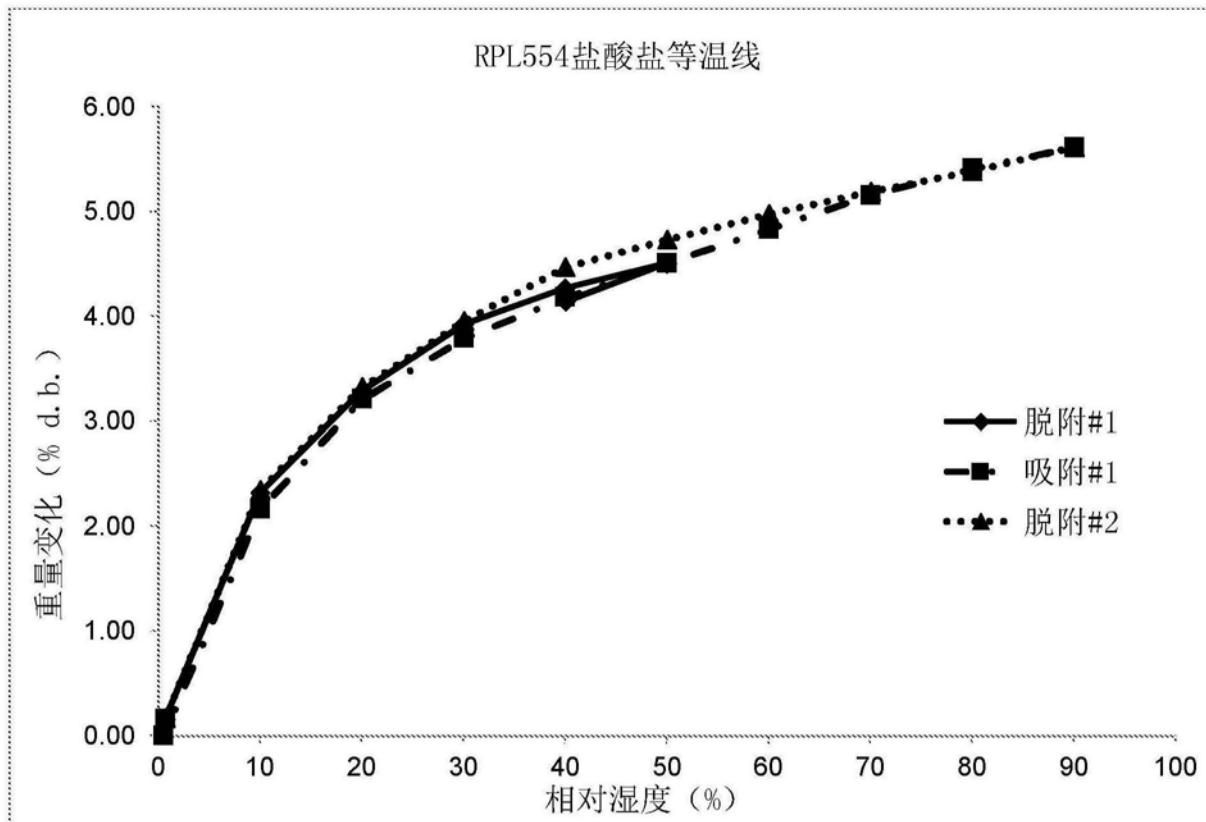


图4

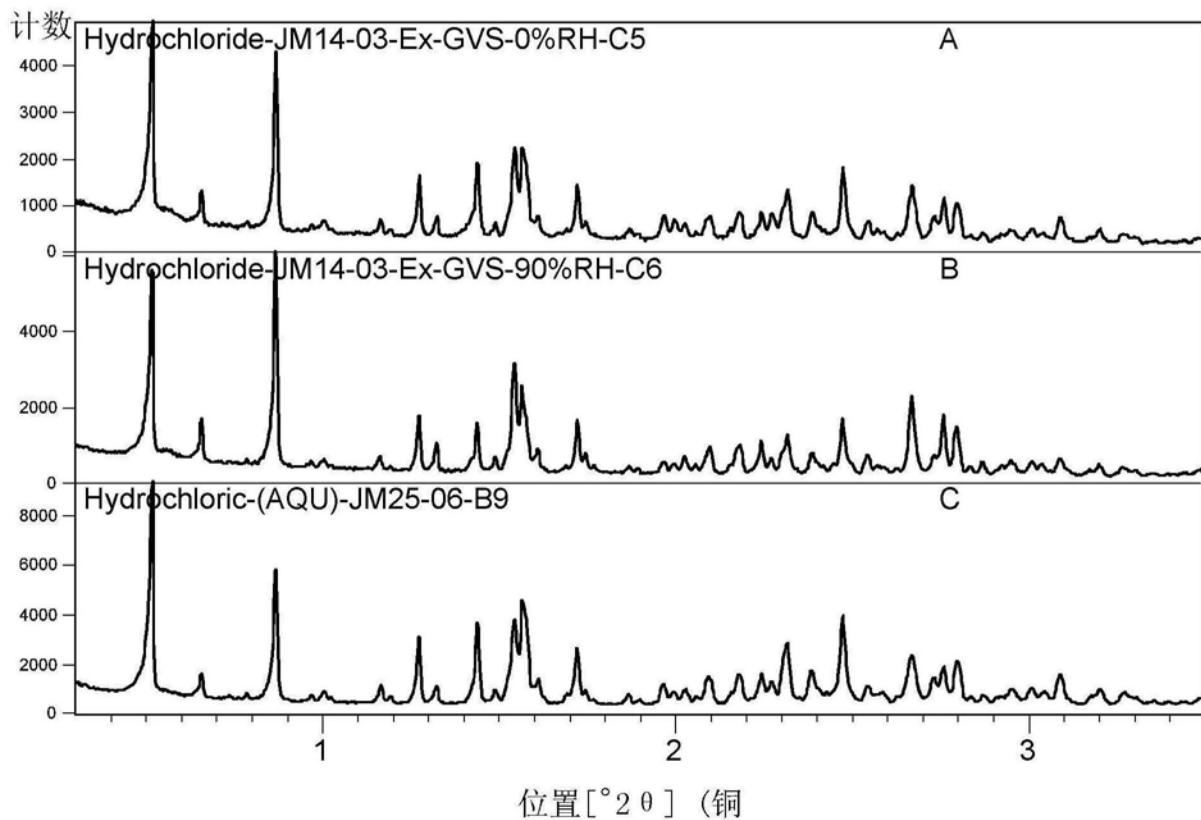


图5

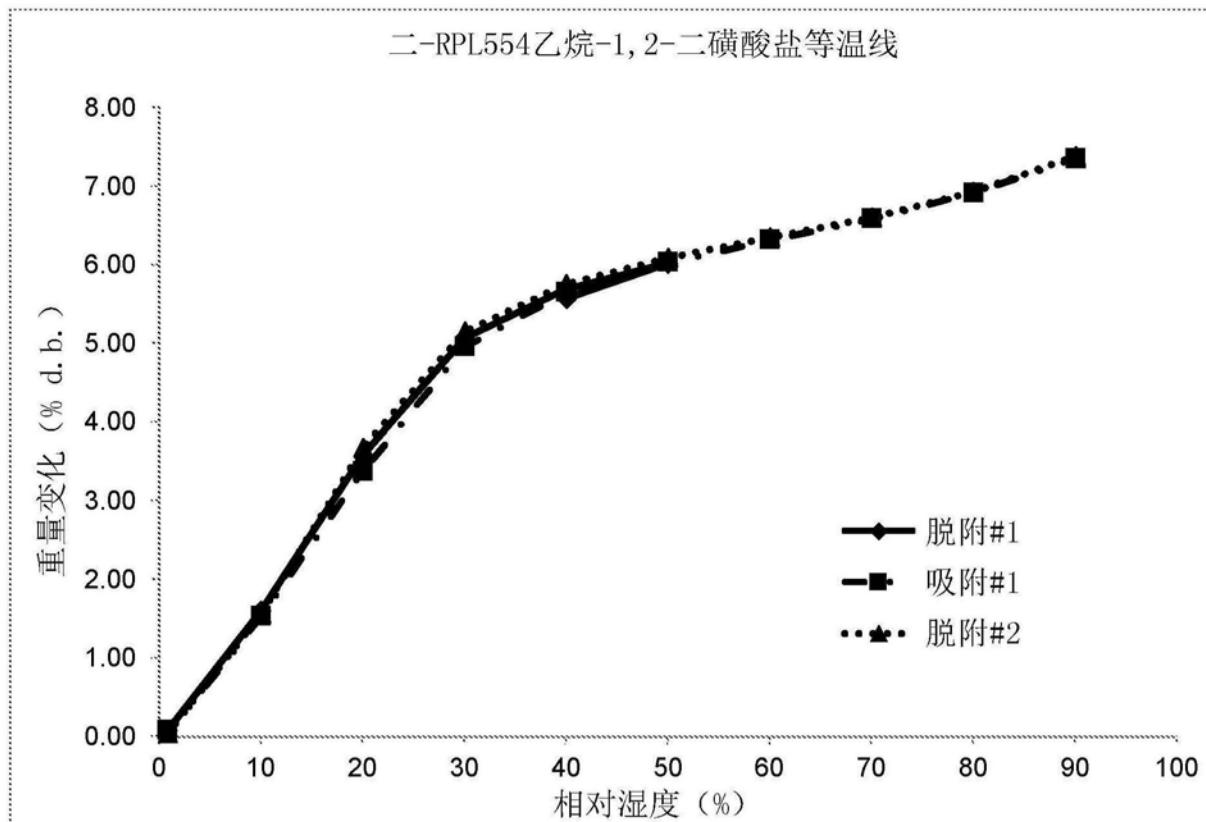


图6

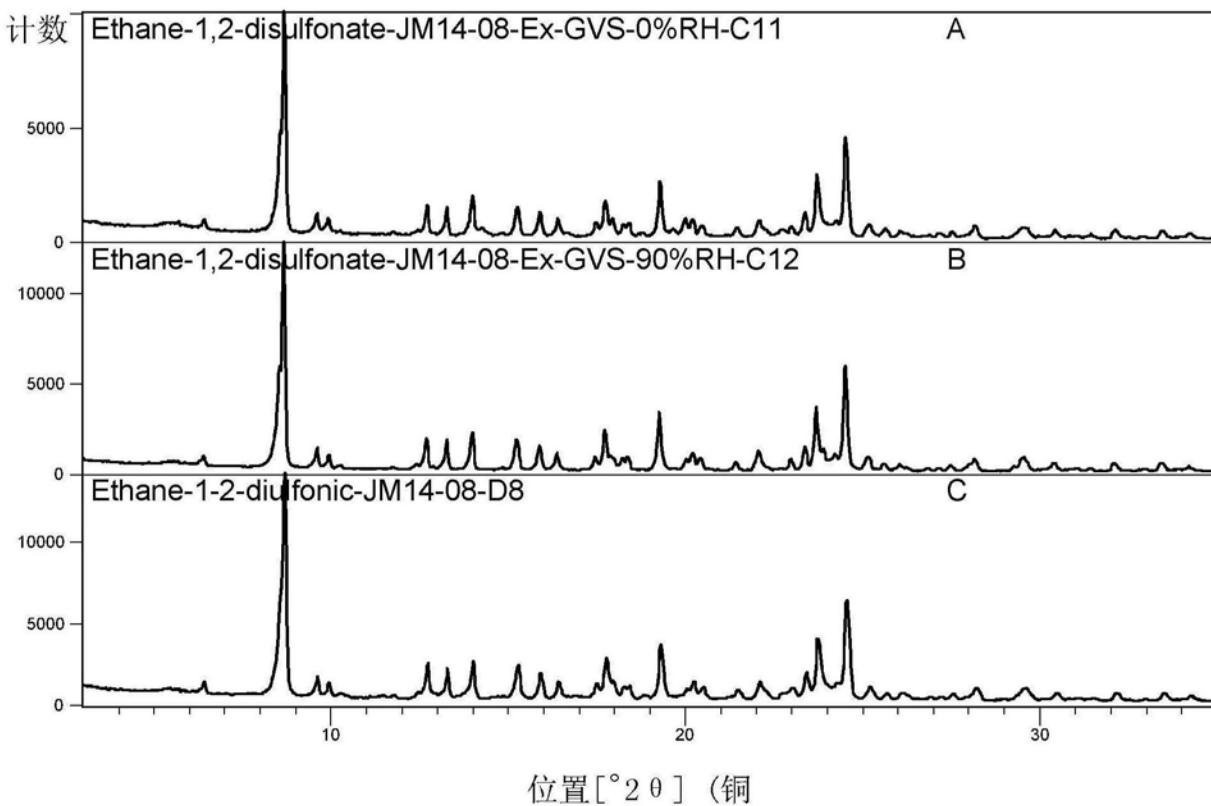


图7

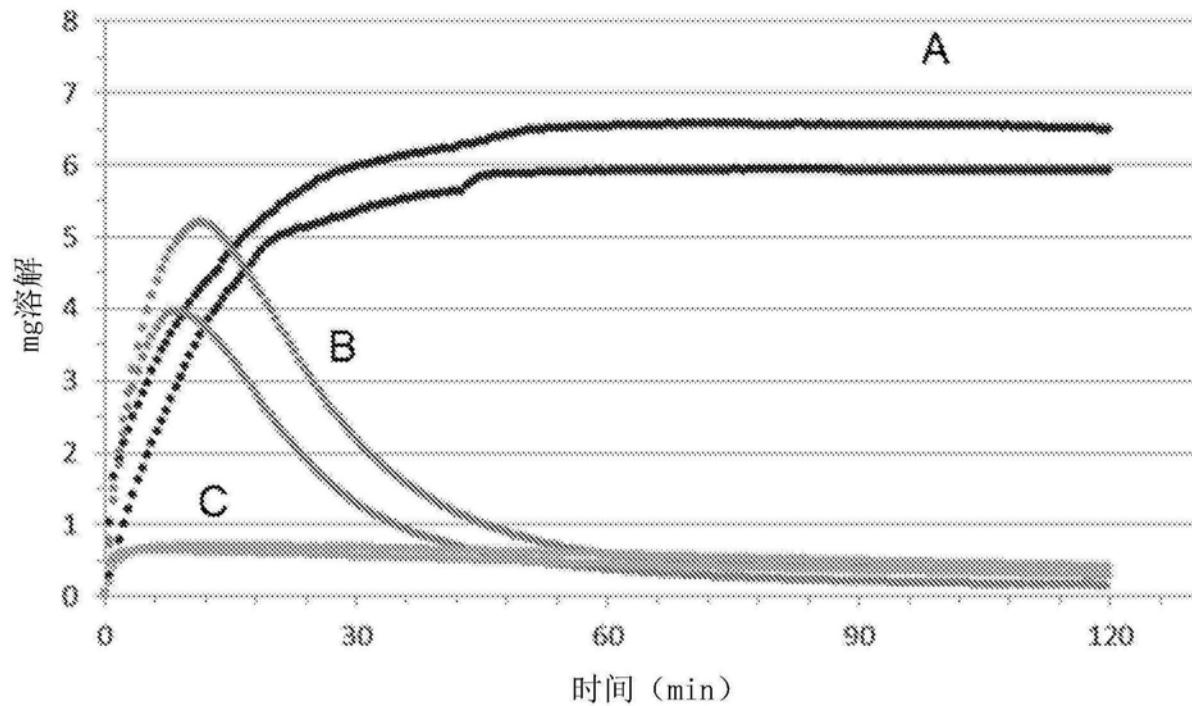


图8

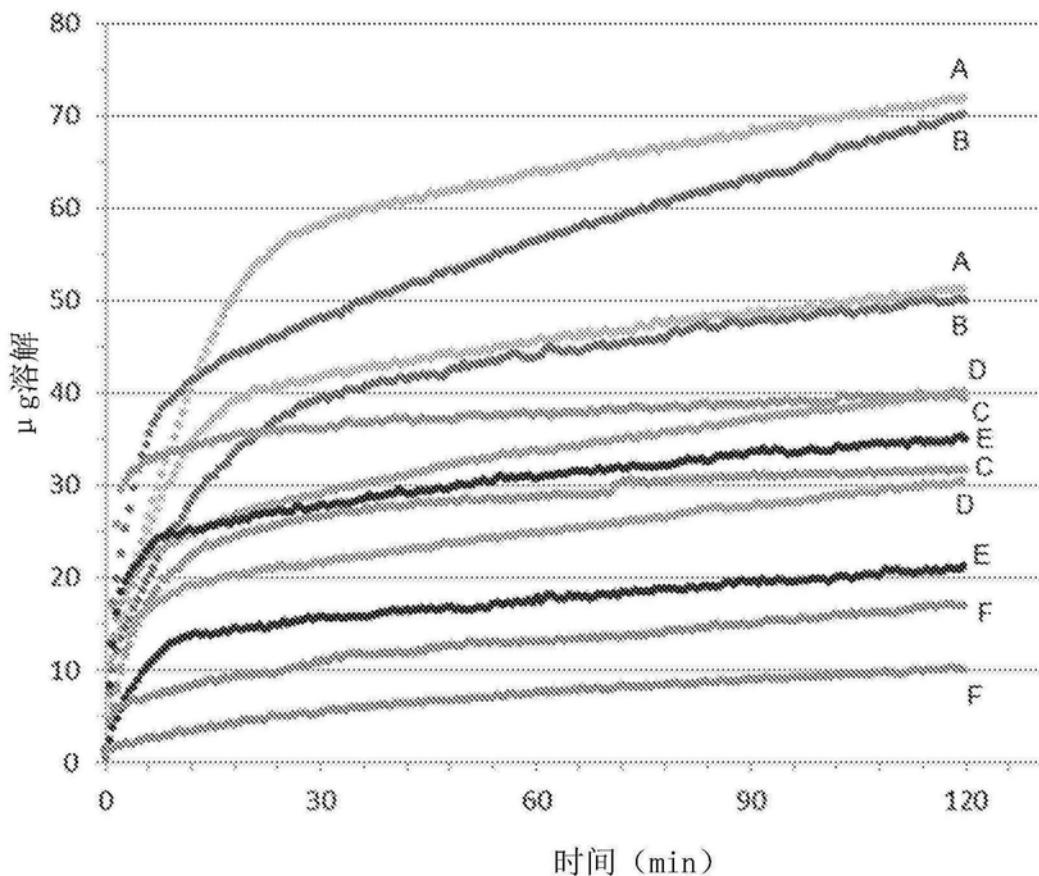


图9

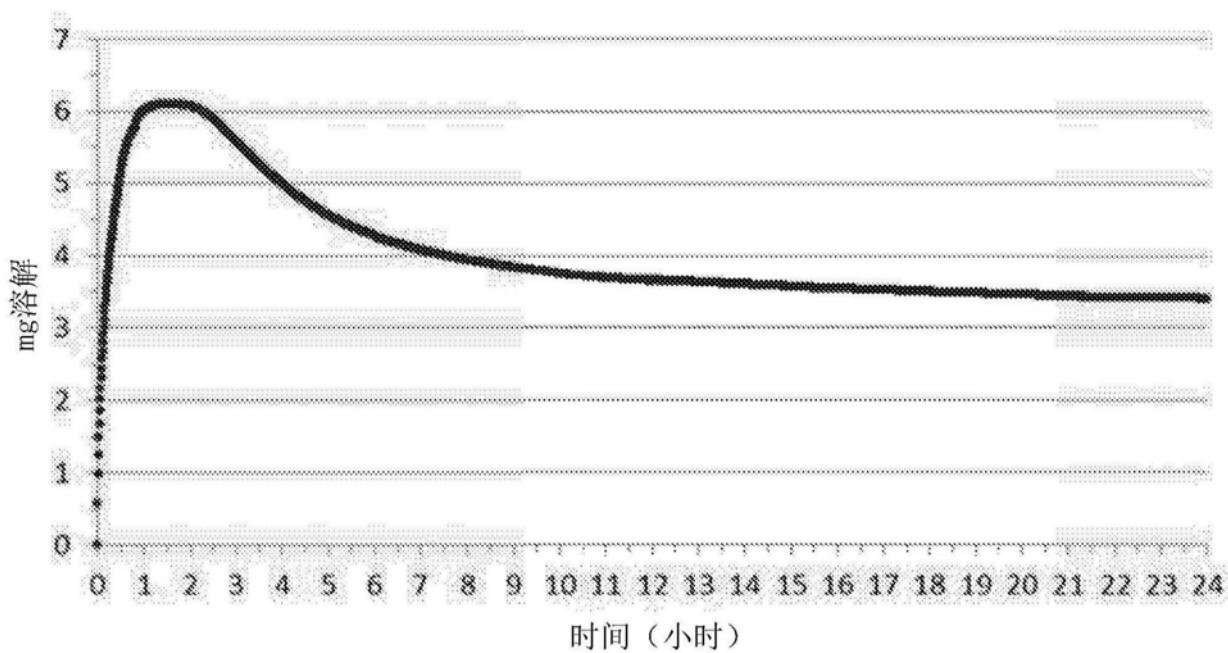


图10

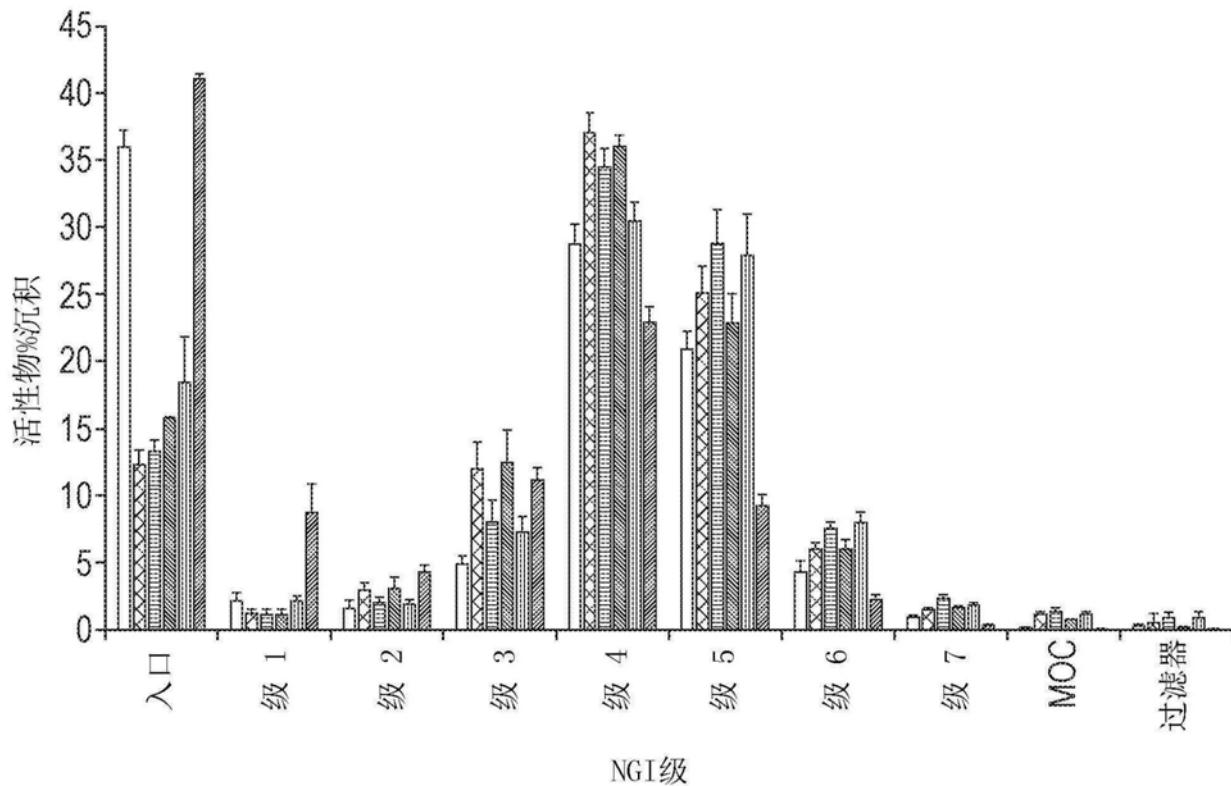


图11



图12