



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103626744 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201310554645. 5

(22) 申请日 2008. 12. 04

(30) 优先权数据

61/012, 162 2007. 12. 07 US

(62) 分案原申请数据

200880123888. 0 2008. 12. 04

(73) 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 A · 科舍瓦兹舒克瑞 B · 张

M · 克拉维克

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 王贵杰

(51) Int. Cl.

C07D 405/12(2006. 01)

A61K 31/443(2006. 01)

A61P 11/00(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007134279 A2, 2007. 11. 22,

WO 2007056341 A1, 2007. 05. 18,

CN 101006076 A, 2007. 07. 25,

US 4501729 A, 1985. 02. 26,

US 5876700 A, 1999. 03. 02,

审查员 胡建朝

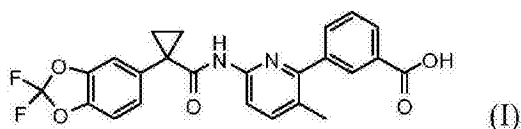
权利要求书1页 说明书24页 附图10页

(54) 发明名称

3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [D][1, 3] 间二氧杂环戊烯-5- 基) 环丙烷甲酰氨基)-3- 甲基吡啶-2- 基) 苯甲酸的固体形式

(57) 摘要

本发明涉及式 (I) 的 3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [d][1, 3] 间二氧杂环戊烯-5- 基) 环丙烷甲酰氨基)-3- 甲基吡啶-2- 基) 苯甲酸 (晶型 I) 的基本上结晶和游离固态形式、其药物组合物和使用它们的治疗方法。



1. 药物组合物, 包含 3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [d] [1, 3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基) 环丙烷甲酰氨基)-3- 甲基吡啶 -2- 基) 苯甲酸的晶型 I、药学上可接受的载体和 N-(5- 羟基 -2, 4- 二叔丁基 - 苯基)-4- 氧代 -1H- 喹啉 -3- 甲酰胺, 其中晶型 I 的特征在于在使用 Cu K α 射线得到的 X- 射线粉末衍射中在 15.2-15.6 度、16.1-16.5 度、14.3-14.7 度、14.6-15.0 度、17.6-18.0 度、16.4-16.8 度、7.6-8.0 度、25.8-26.2 度、21.4-21.8 度和 23.1-23.5 度的峰。

2. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的特征在于在 15.4 度、16.3 度、14.5 度、14.8 度和 17.8 度的峰。

3. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的特征在于在 16.6 度的峰。

4. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的特征在于在 7.8 度的峰。

5. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的特征在于在 26.0 度的峰。

6. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的特征在于在 21.6 度的峰。

7. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的特征在于在 23.3 度的峰。

8. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的特征在于与图 2 的衍射图案相同的衍射图案。

9. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的 D90 的粒度分布为 82 μm 或更小。

10. 权利要求 1 的药物组合物, 其中晶型 I 的 D50 的粒度分布为 30 μm 或更小。

11. 权利要求 1 的药物组合物在制备治疗哺乳动物囊性纤维化的药物中的用途。

3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [D] [1, 3] 间二氧杂环戊
烯-5- 基) 环丙烷甲酰氨基)-3- 甲基吡啶-2- 基) 苯甲酸
的固体形式

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 12 月 04 日、申请号为 200880123888.0、发明名称为“3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [D] [1, 3] 间二氧杂环戊烯-5- 基) 环丙烷甲酰氨基)-3- 甲基吡啶-2- 基) 苯甲酸的固体形式”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请根据 35U. S. C. § 119 要求 2007 年 12 月 7 日提交的美国临时专利申请顺序号 US61/012, 162 的利益, 将该文献的全部内容引入本文参考。

[0004] 本发明的技术领域

[0005] 本发明涉及 3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [d] [1, 3] 间二氧杂环戊烯-5- 基) 环丙烷甲酰氨基)-3- 甲基吡啶-2- 基) 苯甲酸的固态形式例如晶型、其药物组合物及其使用方法。

[0006] 发明背景

[0007] CFTR 是在多种细胞类型包括吸收性和分泌上皮细胞中表达的 cAMP/ATP- 介导的阴离子通道, 其中它调节通过膜的阴离子流量和其他离子通道和蛋白的活性。在上皮细胞中, CFTR 的正常概念对维持遍布体内包括呼吸和消化组织的电解质运输而言是关键的。CFTR 由约 1480 个氨基酸组成, 这些氨基酸编码由跨膜结构域的串联重复单元构成的蛋白质, 所述跨膜结构域各自包含六个跨膜螺旋和核苷酸结合结构域。两个跨膜结构域通过大的极性调节 (R)- 结构域连接, 所述大的极性调节 (R)- 结构域具有调节通道活性和细胞运输的多个磷酸化位点。

[0008] 编码 CFTR 的基因已被鉴别和测序 (参见 Gregory, R. J. 等人, (1990)Nature347 : 382-386 ;Rich, D. P. 等 人, (1990)Nature347 :358-362 ;Riordan, J. R. 等 人, (1989)Science245 :1066-1073)。这种基因的缺陷引起 CFTR 突变, 导致囊性纤维化 (“CF”), 这是人类最常见的致命性遗传疾病。囊性纤维化影响大约两千五百分之一的美国新生儿。在全部美国人口中, 多达一千万人携带有缺陷基因的单一副本, 没有明显的疾病效应。相反, 带有两个 CF 相关基因副本的个体遭受 CF 的衰弱与致命性效应, 包括慢性肺病。

[0009] 在囊性纤维化患者中, 在呼吸道上皮中被内源性表达的 CFTR 的突变引起顶端阴离子分泌减少, 导致离子和体液转运的失衡。所致阴离子转运降低导致肺中粘液蓄积增强和伴随的微生物感染, 最终导致 CF 患者死亡。除了呼吸疾病以外, CF 患者通常经历胃肠问题和胰腺机能不全, 如果不加治疗则导致死亡。另外, 大多数患有囊性纤维化的男性是不育的, 患有囊性纤维化的女性的生育力降低。与两个 CF 相关基因副本的严重效应相反, 带有单一 CF 相关基因副本的个体表现出对霍乱和腹泻所致脱水的抗性增加—这也许解释了人群内相对高频率的 CF 基因的原因。

[0010] CF 染色体 CFTR 基因的序列分析已经揭示了多种致病性突变 (Cutting, G. R. 等人, (1990)Nature346 :366-369 ;Dean, M. 等人, (1990)Cell161 :863 :870 ;和 Kerem, B-S. 等人, (1989)Science245 :1073-1080 ;Kerem, B-S 等人, (1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA87 : 8447-8451)。迄今已经鉴别了 1000 种以上致病性 CF 基因突变 (<http://www.genet>。

sickkids.on.ca/cftr/)。最常见的突变是 CFTR 氨基酸序列 508 位苯丙氨酸的缺失,其普遍被称为 $\Delta F508$ -CFTR。这种突变发生在大约 70% 的囊性纤维化病例中,与严重的疾病有关。

[0011] $\Delta F508$ -CFTR 中残基 508 的缺失阻止初生蛋白正确地折叠。这导致该突变蛋白不能退出 ER 并运输至质膜。其结果是,膜中通道数量远远少于表达野生型 CFTR 的细胞中所观察到的。除了运输受损以外,突变还导致有缺陷的通道门控。同时,膜中通道数量减少和有缺陷的门控引起跨越上皮的阴离子转运减少,引起有缺陷的离子和体液转运 (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4 :2709-2727)。不过,研究已经显示,膜中 $\Delta F508$ -CFTR 的数量减少是功能性的,尽管少于野生型 CFTR (Dalemans 等人, (1991), Nature Lond. 354 :526-528 ; Denning 等人, 见上 ;Pasyk 和 Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270 :12347-50)。除了 $\Delta F508$ -CFTR 以外,其他导致有缺陷的运输、合成和 / 或通道门控的致病性 CFTR 突变可能被增量或减量调节,以改变阴离子分泌和减缓疾病进展和 / 或严重性。

[0012] 尽管 CFTR 除了阴离子以外还转运多种分子,不过显然这种角色 (阴离子的转运) 代表了跨越上皮转运离子和水的重要机理中的一种要素。其他要素包括上皮 Na^+ 通道、ENaC、 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共同转运蛋白、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道,它们负责摄取氯化物进入细胞。

[0013] 这些要素一起工作,经由它们在细胞内的选择性表达和定位实现跨越上皮的定向转运。借助存在于顶端膜上的 ENaC 与 CFTR 和在细胞基底外侧表面上表达的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵与 Cl^- 通道的协调活性,发生氯化物的吸收。氯化物从腔侧的次级主动转运引起细胞内氯化物的蓄积,然后可以被动地经由 Cl^- 通道离开细胞,导致向量转运。 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共同转运蛋白、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道在基底外侧表面上的排列和腔侧上的 CFTR 协调氯化物经由腔侧上 CFTR 的分泌。因为水可能从不主动转运自己,它跨越上皮的流动依赖于由钠和氯化物的大量流动所生成的微小跨上皮渗透梯度。

[0014] 正如上文所讨论的,据信 $\Delta F508$ -CFTR 中残基 508 的缺失阻止初生蛋白正确地折叠,导致这种突变蛋白不能退出 ER 和运输至质膜。其结果是,存在于质膜的成熟蛋白数量不足,上皮组织内氯化物的转运显著减少。事实上,这种 ABC 转运蛋白被 ER 机构有缺陷的 ER 加工的细胞现象已被显示不仅是囊性纤维化疾病的基础,而且是广泛的其他孤立性与遗传性疾病的基础。ER 机构可能发生故障的两种方式要么是与蛋白质的 ER 输出的偶联丧失,引起降解,要么是这些有缺陷 / 误折叠的蛋白质的 ER 蓄积 [Aridor M. 等人, Nature Med., 5(7), pp745-751 (1999) ;Shastry, B. S. 等人, Neurochem. International, 43, pp1-7 (2003) ;Rutishauser, J. 等人, Swiss Med Wkly, 132, pp211-222 (2002) ;Morello, JP 等人, TIPS, 21, pp. 466-469 (2000) ;Bross P. 等人, Human Mut., 14, pp. 186-198 (1999)]。

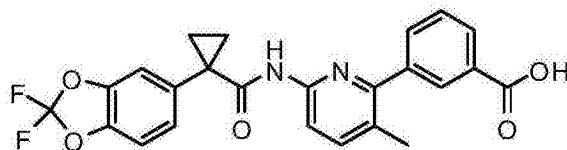
[0015] 盐形式的 3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [d] [1, 3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基) 环丙烷甲酰氨基)-3- 甲基吡啶 -2- 基) 苯甲酸作为 CFTR 活性调节剂公开在国际 PCT 公开号 W02007056341 中 (将该公开文献的全部内容引入本文参考) 且由此用于治疗 CFTR- 介导的疾病例如囊性纤维化。然而,对准备用于适合于用作治疗剂的药物组合物的所述化合物的稳定固体形式存在需求。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及 3-(6-(1-(2, 2- 二氟苯并 [d] [1, 3] 间二氧杂环戊烯 -5- 基) 环丙烷

甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(下文的“化合物1”)的固体形式,它具有如下结构:

[0018]



化合物 1。

[0019] 化合物 1 及其药学上可接受的组合物用于治疗囊性纤维化或减轻其严重性。在一个方面中,化合物 1 为基本上结晶且不含盐(salt free)的形式,被称为如下文所述和表征的晶型 I。

[0020] 本文描述了可以用于制备包含晶型 I 的本发明组合物的方法。用于该方法的分量的量和特征如本文所述。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1 是根据化合物 1 的晶型 I 的单晶结构计算的 X-射线衍射图案。

[0023] 图 2 是化合物 1 的晶型 I 的实际 X-射线粉末衍射图案。

[0024] 图 3 是根据化合物 1 的晶型 I 的单晶结构计算的 X-射线衍射图案和化合物 1 的晶型 I 的实际 X-射线粉末衍射图案的覆盖图。

[0025] 图 4 是化合物 1 的晶型 I 的差示扫描量热(DSC)扫迹(trace)。

[0026] 图 5 是基于单晶 X-射线分析的化合物 1 的晶型 I 的构象照片。

[0027] 图 6 是基于作为通过羧酸基团形成的二聚体的单晶 X-射线分析的化合物 1 的晶型 I 的构象照片。

[0028] 图 7 是基于显示分子彼此叠加的单晶 X-射线分析的化合物 1 的晶型 I 的构象照片。

[0029] 图 8 是显示不同视图的基于单晶 X-射线分析的化合物 1 的晶型 I 的构象照片(a 向下)。

[0030] 图 9 是化合物 1 的晶型 I 的 50mg/mL、0.5 甲基纤维素-聚山梨醇酯 80 混悬液在 T(0) 的 ¹HNMR 分析。

[0031] 图 10 是贮存在室温 24 小时的化合物 1 的晶型 I 的 50mg/mL、0.5 甲基纤维素-聚山梨醇酯 80 混悬液在 T(0) 的 ¹HNMR 分析。

[0032] 图 11 是化合物 1·HCl 标准品的 ¹HNMR 分析。

[0033] 发明概述

[0034] 定义

[0035] 除非另作陈述,否则下列定义应适用。

[0036] 本文所用的术语“CFTR”表示囊性纤维化跨膜传导调节剂或其具有调节剂活性的突变体,包括但不限于 ΔF508CFTR 和 G551D CFTR(参见例如 <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, 关于 CFTR 突变)。

[0037] 本文所用的“结晶”意指化合物或组合物,其中结构单元以固定几何模式或晶格排列,使得结晶固体具有刚性长程序。构成晶体结构的结构单元可以是原子、分子或离子。结

晶固体显示确定的熔点。

[0038] 本文所用的术语“调节”表示以可测量的量增加或降低例如活性。

[0039] 本发明在一个方面中的特征在于 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的晶型,其特征为晶型 I。

[0040] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征在于使用 Cu K α 射线得到的在 X-射线粉末衍射中在 15.2-15.6 度、16.1-16.5 度和 14.3-14.7 度的一个或多个峰。

[0041] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征在于在 15.4、16.3 和 14.5 度的一个或多个峰。

[0042] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 14.6-15.0 度的峰。

[0043] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 14.8 度的峰。

[0044] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 17.6-18.0 度的峰。

[0045] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 17.8 度的峰。

[0046] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 16.4-16.8 度的峰。

[0047] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 16.4-16.8 度的峰。

[0048] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 16.6 度的峰。

[0049] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 7.6-8.0 度的峰。

[0050] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 7.8 度的峰。

[0051] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 25.8-26.2 度的峰。

[0052] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 26.0 度的峰。

[0053] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 21.4-21.8 度的峰。

[0054] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 21.6 度的峰。

[0055] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 23.1-23.5 度的峰。

[0056] 在另一个实施方案中,晶型 I 的特征还在于在 23.3 度的峰。

[0057] 在一些实施方案中,晶型 I 的特征在于基本上与图 1 的衍射图案类似的衍射图案。

[0058] 在一些实施方案中,晶型 I 的特征在于基本上与图 2 的衍射图案类似的衍射图案。

[0059] 在一些实施方案中,晶型 I 的 D90 的粒度分布为约 82 μm 或更小。

[0060] 在一些实施方案中,晶型 I 的 D50 的粒度分布为约 30 μm 或更小。

[0061] 本发明在一个方面中的特征在于包含晶型 I 和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0062] 在一个方面中,本发明的特征在于治疗人 CFTR 介导的疾病的方法,该方法包括对该人给予有效量的晶型 I。

[0063] 在一些实施方案中,该方法包括给予另一种治疗剂。

[0064] 在一些实施方案中,所述疾病选自囊性纤维化、遗传性肺气肿、遗传性血色素沉着症、凝血-纤维蛋白溶解缺陷症例如 C 蛋白缺陷症、I 型遗传性血管水肿、脂质加工缺陷症例如家族性高胆固醇血症、I 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积病例如 I-细胞疾病/假性赫尔勒 (Hurler) 病、粘多糖病、桑德霍夫/泰-萨克斯 (Sandhof/Tay-Sachs) 病、克里格勒-纳贾尔 (Crigler-Najjar) 综合症 II 型、多内分泌腺病/高胰岛素血症 (hyperinsulemia)、糖尿病、拉伦 (Laron) 侏儒症、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase) 缺乏症、原发性甲状旁腺机能减退症、黑色素瘤、聚糖病 (glycanosis) CDG1 型、遗传性肺气肿、

先天性甲状腺机能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺乏症、尿崩症 (DI)、后叶激素运载蛋白性 (neurophyseal) DI、肾性 DI、夏 - 马 - 图 (Charcot-Marie Tooth) 综合征、佩 - 梅 (Perlizaeus-Merzbacher) 病、神经变性疾病例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、皮克病、若干聚谷氨酰胺神经障碍例如亨廷顿病、I 型脊髓小脑性共济失调 (spinocerebellar ataxia type I)、脊髓与延髓肌肉萎缩、齿状核红核 (dentatorubal) 苍白球丘脑下部核萎缩和肌强直性营养不良以及海绵状脑病例如遗传性克 - 雅病、法布里病和斯 - 施综合征、COPD、干眼病和斯耶格仑病。

[0065] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗人囊性纤维化的方法,该方法包括对该人给予有效量的晶型 I。

[0066] 在一个方面中,本发明的特征在于包含晶型 I 及其使用说明书的试剂盒。

[0067] 在一个方面中,本发明的特征在于晶型 I 的制备方法,该方法包括将 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的 HCl 盐分散于或溶于适合溶剂有效量的时间。

[0068] 在一个实施方案中,本发明的特征在于晶型 I 的制备方法,该方法包括将 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的 HCl 盐分散于适合溶剂有效量的时间。

[0069] 在一些实施方案中,适合溶剂是水或醇/水混合物。

[0070] 在一些实施方案中,适合溶剂是水或 50% 甲醇/水混合物。

[0071] 在一些实施方案中,适合溶剂是水。

[0072] 在一些实施方案中,适合溶剂是包含 50% 甲醇和 50% 水的混合物。

[0073] 在一些实施方案中,有效量的时间是约 2-约 1 天。在一些实施方案中,有效量的时间是约 2-约 18 小时。在一些实施方案中,有效量的时间是约 2-约 12 小时。在一些实施方案中,有效量的时间是约 2-约 6 小时。

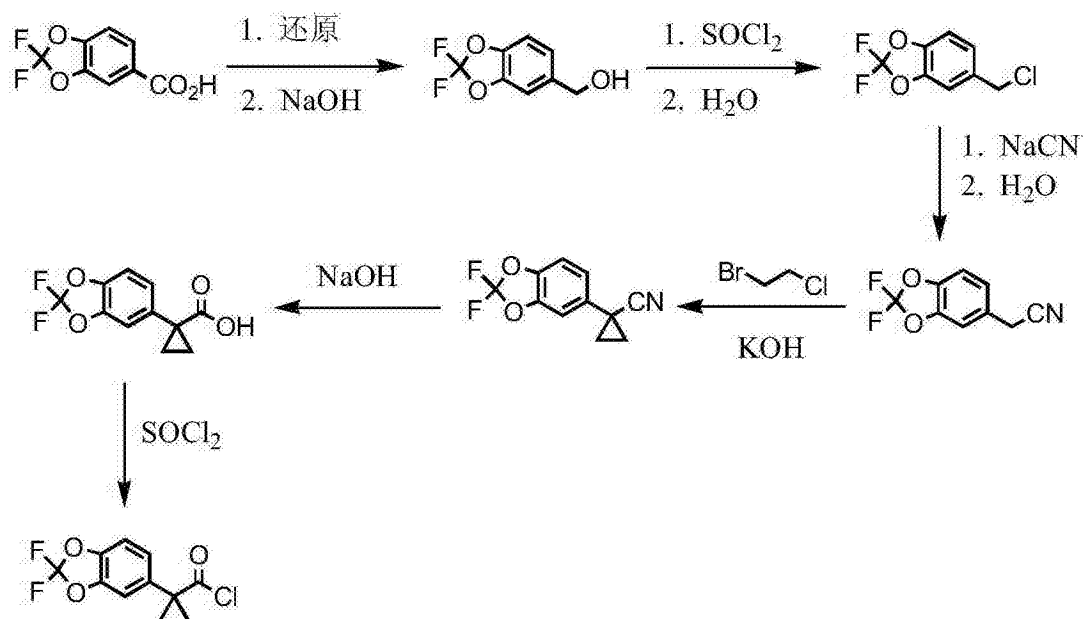
[0074] 本发明在一个方面中的特征在于 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的晶型,它具有单斜晶系、 $P2_1/n$ 空间群和如下晶胞大小: $a = 4.9626(7) \text{ \AA}$ 、 $b = 12.2994(18) \text{ \AA}$ 、 $c = 33.075(4) \text{ \AA}$ 、 $\alpha = 90^\circ$ 、 $\beta = 93.938(9)^\circ$ 和 $\gamma = 90^\circ$ 。

[0075] 晶型 I 的制备方法

[0076] 在一个实施方案中,通过将 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的盐形式例如 HCL 分散于或溶于适合溶剂有效量的时间制备晶型 I。在另一个实施方案中,通过将 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的盐形式例如 HCL 分散于适合溶剂有效量的时间制备晶型 I。在另一个实施方案中,由 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-叔丁基苯甲酸酯和适宜酸例如甲酸直接形成晶型 I。在一个实施方案中,3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的 HCl 盐形式是起点,且在一个实施方案中,可以根据反应路线 1-3 通过使酰氯结构部分与胺结构部分偶合来制备。

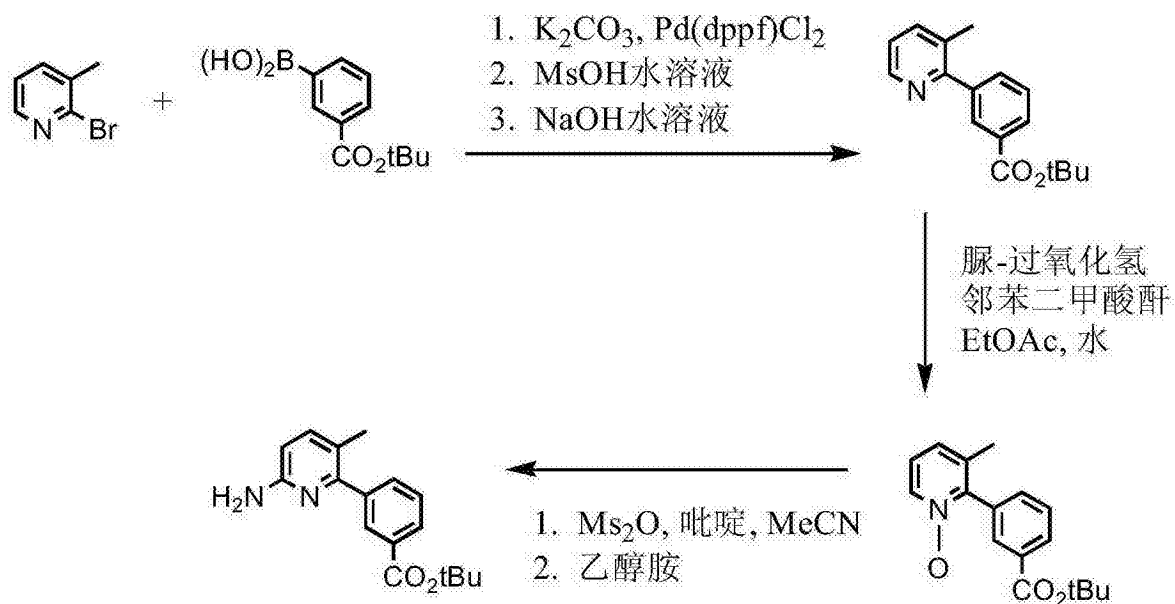
[0077] 反应路线 1. 酰氯结构部分的合成

[0078]



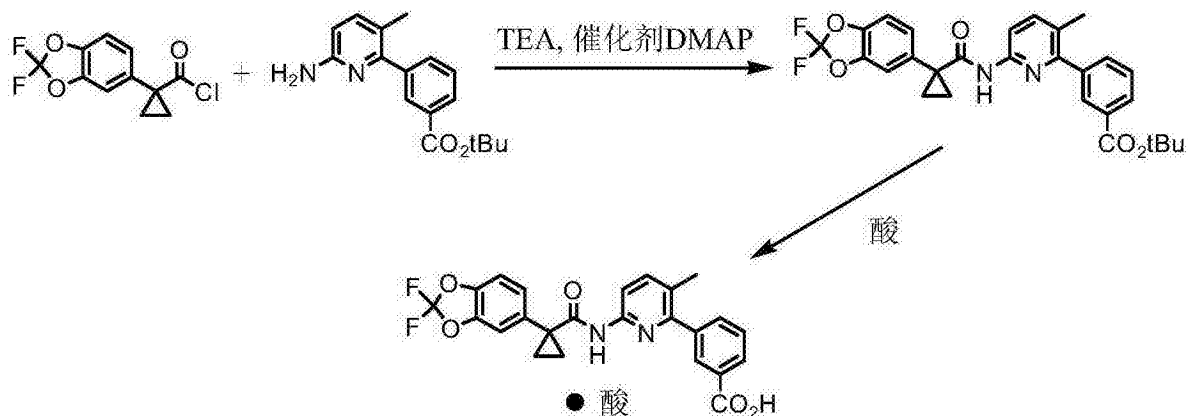
[0079] 反应路线 2. 胺结构部分的合成

[0080]



[0081] 反应路线 3. 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的酸盐的形成

[0082]



[0083] 使用例如 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的 HCl 盐形式作为起点,可以通过将 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的 HCl 盐形式分散于或溶于适合溶剂有效量的时间以高收率形成晶型 I。可以使用 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的其他盐形式例如其他无机酸或有机酸形式。其他盐形式由叔丁酯与相应酸的水解产生。其他酸/盐形式包括硝酸、硫酸、磷酸、硼酸、乙酸、苯甲酸、丙二酸等。3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的盐形式可以根据所用溶剂的不同是可溶的或不溶的,但溶解度低不会妨碍晶型 I 形成。例如,在一个实施方案中,适合溶剂可以是水或醇/水混合物例如 50% 甲醇/水混合物,即使 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的 HCl 盐形式仅仅微溶于水。在一个实施方案中,适合溶剂是水。

[0084] 由 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的盐形式形成晶型 I 的有效量的时间可以是 2-24 小时之间的任意时间或更长。一般而言,24 小时以上不一定得到高收率(~98%),但一些溶剂可能需要更长时间。还认为所需时间的量与温度成反比。即温度越高,则所需影响酸解离形成晶型 I 的时间越短。当溶剂是水时,在室温将该混悬液搅拌约 24 小时得到约 98% 收率的晶型 I。如果 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的盐形式的溶液是方法目的所期望的,则可以使用高温。将该溶液在高温下搅拌有效量的时间后,在冷却时重结晶得到基本上纯形式的晶型 I。在一个实施方案中,基本上纯的含义是高于约 90% 的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的含义是高于约 95% 的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的含义是高于约 98% 的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的含义是高于约 99% 的纯度。选择的温度部分取决于所用的溶剂并且属于本领域技术人员决定能力的范围。在一个实施方案中,温度是室温-约 80℃。在另一个实施方案中,温度是室温-约 40℃。在另一个实施方案中,温度是约 40℃-约 60℃。在另一个实施方案中,温度是约 60℃-约 80℃。

[0085] 在一些实施方案中,可以通过从有机溶剂中重结晶进一步纯化晶型 I。有机溶剂的实例包括但不限于甲苯、枯烯、茴香醚、1-丁醇、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮或 1-丙醇/水(以不同比例)。可以如上所述使用温度。例如,在一

个实施方案中,将晶型 I 在 75℃溶于 1-丁醇至完全溶解。将该溶液以 0.2℃/min 的速率冷却至 10℃得到晶型 I 的晶体,其可以通过过滤分离。

[0086] 用途、制剂和给药

[0087] 药学上可接受的组合物

[0088] 在本发明的另一个方面中提供了药学上可接受的组合物,其中这些组合物包含如本文所述的晶型 I 且任选包含药学上可接受的载体、佐剂或媒介物。在一些实施方案中,这些组合物任选还包含一种或多种其他治疗剂。

[0089] 如上所述,本发明的药学上可接受的组合物另外包含药学上可接受的载体、佐剂或媒介物,如本发明中所述,它们包括适合于所需的特定剂型的任意和所有溶剂、稀释剂或其它液体赋形剂、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。在 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 16 版, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 中公开了用于配制药学上可接受的组合物的各种载体和用于其制备的已知技术,将这些文献的内容引入本文参考。除了任何常规载体介质与本发明化合物不相容以外,例如产生任何不可取的生物学效应或者以有害方式相互作用于药学上可接受的组合物的任何其他成分,它的使用涵盖在本发明的范围内。能够充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括但不限于离子交换剂;氧化铝;硬脂酸铝;卵磷脂;血清蛋白质,例如血清白蛋白;缓冲物质,例如磷酸盐;甘氨酸;山梨酸或山梨酸钾;饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物;水;盐或电解质,例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐;胶体二氧化硅;三硅酸镁;聚乙烯吡咯烷酮;聚丙烯酸酯;蜡类;聚乙烯-聚氧化丙烯-嵌段聚合物;羊毛脂;糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸钠;粉碎的黄耆胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂用蜡;油类,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,例如丙二醇或聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及其他无毒的可相容的润滑剂,例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁;根据制剂人员的判断,在组合物中也可以存在着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和香料、防腐剂和抗氧化剂。

[0090] 化合物和药学上可接受的组合物的用途

[0091] 本发明在另一个方面中提供了治疗涉及 CFTR 的病症、疾病或障碍的方法。在一些实施方案中,本发明提供了治疗涉及 CFTR 活性缺陷的病症、疾病或障碍的方法,该方法包括对有此需要的受试者、优选哺乳动物给予本文所述的晶型 I 的固态形式。

[0092] 本文所用的“CFTR-介导的疾病”是选自如下的疾病:囊性纤维化、遗传性肺气肿、遗传性血色素沉着症、凝血-纤维蛋白溶解缺陷症(例如 C 蛋白缺陷症)、1 型遗传性血管水肿、脂质加工缺陷(例如家族性高胆固醇血症)、1 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积病(例如 I-细胞疾病/假性赫尔勒病)、粘多糖病、桑德霍夫/泰-萨克斯病、克里格勒-纳贾尔 (Crigler-Najjar) 综合症 II 型、多内分泌腺病/高胰岛素血症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺机能减退症、黑色素瘤、聚糖病 CDG1 型、遗传性肺气肿、先天性甲状腺机能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺乏症、尿崩症 (DI)、后叶激素运载蛋白性 DI、肾性 DI、夏-马-图综合征、佩-梅病、神经变

性疾病（例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、皮克病）、若干聚谷氨酰胺神经障碍（例如亨廷顿病、I 型脊髓小脑性共济失调、脊髓与延髓肌肉萎缩、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩和肌强直性营养不良）以及海绵状脑病（例如遗传性克-雅二病、法布里病和斯-施综合征、COPD、干眼病和斯耶格仑病）。

[0093] 在一些实施方案中，本发明提供了治疗人 CFTR- 介导的疾病的方法，该方法包括对该人给予有效量的包含本文所述的晶型 I 的组合物的步骤。

[0094] 根据可选择的优选实施方案，本发明提供了治疗人囊性纤维化的方法，该方法包括对该人给予有效量的包含本文所述的晶型 I 的组合物的步骤。

[0095] 本发明的晶型 I 或其药学上可接受的组合物的“有效量”是用于治疗上述任意疾病或减轻其严重性的用量。

[0096] 可以使用有效治疗一种或多种上述疾病或减轻其严重性的任意量和任意给药途径给予晶型 I 或其药学上可接受的组合物。

[0097] 在一些实施方案中，本文所述的晶型 I 或其药学上可接受的组合物用于治疗患者囊性纤维化或减轻其严重性，所述患者显示在呼吸和非呼吸上皮顶膜中的残留 CFTR 活性。易于使用本领域公知的方法例如标准电生理、生化或组织化学技术检测上皮表面上存在的残留 CFTR 活性。这种方法使用体内或离体电生理技术、测量汗液或唾液 Cl⁻ 浓度或离体生化或组织化学技术鉴定 CFTR 活性，以监测细胞表面密度。使用这种方法易于在各种不同突变的杂合或纯合的患者包括对最常见突变 $\Delta F508$ 纯合或杂合的患者中检测残留 CFTR 活性。

[0098] 在一个实施方案中，本文所述的晶型 I 或其药学上可接受的组合物用于治疗患者囊性纤维化或减轻其严重性，所述患者在一些基因型中显示残留 CFTR 活性，例如 III 型突变（调节或门控受损）、IV 型突变（传导改变）或 V 型突变（合成减少）(Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521-529, 2000)。其他显示残留 CFTR 活性的患者基因型包括对这些类型之一纯合的患者或对任意其他类型突变杂合的患者，所述其他类型突变包括 I 型突变、II 型突变或缺乏分类的突变。

[0099] 在一个实施方案中，本文所述的晶型 I 或其药学上可接受的组合物用于治疗具有一些临床表型内患者囊性纤维化或减轻其严重性，在所述患者的一些临床表型例如为典型地与上皮顶膜中残留 CFTR 活性量相关的中度到轻度临床表型。这种表型包括显示胰腺功能不全的患者或诊断为特发性胰腺炎和先天性双侧输精管缺失或轻度肺病的患者。

[0100] 所需确切的量将因受治疗者而异，取决于受治疗者的种类、年龄与一般状态、感染的严重性、特定药物、其给药的方式等。本发明化合物优选地被配制成剂量单元形式，有易于给药和剂量的一致性。本文所用的表达方式“剂量单元形式”表示物理上离散的药物单元，对所治疗的患者而言是适当的。不过将被理解的是，本发明化合物和组合物的总每日用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任意特定患者或生物体的具体有效剂量水平将依赖于多种因素，包括所治疗的病症和病症的严重性；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；给药的时间、给药的途径和所采用的具体化合物的排泄速率；治疗的持续时间；与所采用的具体化合物联合或

同时使用的药物；和医药领域熟知的其他因素。本文所用的术语“患者”表示动物，优选哺乳动物，最优选人。

[0101] 本发明的药学上可接受的组合物可以对人和其他动物口服、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部（以粉剂、软膏剂或滴剂）、颊、以口用或鼻用喷雾剂等方式给药，这依赖于所治疗感染的严重性。在一些实施方案中，本发明化合物可以被口服或肠胃外给药，剂量水平为每天约 0.01mg/kg- 约 50mg/kg、优选约 1mg/kg- 约 25mg/kg 受治疗者体重，一天一次或多次，以获得期望的治疗效果。

[0102] 在一些实施方案中，晶型 I 在单位剂量晶型 I 中的剂量是 100mg-1,000mg。在另一个实施方案中，晶型 I 的剂量是 200mg-900mg。在另一个实施方案中，晶型 I 的剂量是 300mg-800mg。在另一个实施方案中，晶型 I 的剂量是 400mg-700mg。在另一个实施方案中，晶型 I 的剂量是 500mg-600mg。

[0103] 使用适合的分散或湿润剂和悬浮剂，可以按照已知技术配制可注射制剂，例如无菌可注射的水性或油性悬液。无菌可注射制备物也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬液或乳液，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的载体和溶剂有水、林格液、U.S.P. 和等渗氯化钠溶液。另外，常规上采用无菌的不挥发油作为溶剂或悬浮介质。为此，可以采用任何温和的固定油，包括合成的单-或二-甘油酯。另外，在注射剂的制备中也可以使用脂肪酸，例如油酸。

[0104] 可注射制剂可以这样进行灭菌，例如通过细菌截留性滤器过滤，或者掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂，可以在使用前将其溶解或分散在无菌的水或其他无菌可注射介质中。

[0105] 直肠或阴道给药组合物优选地是栓剂，它们可以这样制备，将本发明化合物与适合的无刺激性赋形剂或载体混合，例如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡，它们在环境温度下是固体，但是在体温下是液体，因此在直肠或阴道腔中融化，释放出活性化合物。

[0106] 口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这类固体剂型中，将活性化合物与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体混合，例如柠檬酸钠或磷酸二钙，和 / 或 a) 填充剂或增充剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸，b) 粘合剂，例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶，c) 润湿剂，例如甘油，d) 崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠，e) 溶解延迟剂，例如石蜡，f) 吸收促进剂，例如季铵化合物，g) 湿润剂，例如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯，h) 吸收剂，例如高岭土和膨润土，和 i) 润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下，所述剂型也可以包含缓冲剂。

[0107] 也可以采用相似类型的固体组合物作为软或硬的填充的明胶胶囊剂中的填充剂，胶囊所用赋形剂例如乳糖或奶糖以及高分子聚乙二醇等。片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂等固体剂型可以带有包衣和外壳，例如肠溶衣和药物配制领域熟知的其他包衣。它们可以可选地含有遮光剂，也可以是仅仅或优先在肠道某一部分释放活性成分的组合物，可选地为延迟的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。也可以采用相似类型的固体组合物作为软与硬的填充的明胶胶囊剂中的填充剂，胶囊所用赋形剂例如乳糖或奶糖以及高分子聚乙二醇等。

[0108] 活性化合物也可以是微囊包封的形式,其中含有一种或多种上述赋形剂。片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂等固体剂型可以带有包衣和外壳,例如肠溶衣、释放控制性包衣和药物配制领域熟知的其他包衣。在这类固体剂型中,可以将活性化合物与至少一种惰性稀释剂混合,例如蔗糖、乳糖或淀粉。在正常情况下,这类剂型也可以包含除惰性稀释剂以外的其他物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂,例如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,剂型也可以包含缓冲剂。它们可以可选地含有遮光剂,也可以是仅仅或优先在肠道某一部分释放活性成分的组合,可选地为延迟的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。

[0109] 也将被领会的是,本文所述的晶型 I 及其药学上可接受的组合物可以用在联合疗法中,也就是说,晶型 I 及其药学上可接受的组合物可以在一种或多种其他所需治疗剂或医药程序同时、之前或随后给药。用在联合方案中的特定疗法组合(治疗剂或程序)将考虑所需治疗剂和/或程序与所要达到的所需治疗效果的可相容性。也将被领会的是,所用疗法可以对同一病症达到所需效果(例如,本发明化合物可以与另一种用于治疗同一病症的药物同时给药),或者它们可以达到不同的效果(例如控制任何副作用)。正如本文所用的,在正常情况下给药以治疗或预防特定疾病或病症的其他治疗剂被称为“就所治疗的疾病或病症而言是适当的”。

[0110] 在一个实施方案中,另一种活性剂选自溶粘蛋白剂、支气管扩张药、抗生物素药、抗感染药、抗炎药、非本发明化合物的 CFTR 调节剂或营养剂。

[0111] 在另一个实施方案中,另一种活性剂是选自如下的化合物:庆大霉素、姜黄素、环磷酸胺、4-苯基丁酸酯、麦格司他、非洛地平、尼莫地平、Philoxin B、染料木黄酮(geniestein)、芹菜配基、cAMP/cGMP 调节剂例如咯利普兰、西地那非、米力农、他达拉非、氨力农、异丙肾上腺素、沙丁胺醇和沙美特罗(almeterol)、脱氧精肌菌素、HSP90 抑制剂、HSP70 抑制剂、蛋白体抑制剂例如 epoxomicin、乳胞素等。

[0112] 在另一个实施方案中,另一种活性剂是公开在 W02004028480、W02004110352、W02005094374、W02005120497 或 W02006101740 中的化合物。

[0113] 在另一个实施方案中,另一种活性剂是显示 CFTR 调节活性的苯并[c]喹啉(benzo(c)quinolizinium)衍生物或显示 CFTR 调节活性的苯并吡喃衍生物。

[0114] 在另一个实施方案中,另一种活性剂是公开在 US7202262、US6992096、US20060148864、US20060148863、US20060035943、US20050164973、W02006110483、W02006044456、W02006044682、W02006044505、W02006044503、W02006044502 或 W02004091502 中的化合物。

[0115] 在另一个实施方案中,另一种活性剂是公开在 W02004080972、W02004111014、W02005035514、W02005049018、W02006002421、W02006099256、W02006127588 或 W02007044560 中的化合物。

[0116] 在另一个实施方案中,另一种活性剂选自公开在如下文献中的化合物:美国专利申请顺序号 US11/165,818、作为 2005 年 6 月 24 日提交的美国公开专利申请号 US2006/0074075 公布,将其全部内容引入本文参考。在另一个实施方案中,另一种活性剂是 N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺。它们的组合用于治疗本文所述的疾病包括囊性纤维化。这些组合物还用于本文所述的试剂盒。

[0117] 其他治疗剂在本发明组合物中的含量将不超过在包含该治疗剂作为唯一活性成分的组合物中通常的给药量。优选地,其他治疗剂在目前所公开的组合物中的量将是通常的包含该药物作为唯一治疗活性成分的组合物中的含量的约 50%-100%。

[0118] 本文所述的晶型 I 或其药学上可接受的组合物也可以引入到涂覆可植入医药装置的组合物中,例如假肢、人工瓣膜、脉管移植物、支架和导管。因此,本发明在另一方面包括涂覆可植入装置的组合物,包含如上一般性描述和在本文大类与小类中所述的本发明化合物,和适合于涂覆所述可植入装置的载体。在另一方面,本发明包括涂有组合物的可植入装置,所述组合物包含如上一般性描述和在本文大类与小类中所述的本发明化合物,和适合于涂覆所述可植入装置的载体。适合的涂料和涂覆可植入装置的一般制备方法描述在美国专利 6,099,562、5,886,026 和 5,304,121 中。涂料通常是生物可相容的聚合材料,例如水凝胶聚合物、聚甲基二硅氧烷、聚己内酯、聚乙二醇、聚乳酸、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物和它们的混合物。涂料可以选择性地进一步被适合的氟硅酮、多糖、聚乙二醇、磷脂或其组合的表层所覆盖,以赋予组合物的控释特征。

[0119] 为了更完整地理解本文所述的本发明,举出下列实施例。应理解这些实施例仅用于示例目的,而不以任何方式限定本发明。

实施例

[0120] 方法和材料

[0121] 差示扫描量热法 (DSC)

[0122] 使用 DSC Q100V9.6Build290 (TA Instruments, New Castle, DE) 采集晶型 I 的差示扫描量热法 (DSC) 数据。使用钢校准温度并且使用蓝宝石校准热容。将 3-6mg 样品称量入用带有 1 个针孔的盖覆盖的铝盘。从 25°C -350°C 以 1.0°C /min 的加热速率和 50ml/min 的氮气吹扫来扫描样品。用 Thermal Advantage Q SeriesTM2.2.0.248 版软件采集数据并且用 Universal Analysis 软件 4.1D 版 (TA Instruments, New Castle, DE) 分析。报道的数值表示单一分析。

[0123] XRPD (X-射线粉末衍射)

[0124] 用带有 HI-STAR2- 维检测器和扁平石墨单色镜的 Bruker D8DISCOVER 粉末衍射计采集晶型 I 的 X-射线衍射 (XRD) 数据。在 40kV, 35mA 使用带有 K α 射线的 Cu 密封试管。在 25°C 将样品置于零背景的硅晶片上。对每一样品而言,各自以 2 个不同的 θ_2 角在 120 秒采集两个数据范围:8° 和 26°。用 GADDS 软件给数据积分并且用 DIFFRACT⁺EVA 软件进行数据合并。报道的峰位的不确定值是 ± 0.2 度。

[0125] **Vitride®** (双 (2-甲氧基乙氧基) 铝钠氢化物 [或 NaAlH₂(OCH₂CH₂OCH₃)₂], 65wgt% 的甲苯溶液) 购自 Aldrich Chemicals。

[0126] 2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-甲酸购自 Saltigo (并入 Lanxess Corporation)。

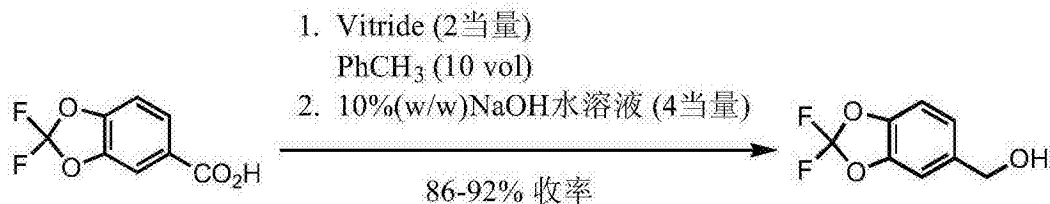
[0127] 在本申请中化合物名称不能正确描述该化合物结构的任何地方,结构替代名称并且以其为准。

[0128] 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸·HCl 的合成

[0129] 酰氯结构部分

[0130] (2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯 -5- 基) - 甲醇的合成

[0131]



[0132] 将商购 2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯 -5- 甲酸 (1.0eq) 在甲苯 (10vol) 中搅拌成淤浆。以维持温度在 15-25℃ 的速率通过滴液漏斗加入 **Vitride®** (2eq)。在添加结束时,使温度增加至 40℃ 2h, 然后通过滴液漏斗谨慎加入 10% (w/w) NaOH (4.0eq) 水溶液, 维持温度在 40-50℃。再搅拌 30 分钟后, 使各层在 40℃ 分离。将有机相冷却至 20℃, 然后用水 (2x1.5vol) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤, 浓缩至得到粗 (2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯 -5- 基) - 甲醇, 将其直接用于下一步。

[0133] 5- 氯甲基 -2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯的合成

[0134]



[0135] 将 (2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯 -5- 基) - 甲醇 (1.0eq) 溶于 MTBE (5vol)。加入催化量的 DMAP (1mol%), 通过滴液漏斗加入 SOCl₂ (1.2eq)。以维持反应器中在 15-25℃ 温度的速率加入 SOCl₂。使温度增加至 30℃ 1 小时, 冷却至 20℃, 然后通过滴液漏斗加入水 (4vol), 维持温度低于 30℃。再搅拌 30 分钟后, 使各层分离。搅拌有机层, 加入 10% (w/v) NaOH 水溶液 (4.4vol)。搅拌 15-20 分钟后, 使各层分离。然后干燥有机相 (Na₂SO₄), 过滤, 浓缩, 得到粗 5- 氯甲基 -2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯, 将其直接用于下一步。

[0136] (2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯 -5- 基) - 乙腈的合成

[0137]

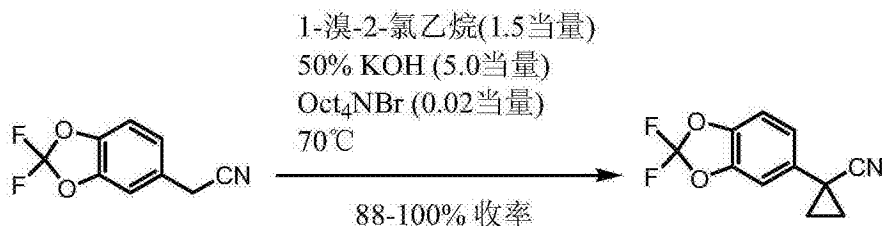


[0138] 将 5- 氯甲基 -2, 2- 二氟 -1, 3- 苯并间二氧杂环戊烯 (1eq) 在 DMSO (1.25vol) 中的溶液加入到 NaCN (1.4eq) 在 DMSO (3vol) 中的淤浆中, 维持温度在 30-40℃。将该混合物搅拌 1 小时, 然后加入水 (6vol), 然后加入 MTBE (4vol)。搅拌 30min 后, 分离各层。用

MTBE (1.8vol) 萃取水层。用水 (1.8vol) 洗涤合并的有机层,干燥 (Na_2SO_4),过滤,浓缩,得到粗 (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈 (95%),将其直接用于下一步。

[0139] (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷腈的合成

[0140]



[0141] 将 (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈 (1.0eq)、50wt%KOH 水溶液 (5.0eq)、1-溴-2-氯乙烷 (1.5eq) 和 Oct₄NBr (0.02eq) 的混合物在 70 °C 加热 1h。冷却该反应混合物,然后用 MTBE 和水进行后处理。用水和盐水洗涤有机相,然后除去溶剂,得到 (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷腈。

[0142] 1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸的合成

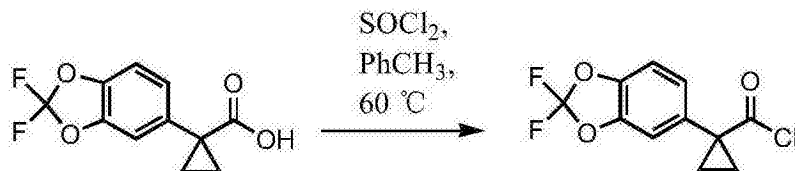
[0143]



[0144] 在 80 °C 使用 6M NaOH (8 当量) 的乙醇 (5vol) 溶液水解 (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷腈过夜。将该混合物冷却至室温,真空蒸发乙醇。将残余物溶于水 and MTBE,加入 1M HCl,分离各层。然后用二环己基胺 (0.97 当量) 处理 MTBE 层。将该淤浆冷却至 0 °C,过滤,用庚烷洗涤,得到相应的 DCHA 盐。将该盐溶于 MTBE 和 10% 柠檬酸,搅拌至全部固体溶解。分离各层,用水和盐水洗涤 MTBE 层。将溶剂交换成庚烷,然后过滤,在 50 °C、在真空烘箱内干燥过夜后得到 1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸。

[0145] 1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷羰基氯的合成

[0146]

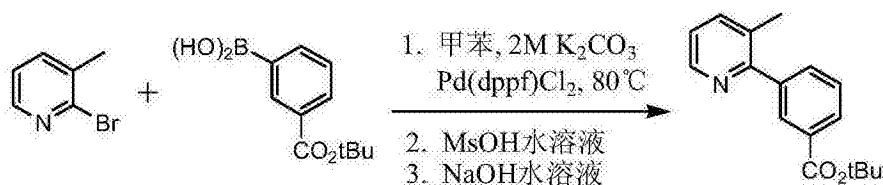


[0147] 将 1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸 (1.2eq) 在甲苯 (2.5vol) 中搅拌成淤浆,将该混合物加热至 60 °C。通过滴液漏斗加入 SOCl_2 (1.4eq)。30 分钟后从反应混合物中蒸馏甲苯和 SOCl_2 。再加入甲苯 (2.5vol),再蒸馏。

[0148] 胺结构部分

[0149] 叔丁基-3-(3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯的合成

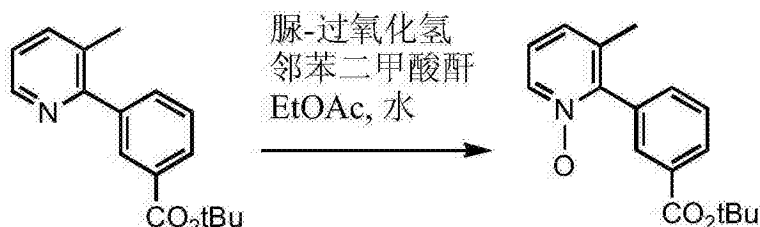
[0150]



[0151] 将2-溴-3-甲基吡啶 (1.0eq) 溶于甲苯 (12vol)。加入 K_2CO_3 (4.8eq), 然后加入水 (3.5vol), 在 N_2 气流中将该混合物加热至 65°C 1 小时。然后加入 3-(叔丁氧羰基)苯基硼酸 (1.05eq), 然后加入 $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ (0.015eq), 将该混合物加热至 80°C。2 小时后, 停止加热, 加入水 (3.5vol), 使各层分离。然后用水 (3.5vol) 洗涤有机相, 用 10% 甲磺酸水溶液 (2eq MsOH, 7.7vol) 萃取。用 50%NaOH 水溶液 (2eq) 使水相呈碱性, 用 EtOAc (8vol) 萃取。浓缩有机层, 得到粗叔丁基-3-(3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯 (82%), 将其直接用于下一步。

[0152] 2-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶-1-氧化物的合成

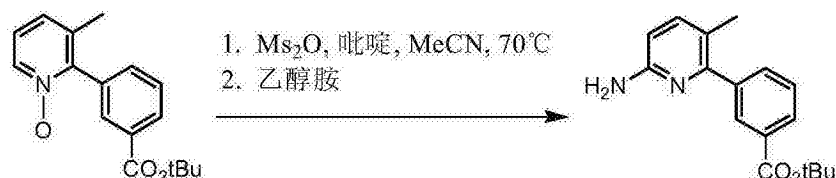
[0153]



[0154] 将叔丁基-3-(3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯 (1.0eq) 溶于 EtOAc (6vol)。加入水 (0.3vol), 然后加入脲-过氧化氢 (3eq)。逐步加入作为固体的邻苯二甲酸酐 (3eq), 维持反应器内部温度低于 45°C。邻苯二甲酸酐添加完成后, 将该混合物加热至 45°C。再搅拌 4 小时后, 停止加热。通过滴液漏斗加入 10%w/w Na_2SO_3 水溶液 (1.5eq)。 Na_2SO_3 添加完成后, 将该混合物再搅拌 30 分钟, 分离各层。搅拌有机层, 加入 10%w/w Na_2CO_3 水溶液 (2eq)。搅拌 30 分钟后, 使各层分离。用 13%w/v NaCl 水溶液洗涤有机相。然后过滤有机相, 浓缩, 得到粗 2-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶-1-氧化物 (95%), 将其直接用于下一步。

[0155] 叔丁基-3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯的合成

[0156]

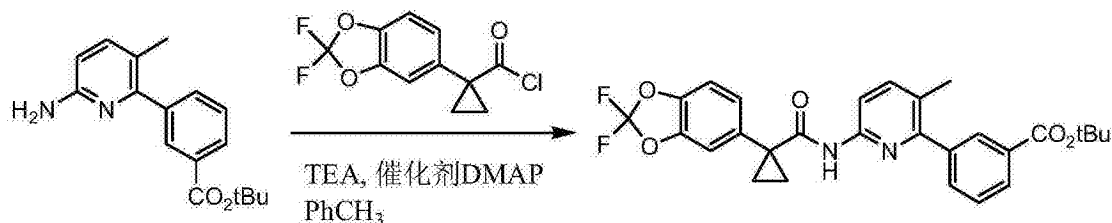


[0157] 将 2-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶-1-氧化物 (1eq) 和吡啶 (4eq) 在 MeCN (8vol) 中的溶液加热至 70°C。在 50min 内通过滴液漏斗加入甲磺酸酐 (1.5eq) 在 MeCN (2vol) 中的溶液, 维持温度低于 75°C。添加完成后将该混合物再搅拌 0.5 小时。然后将该混合物冷却至环境温度。通过滴液漏斗加入乙醇胺 (10eq)。搅拌 2 小时后, 加入水 (6vol), 将该混合物冷却至 10°C。搅拌 NLT 3 小时后, 通过过滤收集固体, 用水 (3vol)、2:1MeCN/水 (3vol) 和 MeCN (2x1.5vol) 洗涤。在 50°C、在通少许 N_2 的真空烘箱内干燥固

体至恒重 (<1% 差异), 得到叔丁基-3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯, 为红-黄色固体 (53% 收率)。

[0158] 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-叔丁基苯甲酸酯的合成

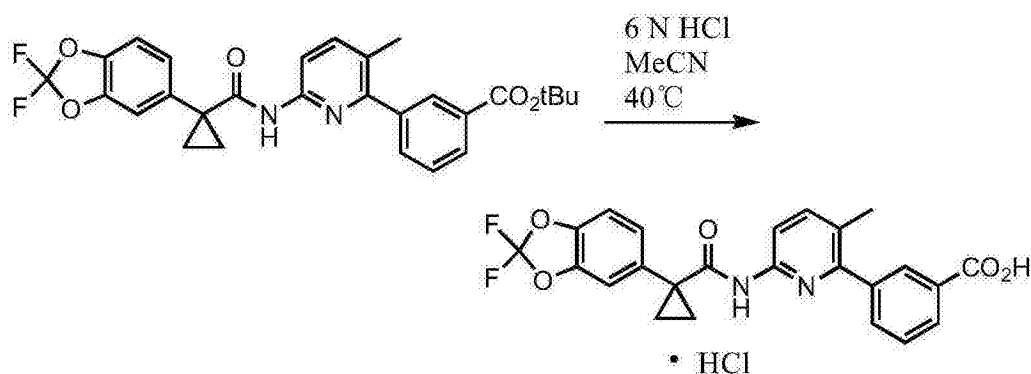
[0159]



[0160] 将粗的酰氯溶于甲苯 (基于酰氯 2.5vol), 通过滴液漏斗加入到叔丁基-3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯 (1eq)、二甲氨基吡啶 (DMAP, 0.02eq) 和三乙胺 (3.0eq) 在甲苯 (基于叔丁基-3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯 4vol) 中的混合物中。2 小时后, 向该反应混合物中加入水 (基于叔丁基-3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸酯 4vol)。搅拌 30 分钟后, 分离各层。然后过滤有机相, 浓缩至得到 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-叔丁基苯甲酸酯的粘稠油 (定量粗收率)。加入 MeCN (基于粗产物 3vol), 蒸馏至出现结晶。加入水 (基于粗产物 2vol), 将该混合物搅拌 2h。通过过滤收集固体, 用 1:1 (按体积计) MeCN/水 (基于粗产物 2x1vol) 洗涤, 在真空下在过滤器上部分干燥。在 60℃、在通少许 N₂ 的真空烘箱内干燥固体至恒重 (<1% 差异), 得到 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-叔丁基苯甲酸酯, 为棕色固体。

[0161] 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸·HCl 盐的合成

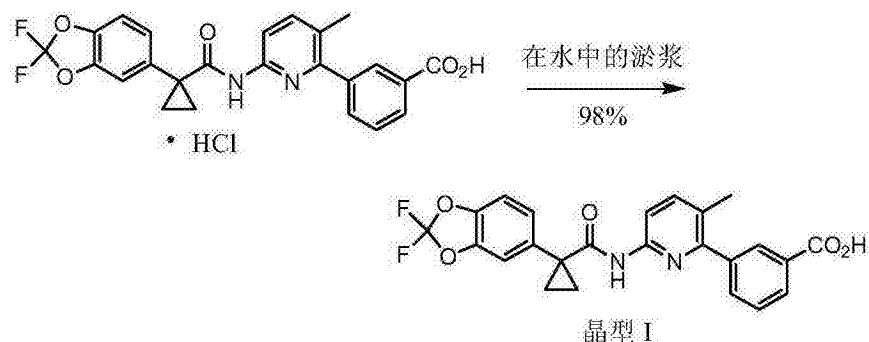
[0162]



[0163] 向 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-叔丁基苯甲酸酯 (1.0eq) 在 MeCN (3.0vol) 中的淤浆中加入水 (0.83vol), 然后加入浓 HCl 水溶液 (0.83vol)。将该混合物加热至 45±5℃。搅拌 24-48 小时后, 反应完成, 将该混合物冷却至环境温度。加入水 (1.33vol), 搅拌该混合物。通过过滤收集固体, 用水 (2x0.3vol) 洗涤, 在真空下在过滤器上部分干燥。在 60℃、在通少许 N₂ 的真空烘箱内干燥固体至恒重 (<1% 差异), 得到 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸·HCl, 为黄白色固体。

[0164] 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(晶型I)的合成

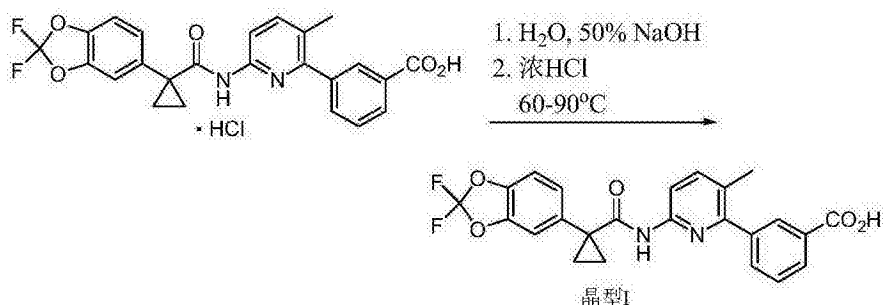
[0165]



[0166] 在环境温度搅拌 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸·HCl(1eq) 在水(10vol) 中的淤浆。搅拌 24 小时后取样。过滤样品,用水(2x) 洗涤固体。对固体样品进行 DSC 分析。当 DSC 分析显示完全转化成晶型 I 时,通过过滤收集固体,用水(2x1.0vol) 洗涤,在真空下在过滤器上部分干燥。在 60℃、在通少许 N₂ 的真空烘箱内干燥固体至恒重(<1% 差异),得到晶型 I,为黄白色固体(98% 收率)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) 9.14(s, 1H), 7.99-7.93(m, 3H), 7.80-7.78(m, 1H), 7.74-7.72(m, 1H), 7.60-7.55(m, 2H), 7.41-7.33(m, 2H), 2.24(s, 3H), 1.53-1.51(m, 2H), 1.19-1.17(m, 2H)。

[0167] 使用水和碱合成 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(晶型 I)。

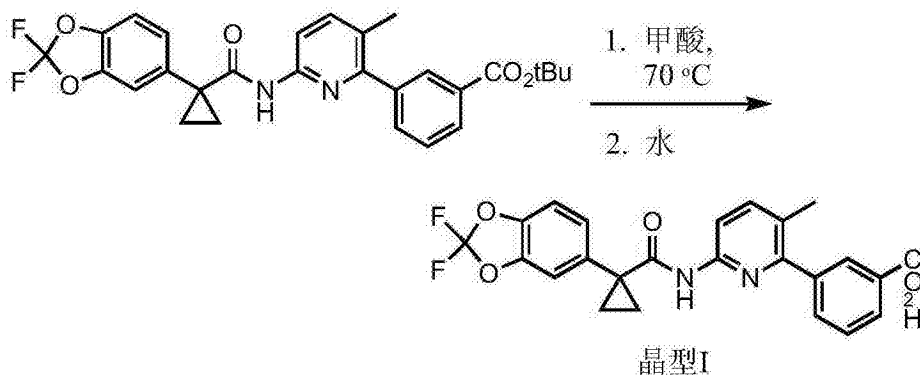
[0168]



[0169] 向在环境温度搅拌的 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸·HCl(1eq) 在水(10vol) 中的淤浆中加入 50%w/w NaOH 水溶液(2.5eq)。将该混合物搅拌 NLT15min 或直到得到均匀溶液。加入浓 HCl(4eq) 以使晶型 I 结晶。如果需要,将该混合物加热至 60℃或 90℃,以降低叔丁基苯甲酸酯的水平。加热该混合物至 HPLC 分析显示 NMT0.8%(AUC) 叔丁基苯甲酸酯。然后将该混合物滤器至环境温度,通过过滤收集固体,用水(3x3.4vol) 洗涤,在真空下在过滤器上部分干燥。在 60℃、在通少许 N₂ 的真空烘箱内干燥固体至恒重(<1% 差异),得到晶型 I,为黄白色固体(97% 收率)。

[0170] 直接由苯甲酸酯合成 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(晶型 I)。

[0171]



[0172] 将 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)叔丁基苯甲酸酯 (1.0eq) 在甲酸 (3.0vol) 中的溶液加热至 $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 。将反应持续至反应完成 (NMT1.0%AUC3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-叔丁基苯甲酸酯) 或加热至 NMT8h。将该混合物冷却至环境温度。将该溶液加入到水 (6vol) 中, 在 50°C 加热, 搅拌该混合物。然后将该混合物加热至 $70 \pm 10^\circ\text{C}$ 直到 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-叔丁基苯甲酸酯的水平是 NMT0.8%(AUC)。通过过滤收集固体, 用水 (2x3vol) 洗涤, 在真空下在过滤器上部分干燥。在 60°C 、在通少许 N_2 的真空烘箱内干燥固体至恒重 (<1% 差异), 得到化合物 1 的晶型 I, 为黄白色固体。

[0173] 根据化合物 1 的晶型 I 的单晶结构计算的 X-射线衍射图案如图 1 所示。表 1 举出了计算的图 1 的峰。

[0174] 表 1.

[0175]

峰等级 (Peak Rank)	2 θ 角 [度]	相对强度 [%]
11	14.41	48.2
8	14.64	58.8
1	15.23	100.0
2	16.11	94.7
3	17.67	81.9
7	19.32	61.3
4	21.67	76.5
5	23.40	68.7
9	23.99	50.8

6	26.10	67.4
10	28.54	50.1

[0176] 化合物 1 的晶型 I 的实际 X-射线粉末衍射图案如图 2 所示。表 2 举出了图 2 的实际峰。

[0177] 表 2.

[0178]

峰等级	2 θ 角 [度]	相对强度 [%]
7	7.83	37.7
3	14.51	74.9
4	14.78	73.5
1	15.39	100.0
2	16.26	75.6
6	16.62	42.6
5	17.81	70.9
9	21.59	36.6
10	23.32	34.8
11	24.93	26.4
8	25.99	36.9

[0179] 化合物 1 的晶型 I 的单晶结构计算是 X-射线衍射图案和化合物 1 的晶型 I 的实际 X-射线粉末衍射图案的重叠图如图 3 所示。这种重叠图显示计算与实际峰位之间的良好一致性,其中差异仅为约 0.15 度。

[0180] 化合物 1 的晶型 I 的 DSC 扫迹如图 4 所示。化合物 1 的晶型 I 的熔化在约 204℃ 出现。

[0181] 基于单晶 X-射线分析的化合物 1 的晶型 I 的构象照片如图 5-8 所示。图 6-8 显示二聚体羧酸基团之间的氢键与得到的晶体中出现的堆积。该晶体结构揭示出分子的紧密堆积。化合物 1 的晶型 I 是单斜晶系, $P2_1/n$, 其具有如下晶胞大小:
 **$a = 4.9626(7) \text{ \AA}$, $b = 12.299(2) \text{ \AA}$, $c = 33.075(4) \text{ \AA}$, $\beta = 93.938(9)^\circ$,
 $V = 2014.0 \text{ \AA}^3$, $Z = 4$ 。根据结构数据计算的化合物 1 的晶型 I 的密度是在 100K 1.492 g/cm^3 。**

[0182] 化合物 1 的 ^1H NMR 光谱如图 9-11 所示 (图 9 和 10 描述了化合物 1 的晶型 I 的 50mg/mL、0.5 甲基纤维素 - 聚山梨醇酯 80 的混悬液, 图 11 描述了化合物 1 的 HCl 盐)。

[0183] 下表 3 描述了化合物 1 的其他分析数据。

[0184] 表 3.

[0185]

化合物 编号	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
1	453.3	1.93	H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 9.14 (s, 1H), 7.99-7.93 (m, 3H), 7.80-7.78 (m, 1H), 7.74-7.72 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.53-1.51 (m, 2H), 1.19-1.17 (m, 2H)

[0186] 试验

[0187] 用于检测和测定化合物的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 纠正 (Correction) 性质的试验

[0188] 用于测定化合物的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 调节特性的膜电位光学方法

[0189] 光学膜电位测定法采用如 Gonzalez 和 Tsien 所述的电压 - 敏感性 FRET 传感器 (参见, Gonzalez, J.E. 和 R.Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells" Biophys J 69(4):1272-80; 和 Gonzalez, J.E. 和 R.Y. Tsien (1997) "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer" Chem Biol 4(4):269-77) 与测量荧光变化的仪器的组合, 例如电压 / 离子探针读数器 (VIPR) (参见, Gonzalez, J.E., K. Oades 等人, (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" Drug Discov Today 4(9):431-439)。

[0190] 这些电压敏感性测定法基于膜溶性、电压敏感性染料 DiSBAC₂(3) 与荧光磷脂 CC2-DMPE 之间荧光共振能量转移 (FRET) 的变化, 所述荧光磷脂连接于质膜的外部小叶, 充当 FRET 供体。膜电位 (V_m) 的变化导致带负电的 DiSBAC₂(3) 跨越质膜重新分布, 从 CC2-DMPE 转移的能量相应地改变。荧光发射的变化可以利用 VIPRTM II 监测, 它是一种整合的液体处理器和荧光检测器, 被设计用来在 96- 或 384- 孔微量滴定平板中进行基于细胞的筛选。

[0191] 1. 纠正化合物的鉴别

[0192] 为了鉴别纠正与 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 相关的运输缺陷的小分子, 研发了单一 - 添加 HTS 测定方式。在 37°C 将细胞在有或没有 (阴性对照) 测试化合物的存在下在不含血清的培养基中孵育 16h。作为阳性对照, 将在 384- 孔培养板上铺板的细胞在 27°C 孵育至 "温度 - 校准" $\Delta\text{F508-CFTR}$ 。然后用 3X Krebs 林格液冲洗细胞并且加载电压敏感性染料。为了活化 $\Delta\text{F508-CFTR}$, 加入 10 μM 福司柯林和 CFTR 增强剂染料木黄酮 (20 μM) 与不含 Cl 的培养基到各孔中。添加不含 Cl 的培养基促进了 Cl 流出量作为对 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 活化的响应, 且使用基于 FRET 的电压敏感器染料以光学方式监测产生的膜去极化。

[0193] 2. 增强剂化合物的鉴别

[0194] 为了鉴别 $\Delta F508$ -CFTR 增强剂,研发了双重—添加 HTS 测定方式。第一次添加过程中,向各孔中添加不含 Cl 的培养基与或不与测试化合物。22 秒后,第二次添加不含 Cl 的包含 2-10 μM 福司柯林的培养基以活化 $\Delta F508$ -CFTR。两次添加后的胞外 Cl 浓度是 28mM,这促进了 Cl 流出量作为对 $\Delta F508$ -CFTR 活化的响应,且使用基于 FRET 的电压敏感器染料以光学方式监测产生的膜去极化。

[0195] 3. 溶液

[0196] 浴溶液 #1:(以 mM 计)NaCl160,KCl4.5,CaCl₂2,MgCl₂1,HEPES10,pH7.4 与 NaOH。

[0197] 不含氯化物的浴溶液:浴溶液 #1 中的氯化物盐被葡萄糖酸盐取代。

[0198] CC2-DMPE:制备成 10mM 的 DMSO 储备溶液并且贮存在 -20℃ 下。

[0199] DiSBAC₂(3):制备成 10mM 的 DMSO 储备溶液并且贮存在 -20℃ 下。

[0200] 4. 细胞培养

[0201] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于膜电位的光学测定。将细胞维持在 37℃、在 5%CO₂和 90%湿度中的在 175cm²培养烧瓶中的改进的 Eagle 培养基中,该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X pen/strep 和 25mM HEPES。就所有光学测定而言,以 30,000/孔将细胞接种在 384-孔基质胶包被的培养板上并且在 37℃ 培养 2h,然后在 27℃ 培养 24h,以用于增强剂测定。就纠正测定而言,将细胞在 27℃ 或 37℃ 与和与化合物一起培养 16-24 小时。

[0202] 用于测定化合物的 $\Delta F508$ -CFTR 调节性质的电生理测定法

[0203] 1. Using 室测定

[0204] 对表达 $\Delta F508$ -CFTR 的极化上皮细胞进行 Using 室实验,以进一步鉴定在光学测定法中鉴别的 $\Delta F508$ -CFTR 调控剂。将生长在 Costar Snapwell 细胞培养插件上的 FRT ^{$\Delta F508$ CFTR}上皮细胞固定在 Ussing 室内 (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA),利用电压箝系统 (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA, and, Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) 连续使单层短路。施加 2mV 脉冲测量跨上皮电阻。在这些条件下,FRT 上皮证明有 4K Ω /cm²或以上的电阻。将溶液维持在 27℃ 下,通入空气。利用无电池插件纠正电极偏移电位和流体电阻。在这些条件下,电流反映顶端膜中 Cl 通过 $\Delta F508$ -CFTR 的流动。利用 MP100A-CE 界面和 AcqKnowledge 软件 (v3.2.6; BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA) 获取数字方式的 I_{sc}。

[0205] 2. 纠正化合物的鉴别

[0206] 典型的方案采用基底外侧至顶端膜 Cl 浓度梯度。为了建立这种梯度,对基底外侧膜使用正常的套环,而顶端 NaCl 被等摩尔葡萄糖酸钠代替 (用 NaOH 滴定至 pH7.4),得到跨越上皮的大幅 Cl 浓度梯度。所有实验均是用完整单层进行的。为了充分活化 $\Delta F508$ -CFTR,施加福司柯林 (10 μM) 和 PDE 抑制剂 IBMX (100 μM),继之以加入 CFTR 增强剂染料木黄酮 (50 μM)。

[0207] 正如在其他细胞类型中所观察到的,在低温下孵育稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 FRT 细胞会增加 CFTR 在质膜中的功能密度。为了测定纠正化合物的活性,将细胞与 10 μM 供试化合物在 37℃ 下孵育 24 小时,随后洗涤 3 次,然后记录。将 cAMP- 和染料木黄酮-介导的化合物-处置细胞 I_{sc}正常化为 27℃ 和 37℃ 对照,以活性百分比表示。与 37℃ 对照相比,细胞用纠正化合物预孵育显著增加 cAMP- 和染料木黄酮-介导的 I_{sc}。

[0208] 3. 增强剂化合物的鉴别

[0209] 典型的方案采用基底外侧至顶端膜 Cl 浓度梯度。为了建立这种梯度,对基底外侧膜使用正常的套环并且用制霉菌素 (360 $\mu\text{g/ml}$) 可渗透化处理,而顶端 NaCl 被等摩尔葡萄糖酸钠代替 (用 NaOH 滴定至 pH7.4),得到跨越上皮的大幅 Cl 浓度梯度。所有实验均在制霉菌素可渗透化处理后 30min 进行。向细胞培养插入物两侧施加福司柯林 (10 μM) 和测试化合物。将推定的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 增强剂功效与已知增强剂染料木黄酮的功效进行比较。

[0210] 4. 溶液

[0211] 基底外侧溶液 (以 mM 计): NaCl (135)、 CaCl_2 (1.2)、 MgCl_2 (1.2)、 K_2HPO_4 (2.4)、 KH_2PO_4 (0.6)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) (10) 和葡萄糖 (10)。用 NaOH 将该溶液滴定至 pH7.4。

[0212] 顶部溶液 (以 mM 计): 与基底外侧溶液相同,但 NaCl 被葡萄糖酸 Na (135) 替代。

[0213] 5. 细胞培养

[0214] 将表达 $\Delta\text{F508-CFTR}$ (FRT ^{$\Delta\text{F508 CFTR}$}) 的 Fisher 大鼠上皮 (FRT) 细胞用于从我们的光学测定法鉴别的推定 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 调节剂的 Ussing 室实验。在 Costar Snapwell 细胞培养插入物上培养细胞并且在 37°C 和 5%CO₂、在 Coon 改进的 Ham's F-12 培养基中培养 5 天,该培养基补充了 5% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素。在用于表征化合物增强剂活性钳,将细胞在 27°C 孵育 16-48h 以校准 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 。为了测定纠正化合物的活性,将细胞在 27°C 或 37°C 与和与化合物一起孵育 24 小时。

[0215] 6. 全细胞记录

[0216] 使用穿孔的膜片全细胞记录监测温度和测试化合物校准的 NIH3T3 细胞中的宏观 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 电流 ($I_{\Delta\text{F508}}$)。简言之,在室温用 Axopatch200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) 对 $I_{\Delta\text{F508}}$ 进行电压钳记录。全部记录均在 10kHz 采样频率下获取并且在 1kHz 低通滤波。移取管在充满胞内溶液时具有 5-6M Ω 电阻。在这些记录条件下,在室温计算的 Cl 逆转电位 (E_{Cl}) 是 -28mV。全部记录均具有 >20G Ω 的密封电阻和 <15M Ω 的串联电阻。使用安装了 Digidata1320A/D 界面与 Clampex8 (Axon Instruments Inc.) 的 PC 进行脉冲发生、数据采集和分析。浴包含 <250 μl 的盐水并且使用重力驱动的灌注系统以 2ml/min 的速率连续灌注。

[0217] 7. 纠正化合物的鉴别

[0218] 为了测定纠正化合物增加质膜中功能性 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 密度的活性,我们利用上述开孔-碎片-记录技术测量纠正化合物处理 24 小时后的电流密度。为了充分活化 $\Delta\text{F508-CFTR}$,向细胞加入 10 μM 福司柯林和 20 μM 染料木黄酮。在我们的记录条件下,在 27°C 下孵育 24 小时后的电流密度高于在 37°C 下孵育 24 小时后的观测值。这些结果与低温孵育对质膜中 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 密度的已知影响是一致的。为了测定纠正化合物对 CFTR 电流密度的影响,将细胞与 10 μM 供试化合物在 37°C 下孵育 24 小时,与 27°C 和 37°C 对照比较电流密度 (活性%)。在记录之前,将细胞用细胞外记录介质洗涤 3 次,以除去任何剩余的供试化合物。与 37°C 对照相比,用 10 μM 纠正化合物预孵育显著增加 cAMP- 和染料木黄酮- 依赖性电流。

[0219] 8. 增强剂化合物的鉴别

[0220] 还用穿孔膜片记录技术研究了 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 增强剂增加稳定表达 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 的

NIH3T3 细胞中宏观 $\Delta F508$ -CFTR Cl 电流 ($I_{\Delta F508}$) 的能力。从光学测定法中鉴别的增强剂引起与在光学测定法中观察到的类似效力和功效的 $I_{\Delta F508}$ 剂量依赖性增加。在所有检验的细胞中,施加增强剂前和过程中的逆转电位为约 -30mV,它是计算的 E_{Cl} (-28mV)。

[0221] 9. 溶液

[0222] 胞内溶液 (以 mM 计): 天冬氨酸 Cs(90)、CsCl(50)、MgCl₂(1)、HEPES(10) 和 240 μ g/ml 两性霉素-B(用 CsOH 将 pH 调节至 7.35)。

[0223] 胞外溶液 (以 mM 计): N-甲基-D-葡萄糖胺 (NMDG)-Cl(150)、MgCl₂(2)、CaCl₂(2)、HEPES(10) (用 HCl 将 pH 调节至 7.35)。

[0224] 10. 细胞培养

[0225] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于全细胞记录。将细胞维持在 37℃、在 5%CO₂ 和 90% 湿度中的在 175cm² 培养烧瓶中的改进的 Eagle 培养基中,该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X pen/strep 和 25mM HEPES。为了进行全细胞记录,将 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上并且在 27℃ 培养 24-48h 后用于测试增强剂的活性;且与或不与纠正化合物一起在 37℃ 孵育,以便测定纠正剂的活性。

[0226] 11. 单通道记录

[0227] 使用切下的膜内侧翻外膜片观察稳定表达 NIH3T3 细胞中温度校准的 $\Delta F508$ -CFTR 的单通道活性和强化即化合物的活性。简言之,在室温用 Axopatch200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc.) 对单通道活性进行电压钳记录。全部记录均在 10kHz 采样频率下获取并且在 400Hz 低通过滤。膜片移接管由 Corning Kovar Sealing#7052 玻璃制成 (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) 并且在充满胞外溶液时具有 5-8M Ω 电阻。在切下后通过添加 1mM Mg-ATP 和 75nM cAMP- 依赖性蛋白激酶催化亚单位 (PKA; Promega Corp. Madison, WI) 活化 $\Delta F508$ -CFTR。在通道活性稳定后,使用重力驱动微量灌注系统灌注膜片。使流入量接近膜片,导致在 1-2sec 内完全交换溶液。为了维持快速灌注过程中的 $\Delta F508$ -CFTR 活性,将非特异性磷酸酶抑制剂 F-(10mM NaF) 加入到浴溶液中。在这些记录条件下,通道活性在整个膜片记录期间保持恒定 (至多 60min)。从胞内溶液运动至胞外溶液 (阴离子以相反方向运动) 的正电荷产生的电流显示为正电流。将移接管电位 (V_p) 维持在 80mV。

[0228] 分析来自包含 ≤ 2 活性通道的膜片中通道活性。同时开放的最大值确定了实验过程中活性通道的数量。为了测定单通道电离振幅,在 100Hz “离线”过滤从 120sec $\Delta F508$ -CFTR 活性记录的数据,然后用于构建所有点的振幅直方图,使用 Bio-Patch Analysis 软件 (Bio-Logic Comp. France) 与多高斯函数拟合。根据 120sec 的通道活性确定总微型电流和开放概率 (P_o)。使用 Bio-Patch 软件或根据相关性 $P_o = I/i(N)$ 测定 P_o , 其中 I = 平均电流, i = 单通道电流振幅,且 N = 膜片中活性通道的数量。

[0229] 12. 溶液

[0230] 胞外溶液 (以 mM 计): NMDG(150)、天冬氨酸 (150)、CaCl₂(5)、MgCl₂(2) 和 HEPES(10) (用 Tris 碱将 pH 调节至 7.35)。

[0231] 胞内溶液 (以 mM 计): NMDG-Cl(150)、MgCl₂(2)、EGTA(5)、TES(10) 和 Tris 碱 (14) (用 HCl 将 pH 调节至 7.35)。

[0232] 13. 细胞培养

[0233] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于切下膜的膜片钳记录。将细胞维持在 37°C、在 5%CO₂和 90%湿度中的在 175cm²培养烧瓶中的改进的 Eagle 培养基中,该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X pen/strep 和 25mM HEPES。为了进行单通道记录,将 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上并且在 27°C 培养 24-48h 后使用。

[0234] 使用上述方法测定了化合物 1 的活性即 EC50 并且如表 4 所示。

[0235] 表 4.

[0236]

IC50/EC50 宾 (Bins): +++ <= 2.0 < ++ <= 5.0 < +		
百分比活性 宾 (Bins): + <= 25.0 < ++ <= 100.0 < +++		
化合物编号	宾 EC50 (BinnedEC50)	宾最大功效 (Binned Max Efficacy)
1	+++	+++

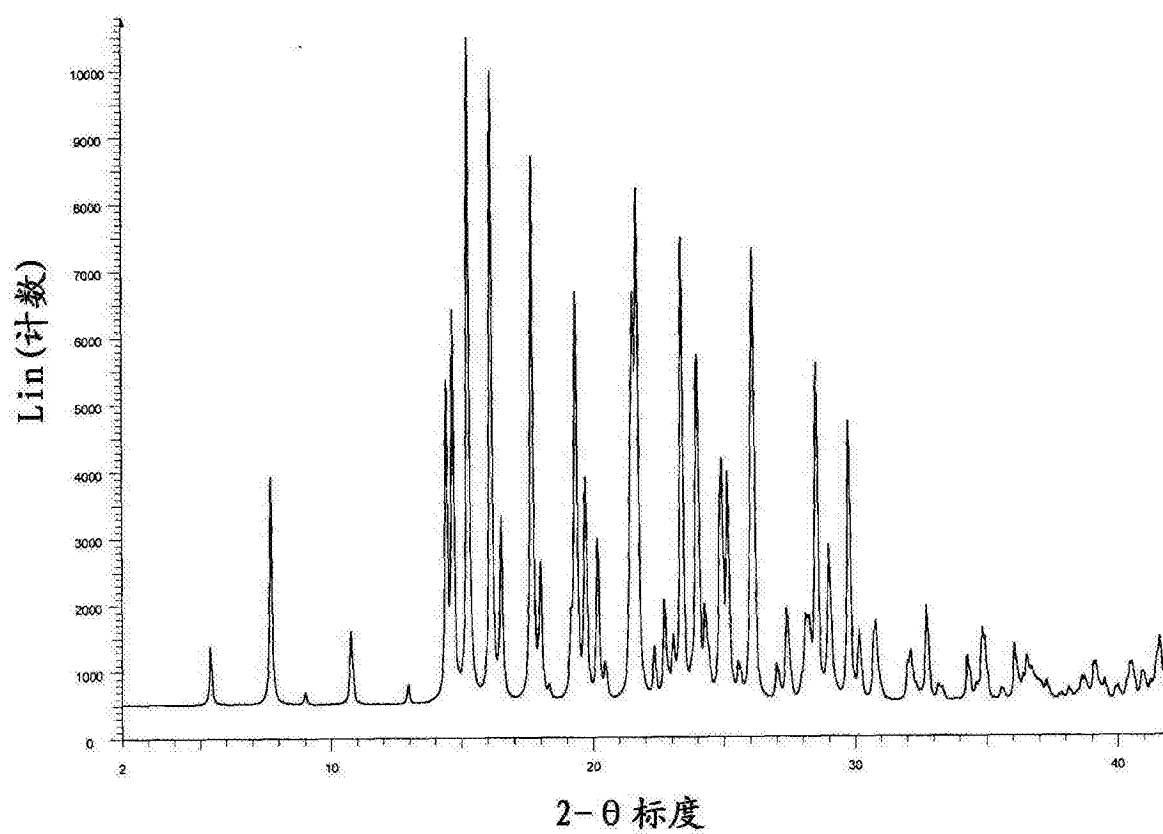


图 1

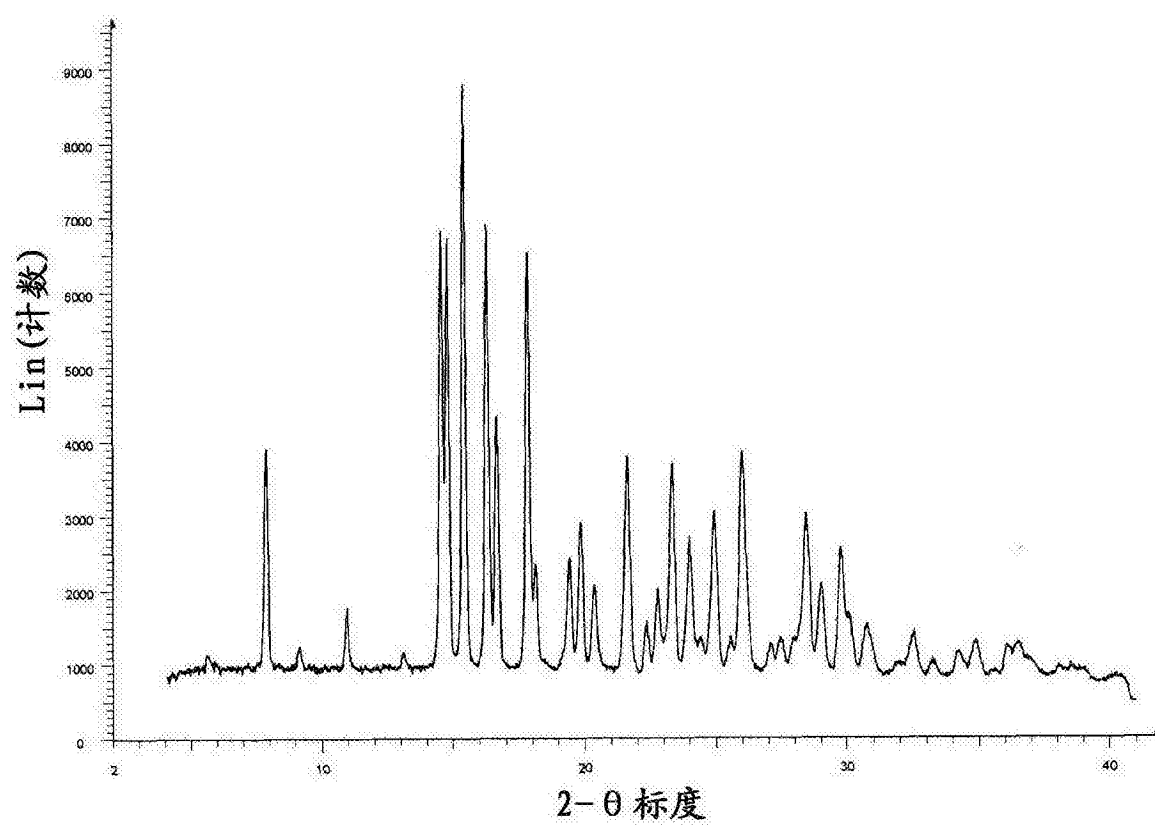


图 2

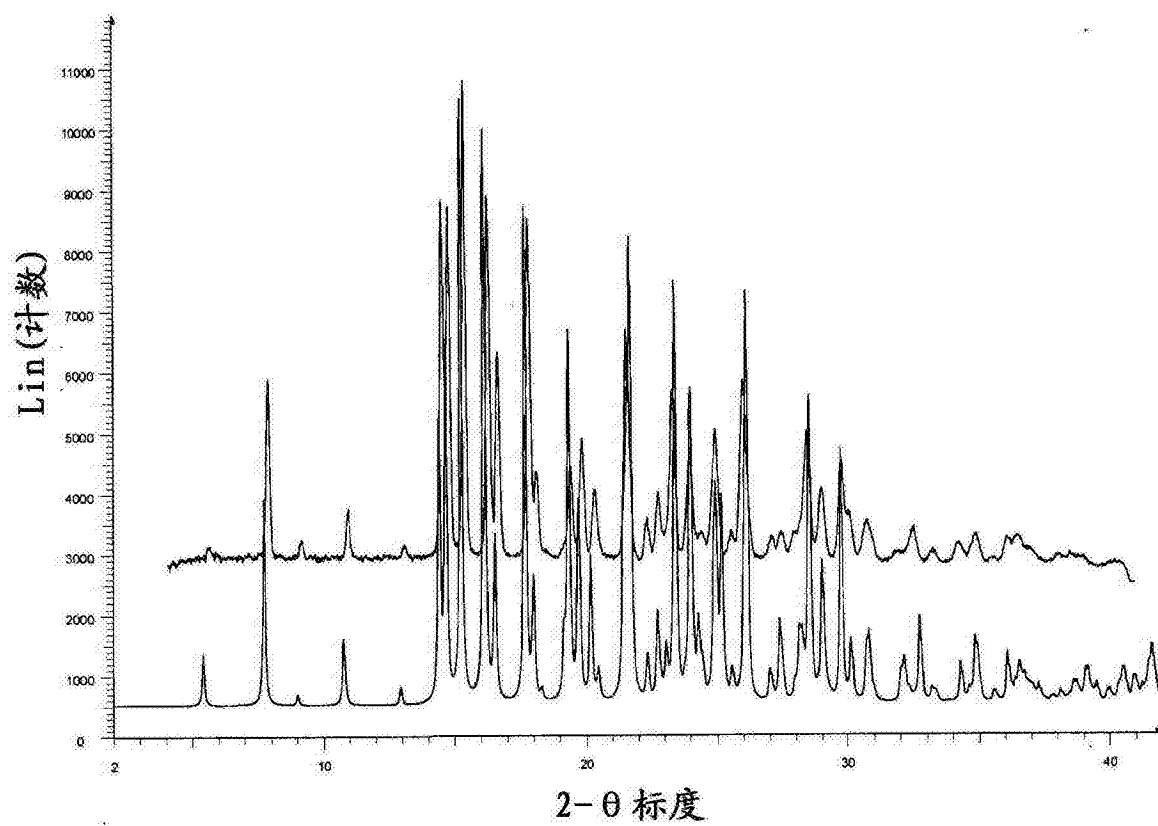


图 3

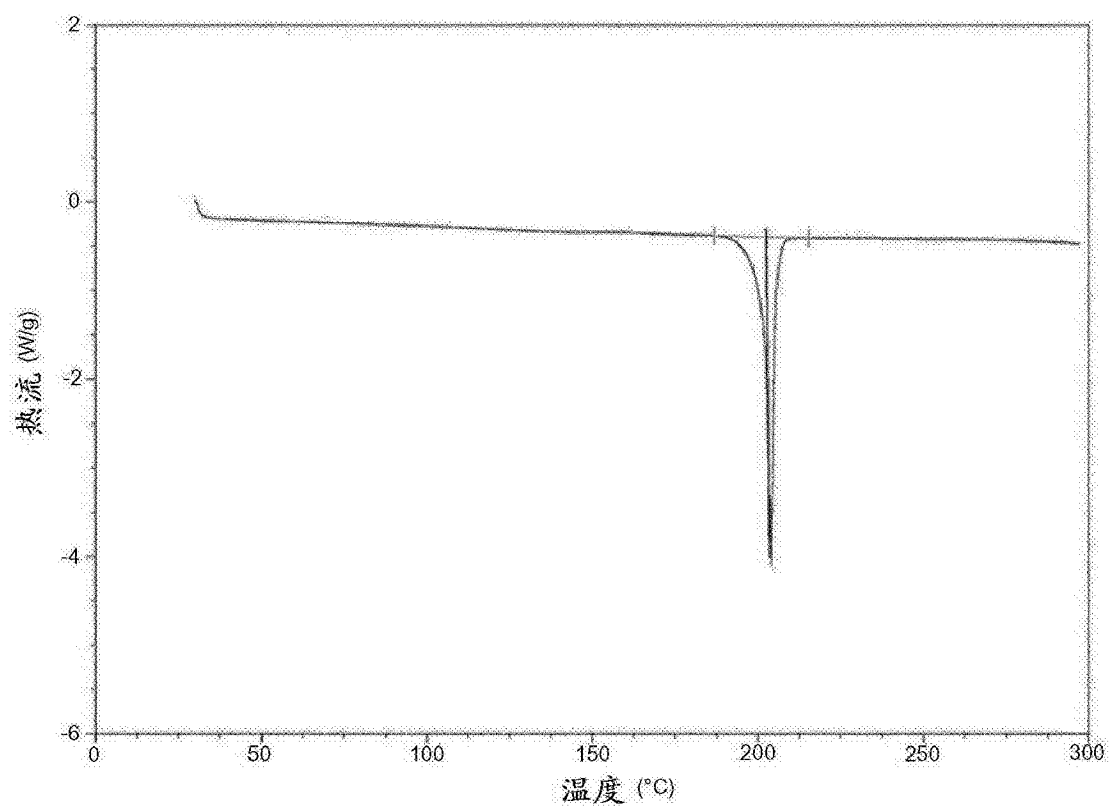


图 4

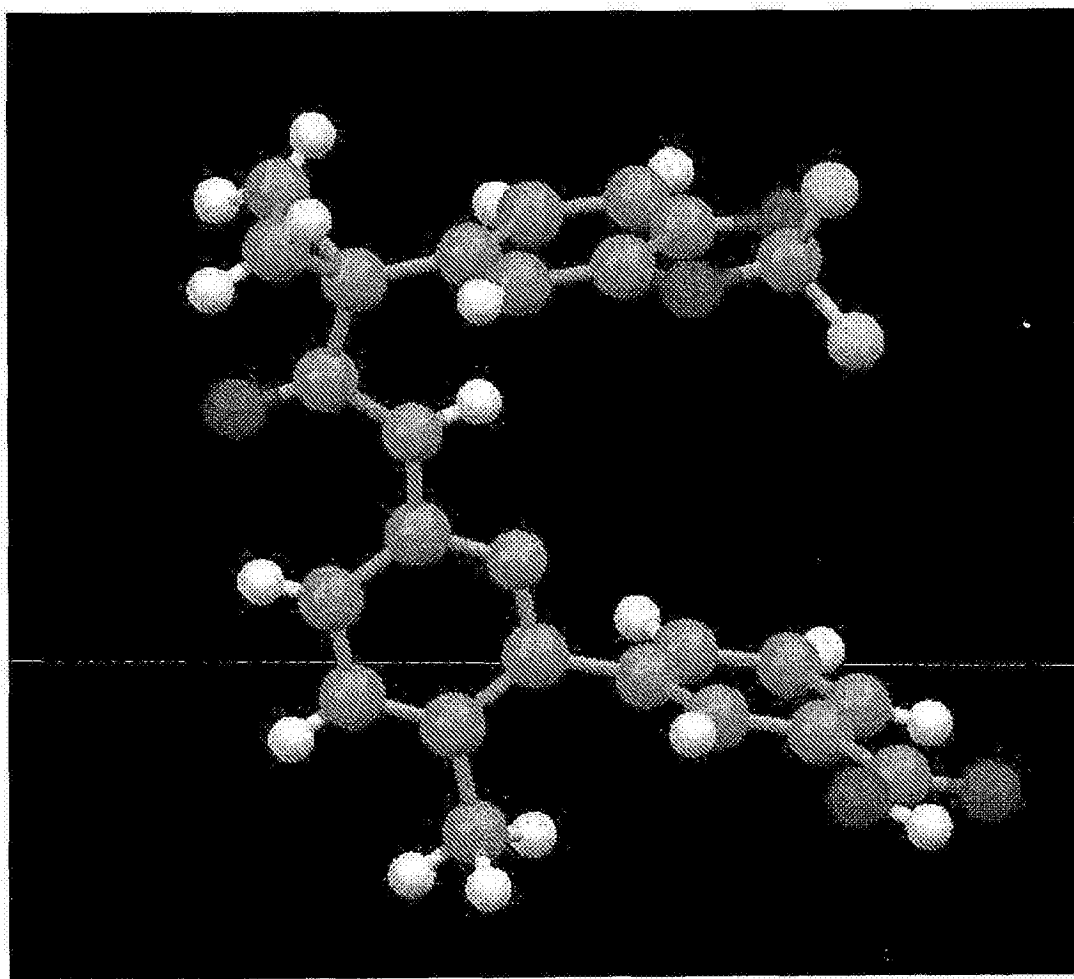


图 5

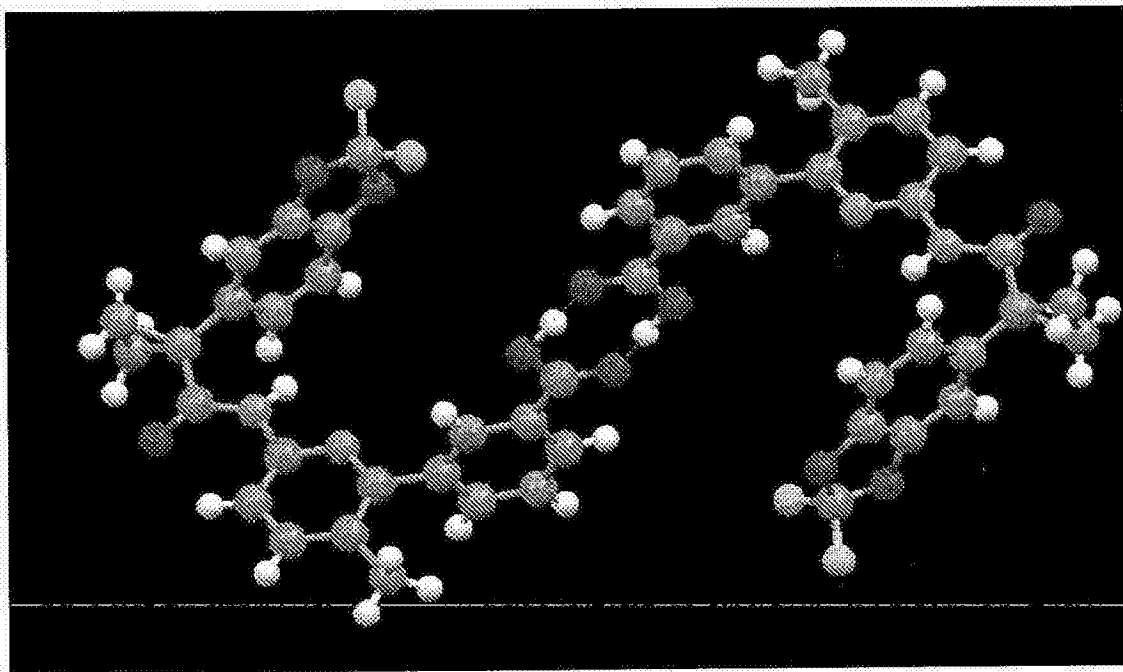


图 6

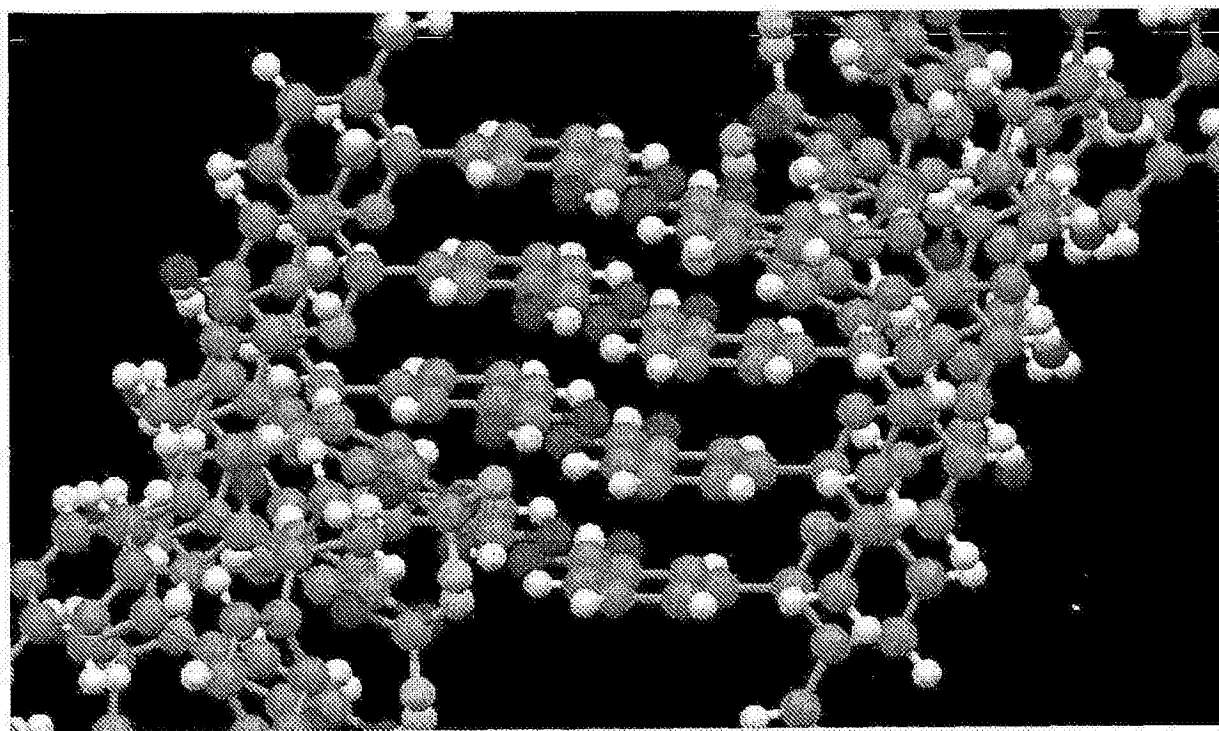


图 7

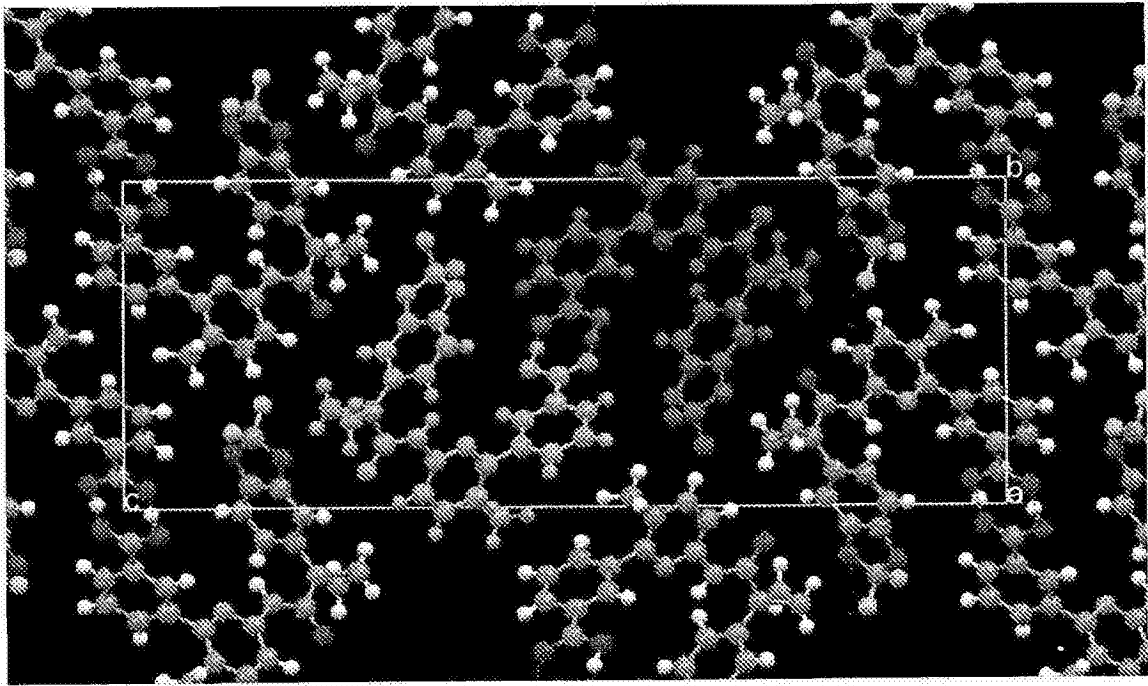


图 8

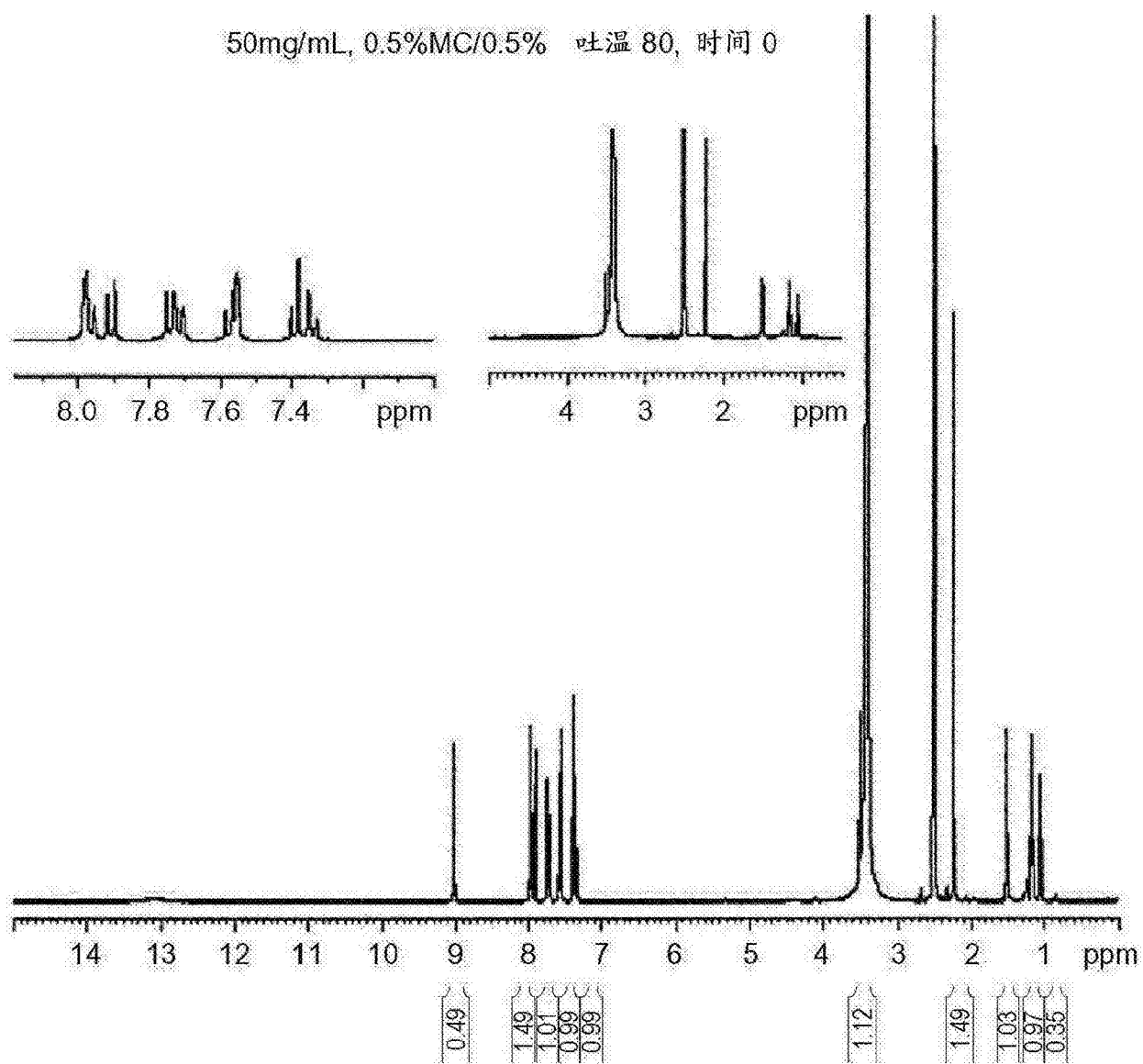


图 9

0.5%MC/0.5%吐温80, 50mg·ml 24小时

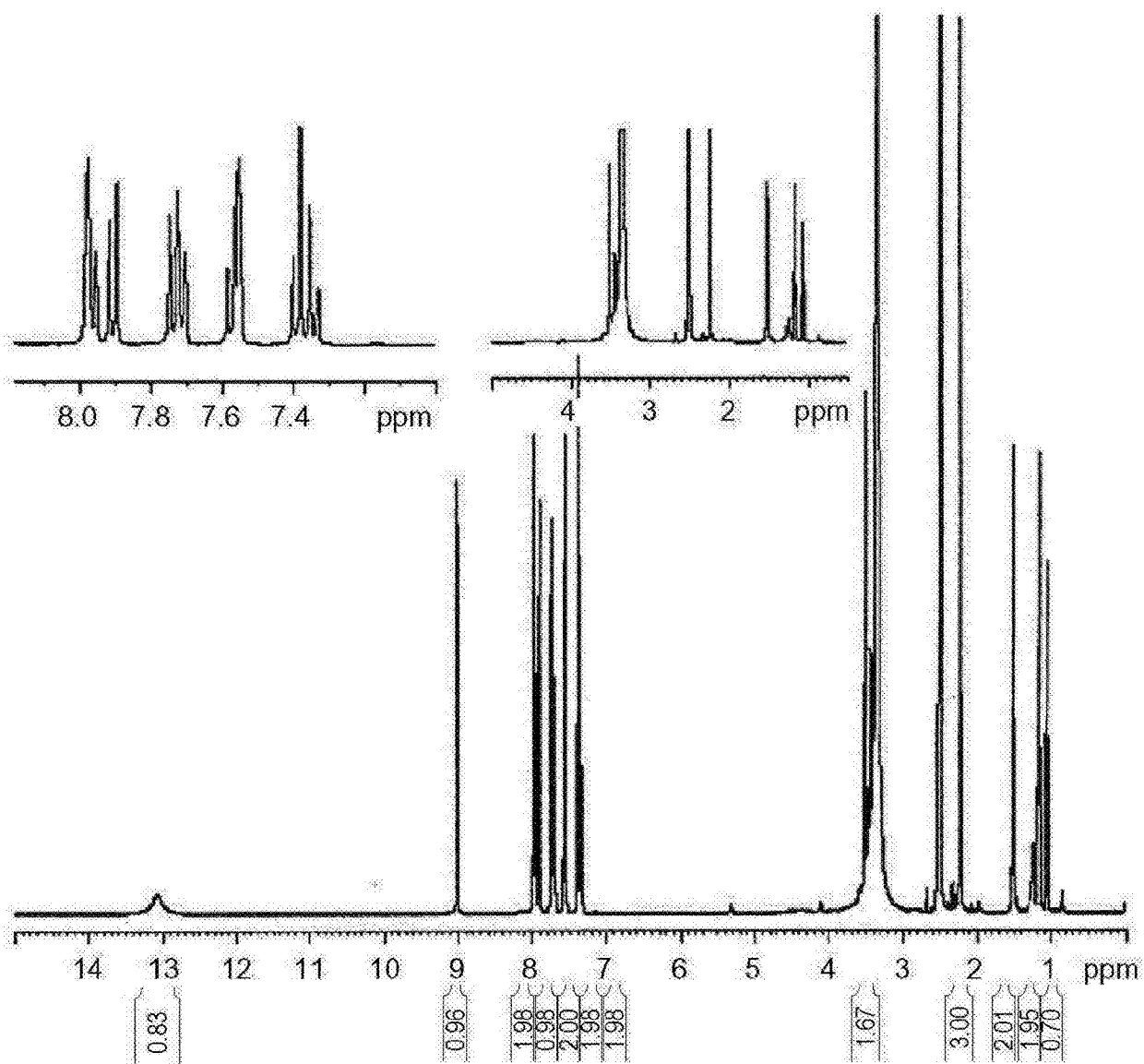


图 10

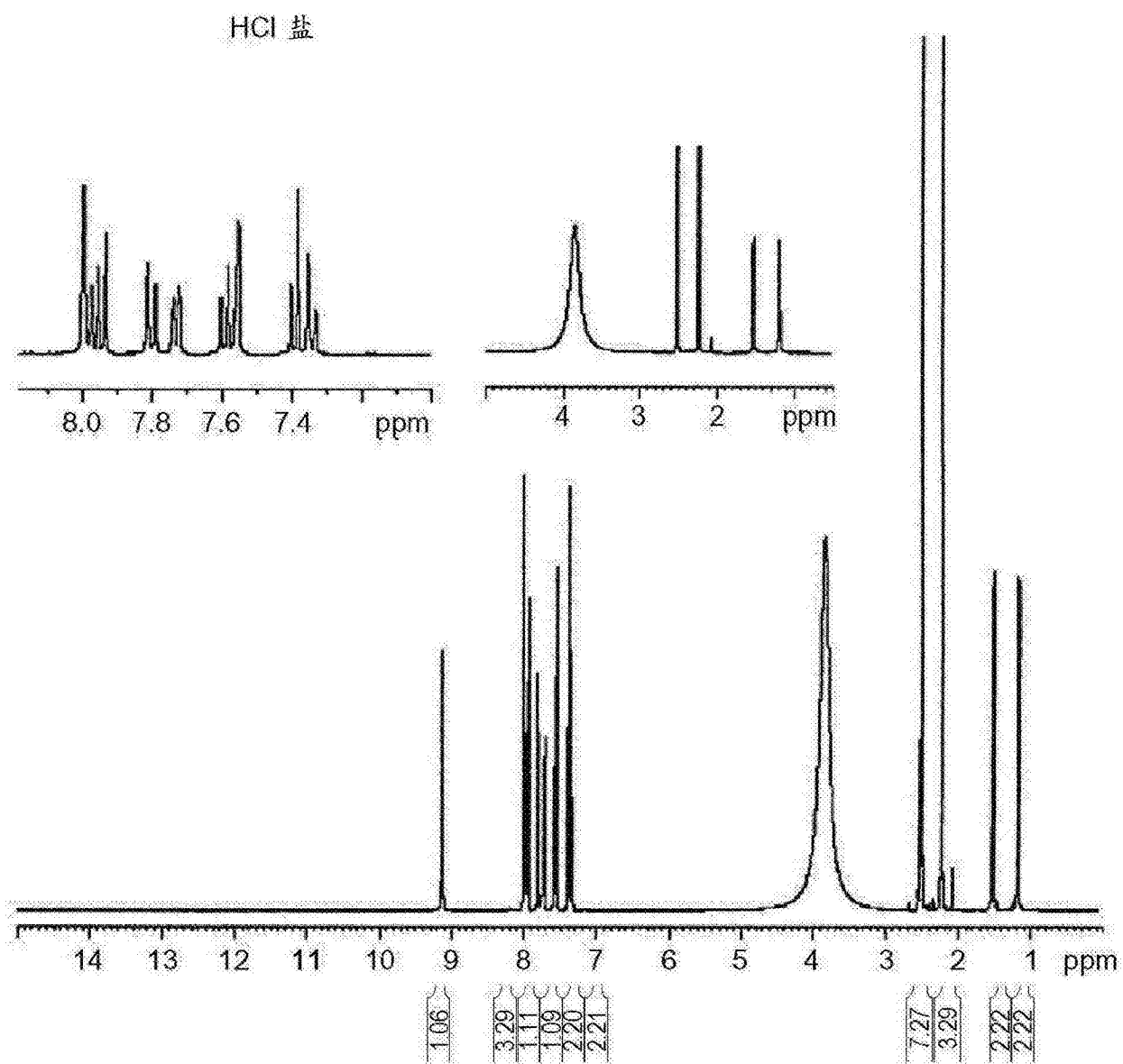


图 11