



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113354649 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 10

(21) 申请号 202110402862.7

(22) 申请日 2015.11.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113354649 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(30) 优先权数据
62/080374 2014.11.16 US
62/169545 2015.06.01 US

(62) 分案原申请数据
201580073515.7 2015.11.16

(73) 专利权人 阵列生物制药公司
地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 A·B·阿里戈 D·云斯特 K·沙

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 彭昶

(51) Int.Cl.
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 33/02 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102264736 A, 2011.11.30
WO 2012125667 A1, 2012.09.20

审查员 陈宁

权利要求书1页 说明书57页 附图27页

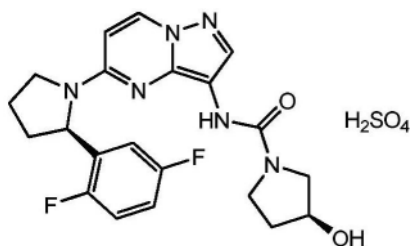
(54) 发明名称

一种新的晶型

(57) 摘要

本申请公开了(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺的新的晶型,包含所述晶型的药物组合物和所述晶型治疗疼痛、癌症、炎症、神经变性疾病或克氏锥虫感染的用途。在一些实施方案中,所述新的晶型包含包括(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐的稳定的多晶型物。本发明进一步涉及制备新的晶型的方法。

1. 具有下式的晶型 (I-HS) :



I-HS,

其特征在于具有位于 18.4 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰 (2 θ 度), 其中所述晶型基本上不含非晶型。

2. 根据权利要求1的晶型, 其特征在于具有位于 10.7 ± 0.2 、 18.4 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰 (2 θ 度)。

3. 根据权利要求1的晶型, 其中所述晶型含有小于5摩尔%的非晶型。

4. 根据权利要求1的晶型, 其中所述晶型含有小于2摩尔%的非晶型。

5. 药物组合物, 其包含药学上可接受的载体和根据权利要求1-4任一项的晶型。

6. 根据权利要求1-4任一项的晶型在制备用于治疗选自以下的疾病的药物中的用途: Trk激酶介导的癌症、疼痛、炎症、神经变性疾病或克氏锥虫感染。

7. 根据权利要求1-4任一项的晶型在制备用于在需要的受试者中治疗Trk激酶介导的癌症的药物中的用途。

8. 权利要求6所述的用途, 其中所述癌症通过TrkA介导。

9. 权利要求6所述的用途, 其中所述癌症通过TrkB介导。

10. 根据权利要求1-4任一项的晶型在制备用于在需要的受试者中治疗癌症的药物中的用途, 其中所述治疗首先包括确定癌症是否由Trk激酶介导。

一种新的晶型

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年11月16日提交的美国临时申请序列号62/080,374和2015年6月1日提交的62/169,545的优先权,将它们以其整体在此引入作为参考。

背景技术

[0003] 1.技术领域

[0004] 本发明涉及(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺(式I)及其药学上可接受的盐,例如硫酸氢盐,且进一步涉及硫酸氢盐的新的晶型,它们显示Trk家族蛋白酪氨酸激酶抑制作用,以及涉及包含该晶型的药物组合物,制备该晶型的方法,和该化合物和晶型治疗疼痛、炎症、癌症和某些传染病的用途。

[0005] 2.相关技术的描述

[0006] Trk是由称为神经营养因子(NT)的一组可溶性生长因子激活的高亲和性受体酪氨酸激酶。Trk受体家族具有3个成员,即TrkA、TrkB和TrkC。神经营养因子中有(i)可激活TrkA的神经生长因子(NGF), (ii)可激活TrkB的脑源性神经营养因子(BDNF)和NT-4/5,和(iii)可激活TrkC的NT3。Trk在神经元组织中广泛表达且与神经元细胞的维持、信号传导和存活有关(Patapoutian, A.等人, *Current Opinion in Neurobiology*, 2001, 11, 272-280)。

[0007] 最近文献也已显示Trk的过度表达、激活、扩增和/或突变与许多癌症有关,该癌症包括成神经细胞瘤(Brodeur, G. M., *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 203-216)、卵巢癌(Davidson, B.等人, *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 2248-2259)、乳腺癌(Kruettgen等人, *Brain Pathology* 2006, 16:304-310)、前列腺癌(Dionne等人, *Clin. Cancer Res.* 1998, 4(8): 1887-1898)、胰腺癌(Dang等人, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2006, 21(5): 850-858)、多发性骨髓瘤(Hu等人, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007, 178:1-10)、星形细胞瘤与成神经管细胞瘤(Kruettgen等人, *Brain Pathology* 2006, 16:304-310)、神经胶质瘤(Hansen等人, *Journal of Neurochemistry* 2007, 103:259-275)、黑色素瘤²⁵、甲状腺癌(Brzezianska等人, *Neuroendocrinology Letters* 2007, 28(3), 221-229)、肺腺癌(Perez-Pinera等人, *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007, 295(1&2), 19-26)、大细胞神经内分泌瘤¹⁹(Marchetti等人, *Human Mutation* 2008, 29(5), 609-616)和结肠直肠癌(Bardelli, A., *Science* 2003, 300, 949)。在癌症的临床前模型中, Trk抑制剂在抑制肿瘤生长与阻止肿瘤转移中有效。具体而言, TrkA、TrkB、TrkC和Trk/Fc嵌合体的非选择性小分子抑制剂在抑制肿瘤生长与阻止肿瘤转移中有效²⁵(Nakagawara, A. (2001) *Cancer Letters* 169:107-114; Meyer, J.等人(2007) *Leukemia*, 1-10; Pierottia, M. A.和Greco A., (2006) *Cancer Letters* 232:90-98; Eric Adriaenssens, E.等人, *Cancer Res* (2008) 68:(2) 346-351)。因此, 预期Trk激酶家族的抑制剂具有治疗癌症的用途。

[0008] 此外, 已证明Trk/神经营养因子途径的抑制剂在疼痛的多种临床前动物模型中有效。例如, 已显示拮抗性NGF和TrkA抗体(例如, RN-624)在炎性和神经性疼痛动物模型中

在人类临床试验中有效(Woolf,C.J.等人(1994)Neuroscience 62,327-331;Zahn,P.K.等人(2004)J.pain5,157-163;McMahon,S.B.等人,(1995)Nat.Med.1,774-780;Ma,Q.P.和Woolf,C.J.(1997)Neuroreport 8,807-810;Shelton,D.L.等人(2005)Pain116,8-16;De la f o y , L . 等 人 (2 0 0 3) P a i n 1 0 5 , 4 8 9 - 4 9 7 ; L a m b , K . 等 人 (2 0 0 3) Neurogastroenterol.Motil.15,355-361;Jaggar,S.I.等人(1999)Br.J.Anaesth.83,442-448)。另外,最近文献显示,发炎后,在背根神经节中BDNF水平和TrkB信号传导被增加(Cho,L.等人,Brain Research 1997,749,358),且几个研究显示使通过BDNF/TrkB途径的信号传导降低的抗体可抑制神经元致超敏作用和有关疼痛(Chang-Qi,L等人,Molecular pain 2008,4:27)。

[0009] 已显示肿瘤细胞和肿瘤侵入性巨噬细胞分泌的NGF直接刺激位于外周疼痛纤维上的TrkA。在小鼠和大鼠中使用各种肿瘤模型显示用单克隆抗体中和NGF可抑制与癌症有关的疼痛达到类似于或高于吗啡最高耐受剂量的程度。另外,许多研究中已经涉及BDNF/TrkB途径的激活用作各种类型的疼痛调节剂,该疼痛包括炎性疼痛(Matayoshi,S.,J.Physiol.2005,569:685-95)、神经性疼痛(Thompson,S.W.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1999,96:7714-18)和手术疼痛(Li,C.-Q等人,Molecular疼痛、2008,4(28),1-11)。因为TrkA和TrkB激酶可用作NGF驱动的生物反应的介质,所以TrkA和/或其它Trk激酶的抑制剂可为慢性疼痛状态提供有效治疗。

[0010] 对于疼痛病症目前的治疗方案利用了几种类型的化合物。阿片类(例如吗啡)具有包括引起呕吐、便秘和负面呼吸效应在内的几个缺陷以及成瘾的可能性。非甾体抗炎镇痛药(NSAID,例如COX-1型或COX-2型)也具有包括治疗重度疼痛的效力不足在内的缺陷。另外,COX-1抑制剂可造成粘膜溃疡。因此,持续需要新的且更加有效的治疗用于减轻疼痛、尤其慢性疼痛。

[0011] 另外,已显示抑制神经营养因子/Trk途径可有效治疗炎性疾病的临床前模型。例如,抑制神经营养因子/Trk途径已经牵涉下述疾病的临床前模型:包括哮喘在内的炎性肺病(Freund-Michel,V;Frossard,N.;Pharmacology&Therapeutics(2008),117(1),52-76),间质性膀胱炎(Hu Vivian Y等人,The Journal of Urology(2005),173(3),1016-21),包括溃疡性结肠炎和克罗恩病(Crohn's disease)在内的炎性肠病(Di Mola,F.F等人,Gut(2000),46(5),670-678)和炎性皮肤病,例如异位性皮炎(Dou,Y.-C.等人,Archives of Dermatological Research(2006),298(1),31-37)、湿疹和银屑病(Raychaudhuri,S.P.等人,Journal of Investigative Dermatology(2004),122(3),812-819)。

[0012] 神经营养因子/Trk途径,特别是BDNF/TrkB途径也已经牵涉神经变性疾病的病因,该疾病包括多发性硬化、帕金森氏病(Parkinson's disease)和阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)(Sohrabji,Farida;Lewis,Danielle K.Frontiers in Neuroendocrinology(2006),27(4),404-414)。调节神经营养因子/Trk途径可用于治疗这些疾病和相关疾病。

[0013] 据认为TrkA受体对于克氏锥虫(Typanosoma cruzi)(查加斯氏病(Chagas disease))在人类宿主中的寄生虫感染中的疾病过程至关重要(de Melo-Jorge,M.等人,Cell Host&Microbe(2007),1(4),251-261)。因此,TrkA抑制可用于治疗查加斯氏病和有关的原生动物感染。

[0014] Trk抑制剂也可用于治疗与骨重建调节失衡有关的疾病,例如骨质疏松症、类风湿

性关节炎和骨转移。骨转移是癌症的常见的并发症,在晚期乳腺癌或前列腺癌(1)患者中高达70%和在肺癌、结肠癌、胃癌、膀胱癌、子宫癌、直肠癌、甲状腺癌或肾癌患者中为约15至30%。溶骨性转移可造成严重的疼痛、病理性骨折、危及生命的高钙血症、脊髓压迫症和其它神经压迫综合征。出于这些原因,骨转移是花费高的严重的癌症并发症。因此,可诱导增殖性成骨细胞凋亡的药剂是非常有优势的。已在骨折的小鼠模型的成骨区域中观察到TrkA受体和TrkC受体的表达(K.Asaumi等人,Bone (2000) 26 (6) 625-633)。另外,在几乎所有的成骨细胞中均观察到NGF的定位(K.Asaumi等人)。最近,证明在人类hFOB成骨细胞中pan-Trk抑制剂可抑制由与所有3个Trk受体结合的神经营养因子所激活的酪氨酸信号传导(J.Pinski等人,(2002) 62, 986-989)。该数据支持使用Trk抑制剂治疗骨重建疾病(例如癌症患者中的骨转移)的理论。

[0015] 据称可用于治疗疼痛或癌症的Trk激酶的几种类型的小分子抑制剂是已知的(Expert Opin. Ther. Patents (2009) 19 (3))。

[0016] 国际专利申请公开W0 2006/115452和W0 2006/087538描述了几种类别的小分子,据称它们为可用于治疗疼痛或癌症的Trk激酶的抑制剂。

[0017] 吡唑并[1,5-a]嘧啶化合物是已知的。例如,国际专利申请公开W0 2008/037477公开了在3-位携带烷基、芳基或杂环基的吡唑并[1,5-a]嘧啶化合物。这些化合物据称为PI3K和/或mTOR脂质激酶抑制剂。

[0018] PCT专利公开号W0 2008/058126公开了在3-位携带苯基的吡唑并[1,5-a]嘧啶化合物。这些化合物据称为Pim-激酶抑制剂。

[0019] 美国专利公开号2006/0094699公开了在3-位携带-C(=O)NH-苯基、-C(=O)(4-甲基哌啶基)或-C(=O)NMe(CH₂-三甲基吡唑基)基团的吡唑并[1,5-a]嘧啶化合物,其用于与糖皮质激素受体激动剂的组合治疗。

[0020] PCT专利公开号W0 2010/033941、W0 2010/048314、W0 2011/006074和W0 2011/146336公开了具有Trk家族蛋白酪氨酸激酶抑制作用的化合物,其可用于治疗疼痛、癌症、炎症、神经变性疾病和某些传染病。

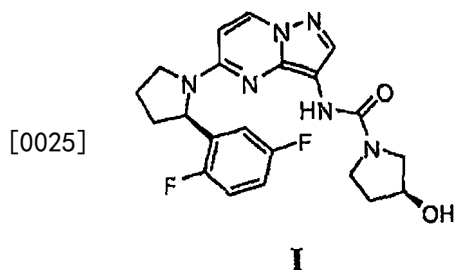
[0021] W0 2010/048314在实施例14A公开了(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺的硫酸氢盐。当根据该文献的实施例14A的方法制备时,W0 2010/048314未公开本文所述的硫酸氢盐的具体形式。特别是,W0 2010/048314未公开下述的晶型(I-HS)。

[0022] 本发明中所提及的所有文件(包括科学论文、专利公开案及申请案及诸如此类)皆以全文引用方式并入本文中作为参考。

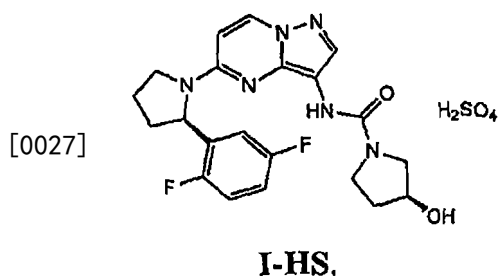
发明内容

[0023] 本发明涉及(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺(式I)及其药学上可接受的盐,例如硫酸氢盐,且进一步涉及硫酸氢盐的新的晶型,它们显示Trk家族蛋白酪氨酸激酶抑制作用,以及涉及包含该晶型的药物组合物,制备该晶型的方法,和该化合物和晶型治疗疼痛、炎症、癌症和某些传染病的用途。

[0024] 本文提供了式I的化合物的新的晶型:



[0026] 该化合物也被称作(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺。特别是,该新的晶型包括式I化合物的硫酸氢盐的稳定的多晶型物形式,下文称为晶型(I-HS)和LOX0-101,其可通过例如其X-射线衍射图表征-具有下式的晶型(I-HS):



[0028] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 18.4 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 10.7 ± 0.2 、 18.4 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 10.7 ± 0.2 、 18.4 ± 0.2 、 19.2 ± 0.2 、 20.2 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 21.5 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 10.7 ± 0.2 、 15.3 ± 0.2 、 16.5 ± 0.2 、 18.4 ± 0.2 、 19.2 ± 0.2 、 19.9 ± 0.2 、 20.2 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 21.5 ± 0.2 、 22.1 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 、 24.0 ± 0.2 、 24.4 ± 0.2 、 25.6 ± 0.2 、 26.5 ± 0.2 、 27.6 ± 0.2 、 28.2 ± 0.2 、 28.7 ± 0.2 、 30.8 ± 0.2 和 38.5 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2θ 度)。

[0029] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有基本上如图29所示的XRPD图谱。

[0030] 在一些实施方案中,该晶型具有的开始至最大温度为约193至约205 $^{\circ}\text{C}$,其通过差示扫描量热法测量。在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的熔化热为约2.415mW,其通过差示扫描量热法测量。在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的DSC温谱图基本上如图26所示。在一些实施方案中,晶型(I-HS)为非吸湿的。

[0031] 一些实施方案包括包含药学上可接受的载体和晶型(I-HS)的药物组合物。一些实施方案包括通过将晶型(I-HS)和药学上可接受的载体混合制备的药物组合物。一些实施方案包括制备药物组合物的方法,包括将晶型(I-HS)和药学上可接受的载体混合。

[0032] 本发明还涉及治疗癌症、疼痛、炎症和某些传染病的方法,包括向需要的受试者给药治疗有效量的晶型(I-HS)。一些实施方案包括晶型(I-HS)在制备用于在需要的受试者中治疗癌症、疼痛、炎症和某些传染病的药物中的用途。

[0033] 本文还提供在需要的受试者中治疗Trk激酶介导的癌症的方法,该方法包括向该受试者给药治疗有效量的晶型(I-HS)。在一些实施方案中,所述癌症通过Trk;TrkB;或TrkA和TrkB介导。在一些实施方案中,患者诊断或鉴定为患有Trk-相关的癌症。

[0034] 本文还提供在需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括:(a) 确定所述癌症是否与Trk激酶的过表达、活化、扩增和突变中的一种或多种相关;和(b) 如果确定该癌症与Trk激酶的过表达、活化、扩增和突变中的一种或多种相关,向该受试者给药治疗有效量的晶型(I-HS)。在一些实施方案中,提供在需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括:(a) 确定该癌症是否通过Trk激酶介导;和(b) 如果确定该癌症是通过Trk激酶介导,向该受试者给药治疗有效量的晶型(I-HS)。本文还提供治疗受试者的方法,包括:(a) 对获自受试者的样品进行测试以确定该受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或水平的失调;和(b) 向经确定具有NTRK基因、Trk蛋白、或它们的表达或活性或水平的失调的受试者给药治疗有效量的晶型(I-HS)。

[0035] 在一些实施方案中,NTRK基因、Trk蛋白、或它们的表达或水平的失调为导致Trk融合蛋白的翻译的染色体翻译。例如,所述Trk融合蛋白选自:TP53-TrkA、LMNA-TrkA、CD74-TrkA、TFG-TrkA、TPM3-TrkA、NFASC-TrkA、BCAN-TrkA、MPRIP-TrkA、TPR-TrkA、RFWD2-TrkA、IRF2BP2-TrkA、SQSTM1-TrkA、SSBP2-TrkA、RABGAP1L-TrkA、C18ORF8-TrkA、RNF213-TrkA、TBC1D22A-TrkA、C200RF112-TrkA、DNER-TrkA、ARHGEF2-TrkA、CHTOP-TrkA、PPL-TrkA、PLEKHA6-TrkA、PEAR1-TrkA、MRPL24-TrkA、MDM4-TrkA、LRRC71-TrkA、GRIPAP1-TrkA、EPS15-TrkA、DYNC2H1-TrkA、CEL-TrkA、EPHB2-TrkA、TGF-TrkA、NACC2-TrkB、QKI-TrkB、AFAP1-TrkB、PAN3-TrkB、SQSTM1-TrkB、TRIM24-TrkB、VCL-TrkB、AGBL4-TrkB、DAB2IP-TrkB、ETV6-TrkC、BTBD1-TrkC、LYN-TrkC、RBPMS-TrkC、EML4-TrkC、HOMER2-TrkC、TFG-TrkC、FAT1-TrkC和TEL-TrkC。

[0036] 在一些实施方案中,所述NTRK基因、Trk蛋白、或它们的表达或活性的失调为在基因中的一个或多个点突变。例如,所述NTRK基因为NTRK1基因,且NTRK1基因中的一个或多个点突变导致TrkA蛋白的翻译,该TrkA蛋白在以下一个或多个以下氨基酸位置具有取代:33、336、337、324、420、444、517、538、649、682、683、702和1879。在一些实施方案中,NTRK1基因中的一个或多个点突变导致具有一个或多个以下氨基酸取代的TrkA蛋白的翻译:R33W、A336E、A337T、R324Q、R324W、V420M、R444Q、R444W、G517R、G517V、K538A、R649W、R649L、R682S、V683G、R702C和C1879T。

[0037] 上述发明内容及以下发明详述中所阐述的特征及优点并非详尽的。本领域技术人员鉴于本发明的附图、说明书及权利要求将明了许多其它特征及优点。

附图简述

[0038] 图1图解说明根据一个实施方案,根据实施例2制备的晶型(I-HS)的X射线粉末衍射(XRPD)图谱。

[0039] 图2图解说明根据一个实施方案,根据实施例2制备的晶型(I-HS)的同时热重/差示热分析仪(TG/DTA)曲线。

[0040] 图3图解说明根据一个实施方案,根据实施例2制备的晶型(I-HS)的差示扫描量热(DSC)曲线。

[0041] 图4A及图4B图解说明根据一些实施方案,在(A)非偏振光及(B)偏振光下根据实施例2制备的晶型(I-HS)的偏振光显微术(PLM)影像。

[0042] 图5图解说明根据一个实施方案,根据实施例2制备的晶型(I-HS)的动态蒸气吸附

(DVS) 等温曲线。

[0043] 图6图解说明根据一个实施方案,根据实施例2制备的晶型(I-HS)的红外(IR)光谱曲线。

[0044] 图7图解说明根据一个实施方案,式I化合物的非晶型游离碱形式的XRPD图谱。

[0045] 图8的图显示使用晶型(I-HS)剂量依赖性抑制具有MPRIP-NTRK1融合蛋白的CUTO-3F肺腺癌细胞的增殖。

[0046] 图9的图显示使用晶型(I-HS)剂量依赖性抑制具有TPM3-NTRK1融合蛋白的KM12结肠直肠癌细胞的增殖。

[0047] 图10的图显示使用晶型(I-HS)剂量依赖性抑制具有ETV6-NTRK3融合蛋白的M0-91急性髓细胞性白血病细胞的增殖。

[0048] 图11为显示晶型(I-HS)抑制CUTO-3F细胞中MPRIP-TRKA激酶、ERK1/2的活化和KM12细胞中的AKT活性的免疫印迹。这些细胞经指示剂量的晶型(I-HS)处理2小时。

[0049] 图12为显示晶型(I-HS)抑制KM12细胞中TPM3-TRKA激酶的活化及下游ERK1/2及AKT活性的免疫印迹。这些细胞经指示剂量下的晶型(I-HS)处理2小时。

[0050] 图13为显示晶型(I-HS)抑制M0-91细胞中的TEL-TRKC激酶及ERK1/2及AKT活性的免疫印迹。这些细胞经指示剂量下的晶型(I-HS)处理2小时。

[0051] 图14为描绘在患者的肿瘤样品中鉴定的LMNA-NTRK1基因融合的示意图:LMNA(NM_170707)的前两个外显子与NTRK1(NM_002529)的外显子11-17结合。

[0052] 图15为来自NTRK1分离FISH分析的荧光显微图,其显示对应于正常基因(黄色箭头)的成对绿色(5' NTRK1)及红色(3' NTRK1)信号,且在肿瘤细胞核(利用DAPI染成蓝色)中观察到经分离红色信号(红色箭头)指示导致NTRK1基因融合的染色体缺失。

[0053] 图16为对使用LMNA(5')及NTRK1(3')引物的RT-PCR产物进行DNA定序的层析图,其指示在NTRK1的外显子2LMNA与外显子11之间的融合断点。

[0054] 图17为TRK-SHC1邻位连接分析(PLA)的示意图。此卡通图证实在肿瘤细胞中检测到近端(<40nm) TRK及SHC1蛋白。所用TRK抗体(兔)可检测TRKA(由NTRK1编码)、TRKB(NTRK2)或TRKC(NTRK3)蛋白的c末端。通过SHC1抗体(小鼠)检测SHC1。物种特异性二级抗体与共价连接的互补核苷酸序列的结合允许原位PCR反应以生成DNA,该DNA可通过荧光原位杂交检测,其在该方法中作为红色点显现。该分析可检测经活化TRK,无论TRK受体家族成员(TRKA/B/C)的活化的机制如何(野生型的基因融合、突变或自分泌/旁分泌活化)。

[0055] 图18为验证TRK-SHC1 PLA的数据集。(A)源于患有具有MPRIP-NTRK1基因融合的IV期肺腺癌的患者恶性胸膜渗出液的CUTO-3细胞系经非靶向对照(non-targeting control, NTC) siRNA、NTRK1导向的siRNA转染或未经处理(对照),并针对TRKA蛋白表达进行分析。Western印迹分析证实TRKA蛋白含量显著降低,且对应于以170kD的表观分子量迁移的MPRIP-TRKA融合蛋白。在如(A)中处理的细胞中实施TRK-SHC1PLA,其证实在siRNA对照(B)中具有稳健阳性信号,但在NTRK1 siRNA(C)中成比例减少。将CUTO-3细胞用DMSO(D)或100nM浓度的晶型(I-HS)(E)处理2小时,此证实与对照相比在晶型(I-HS)处理的样品中TRKA-SHC1复合物被破坏。CULC001为源于与CUTO-3细胞系相同的肿瘤的患者源性肿瘤异种移植物(PDX)且具有MPRIP-NTRK1基因融合(未显示)。CULC002为来自无已知驱动子(ALK、ROS1、EGFR、KRAS及BRAF阴性)的NSCLC患者的PDX且通过NTRK1分离FISH对于NTRK1基因融合

而言为阴性(未显示)。TRK PLA分析证实在CULC001 (F) 肿瘤细胞核中具有稳健信号而在CULC002 (G) 肿瘤细胞核中无信号。(H) 及 (I) 组显示来自CULC001PDX的神经束。TRK-SHC1 PLA仅在CULC002肿瘤样品的此区域中为阳性且表明TRKA、TRKB或TRKC受体中的自分泌信号传导,因为此家族在神经组织中表达且用作此在其它方面为阴性的肿瘤样品的内部阳性对照。

[0056] 图19为来自TRK SHC1邻位连接分析及对照的影像。(A) TRK-SHC1邻位连接分析证实在肿瘤细胞核中具有稳健信号传导而在厚壁血管中具有弱信号传导。利用DAPI (蓝色) 将细胞核染色且红色信号代表TRKA-SHC1蛋白复合物的阳性PLA指示物。血管经指示在部分椭圆(白色虚线)内。(B) 指示厚壁血管(在由白色虚线指示的部分椭圆内) 及侧腹肿瘤细胞核的经苏木精及伊红染色的毗邻肿瘤组织切片。

[0057] 图20为显示ALK+肿瘤样品中TRK及ALK PLA的一组影像。使用证实不存在信号的TRK-SHC1PLA (A) 或显示稳健ALK信号传导的ALK-GRB2PLA (B) 分析来自ALK+患者(尸体剖检样品)的FFPE肿瘤样品。

[0058] 图21为来自具有未分化肉瘤的受试者的一组三个计算机断层摄影影像。CT影像为在手术前化学疗法及原发性肿瘤切除术(利用箭头指示18mm的右肺小结节的存在)之后(A)、在研究当天在即将利用晶型(I-HS) 给药之前的基线成像(B) 及在利用晶型(I-HS) 给药的1个循环(28天)之后(C) 获得的。观察到患者仅在肺中具有转移性疾病,且因此CT扫描影像显示聚焦于胸腔的轴影像(顶部) 及冠状(底部) 影像。这些影像证实初始快速疾病进展(A-B, 13周间隔),随后是显著肿瘤反应,包括尺寸减小和/或众多肺转移的消退(B-C, 4周间隔)。

[0059] 图22为显示经晶型(I-HS) 治疗的具有未分化肉瘤的患者中的血清CA125含量随时间的图。发现此患者中的血清CA125水平有所升高,且随后将其作为潜在活性指示物进行追踪。绘制在给药前的基线(第-8天) 及在第-3天至第56天在开始给药后的指示时间点处的血清CA125,证实此肿瘤标记物的时间依赖性减少。红色虚线指示此实验室测试的正常上限(35U/mL)。

[0060] 图23为显示使用晶型(I-HS) 剂量依赖性抑制具有SLC34A2-ROS1融合蛋白的HCC78细胞的增殖的图。

[0061] 图24为显示AM (HS) 1的温谱图数据的图形。该图形的顶部线为该化合物的热重分析(TGA) 的图,而底部线为差示扫描量热法(DSC) 的图。

[0062] 图25为显示AM (HS) 2的湿谱图数据的图形。该图形的顶部线为该化合物的热重分析(TGA) 的图形,而底部线为差示扫描量热法(DSC) 的图。

[0063] 图26为显示晶型(I-HS) 的温谱图数据的图形。该图形的顶部线为该化合物的热重分析(TGA) 的图形,而底部线为差示扫描量热法(DSC) 的图。

[0064] 图27图解说明AM (HS) 1、AM (HS) 2及晶型(I-HS) 的X射线粉末衍射(XRPD) 图谱的重叠。AM (HS) 1及AM (HS) 2在该图的下部为宽线,而晶型(I-HS) 展现尖锐峰。

[0065] 图28图解说明AM (HS) 1及AM (HS) 2的X射线粉末衍射(XRPD) 图案。

[0066] 图29图解说明晶型(I-HS) 的X射线粉末衍射(XRPD) 图案。

[0067] 图30为AM (HS) 1的样品在20X放大倍数下的偏振光显微术下的影像。

[0068] 图31为AM (HS) 2的样品在20X放大倍数下的偏振光显微术下的影像。

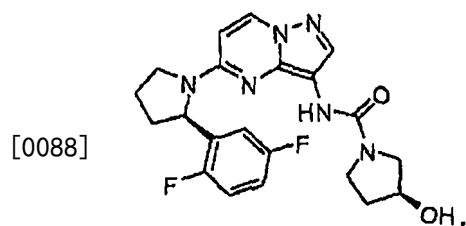
- [0069] 图32为晶型(I-HS)的样品在20X放大倍数下的偏振光显微术下的影像。
- [0070] 图33为使用动态蒸气吸附(DVS)的AM(HS)1的吸湿性的图形。
- [0071] 图34图解说明在DVS前(顶部线)及DVS后(底部线)的AM(HS)1的X射线粉末衍射(XRPD)图案。
- [0072] 图35为使用动态蒸气吸附(DVS)的AM(HS)2的吸湿性的图形。
- [0073] 图36图解说明在DVS前(顶部线)及DVS后(底部线)的AM(HS)2的X射线粉末衍射(XRPD)图案。
- [0074] 图37为使用动态蒸气吸附(DVS)的晶型(I-HS)的吸湿性的图形。
- [0075] 图38图解说明在DVS前(顶部线)及DVS后(底部线)的晶型(I-HS)的X射线粉末衍射(XRPD)图案。
- [0076] 图39为各种200mg的纳入晶型(I-HS)或AM(HS)2的直接压缩共混紧实物的拉伸强度相对于压缩压力的图。在该图中,(1)为具有AM(HS)2的2:1 MCC:乳糖共混物;(2)为具有晶型(I-HS)的2:1 MCC:乳糖共混物;(3)为具有AM(HS)2的1:1 MCC:淀粉共混物;(4)为具有晶型(I-HS)的1:1 MCC:淀粉共混物。
- [0077] 图40为在T0时(底部线)及在40℃/75%RH下5周后(顶部线)的AM(HS)1的DSC温谱图的重叠。
- [0078] 图41为在T0时(底部线)及在40℃/75%RH下5周后(顶部线)的晶型(I-HS)的DSC温谱图的重叠。
- [0079] 图42图解说明在T0时(宽线)及在40℃/75%RH下5周后(尖锐峰)的AM(HS)1的X射线粉末衍射(XRPD)图案的重叠。
- [0080] 图43图解说明在T0时(底部)及在40℃/75%RH下5周后(顶部)的晶型(I-HS)的X射线粉末衍射(XRPD)图案的重叠。
- [0081] 图44图解说明在40℃/75%RH下5周后的晶型(I-HS)(底部)及AM(HS)1(顶部)的X射线粉末衍射(XRPD)图案的重叠。
- [0082] 图45为显示在将异种移植物植入小鼠中之后在用媒介物处理的(三角形)或口服给药日剂量为60mg/kg(圆形)或200mg/kg(正方形)的晶型(I-HS)的小鼠中源于肺腺癌CUT0-3F细胞系(CUT0-3.29)的异种移植物(人类)肿瘤的体积随时间变化的百分比的图。
- [0083] 图46为在将异种移植物植入小鼠中之后在用媒介物处理的(三角形)或口服给药日剂量为60mg/kg(圆形)或200mg/kg(正方形)的晶型(I-HS)的小鼠中源于结肠直肠癌KM12细胞系的异种移植物(人类)肿瘤的体积随时间变化的百分比的图。
- [0084] 图47为在将异种移植物植入小鼠中之后在用媒介物处理的(三角形)或口服给药日剂量为60mg/kg(圆形)或200mg/kg(正方形)的晶型(I-HS)的小鼠中源于急性髓细胞性白血病M0-91细胞系的异种移植物(人类)肿瘤的体积随时间变化的百分比的图形。
- [0085] 各图仅出于图解说明的目的而描绘本发明的各种实施方案。依据以下论述,本领域技术人员将易于认识到,可采用本文中所图解说明的结构及方法的替代实施方案而不背离本文中所阐述的本发明的原理。

发明详述

- [0086] 本发明涉及(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧

啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺(式I)及其药学上可接受的盐,例如硫酸氢盐,且进一步涉及硫酸氢盐的新的晶型,它们显示Trk家族蛋白酪氨酸激酶抑制作用,以及涉及包含该晶型的药物组合物和制备该晶型的方法。

[0087] 本文提供了式I的化合物的新的晶型:



I

[0089] 特别是,所述新的晶型包括式I的化合物的硫酸氢盐的稳定的多晶型物形式,下文称为晶型(I-HS),其特征可在于例如其X-射线衍射图。

[0090] 如图1中所图解说明,在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征可在于其X射线粉末衍射图(XRPD)。XRPD在来自Siemens的具有CuK α 1、0.1540562nm长的细焦点密封管来源的D5000X射线衍射计上通过以0.0200°2- θ 的步长大小及1秒时间/步长在3至40°2- θ 之间扫描样品来实施。有效扫描速度为0.0200°/s,且仪器电压为40kV且电流设定为40mA。在以下实验条件下使用具有2mm大小的发散狭缝以反射模式分析样品。

[0091] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱有至少20个特征峰(2 θ 度 $\pm$ 0.3),如表1所列。

[0092] 表1.晶型(I-HS)的XRPD峰

[0093]

位置[°2- θ]	FWHM [°2- θ]	d-间距 [Å]	相对强度 [%]
10.63	0.12	8.32	27.44
15.25	0.14	5.81	12.24
16.39	0.13	5.40	13.92
18.37	0.13	4.82	43.65
19.08	0.14	4.65	19.60
19.79	0.11	4.48	9.83
20.15	0.25	4.40	25.09
20.61	0.13	4.31	100.00
21.47	0.21	4.14	24.71
22.01	0.12	4.03	14.45
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52
24.35	0.21	3.65	10.05
25.58	0.13	3.48	8.11
26.48	0.17	3.36	9.76
27.50	0.14	3.24	7.70
28.17	0.17	3.16	11.60
28.58	0.19	3.12	10.85
30.77	0.29	2.90	8.48
38.47	0.21	2.34	10.97

[0094] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱有至少8个特征峰(2 θ 度 $\pm$ 0.3),所述峰包括相对强度大于或等于约15%的峰,如表2所列。

[0095] 表2.晶型(I-HS)的XRPD峰

[0096]

位置 [°2- θ]	FWHM [°2- θ]	d-间距 [Å]	相对强度 [%]
10.63	0.12	8.32	27.44
18.37	0.13	4.82	43.65
19.08	0.14	4.65	19.60
20.15	0.25	4.40	25.09
20.61	0.13	4.31	100.00
21.47	0.21	4.14	24.71
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52

[0097] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱有至少5个特征峰(2θ 度 ± 0.3),所述峰包括相对强度大于或等于约25%的峰,如表所列3。

[0098] 表3.晶型(I-HS)的XRPD峰

[0099]

位置 [°2- θ]	FWHM [°2- θ]	d-间距 [Å]	相对强度 [%]
10.63	0.12	8.32	27.44
18.37	0.13	4.82	43.65
20.61	0.13	4.31	100.00
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52

[0100] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱有至少4个特征峰(2θ 度 ± 0.3),所述峰包括相对强度大于或等于约30%的峰,如表4所列。

[0101] 表4.晶型(I-HS)的XRPD峰

[0102]

位置 [°2- θ]	FWHM [°2- θ]	d-间距 [Å]	相对强度 [%]
18.37	0.13	4.82	43.65
20.61	0.13	4.31	100.00
23.04	0.15	3.86	33.01
23.97	0.12	3.71	38.52

[0103] 在某些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱基本上与图1所示的XRPD图谱相同。

[0104] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约18.4、20.6、23.0和24.0的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约10.6、18.4、20.6、23.0和24.0的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约10.6、18.4、19.1、20.2、20.6、21.5、23.0和24.0的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约10.6、15.3、16.4、18.4、19.1、19.8、20.2、20.6、21.5、22.0、23.0、24.0、24.4、25.6、26.5、27.5、28.2、28.6、30.8和38.5的XRPD衍射峰(2θ 度)。

[0105] 在某些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱基本上与图29所示的XRPD图谱相同。

[0106] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱有至少所述20个特征峰(2θ 度 ± 0.3),如表5所列。

[0107] 表5.晶型(I-HS)的XRPD峰

[0108]

位置 (°2 θ)	相对强度 (%)
10.76	29.85
15.38	13.22

16.52	16.46
18.50	48.07
19.22	22.92
19.92	16.05
20.26	30.80
20.74	100.00
21.56	23.78
22.16	15.51
23.16	32.52
24.10	33.89
24.50	12.14
25.72	8.89
26.50	10.88
27.62	8.61
28.32	11.44
28.74	10.73
30.92	8.23
38.60	8.88

[0109] 在一些实施方案中,晶型 (I-HS) 具有的XRPD图谱有至少8个特征峰 (2θ 度 ± 0.3), 所述峰包括相对强度大于或等于约15%的峰,如表6所列。

[0110] 表6.晶型 (I-HS) 的XRPD峰

[0111]	位置 ($^{\circ}2\theta$)	相对强度 (%)
	10.76	29.85
	18.50	48.07
	19.22	22.92
	20.26	30.80
	20.74	100.00
	21.56	23.78
	23.16	32.52
	24.10	33.89

[0112] 在一些实施方案中,晶型 (I-HS) 具有的XRPD图谱有至少5个特征峰 (2θ 度 ± 0.3), 所述峰包括相对强度大于或等于约25%的峰,如表7所列。

[0113] 表7.晶型 (I-HS) 的XRPD峰

[0114]	位置 ($^{\circ}2\theta$)	相对强度 (%)
	10.76	29.85
	18.50	48.07
	20.74	100.00
	23.16	32.52
	24.10	33.89

[0115] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有的XRPD图谱有至少4个特征峰(2θ 度 ± 0.3),所述峰包括相对强度大于或等于约30%的峰,如表8所列。

[0116] 表8.晶型(I-HS)的XRPD峰

位置(2θ)	相对强度(%)
18.50	48.07
20.74	100.00
23.16	32.52
24.10	33.89

[0118] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约18.5、20.7、23.2和24.1的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约10.8,18.5,20.7,23.2和24.1的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约10.8、18.5、19.2、20.3、20.7、21.6、23.2和24.1的XRPD衍射峰(2θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于约10.8、15.4、16.5、18.5、19.2、19.9、20.3、20.7、21.6、22.2、23.2、24.1、24.5、25.7、26.5、27.6、28.3、28.7、30.9和38.6的XRPD衍射峰(2θ 度)。

[0119] 在一些实施方案中,考虑到图1和29提供的XRPD图谱,晶型(I-HS)的特征为具有如表9所示的XRPD峰(2θ 度)。

[0120] 表9.晶型(I-HS)的XRPD峰

图1	图29	差异	平均
10.76	10.63	0.13	10.70
15.38	15.25	0.13	15.32
16.52	16.39	0.13	16.46
18.50	18.37	0.13	18.44
19.22	19.08	0.14	19.15
19.92	19.79	0.13	19.86
20.26	20.15	0.11	20.21
20.74	20.61	0.13	20.68
21.56	21.47	0.09	21.52
22.16	22.01	0.15	22.09
23.16	23.04	0.12	23.10
24.10	23.97	0.13	24.04
24.50	24.35	0.15	24.43
25.72	25.58	0.14	25.65
26.50	26.48	0.02	26.49
27.62	27.50	0.12	27.56
28.32	28.17	0.15	28.25
28.74	28.58	0.16	28.66
30.92	30.77	0.15	30.85
38.60	38.47	0.13	38.54

[0122] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 18.4 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2 θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 10.7 ± 0.2 、 18.4 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2 θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 10.7 ± 0.2 、 18.4 ± 0.2 、 19.2 ± 0.2 、 20.2 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 21.5 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 和 24.0 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2 θ 度)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)的特征在于具有位于 10.7 ± 0.2 、 15.3 ± 0.2 、 16.5 ± 0.2 、 18.4 ± 0.2 、 19.2 ± 0.2 、 19.9 ± 0.2 、 20.2 ± 0.2 、 20.7 ± 0.2 、 21.5 ± 0.2 、 22.1 ± 0.2 、 23.1 ± 0.2 、 24.0 ± 0.2 、 24.4 ± 0.2 、 25.6 ± 0.2 、 26.5 ± 0.2 、 27.6 ± 0.2 、 28.2 ± 0.2 、 28.7 ± 0.2 、 30.8 ± 0.2 和 38.5 ± 0.2 的XRPD衍射峰(2 θ 度)。

[0123] 应理解晶型(I-HS)的X射线粉末衍射图的2 θ 值在仪器之间可略微不同且也取决于样品制备的变化及批次间的变化,且因此所引用的值不应视为绝对值。也应理解峰的相对强度可视定向效应而变化,使得本文所包括的XRPD迹线中所示的强度为说明性的且并非意欲用于绝对比较。因此,应理解短语“基本上与如图1或图29中所示相同的XRPD图谱”意味着出于比较目的存在图1或图29中所示峰的至少90%。应理解相对峰位置可自图1或图29中所示的峰位置变化 ± 0.3 度。应进一步了解,出于比较目的允许峰强度相对于图1和图29中所示有一些变化。

[0124] 图2图解说明根据一个实施方案的晶型(I-HS)的同时热重/差示热分析仪(TG/DTA)曲线。为进行分析,称取约5mg晶型(I-HS)放至在开放铝盘中并将其装载至同时热重/差示热分析仪(TG/DTA)中,并保持在室温下。然后以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率将样品自 25°C 加热至 300°C ,在该时间期间记录样品重量的变化以及任何差示热事件。使用氮气作为吹扫气体,流速为 $100\text{cm}^3/\text{min}$ 。晶型(I-HS)的TG/DAT曲线显示在 27.4°C 至 182.4°C 间的0.8%的初始重量损失,此后在TG曲线中在 182.4°C 至 225.0°C 间的4.9%重量损失,也将其视为DTA曲线中的吸热。这些重量损失可为材料的分解。

[0125] 图3图解说明根据一个实施方案的晶型(I-HS)的差示扫描量热法(DSC)曲线。样品的DSC分析使用Seiko DSC6200差示扫描热量计(配备有冷却器)实施。称取约5mg晶型(I-HS)放至铝DSC盘中且利用有孔铝盖进行非气密性密封。然后,将样品盘装载至Seiko DSC6200(配备有冷却器)中,冷却并在 25°C 下保持。在获得稳定热流反应后,将样品及参考物以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的扫描速率加热至 270°C ,同时监测所得热流反应。在一些实施方案中,晶型(I-HS)具有基本上如图3中所示的DSC温谱图。如本文所使用,“基本上如图3中所示”意味着图3中所示的吸热事件的温度可变化约 $\pm 5^\circ\text{C}$ 。

[0126] 如图3中所示,晶型(I-HS)的DSC温谱图指示基线中在 122.9°C 至 152.8°C 之间的小的吸热变化,随后是急剧吸热,其对应于晶型(I-HS)在 190.8°C 熔融起始温度熔融、 197.9°C 的熔融峰温度及 2.415mW 的熔融热下的熔融的。熔融吸热后的转变可由熔融晶型(I-HS)的分解造成。

[0127] 图4A及图4B图解说明根据一些实施方案的(A)非偏振光及(B)偏振光下晶型(I-HS)的偏振光显微术(PLM)影像。使用配备有Motic相机及影像捕获软件(Motic Images Plus 2.0)的Olympus BX50偏振显微镜确定结晶性(双折射)的存在。所有影像皆使用20x物镜记录。晶型(I-HS)在偏振光下检查时展现双折射而未展现明确形态或积聚物。

[0128] 图5图解说明根据一个实施方案的晶型(I-HS)的动态蒸气吸附(DVS)等温曲线。为

进行DVS测量,通过改变湿度条件使晶型(I-HS)的样品循环以确定其吸湿性。使用表面测量系统DVS-1动态蒸气吸附系统(Surface Measurement System DVS-1 Dynamic Vapor Sorption System)分析样品。将约10mg晶型(I-HS)放置至网型蒸气吸附天平盘中并将其装载至作为Surface Measurement System的部件的动态蒸气吸附天平中。以1分钟间隔收集数据。使用氮作为载气。使经取样晶型(I-HS)以10%增量经受20%至90%相对湿度(RH)的升高曲线,在每一步骤下维持样品直至达成稳定重量(99.5%步骤完成)。在完成吸附循环后,使用相同程序干燥样品,但一直下降至0%RH且最后返回至20%RH的起始点。绘制吸附/解吸附循环期间的重量变化的图形,允许确定样品的吸湿性质。

[0129] 如图5中所示,晶型(I-HS)似乎为非吸湿性的。在吸附循环期间在0%RH与90%RH之间观察到质量方面约1.7%的小的增加。另外,在吸附与解吸附循环之间观察到极小滞后。DVS分析后晶型(I-HS)的XRPD图(未显示)与图1或图29中所示的其DVS前的XRPD图类似,指示在DVS期间晶型(I-HS)未发生变化。

[0130] 图6图解说明根据一个实施方案的式I化合物的晶型(I-HS)的红外(IR)光谱曲线。IR光谱在Bruker ALPHA P光谱仪上实施。将充足的晶型(I-HS)的材料放置至光谱仪板的中心上,且使用 4cm^{-1} 的分辨率、16次扫描的背景扫描时间、16次扫描的样品扫描时间获得透射率光谱,且自 4000cm^{-1} 至 400cm^{-1} 收集数据。所观察到的晶型(I-HS)的IR光谱显示于图6中。

[0131] 晶型(I-HS)具有多种使得其出人意料地优于(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐的非晶型形式(AM(HS))的性质。例如,晶型(I-HS)具有有助于其可制造性及生产为商业产品的性质。如实施例8中所示,晶型(I-HS)具有与非晶型API(AM(HS))相比更好的流动性质,如通过卡尔及豪斯纳指数(Carr's and Hausner Index)所证实。例如,晶型(I-HS)展现大于20%的卡尔指数值。在一些实施方案中,晶型(I-HS)展现小于1.35的豪斯纳比(例如,介于约1.26至约1.34之间的值)。流动性质的差异可使得非晶型API比结晶API更难研发成为固体口服剂型。

[0132] 晶型(I-HS)也在LDPE袋中在 $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$ 下进行5周的加速稳定性研究中证实较好稳定性。同时AM(HS)或晶型(I-HS)在该研究的过程期间皆未展现化学杂质含量的显著变化,该研究确实揭露了晶型(I-HS)具有稳定的物理化学性质。另一方面,非晶型API转化为基本上类似于晶型(I-HS)的晶型(通过XRPD、DSC、TGA、KF及偏振光显微术)。另外,非晶型API在稳定性测试的过程期间变成具有降低的流动性质的积聚粉末。储存时化合物的这些物理性质变化(包括非晶型粉末变为结晶物质和/或具有降低的流动的积聚粉末)可使得其几乎不可能制造出供患者使用的基于非晶型化合物固体口服剂型。然而,针对晶型(I-HS)所观察到的性质与针对商业产品所期望的性质一致,包括具有稳定的物理及化学结构。

[0133] 如先前所阐述,晶型(I-HS)为非吸湿性的。如本文所使用,“非吸湿性”是指化合物在 25°C 及80%RH下在24至48小时后展现小于2%的重量增加(参见,例如,实施例10)。然而,发现AM(HS)化合物在暴露于湿度后会潮解。鉴于此趋势,AM(HS)化合物的使用可能在储存及制造期间需要显著处置防范措施以防止发生此形式变化,而晶型(I-HS)在API的制造期间不需要这些防范措施。也可预期此对湿度的稳定性延伸至使用晶型(I-HS)制备的任一固体口服剂量产品。

[0134] 最后,晶型(I-HS)相对于非晶型API提供显著改良的杂质概况。控制杂质概况的能

力对于患者安全、研发可重复制备方法及在用于人类前满足监管机构的要求至关重要。

[0135] 本文所提供的化合物,包括(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺(式I)及其药学上可接受的盐(例如硫酸氢盐)以及进一步硫酸氢盐的新颖晶型(晶型(I-HS))展现Trk家族蛋白酪氨酸激酶抑制作用,且该化合物、其硫酸氢盐及晶型可用于治疗疼痛、炎症、癌症和某些传染病。

[0136] 一些实施方案包括晶型(I-HS)用于治疗可通过抑制TrkA、TrkB和/或TrkC激酶治疗的病症及疾病(例如TrkA、TrkB和/或TrkC介导的病症,例如本文所述的一或多种病症,包括Trk相关的癌症)的用途。在一些实施方案中,晶型(I-HS)也可用于治疗疼痛(包括慢性及急性疼痛)。在一些实施方案中,晶型(I-HS)可用于治疗多种类型的疼痛,包括炎性疼痛、神经性疼痛、手术疼痛及与癌症、手术及骨折相关的疼痛。另外,晶型(I-HS)可用于治疗炎症、活性及慢性神经变性疾病及某些传染性疾病。本发明进一步涉及包含晶型(I-HS)的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含晶型(I-HS)及药学上可接受的稀释剂或载体。

[0137] 晶型(I-HS)用作TrkA、TrkB和/或TrkC抑制剂的能力可通过如2013年8月20日授权的美国专利第8,513,263号中所揭示的实例A及B中所阐述的测试来证实,该案以引用方式并入本文中作为参考。

[0138] 在一些实施方案中,本文提供了治疗诊断患有Trk-相关的癌症的患者的方法,包括向患者给药治疗有效量的晶型(I-HS)或式I的化合物或其盐,如硫酸氢盐(例如,参见美国专利号8,513,263的实施例14A)。神经营养因子受体的Trk家族TrkA、TrkB及TrkC(分别由NTRK1、NTRK2及NTRK3基因编码)及其神经营养因子配体调控神经元的生长、分化及存活。NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调(例如涉及NTRK激酶结构域的易位、涉及TRK配体-结合位点的突变、NTRK基因的扩增、Trk mRNA剪接变体及Trk自分泌/旁分泌信号传导)阐述于各种各样的肿瘤类型中且可有助于肿瘤形成。最近,在一小组腺癌肺癌患者中阐述了NTRK1融合²。导致组成性活性TrkA、TrkB及TrkC融合蛋白产生的NTRK1、NTRK2及NTRK3的易位在大量肿瘤类型(包括肺腺癌、甲状腺癌、头颈癌、成胶质细胞瘤及其它)中为致癌且普遍的。

[0139] 在一些实施方案中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括野生型TrkA、TrkB或TrkC的过表达(例如,导致自分泌活化)。在一些实施方案中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括染色体片段(包含NTRK1、NTRK2或NTRK3基因或其一部分)的过表达、活化、扩增或突变。在一些实施方案中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括分别造成NTRK1、NTRK2或NTRK3基因融合的一或多个染色体易位或倒位。在一些实施方案中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调为基因易位的结果,其中所表达蛋白为含有来自非TrkA伴侣蛋白及TrkA、非TrkB伴侣蛋白及TrkB或非TrkC伴侣蛋白及TrkC蛋白的残基的融合蛋白,且分别包括最小的功能性TrkA、TrkB或TrkC激酶结构域。

[0140] 在一些实施方案中,TrkA融合蛋白为表10所示的TrkA融合蛋白之一,其中:

[0141] 表10. 示例性TrkA融合蛋白和癌症

[0142]

融合蛋白	非TrkA融合伴侣	非限制性示例性Trk- 和相关癌症的同义词
TP53-TrkA ^{1,11}	肿瘤蛋白P53	Spitzoid黑素瘤, Spitz肿瘤
LMNA-TrkA ^{1,12}	Lamin A/C	Spitzoid黑素瘤, Spitz肿瘤, 未分化肉瘤, 成人软组织肉瘤 (例如, 转移至肺的软组织肉瘤), 软组织纤维肉瘤
CD74-TrkA ²	MHC II类不变链	非小细胞肺癌 (NSCLC) 肺腺癌
TFG-TrkA (TRK-T3) ³	TRK-融合基因	乳头状甲状腺癌 (PTC), 软组织孤立性纤维性肿瘤
TPM3-TrkA ³	原肌球蛋白3	肺癌, 乳头状甲状腺癌 (PTC), 急性髓细胞性白血病 (AML), 肉瘤, 小儿神经胶质瘤, 结肠直肠癌 (CRC), 软组织神经鞘瘤
NFASC-TrkA ⁴	神经束蛋白	多形性成胶质细胞瘤 (GBM); 成胶质细胞瘤
BCAN-TrkA ⁴	Brevican	多形性成胶质细胞瘤 (GBM)
MPRIIP-TrkA ⁵	肌球蛋白磷酸酶 Rho相互作用蛋白或Rho相互作用蛋白3	非小细胞肺癌 (NSCLC), 肺腺癌
TPR-TrkA (TRK-T1或 TRK-T2) ³	易位启动子区, 核篮蛋白	乳头状甲状腺癌 (PTC), 结肠直肠癌 (CRC) ^A , 非小细胞肺癌 (NSCLC)
RFWD2-TrkA ⁶	环指和WD重复结构域2	大细胞神经内分泌癌症 (LCNEC); NSCLC
IRF2BP2-TrkA ⁷	干扰素调节因子2结合蛋白2	甲状腺癌; 甲状腺腺癌
SQSTM1-TrkA ⁷	Sequestosome 1	甲状腺癌 (例如, 乳头状甲状腺癌), 甲状腺腺癌, 软组织纤维肉瘤

[0143]

融合蛋白	非TrkA融合伴侣	非限制性示例性Trk- 和相关癌症的同义词
SSBP2-TrkA ⁷	单链DNA结合蛋白2	甲状腺癌 (例如, 乳头状甲状腺癌); 甲状腺腺癌
RABGAP1L-TrkA ⁸	RAB GTPase活化蛋白1-样	肝内胆管癌 (ICC)
C18ORF8-TrkA ⁹	染色体18开放可读框 8	非小细胞肺癌 (NSCLC)
RNF213-TrkA ⁹	环指蛋白213	非小细胞肺癌 (NSCLC)
TBC1D22A-TrkA ⁹	TBC1域家族, 成员22A	非小细胞肺癌 (NSCLC)
C20ORF112-TrkA ⁹	染色体20开放可读框112	非小细胞肺癌 (NSCLC)
DNER-TrkA ⁹	含δ/Notch-样EGF重复	非小细胞肺癌 (NSCLC)
ARHGEF2-TrkA ¹³	Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子2	成胶质细胞瘤
CHTOP-TrkA ¹³	PRMT1的染色质靶标	成胶质细胞瘤
PPL-TrkA ¹³	旁血小板溶蛋白(Periplakin)	甲状腺癌
PLEKHA6-TrkA	含普列克底物蛋白同源性结构域的家族A成员6	
PEAR1-TrkA	血小板内皮聚集受体1	
MRPL24-TrkA	39S核糖体蛋白L24, 线粒体	
MDM4-TrkA	小鼠双微体4的人同源物	
LRRC71-TrkA	包含富集亮氨酸的重复的71	
GRIPAP1-TrkA	GRIP1相关蛋白1	
EPS15-TrkA	表皮生长因子受体底物15	
DYNC2H1-TrkA ^B	动力蛋白, 细胞质2, 重链1	肉瘤
CEL-TrkA	羧基酯脂肪酶	胰腺腺癌样品 ^D
EPHB2-TrkA ^B	EPH受体B2	低级神经胶质瘤
TGF-TrkA ^C	转化生长因子	乳头状甲状腺癌

[0144] ^ACréancier等人, Cancer Lett. 365(1):107-111, 2015.[0145] ^B美国专利申请公开号2015/0315657.[0146] ^C美国专利申请公开号2015/0283132.[0147] ^DEgren等人, Cancer Res. 75(15 Supplement):4793, 2015.

[0148] 在一些实施方案中, NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括TrkA蛋白中的一或多个缺失、插入或点突变。在一些实施方案中, NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括源自TrkA蛋白的一或多个残基的缺失, 导致TrkA激酶结构域的组成性活性。在一些实施方案中, 缺失包括TrkA同工型2中氨基酸303-377的缺失。

[0149] 在一些实施方案中, NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括导致产生与野生型TrkA蛋白相比具有一或多个氨基酸取代的TrkA蛋白的于NTRK1基因中的至少一个点突变(例如参见列示于表11中的点突变)。

[0150] 表11. 激活TrkA点突变

[0151]

点突变	基本原理
R33W ¹	
A336E	接近NGF结合位点
A337T	接近NGF结合位点
R324Q或R324W	接近NGF结合位点
V420M	接近膜

R444Q或R444W	接近膜
G517R或G517V	P-环
K538A	激活
R649W或R649L	精氨酸可稳定自抑制的构象。
R682S	活化环
V683G	活化环
R702C	暴露,可形成面对面二硫键连接的二聚体
C1879T ²	

[0152] ¹Zhang等人,Blood 124(21):1682,2014.突变在T-细胞前淋巴细胞性白血病中发现。

[0153] ²Park等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.112(40):12492-12497,2015.突变在结肠直肠癌中发现。

[0154] 在一些实施方案中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括TrkA mRNA的剪接变异,该剪接变异导致为TrkA的缺失至少一个残基的另一替代的经剪接的变体的经表达蛋白(与野生型TrkA蛋白相比),导致引起TrkA激酶结构域的组成性活性。在一些实施方案中,具有组成性活性的TrkA的替代性剪接形式具有导致相对于TrkA同工型2缺少残基192-284及393-398的经表达的蛋白的外显子8、9及11的缺失,在TrkA中具有外显子10的缺失,或在编码在跨膜结构域中具有75氨基酸缺失的TrkA蛋白的NTRK1基因中具有缺失(Reuther等人,Mol.Cell Biol.20:8655-8666,2000)。

[0155] 经鉴定具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的癌症(参见本文引用的参考文献以及www.cancer.gov和www.nccn.org网站)包括:

[0156] (A) 如下癌症:其中NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括产生TrkA融合蛋白的一或多个染色体易位或倒位,例如包括:

癌症	护理标准
非小细胞肺癌 ²	放射治疗(例如,放射性碘化物治疗,外照射辐射(external-beam radiation),或镭 223 治疗),单一药物化疗(例如,阿法替尼二马来酸氢盐,贝伐单抗,卡铂,西妥昔单抗,顺铂,克唑替尼,埃罗替尼,吉非替尼,吉西他滨,甲氨蝶呤,紫杉醇,或培美曲塞)或组合(例如,卡铂-紫杉醇,吉西他滨-紫杉醇,或放化疗)
乳头状甲状腺癌 ¹⁴	放疗(例如,放射性碘化物治疗或外照射辐射)和化疗(例如,索拉非尼,舒尼替尼,或帕唑帕尼)
多形性成胶质细胞瘤 ¹⁵	化疗(例如,贝伐单抗,依维莫司,洛莫司汀,或替莫唑胺)
结肠直肠癌 ¹⁶	单一药物化疗(例如,阿柏西普(aflibercept),贝伐单抗,卡培他滨,西妥昔单抗,氟尿嘧啶,伊立替康,亚叶酸钙,奥沙利铂,帕尼单抗,或瑞戈非尼)或组合(例如,Folfox,Folfiri,Capox,Folfiri-贝伐单抗,Folfiri-西妥昔单抗,或Xelox)
黑色素瘤 ¹²	化疗(例如,阿地白介素,达拉菲尼,达卡巴嗪,干扰素 α -2b,易普利单抗,PEG干扰素 α -2b,曲美替尼,或威罗菲尼)

[0158] (B) 如下癌症:其中NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括在

TrkA蛋白中的一或多个缺失、插入或突变,例如包括:

	癌症	护理标准
[0159]	急性髓细胞性白血病 ^{17, 18}	单一药物化疗(例如, 三氧化二砷, 环磷酰胺, 阿糖胞苷, 柔红霉素, 多柔比星, 或长春新碱)或组合(例如, ADE)
	大细胞神经内分泌癌 ¹⁹	放射治疗(例如, 放射性碘化物治疗, 外照射辐射, 或镭 223 治疗)和/或化疗(例如, 顺铂, 卡铂, 或依托泊苷)
	成神经细胞瘤 ²⁰	化疗(例如, 环磷酰胺, 多柔比星, 或长春新碱)

[0160] (C) 如下癌症:其中所述NTRK基因、Trk蛋白、或它们的表达或活性或水平的失调, 包括野生型TrkA的过表达(自分泌活化), 例如, 包括:

	癌症	护理标准
[0161]	前列腺癌 ^{21, 22}	放射治疗(例如, 镭 223 治疗)或化疗(例如阿比特龙, 卡巴他赛, 地加瑞克, 狄诺塞麦, 多西紫杉醇, 恩杂鲁胺, 亮丙瑞林, 泼尼松, 或西普鲁塞-T)
	成神经细胞瘤 ²³	化疗(例如, 环磷酰胺, 多柔比星, 或长春新碱)

	癌症	护理标准
	胰腺癌 ²⁴	单一药物化疗(例如, 埃罗替尼, 氟尿嘧啶, 吉西他滨, 或丝裂霉素 C)或组合(例如, 吉西他滨-奥沙利铂)
[0162]	黑色素瘤 ²⁵	化疗(例如, 阿地白介素, 达拉菲尼, 达卡巴嗪, 干扰素 α -2b, 易普利单抗, PEG 干扰素 α -2b, 曲美替尼, 或威罗菲尼)
	头颈部鳞状上皮细胞癌 ²⁶	放射治疗和/或化疗(例如, 博来霉素, 西妥昔单抗, 顺铂, 多西紫杉醇, 氟尿嘧啶, 或甲氨蝶呤)
	胃癌 ²⁷	化疗(例如, 多西紫杉醇, 多柔比星, 氟尿嘧啶, 丝裂霉素 C, 或曲妥单抗)

[0163] 在一些实施方案中, NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括造成TrkB融合蛋白(例如表12中所示的TrkB融合蛋白中之一)的表达的易位。

[0164] 表12. 示例性TrkB融合蛋白和癌症

	融合蛋白	非TrkB融合伴侣	非限制性示例性Trk-和相关癌症的同义词
	NACC2-TrkB ¹⁰	NACC家族成员2, 含BEN 和 BTB (POZ)结构域	毛细管性星形细胞瘤
	QKI-TrkB ¹⁰	QKI, 包含KH域, RNA结合	毛细管性星形细胞瘤
	AFAP1-TrkB ⁷	肌动蛋白丝相关蛋白1	低级神经胶质瘤
[0165]	PAN3-TrkB ⁷	PAN3聚(A)特异性核糖核酸酶亚单元	头颈部鳞状上皮细胞癌
	SQSTM1-TrkB ⁷	Sequestosome 1	低级神经胶质瘤
	TRIM24-TrkB ⁷	含三联基序的24	肺腺癌
	VCL-TrkB ¹¹	粘着斑蛋白	小儿神经胶质瘤
	AGBL4-TrkB ¹¹	ATP/GTP结合蛋白-样4	小儿神经胶质瘤
	DAB2IP-TrkB	失效同源物2-相互作用蛋白	

[0166] 在一些实施方案中, NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括造成TrkC融合蛋白(例如表13中所示的TrkC融合蛋白中之一)的表达的易位。

[0167] 表13. 示例性TrkC融合蛋白和癌症

[0168]	融合蛋白	非TrkB融合伴侣	非限制性示例性Trk- 和相关癌症的同义词
	ETV6-TrkC ¹¹	ETS变体6	唾液腺癌, 分泌型乳腺癌, 急性髓细胞性白血病, 纤维肉瘤, 肾瘤,
	融合蛋白	非TrkB融合伴侣	非限制性示例性Trk- 和相关癌症的同义词
			黑素瘤, 结肠直肠癌 (CRC), 乳腺癌, 小儿神经胶质瘤, 甲状腺癌 (例如, 乳头状甲状腺癌), 婴儿纤维肉瘤, 软组织血管瘤, 胃肠道间质瘤 (GIST) (例如, c-kit-阴性GIST), 乳房癌 (例如, 乳房类似分泌性癌)
	BTBD1-TrkC ¹¹	包含BTB (POZ)结构域的1	小儿神经胶质瘤
[0169]	LYN-TrkC ⁷	V-Yes-1山口肉瘤病毒相关的致瘤基因同系物 (也称为Lck/Yes-相关的新的蛋白酪氨酸激酶)	头颈部鳞状上皮细胞癌
	RBPMS-TrkC ⁷	具有多个剪接的RNA结合蛋白	甲状腺癌 (例如, 乳头状甲状腺癌)
	EML4-TrkC ^B	棘皮动物微管-相关的蛋白质-样4	纤维肉瘤
	HOMER2-TrkC	Homer蛋白同系物 2	软组织肉瘤
	TFG-TrkC	TRK-融合基因	软组织孤立性纤维肿瘤
	FAT1-TrkC		子宫颈鳞状上皮细胞癌 ^C
	TEL-TrkC		先天性纤维肉瘤, 急性髓细胞性白血病

[0170] ^BTannenbaum等人, Cold Spring Harb. Mol. Case Stud. 1: a000471, 2015.[0171] ^C美国专利申请公开号2015/0315657.

[0172] 在一些实施方案中, 本文提供了治疗被诊断患有Trk-相关的癌症的患者的方法, 包括向患者给药治疗有效量的晶型 (I-HS) 或式I的化合物或其盐, 如硫酸氢盐 (例如, 参见美国专利号8,513,263的实施例14A)。例如, Trk-相关的癌症可选自: 非小细胞肺癌、乳头状甲状腺癌、多形性成胶质细胞瘤、急性髓细胞性白血病、结肠直肠癌、大细胞神经内分泌癌、前列腺癌、成神经细胞瘤、胰腺癌、黑素瘤、头颈部鳞状上皮细胞癌、胃癌、Spitz癌、乳头状甲状腺癌、结肠癌、急性髓细胞性白血病、肉瘤、小儿神经胶质瘤、肝内胆管癌、毛细胞性星形细胞瘤、低级神经胶质瘤、肺腺癌、唾液腺癌、分泌型乳腺癌、纤维肉瘤、肾瘤和乳腺癌。

[0173] 在一些实施方案中, Trk-相关的癌症选自: TRK-相关的癌症的非限制性实例包括: Spitzoid黑素瘤、Spitz肿瘤 (例如, 转移性Spitz肿瘤)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、甲状腺癌 (例如, 乳头状甲状腺癌 (PTC))、急性髓细胞性白血病 (AML)、肉瘤 (例如, 未分化肉瘤或成人软组织肉瘤)、小儿神经胶质瘤、结肠直肠癌 (CRC)、多形性成胶质细胞瘤 (GBM)、大细胞神经内分泌癌症 (LCNEC)、甲状腺癌、肝内胆管癌 (ICC)、毛细胞性星形细胞瘤、低级神经胶质瘤、头颈部鳞状上皮细胞癌、腺癌 (例如, 肺腺癌)、唾液腺癌、分泌型乳腺癌、乳腺癌、急性髓细胞性白血病、纤维肉瘤、肾瘤、黑素瘤、支气管癌、B-细胞癌症、Bronchus癌症、口腔或咽部癌症、血液组织癌、子宫颈癌、胃癌、肾癌、肝癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、唾液腺癌、小

肠或阑尾癌症、睾丸癌、泌尿膀胱癌、子宫或子宫内膜癌症、炎性肌纤维母细胞瘤、胃肠道间质瘤、非霍奇金淋巴瘤、成神经细胞瘤、小细胞肺癌、鳞状上皮细胞癌、食管-胃癌、皮肤癌、赘瘤(例如,黑色素细胞赘瘤)、Spitz痣、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤、大细胞神经内分泌肿瘤、骨癌和直肠癌。

[0174] 在一些实施方案中,本文所提供的化合物可用于治疗小儿患者的Trk相关的癌症。例如,本文所提供的化合物可用于治疗婴儿型肉瘤、成神经细胞瘤、先天性中胚层肾瘤、脑低分级神经胶质瘤及脑桥神经胶质瘤。

[0175] 在一些实施方案中,本文所提供的化合物可与一或多种通过相同或不同的作用机制起作用的其它治疗剂或疗法组合用于治疗Trk相关的癌症。

[0176] 在一些实施方案中,所述其它治疗剂选自:靶向受体酪氨酸激酶的治疗剂,包括卡博替尼、克唑替尼、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼、帕妥珠单抗、瑞戈非尼、舒尼替尼和曲妥单抗。

[0177] 在一些实施方案中,所述其它治疗剂选自信号转导途径抑制剂,包括,例如,Ras-Raf-MEK-ERK途径抑制剂(例如,索拉非尼,曲美替尼,或威罗菲尼),PI3K-Akt-mTOR-S6K途径抑制剂(例如,依维莫司,雷帕霉素,哌立福辛,或西罗莫司)和凋亡途径的调节剂(例如,奥巴克拉(obataclax))。

[0178] 在一些实施方案中,所述其它治疗剂选自:细胞毒素化疗剂,包括,例如,三氧化二砷、博来霉素、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、柔红霉素、多西紫杉醇、多柔比星、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、伊立替康、洛莫司汀、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替莫唑胺和长春新碱。

[0179] 在一些实施方案中,所述其它治疗剂选自血管发生-靶向的治疗,包括例如,阿柏西普和贝伐单抗。

[0180] 在一些实施方案中,所述其它治疗剂选自免疫靶向的试剂,例如,包括阿地白介素、易普利单抗、拉姆单抗(lambrolizumab)、纳武单抗和西普鲁塞-T。

[0181] 在一些实施方案中,其它治疗剂选自有效抵抗下游Trk路径的药剂,包括(例如)靶向NGF的生物药物,例如NGF抗体及panTrk抑制剂。

[0182] 在一些实施方案中,其它治疗剂或疗法为放射疗法,包括(例如)放射性碘化物疗法、外照射辐射及镭223疗法。

[0183] 在一些实施方案中,其它治疗剂包括上文所列示疗法或治疗剂中的任一者,这些疗法或治疗剂为其中癌症具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的癌症的护理标准。

[0184] 检测NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的方法包括(例如)使用(例如)荧光原位杂交(FISH)检测NTRK基因易位(例如,如国际申请案第PCT/US2013/061211号、第PCT/US2013/057495号中所阐述,这些案件为以引用方式并入本文中)。

[0185] 在一些实施方案中,本文提供了治疗患者癌症(例如,Trk-相关的癌症)的方法,包括向所述患者给药晶型(I-HS)或式I的化合物或其盐,如硫酸氢盐(例如,参见美国专利号8,513,263的实施例14A)与至少一种其它治疗或治疗剂的组合。在一些实施方案中,该至少一种其它治疗或治疗剂选自放射治疗(例如,放射性碘化物治疗、外照射辐射、或镭223治疗)、细胞毒素化疗剂(例如,三氧化二砷、博来霉素、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、顺铂、环磷

酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、柔红霉素、多西紫杉醇、多柔比星、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、伊立替康、洛莫司汀、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替莫唑胺、或长春新碱)、酪氨酸激酶靶向的治疗(例如,阿法替尼、卡博替尼、西妥昔单抗、克唑替尼、达拉菲尼、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼、帕尼单抗、帕妥珠单抗、瑞戈非尼、舒尼替尼、或曲妥单抗)、凋亡调节剂和信号转导抑制剂(例如依维莫司、哌立福辛、雷帕霉素、索拉非尼、西罗莫司、曲美替尼、或威罗菲尼)、免疫-靶向的治疗(例如,阿地白介素、干扰素 α -2b、易普利单抗、拉姆单抗、纳武单抗、泼尼松、或西普鲁塞-T)和血管发生-靶向的治疗(例如,阿柏西普或贝伐单抗),其中当与其它治疗或治疗剂组合时,本文提供的化合物或其药学上可接受的盐的量可有效治疗所述癌症。

[0186] 在一些实施方案中,所述其它治疗剂为不同的Trk抑制剂。其它Trk抑制剂的非限制性实例包括(R)-2-苯基吡咯烷取代的咪唑并吡嗪、AZD6918、GNF-4256、GTx-186、GNF-5837、AZ623、AG-879、altiratinib、CT327、AR-772、AR-523、AR-786、AR-256、AR-618、AZ-23、AZD7451、卡博替尼、CEP-701、CEP-751、PHA-739358、多韦替尼、entrectinib、PLX7486、Gö6976、GW441756、MGCD516、ONO-5390556、PHA-848125AC、瑞戈非尼、索拉非尼、舒尼替尼、TSR-011、VM-902A、K252a、4-氨基吡唑基嘧啶和取代的吡唑并[1,5-a]嘧啶化合物。

[0187] 在一些实施方案中,所述其它治疗剂包括:受体酪氨酸激酶-靶向的治疗剂,如阿法替尼、卡博替尼、西妥昔单抗、克唑替尼、达拉菲尼、埃罗替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、来他替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼、帕尼单抗、帕妥珠单抗、舒尼替尼、曲妥单抗、AG 879、AZ-23、AZ623、Gö6976、GNF-5837、GTx-186、GW 441756、MGCD516、RPI-1、RXDX101和TSR-011;RET-靶向的治疗剂,如阿雷替尼、阿帕替尼、卡博替尼、多韦替尼、乐伐替尼、莫特沙尼、尼达尼布、帕纳替尼、瑞戈非尼、舒尼替尼、索拉非尼、瓦他拉尼、凡德他尼、AUY-922、BLU6864、DCC-2157、MGCD516、NVP-AST487、PZ-1、RXDX105、SPP86、TG101209和XL-184;信号转导途径抑制剂,如Ras-Raf-MEK-ERK途径抑制剂(例如,比尼替尼(binimetinib)、司美替尼、恩可非尼(encorafenib)、索拉非尼、曲美替尼和威罗菲尼)、PI3K-Akt-mTOR-S6K途径抑制剂(例如依维莫司、雷帕霉素、哌立福辛、西罗莫司)、其它激酶抑制剂,如巴瑞克替尼、brigatinib、capmatinib、达鲁舍替、依鲁替尼、milciclib、槲皮素、瑞戈非尼、卢索替尼、司马沙尼、AP32788、BLU285、BLU554、INCB39110、INCB40093、INCB50465、INCB52793、INCB54828、MGCD265、NMS-088、NMS-1286937、PF 477736、PLX3397、PLX7486、PLX8394、PLX9486、PRN1008、PRN1371、RXDX103、RXDX106、RXDX108、和TG101209;检查点抑制剂,如易普利单抗、替西木单抗、纳武单抗、pidilizumab、MPDL3208A、MEDI4736、MSB0010718C、BMS-936559、BMS-956559、BMS-935559(MDX-1105)、AMP-224、和派姆单抗;凋亡途径调节剂(例如奥巴克拉(obataclax));细胞毒素化疗剂,如三氧化二砷、博来霉素、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、柔红霉素、多西紫杉醇、多柔比星、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、伊立替康、洛莫司汀、甲氨蝶呤、丝裂霉素C、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替莫唑胺、和长春新碱;血管发生-靶向的治疗,如阿柏西普和贝伐单抗;免疫靶向的试剂,如阿地白介素、干扰素 α -2b、易普利单抗、拉姆单抗、纳武单抗、泼尼松、西普鲁塞-T;放射治疗,如放射性碘化物治疗、外照射辐射和镭223治疗。

[0188] 其它其它治疗剂包括RET抑制剂如描述于例如,美国专利号8,299,057;8,399,442;8,937,071;9,006,256;和9,035,063;U.S.公开号2014/0121239;2011/0053934;2011/

0301157;2010/0324065;2009/0227556;2009/0130229;2009/0099167;2005/0209195;国际公开号WO 2014/184069;WO 2014/072220;WO 2012/053606;WO 2009/017838;WO 2008/031551;WO 2007/136103;WO 2007/087245;WO 2007/057399;WO 2005/051366;和WO 2005/044835;和J. Med. Chem. 2012, 55(10), 4872-4876中的那些。

[0189] 这些其它治疗剂可与本文所提供的一或多种化合物一起作为相同或单独剂型的一部分经由相同或不同的给药途径且基于相同或不同的给药时间表根据本领域技术人员已知的标准药物实践来给药。

[0190] 本文也提供 (i) 用于治疗有需要的患者的癌症 (例如, Trk 相关的癌症) 的药物组合, 其包含 (a) 晶型 (I-HS) 或式 I 化合物或其盐 (例如硫酸氢盐) (例如, 参见美国专利第 8, 513, 263 号的实施例 14A)、(b) 另一治疗剂及 (c) 任选至少一种药学上可接受的载体, 用于同时、单独或依序治疗肿瘤疾病, 其中化合物或其盐及其它治疗剂的量一起可有效治疗该癌症; (ii) 包含此组合的药物组合物; (iii) 此组合用于制备用以治疗癌症 (例如, Trk 相关的癌症) 的药物的用途; 及 (iv) 包含此组合作为同时、单独或依序使用的组合制剂的商业包装或产品; 及治疗有需要的患者的癌症 (例如, Trk 相关的癌症) 的方法。

[0191] 还提供治疗鉴定或诊断为患有 Trk- 相关的癌症的受试者 (例如, 通过在受试者或受试者的活检样品中使用监管机构批准的, 例如, FDA 批准的用于鉴定 NTRK 基因、Trk 蛋白、或它们的表达或活性或水平的失调的试剂盒, 而被鉴定或诊断为患有 Trk- 相关的癌症的受试者) (例如, 本文所述或本领域已知的 Trk- 相关的癌症的任一种) 的方法, 其包括向受试者给药治疗有效量的晶型 (I-HS) 或式 I 的化合物或其盐, 如硫酸氢盐 (例如, 参见美国专利号 8, 513, 263 的实施例 14A)。还提供晶型 (I-HS) 或式 I 的化合物或其盐如硫酸氢盐, 其用于在鉴定或诊断为患有 Trk- 相关的癌症的受试者中治疗 Trk- 相关的癌症 (例如, 参见美国专利号 8, 513, 263 的实施例 14A) (例如, 通过在受试者或受试者的活检样品中使用监管机构批准的, 例如, FDA 批准的, 用于鉴定 NTRK 基因、Trk 蛋白、或它们的表达或活性或水平的失调的试剂盒, 鉴定或诊断为患有 Trk- 相关的癌症的受试者) (例如, 本文所述或本领域已知的 Trk- 相关的癌症的任一种)。还提供晶型 (I-HS) 或式 I 的化合物或其盐如硫酸氢盐 (例如, 参见美国专利号 8, 513, 263 的实施例 14A) 在制备用于在鉴定或诊断为患有 Trk- 相关的癌症的受试者中治疗 Trk- 相关的癌症的药物中的用途 (例如, 通过在受试者或受试者的活检样品中使用监管机构批准的, 例如, FDA 批准的用于鉴定 NTRK 基因、Trk 蛋白、或它们的表达或活性或水平的失调的试剂盒, 鉴定或诊断为患有 Trk- 相关的癌症的受试者) (例如, 本文所述或本领域已知的 Trk- 相关的癌症的任一种)。

[0192] 本文也提供治疗受试者 (例如, 怀疑具有 Trk 相关的癌症的受试者、呈现具有 Trk 相关的癌症的一或多个症状的受试者, 或发展为 Trk 相关的癌症的风险有所升高的受试者) 的方法, 其包括对自受试者获得的样品实施分析 (例如, 利用下一代定序、免疫组织化学或分离 FISH 分析的分析) (例如, 使用监管机构批准 (例如, FDA 批准) 的试剂盒) 以确定该受试者是否具有 NTRK 基因、Trk 蛋白或它们的表达或活性或水平的失调, 及向经确定具有 NTRK 基因、Trk 蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的受试者给药 (例如, 特定地或选择性给药) 治疗有效量的晶型 (I-HS) 或式 I 化合物或其盐 (例如硫酸氢盐) (例如, 参见美国专利第 8, 513, 263 号的实施例 14A)。本文阐述可用于这些方法中的其它分析、非限制性分析。本领域也已知其它分析。本文也提供晶型 (I-HS) 或式 I 化合物或其盐 (例如硫酸氢盐) (例如, 参见

美国专利第8,513,263号的实施例14A)的用途,其用于治疗经鉴定或诊断具有Trk相关的癌症的受试者的Trk相关的癌症,其为通过对自受试者获得的样品实施分析(例如,体外分析)(例如,利用下一代定序、免疫组织化学或分离FISH分析的分析)(例如,使用监管机构批准(例如,FDA批准)的试剂盒)以确定该受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的步骤达成,其中NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的存在鉴定该受试者具有Trk相关的癌症。本文也提供晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)的用途,其用于制造用以治疗经鉴定或诊断具有Trk相关的癌症的受试者的Trk相关的癌症的药物,其通过对自受试者获得的样品实施分析(例如,体外分析)(例如,利用下一代定序、免疫组织化学或分离FISH分析的分析)(例如,使用监管机构批准(例如,FDA批准)的试剂盒)以确定该受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的步骤来达成,其中NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的存在鉴定该受试者具有Trk相关的癌症。本文所阐述的方法或用途中任一者的一些实施方案进一步包括在受试者的临床记录(例如,计算机可读介质)中记录以下情况:通过实施分析经确定具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的受试者应给药晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)。

[0193] 在本文所阐述的任一方法或用途的一些实施方案中,该受试者已经鉴定或诊断患有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的癌症(例如,如使用监管机构批准(例如,FDA批准)的分析或试剂盒确定)。在本文所阐述的任一方法或用途的一些实施方案中,受试者具有对于NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调为阳性的肿瘤(例如,如使用监管机构批准的分析或试剂盒确定)。在本文所阐述的任一方法或用途的一些实施方案中,受试者可为具有对于NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调为阳性的肿瘤的受试者(例如,使用监管机构批准(例如,FDA批准)的分析或试剂盒经鉴定为阳性)。在本文所阐述的任一方法或用途的一些实施方案中,受试者可为其肿瘤具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平失调的受试者(例如,其中肿瘤同样使用监管机构批准(例如,FDA批准)的试剂盒或分析来鉴定)。在本文所阐述的任一方法或用途的一些实施方案中,怀疑受试者患有Trk相关的癌症。在本文所阐述的任一方法或用途的一些实施方案中,受试者的临床记录指示该受试者患有的肿瘤具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调(且任选该临床记录指示该受试者应利用本文所提供的任一组合物进行治疗)。

[0194] 本文也提供治疗受试者的方法,其包括向临床记录指示该受试者具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平失调的受试者给药治疗有效量的晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)。本文也提供晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)的用途,其用于制造受试者的Trk相关的癌症的药物,所述受试者的临床记录指示该受试者具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调。本文也提供晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)的用途,其用于制造用以治疗临床记录指示该受试者具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的受试者的Trk相关的癌症的药物。这些方法及用途的一些实施

方案可进一步包括：对自受试者获得的样品实施分析的步骤（例如，体外分析）（例如，利用下一代定序、免疫组织化学或分离FISH分析的分析）（例如，使用监管机构批准（例如，FDA批准）的试剂盒）以确定该受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调，及在受试者的临床档案（例如，计算机可读介质）中记录该受试者已经鉴定具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的信息。

[0195] 本文也提供针对受试者选择治疗的方法（例如，体外方法），其包括针对经鉴定或诊断具有Trk相关的癌症（例如，本文所阐述或本领域已知的Trk相关的癌症中的任一者）的受试者（例如，已通过使用监管机构批准（例如，FDA批准）的用于鉴定受试者或来自受试者的活检样品中NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的试剂盒鉴定或诊断具有Trk相关的癌症的受试者）选择包括给药治疗有效量的晶型（I-HS）或式I化合物或其盐（例如硫酸氢盐）（例如，参见美国专利第8,513,263号的实施例14A）的治疗。一些实施方案可进一步包括向经鉴定或诊断具有Trk相关的癌症的受试者给药经选择的治疗。一些实施方案可进一步包括对自受试者获得的样品实施分析（例如，体外分析）（例如，利用下一代定序、免疫组织化学或分离FISH分析的分析）（例如，使用监管机构批准（例如，FDA批准）的试剂盒）以确定该受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的步骤，及鉴定或诊断经确定具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的受试者具有Trk相关的癌症。

[0196] 本文也提供针对受试者选择治疗的方法，其包括给药治疗有效量的晶型（I-HS）或式I化合物或其盐（例如硫酸氢盐）（例如，参见美国专利第8,513,263号的实施例14A），该其中这些方法包括对自受试者获得的样品实施分析（例如，体外分析）（例如，利用下一代定序、免疫组织化学或分离FISH分析的分析）（例如，使用监管机构批准（例如，FDA批准）的试剂盒）以确定该受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的步骤，及鉴定或诊断经确定具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的受试者具有Trk相关的癌症，及针对经鉴定或诊断具有Trk相关的癌症的受试者选择包括给药治疗有效量的晶型（I-HS）或式I化合物或其盐（例如硫酸氢盐）（例如，参见美国专利第8,513,263号的实施例14A）的治疗性治疗。一些实施方案进一步包括向经鉴定或诊断具有Trk相关的癌症的受试者给药经选择的治疗。

[0197] 本文也提供选择受试者以进行包括给药治疗有效量的晶型（I-HS）或式I化合物或其盐（例如硫酸氢盐）（例如，参见美国专利第8,513,263号的实施例14A）的治疗的方法，该方法包括选择、鉴定或诊断具有Trk相关的癌症的受试者，及选择受试者以进行包括给药治疗有效量的晶型（I-HS）或式I化合物或其盐（例如硫酸氢盐）（例如，参见美国专利第8,513,263号的实施例14A）的治疗。在一些实施方案中，鉴定或诊断受试者具有Trk相关的癌症可包括对自受试者获得的样品实施分析（例如，体外分析）（例如，利用下一代定序、免疫组织化学或分离FISH分析的分析）（例如，使用监管机构批准（例如，FDA批准）的试剂盒）以确定该受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的步骤，及鉴定或诊断经确定具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的受试者具有Trk相关的癌症。在一些实施方案中，选择治疗可用作包括给药A1k相关性癌症的各种治疗的临床研究的一部分。

[0198] 在本文所阐述的任一方法或用途的一些实施方案中，所使用的利用来自受试者

(例如,怀疑具有Trk相关的癌症的受试者、具有Trk相关的癌症的一或多个症状的受试者和/或发展Trk相关的癌症的风险有所增加的受试者)的样品(例如,生物样品或活检样品(例如,石蜡包埋的活检样品)确定受试者是否具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的分析可包括(例如)下一代定序、免疫组织化学、荧光显微镜术、分离FISH分析、Southern印迹、Western印迹、FACS分析、Northern印迹及基于PCR的扩增(例如,RT-PCR)。如本领域熟知,这些分析通常利用(例如)至少一种经标记核酸探针或至少一种经标记抗体或其抗原结合片段来实施。分析可利用本领域已知用于检测NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的其它检测方法(例如参见本文中所引用的参考文献)。

[0199] 在一些实施方案中,晶型(I-HS)或式I的化合物或其盐,如硫酸氢盐(例如,参见美国专利号8,513,263的实施例14A)用于治疗慢性和急性疼痛、包括与癌症、手术和骨折相关的疼痛。晶型(I-HS)或式I的化合物或其盐,如硫酸氢盐(例如,参见美国专利号8,513,263的实施例14A)可用于治疗多种类型的疼痛,包括炎性疼痛、神经性疼痛,和与癌症、手术和骨折相关的疼痛。晶型(I-HS)或式I的化合物或其盐,如硫酸氢盐(例如,参见美国专利号8,513,263的实施例14A)也可用于治疗癌症,包括成神经细胞瘤、卵巢、胰腺和结肠直肠癌。晶型(I-HS)或式I的化合物或其盐,如硫酸氢盐(例如,参见美国专利号8,513,263的实施例14A)也可用于治疗炎症和某些传染病。此外,晶型(I-HS)或式I的化合物或其盐,如硫酸氢盐(例如,参见美国专利号8,513,263的实施例14A)也可用于治疗间质性膀胱炎(IC)、疼痛膀胱综合征(PBS)、尿失禁、哮喘、厌食症、特应性皮炎和银屑病。晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)也可用于通过经由阻断Sp35-TrkA相互作用而促进髓鞘形成、神经元存活及少突细胞分化来治疗脱髓鞘及髓鞘形成障碍。晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)可用于治疗多种类型的疼痛,包括炎性疼痛、神经性疼痛、手术疼痛及与癌症相关的疼痛。晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)可用于治疗骨相关性疾病(例如那些涉及骨再吸收的疾病)。骨相关性疾病的实例包括转移性骨病、治疗诱导的骨损失、骨质疏松症、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、佩吉特氏病(Paget's disease)及牙周病。骨质疏松症可归因于(1)女性的停经、(2)男性或女性的老化、(3)儿童及青春期期间造成无法达到峰值骨质量的次最佳骨生长和/或(4)继发于其它疾病病症、饮食障碍、药物和/或医学治疗的骨损失。可根据本文提供的方法治疗的其它溶骨性疾病更有局限性。具体实例为转移性肿瘤诱导的骨质溶解。在此病症中,骨癌或骨转移诱导局部骨质溶解,从而造成疼痛,骨脆弱及骨折。该局部骨质溶解也因在骨中产生于这些肿瘤而言更多的空间及自骨基质释放生长因子而允许肿瘤生长增大。目前已知造成肿瘤诱导的骨质溶解的癌症包括血液恶性肿瘤(例如,骨髓瘤及淋巴瘤)及实体肿瘤(例如,乳房、前列腺、肺、肾及甲状腺),本发明涵盖所有这些肿瘤的治疗。如本文所使用,术语“治疗”包括现有病症的预防以及治疗。

[0200] 因此,本文也提供治疗有需要的受试者的疾病或医学病症的方法,其中该疾病或病症可利用TrkA和/或TrkB的抑制剂来治疗(例如,Trk相关的癌症),其包括向该受试者给药有效治疗或预防该病症的量的晶型(I-HS)或式I化合物或其盐(例如硫酸氢盐)(例如,参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)。在一个具体实施方案中,本文提供治疗哺乳动物的疼痛、癌症、发炎、神经变性疾病或克氏锥虫感染的方法,其包括向该哺乳动物给药治疗

有效量的晶型 (I-HS) 或式I化合物或其盐 (例如硫酸氢盐) (例如, 参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)。在另一实施方案中, 本文提供治疗哺乳动物的溶骨性疾病的方法, 其包括向该有需要的受试者给药治疗有效量的晶型 (I-HS) 或式I化合物或其盐 (例如硫酸氢盐) (例如, 参见美国专利第8,513,263号的实施例14A)。

[0201] 晶型 (I-HS) 或式I化合物或其盐 (例如硫酸氢盐) (例如, 参见美国专利第8,513,263号的实施例14A) 可与一或多种通过相同或不同的作用机制起作用的其它药物组合使用。此联合治疗可通过同时、依序或分开给药治疗的各个组分来达成。实例包括抗炎化合物, 类固醇 (例如, 地塞米松、可的松和氟替卡松), 镇痛剂如NSAID (例如, 阿司匹林、布洛芬、吲哚美辛和酮洛芬), 和阿片样物质 (如吗啡) 和化疗剂。

[0202] 在医学肿瘤学的领域中, 通常实践是使用不同形式治疗的组合来治疗每一患有癌症的患者。在医学肿瘤学中, 该联合治疗除本文所提供组合物以外的其它组分可为 (例如) 手术、放射疗法、化学疗法、信号转导抑制剂和/或单克隆抗体。

[0203] 因此, 晶型 (I-HS) 可与一种或多种选自以下的试剂组合给药: 有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢产物、反义DNA或RNA、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、信号转导抑制剂、细胞周期抑制剂、酶抑制剂、类维生素A受体调节剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、生物响应修饰剂、抗激素剂、血管发生抑制剂、细胞生长抑制剂、抗雄激素剂、靶向抗体、HMG-CoA还原酶抑制剂、和异戊二烯基-蛋白质转移酶抑制剂。

[0204] 当本文所揭示的化合物具有至少一个手性中心时, 则因此这些化合物可作为对映异构体存在。倘若化合物具有两个手性中心, 则这些化合物可另外作为非对映异构体存在。也即, 式I化合物除具有通过命名法命名的期望构型“(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐”(在下文中称作(S,R)异构体)以外, 其也可以极少量作为异构体(R)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐(在下文中称作(R,R)异构体)存在和/或也可以极少量作为(S)-N-(5-((S)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐(在下文中称作(S,S)异构体)存在, 和/或可以极少量作为异构体(R)-N-(5-((S)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐(在下文中称作(R,S)异构体)存在。应理解所有这些异构体及其混合物皆涵盖在本发明的范围内。优选地, 其中该化合物为作为(S,R)异构体存在, (S,R)异构体为以大于或等于约80%的过量存在、更优选以大于或等于约90%的过量存在、再更优选以大于或等于约95%的过量存在、再更优选以大于或等于约98%的过量存在、更优选以大于或等于约99%的过量存在。

[0205] 应理解晶型 (I-HS) 含有两个不对称中心且因此可以异构体的混合物 (例如外消旋或非对映异构体混合物) 或以对映异构体纯的形式来制备及分离。倘若立体化学为通过代表具体构型的实心楔形线或虚线指定, 则该立体异构体为如此指定及定义的。

[0206] 如本文所使用, 除非另有阐述, 否则术语“经分离形式”应意指以自具有另一化合物的任一固体混合物、溶剂体系或生物环境分离的形式存在的化合物。在一些实施方案中, 晶型 (I-HS) 为以经分离形式存在。

[0207] 如本文所使用, 除非另有阐述, 否则术语“基本上纯的形式”应意味着经分离化合物或晶型中杂质的摩尔百分比小于约5摩尔%, 优选地小于约2摩尔%, 更优选小于约0.5摩

尔%，最优选地小于约0.1摩尔%。在一些实施方案中，晶型(I-HS)为以基本上纯的形式存在。

[0208] 如本文所使用，除非另有阐述，否则术语“基本上不含其它非晶型、多晶型或晶型”在用于阐述晶型(I-HS)时应意味着晶型(I-HS)的经分离碱的其它非晶型、多晶型或晶型的摩尔百分比小于约5摩尔%，优选地小于约2摩尔%，更优选小于约0.5摩尔%，最优选小于约0.1摩尔%。在一些实施方案中，晶型(I-HS)为以基本上不含其它非晶型、多晶型或晶型的形式存在。

[0209] 术语“多晶型物(polymorph)及多晶型形式(polymorphic form)”为指单一化合物的不同晶型。也即，多晶型物为具有相同分子式的不同固体，但每一多晶型物可具有不同的固态物理性质。因此，单一化合物可产生多种多晶型形式，其中每一形式具有不同及独特的固态物理性质，例如不同的溶解度性质、溶解速率、熔点温度、流动性和/或不同的X射线衍射峰。物理性质的差异可影响药物参数，例如储存稳定性、可压缩性及密度(在配制及产物制造中可为重要的)及溶解速率(其可为生物利用度中的重要因素)。表征多晶型的技术包括，但不限于，X射线粉末衍射(XRPD)、差示扫描量热法(DSC)、热重分析(TGA)、单一晶体X射线衍射(XRD)、振动光谱(例如，红外(IR)光谱及拉曼光谱、固态及溶液核磁共振(NMR)光谱)、光学显微镜术、热台式光学显微镜术、扫描电子显微镜术(SEM)、电子结晶学及定量分析、粒径分析(PSA)、表面积分析、溶解度测量、溶解测量、元素分析及卡尔费雪分析(Karl Fischer analysis)。

[0210] 术语“非晶型”意指为非结晶状态的呈固态的固体。非晶型固体为无序的分子排列且因此无可区别的晶格或晶胞且因此无可定义的长程有序。固体的固态形式可通过偏振光显微术、X射线粉末衍射(“XRPD”)、差示扫描量热法(“DSC”)或本领域已知的其它标准技术来确定。

[0211] 如本文所使用，除非另有阐述，否则术语“治疗(treating、treatment)”及诸如此类应包括出于对抗疾病、病症或病症的目的对受试者或患者(优选地哺乳动物，更优选人类)的管理及护理且包括所揭示化合物的给药以减轻症状或并发症或降低疾病、病症或病症的进展速率。

[0212] 如本文所使用，除非另有阐述，否则术语“预防”应包括(a)降低一或多个症状的频率；(b)降低一或多个症状的严重性；(c)延迟或避免其它症状的发展；和/或(d)延迟或避免病症或病症的发展。

[0213] 如本文所使用，术语“Trk相关的癌症”应经定义包括与NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调(例如，本文所阐述的NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调类型中的任一者)相关或具有该失调的癌症。本文阐述Trk相关的癌症的非限制性实例。

[0214] 如本文所使用，术语“疼痛”应经定义包括急性、慢性、炎性及神经性疼痛，包括糖尿病性神经病变。另外，疼痛可经中枢介导、外周介导、由结构组织损伤造成、由软组织损伤造成或由进展性疾病造成。任一中枢介导、外周介导、结构组织损伤、软组织损伤或进展性疾病相关性疼痛均可作为急性的或慢性的。

[0215] 如本文所使用，除非另有阐述，否则疼痛应包括炎性疼痛、中枢介导的疼痛、外周介导的疼痛、内脏疼痛、结构相关性疼痛、癌症疼痛、软组织损伤相关性疼痛、进展性疾病相

关性疼痛、神经性疼痛、来自急性损伤的急性疼痛、来自创伤的急性疼痛、来自手术的急性疼痛、头痛、牙齿疼痛、背部疼痛(优选地腰痛)、来自神经病性病症的慢性疼痛及来自中风后病症的慢性疼痛。

[0216] 一些实施方案包括治疗疼痛的方法,其中疼痛为急性疼痛。一些实施方案包括治疗疼痛的方法,其中疼痛为慢性疼痛。一些实施方案包括治疗疼痛的方法,其中疼痛为神经性疼痛,包括糖尿病性神经病变。一些实施方案包括治疗疼痛的方法,其中疼痛为炎性疼痛。

[0217] 在一些实施方案中,疼痛选自:骨关节炎、类风湿性关节炎、纤维肌痛、头痛、牙痛、烧伤、晒伤、动物咬伤(例如狗咬伤、猫咬伤、蛇咬伤、蜘蛛咬伤、昆虫叮咬及诸如此类)、神经原性膀胱障碍、良性前列腺肥大、间质性膀胱炎、鼻炎、接触性皮炎/过敏、瘙痒、湿疹、咽炎、粘膜炎、肠炎、蜂窝织炎、灼痛、坐骨神经炎、下颌关节神经痛、外周神经炎、多发性神经炎、残肢疼痛、幻肢疼痛、术后肠梗阻、胆囊炎、乳房切除术后疼痛综合征、口腔神经性疼痛、夏科氏疼痛(Charcot's pain)、反射交感性营养不良、格林巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、感觉异常性股痛、口腔灼痛综合征、疱疹后神经痛(post-herpetic neuralgia)、三叉神经痛、外周神经病变、双侧外周神经病变、糖尿病性神经病变、疱疹后神经痛(postherpetic neuralgia)、三叉神经痛、视神经炎、发热后神经炎、游走性神经炎、节段性神经炎、汞博氏神经炎(Gombault's neuritis)、神经元炎、颈臂神经痛、颅神经痛、膝状神经节神经痛、舌咽神经痛、偏头痛性神经痛、特发性神经痛、肋间神经痛、乳房神经痛、摩顿神经痛(Morton's neuralgia)、鼻睫神经痛、枕部神经痛、红斑性神经痛、斯路德神经痛(Sluder's neuralgia)、蝶腭骨神经痛、眶上神经痛、翼管神经痛、炎性肠病、肠易激综合征、分娩、生产、经期痉挛、癌症、背部疼痛、腰痛及腕隧道综合征疼痛。

[0218] 急性疼痛包括因急性损伤、创伤、患病或手术(例如,开胸手术(包括心脏直视手术或绕道手术))造成的疼痛。急性疼痛也包括(且不限于)头痛、术后疼痛、肾结石疼痛、胆囊疼痛、胆石疼痛、分娩疼痛、风湿病性疼痛、牙齿疼痛或由运动医学损伤造成的疼痛、腕隧道综合征、烧伤、肌骨扭伤及应变、肌腱应变、颈臂疼痛综合征、消化不良、胃溃疡、十二指肠溃疡、痛经或子宫内膜异位症。

[0219] 慢性疼痛包括由炎性病症、骨关节炎、类风湿性关节炎或疾病、急性损伤或创伤的后遗症造成的疼痛。慢性疼痛也包括(且不限于)头痛、上背部疼痛或腰痛(选自由全身性、区域性或原发性脊椎疾病(选自神经根病变)引起的背部疼痛)、骨疼痛(选自由骨关节炎、骨质疏松症、骨转移或未知原因引起的骨疼痛)、骨盘疼痛、脊髓损伤相关性疼痛、心源性胸痛、非心源性胸痛、中枢性中风后疼痛、肌筋膜疼痛、癌症疼痛、AIDS疼痛、镰状细胞疼痛、老年性疼痛或由头痛、偏头痛、三叉神经痛、颞下颌关节综合征、纤维肌痛综合征、骨关节炎、类风湿性关节炎、痛风、纤维组织炎或胸廓出口综合征造成的疼痛。

[0220] 神经性疼痛包括由慢性或衰竭性病症或病症引起的疼痛。可导致神经性疼痛的慢性或衰竭性病症或病症包括(但不限于)疼痛性糖尿病性外周神经病变、疱疹后神经痛、三叉神经痛、中风后疼痛、多发性硬化症相关性疼痛、神经病变相关性疼痛(例如在特发性或创伤后神经病变及单神经炎中)、HIV相关性神经性疼痛、癌症相关性神经性疼痛、腕隧道相关性神经性疼痛、脊髓损伤相关性疼痛、复杂区域性疼痛综合征、纤维肌痛相关性神经性疼痛、腰部及颈部疼痛、反射交感性营养不良、幻肢综合征及其它慢性及衰竭性病症相关性疼

痛综合征。

[0221] “急性神经变性病症或疾病”包括(但不限于)与神经元死亡或损害相关的各种类型的急性神经变性病症,包括脑血管功能不全、局灶性脑创伤、弥漫性脑损害及脊髓损伤,也即,脑局部缺血或梗塞(包括栓塞性阻塞及血栓形成性阻塞)、急性局部缺血后再灌注、围产期缺氧性局部缺血损伤、心跳停止、以及任一类型的颅内出血(包括(但不限于)硬膜外、硬膜下、蛛网膜下及脑内)、及颅内及脊柱内病灶(包括(但不限于)挫伤、穿透、剪切、压迫及撕裂)及鞭梢摇动婴儿综合征(whiplash shaken infant syndrome)。在一些实施方案中,急性神经变性病症为中风、急性局部缺血损伤、头部损伤或脊髓损伤的结果。

[0222] “慢性神经变性病症或疾病”包括(但不限于)阿尔茨海默氏病、皮克氏病(Pick's disease)、弥漫性路易体病(diffuse Lewy body disease)、进行性核上性麻痹(Steel-Richardson综合征)、多体系变性(Shy-Drager综合征)、与神经变性相关的慢性癫痫病症、运动神经元疾病(包括肌肉萎缩性脊髓侧索硬化症)、变性失调症、皮层基底变性、关岛ALS-帕金森氏-痴呆复合症(ALS-Parkinson's-Dementia complex of Guam)、亚急性硬化性全脑炎、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、帕金森氏病、触核蛋白病(包括多体系萎缩)、原发性进行性失语症、纹状体黑质变性、马查多-约瑟夫病(Machado-Joseph disease)/3型脊髓小脑性失调症及橄榄体桥脑小脑变性、Gilles De La Tourette's病、延髓及假延髓性麻痹、脊髓及脊髓延髓性肌肉萎缩(肯尼迪氏病(Kennedy's disease))、多发性硬化症、原发性侧索硬化症、家族性痉挛性截瘫、沃-霍二氏病(Werdnig-Hoffmann disease)、库-韦二氏病(Kugelberg-Welander disease)、泰-塞二氏病(Tay-Sach's disease)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、家族性痉挛性疾病、沃-库-韦三氏病(Wohlfart-Kugelberg-Welander disease)、痉挛性后躯轻瘫、进行性多灶性脑白质病、家族性自主神经障碍(赖利-戴综合征(Riley-Day syndrome))及朊病毒病(prion disease)(包括(但不限于)克-雅二氏病(Creutzfeldt-Jakob)、格-施-谢三氏病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)、库鲁病(Kuru)及致死性家族性失眠症)。在一些实施方案中,慢性神经变性病症选自阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、多发性硬化症或脑瘫。

[0223] 如本文所使用,术语“受试者”是指动物,优选地哺乳动物,最优选人类,其为治疗、观察或实验的目标。在一些实施方案中,受试者已经历和/或展现待治疗和/或预防的疾病或病症的至少一个症状。在一些实施方案中,患者为小儿患者(即在诊断或治疗时年龄在21岁以下的患者)。术语“小儿”可进一步分成多种亚群,包括:新生儿(自出生至生命的前28天);婴儿(29天龄至小于2岁);儿童(2岁至小于12岁);及青少年(12岁至21岁(最大至(但不包括)22岁生日))。

[0224] 在一些实施方案中,受试者已经鉴定或诊断患有具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的癌症(例如,如使用监管机构批准(例如,FDA批准)的分析或试剂盒所确定)。在一些实施方案中,受试者具有对于NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调为阳性的肿瘤(例如,如使用监管机构批准的分析或试剂盒所确定)。受试者可为具有对于NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调为阳性的肿瘤的受试者(例如,使用监管机构批准(例如,FDA批准)的分析或试剂盒经鉴定为阳性)。受试者可为其肿瘤具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的受试者(例如,其中肿瘤经使用监管机构批准(例如,FDA批准)的试剂盒或分析鉴定得以证实)。在一些实施方案

中,怀疑受试者具有Trk相关的癌症。在一些实施方案中,受试者具有指示受试者患有具有NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的肿瘤的的临床记录(且任选该临床记录指示受试者应利用本文所提供的任一组合物进行治疗)。

[0225] 术语“Trk”或“Trk蛋白”包括本文所述的Trk蛋白的任一种(例如,TrkA、TrkB或TrkC蛋白)。

[0226] 术语“NTRK基因”包括本文所述的NTRK基因的任一种(例如,NTRK1、NTRK2或NTRK3基因)。

[0227] 术语“野生型(wildtype或wild-type)”阐述核酸(例如,NTRK基因或Trk mRNA)或蛋白质(例如,Trk蛋白),其见于不具有Trk相关的癌症(且任选也不具有发展Trk相关的癌症或病症的增加了的风险和/或未怀疑具有Trk相关的癌症或病症)的受试者中或见于来自不具有Trk相关的癌症或病症(且任选也不具有发展Trk相关的癌症或病症的增加了的风险和/或未怀疑具有Trk相关的癌症或病症)的受试者的细胞或组织中。

[0228] 术语“监管机构”为国家批准药物试剂的医学使用的国家机构。例如,监管机构的非限制性实例为美国食品药品监督管理局(U.S.Food and Drug Administration,FDA)。

[0229] 短语“NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调”为基因突变(例如,造成融合蛋白表达的NTRK基因易位、造成Trk蛋白表达的NTRK基因缺失(其包括与野生型Trk蛋白相比缺失至少一个氨基酸),或造成具有一或多个点突变的Trk蛋白的表达的NTRK基因突变、产生造成与野生型Trk蛋白相比在Trk蛋白中缺失至少一个氨基酸的Trk蛋白的Trk mRNA的替代剪接版本),或造成Trk蛋白过表达的NTRK基因复制)或由细胞中NTRK基因的过表达引起的自分泌活性,其引起细胞中Trk蛋白的激酶结构域的活性(例如,Trk蛋白的组成性活性激酶结构域)的病原性增加。例如,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调可为NTRK1、NTRK2或NTRK3基因的突变,其编码具有组成性活性或与由不包括突变的NTRK1、NTRK2或NTRK3基因编码的蛋白质相比具有增加的活性的Trk蛋白。例如,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调可为造成融合蛋白表达的基因易位的结果,该融合蛋白含有TrkA、TrkB或TrkC的第一部分(其包括功能激酶结构域)及伴侣蛋白的第二部分(即,其不为TrkA、TrkB或TrkC)。编码融合蛋白的基因可包括(例如),野生型NTRK1基因的以下外显子:外显子10-19、外显子12-19、外显子12-19、外显子13-19、外显子14-19或外显子15-19。编码融合蛋白的基因可包括(例如)野生型NTRK2基因的以下外显子:外显子12-21、外显子13-21、外显子15-21、外显子16-21、或外显子17-21。编码融合蛋白的基因可包括(例如)野生型NTRK3基因的以下外显子:外显子17-22或外显子16-22。为NTRK基因易位的结果的融合蛋白的非限制性实例阐述于表1、3及4中。

[0230] NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调可包括(例如)NTRK1、NTRK2或NTRK3基因的突变,其导致含有至少一个(例如,2个、3个、4个或5个)点突变(例如,表6中所列示点突变中的一个或多个)的TrkA、TrkB或TrkC。NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调可包括(例如)NTRK2基因的突变,其导致包括V673M的点突变的TrkB蛋白。NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调可包括(例如)NTRK3基因的突变,其导致包括H677Y的点突变的TrkC蛋白。

[0231] NTRK基因、Trk蛋白、或它们的表达或活性或水平的失调,可为导致TrkA、TrkB或TrkC蛋白质中一个或多个连续氨基酸(例如,至少2个,至少3个,至少4个,至少5个,至少6

个,至少7个,至少8个,至少9个,至少10个,至少15个,至少20个,至少30个,至少40个,至少50个,至少60个,至少70个,至少80个,至少90个,至少100个,至少110个,至少120个,至少130个,至少140个,至少150个,至少160个,至少170个,至少180个,至少190个,至少200个,至少210个,至少220个,至少230个,至少240个,至少250个,至少260个,至少270个,至少280个,至少290个,至少300个,至少310个,至少320个,至少330个,至少340个,至少350个,至少360个,至少370个,至少380个,至少390个,或至少400个氨基酸)缺失的NTRK1、NTRK2或NTRK3基因的突变(TrkA、TrkB或TrkC的激酶结构域中可造成激酶结构域的去活化的氨基酸缺失除外)。在一些实施方案中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调可包括NTRK1基因的缺失,该缺失导致缺乏NGF结合位点或外显子10(其包括NGF结合位点)的TrkA蛋白,缺乏外显子10与急性髓细胞性白血病相关。

[0232] 在一些实例中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调可包括Trk mRNA的替代剪接形式,例如,TrkAIII经剪接的变体或TrkA mRNA的替代经剪接形式,其使得产生缺乏由外显子10编码的氨基酸的TrkA蛋白。在一些实例中,NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调包括NTRK基因(例如,NTRK基因的1个、2个、3个或4个额外拷贝)的扩增,这些扩增可造成(例如)细胞中NTRK基因的自分泌表达。

[0233] 术语“Trk相关的癌症或肿瘤”为与NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调相关的癌症(例如,与本文所阐述的NTRK基因、Trk蛋白或它们的表达或活性或水平的失调的至少一个实例(例如,2个、3个、4个或5个实例)相关的癌症)。

[0234] 如本文所使用,术语“哺乳动物”是指具有本文所阐述疾病或具有发展该疾病的风险的温血动物且包括(但不限于)豚鼠、狗、猫、大鼠、小鼠、仓鼠及灵长类动物(包括人类)。

[0235] 如本文所使用,术语“治疗有效量”意指活性化合物或药物剂在组织体系、动物或人类中诱发研究者、兽医、医师或其它临床医师所寻求的生物或医学反应的量,该生物或医学反应包括所治疗疾病或病症的症状的减轻。具体而言,治疗有效量在给药需要该治疗的受试者时足以(i)治疗或预防可利用TrkA和/或TrkB的抑制剂治疗的具体疾病、病症或病症,(ii)减弱、改善或消除该具体疾病、病症或病症的一或多个症状,或(iii)预防或延迟本文所阐述的具体疾病、病症或病症的一或多个症状的发作。晶型(I-HS)的对应于此治疗有效量的量将根据诸如疾病病症及其严重程度、需要治疗的哺乳动物的同一性(例如,重量)等因素而变化,但仍可由本领域技术人员常规地确定。

[0236] 如本文所使用,术语“组合物”意欲涵盖包含指定量的指定成分的产品以及自指定量的指定成分的组合直接或间接产生的任一产品。

[0237] 为提供更简明的阐述,本文所给出的一些定量表达未经术语“约”限制。应理解术语“约”无论明确使用与否,本文所给出的每一量均意欲指实际给定值,且其也意欲指本领域技术人员可合理地推断的该给定值的近似值,包括该给定值的由实验和/或测量条件引起的近似值。

[0238] 在一些实施方案中,本文所用术语“约”意指大约、在附近、概略地或左右。当术语“约”结合数值范围使用时,其通过将边界延伸至高于及低于所述数值来修改该范围。通常,本文所用术语“约”将数值修饰为在所述数值上下变动10%。

[0239] 在X射线粉末衍射图中的一或多个峰位置之前的术语“约”意味着该术语所限定的群组的所有峰皆以具有 $\pm 0.3^\circ$ 的可允许变化度的角度位置(2 θ)来报告。当比较两个粉末X

射线衍射图案时,意欲使用 $\pm 0.3^\circ$ 的变化度。在实践中,若来自一个图的衍射图谱峰被指派为所测量峰位置 $\pm 0.3^\circ$ 的角度位置(2 θ)范围且若这些峰位置范围重叠,则认为两个峰具有相同的角度位置。例如,若来自一个图的峰经测定具有 11.0° 的位置,则出于比较目的,该可允许变化度允许峰经指派在 10.7° - 11.3° 范围内的位置。

[0240] 在以摄氏度报告的DSC、TGA、TG或DTA的值之前的术语“约”具有 $\pm 5^\circ\text{C}$ 的可允许变化度。

[0241] 为提供更简明的阐述,本文的一些定量表达为以约量X至约量Y的范围来列举。应理解倘若列举范围,则该范围并非限于所列举的上界及下界,而是包括约量X至约量Y的全部范围或其中的任一范围。

[0242] 本文进一步提供含有晶型(I-HS)以及药学上可接受的载体的药物组合物。含有晶型(I-HS)作为活性成分的药物组合物可通过根据常规药物混合技术充分混合晶型(I-HS)与药物载体来制备。载体可根据期望的给药途径(例如,经口、肠胃外)而采用众多种形式。因此,对于液体口服制剂(例如悬浮液、酞剂及溶液),适宜载体及添加剂包括水、二醇、油、醇、矫味剂、防腐剂、稳定剂、着色剂及诸如此类;对于固体口服制剂(例如粉末、胶囊及片剂),适宜载体及添加剂包括淀粉、糖、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂及诸如此类。固体口服制剂也可经诸如糖等物质包衣或经肠溶衣包衣以便调节吸收的主要位点。对于肠胃外给药,载体将通常由无菌水组成,且可添加其它成分以增加溶解度或防腐。可注射悬浮液或溶液也可利用水性载体以及适当添加剂来制备。

[0243] 晶型(I-HS)可通过任一便利途径给药至(例如)胃肠道(例如经直肠或经口)、鼻、肺、肌肉或血管中或透皮或经真皮给药。晶型(I-HS)可以任何便利给药形式给药,例如片剂、粉剂、胶囊、溶液、分散液、悬浮液、糖浆、喷雾剂、栓剂、凝胶、乳液、贴剂等。这些组合物可含有药物制剂中的常规组分,例如稀释剂、载体、pH改变剂、甜味剂、增容剂及其它活性剂。若期望肠胃外给药,则组合物为无菌的且呈适于注射或输注的溶液或悬浮液形式。这些组合物形成本发明的另一方面。

[0244] 本文也提供包含晶型(I-HS)的药物组合物。为制备本文所提供的药物组合物,根据常规药物混合技术将作为活性成分的晶型(I-HS)与药物载体充分混合,该载体可根据给药(例如,经口或肠胃外(例如肌内))所期望的制剂形式而采用众多种形式。在制备呈口服剂型的组合物中,可采用任一常用药物介质。因此,对于液体口服制剂(例如,悬浮液、酞剂及溶液),适宜载体及添加剂包括水、二醇、甘油、油、环糊精、醇(例如,乙醇)、矫味剂、防腐剂、着色剂及诸如此类;对于固体口服制剂(例如,粉末、胶囊、囊片、软胶囊及片剂),适宜载体及添加剂包括淀粉、糖、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂及诸如此类。适宜粘合剂包括(但不限于)淀粉、明胶、天然糖(例如葡萄糖或 β 乳糖)、玉米甜味剂、天然及合成胶质(例如阿拉伯胶(acacia)、黄蓍胶)或油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠及诸如此类。崩解剂包括(但不限于)淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄原胶及诸如此类。

[0245] 因片剂及胶囊易于给药,故其代表最有利的口服单位剂量形式,在该情形下,显然采用固体药物载体。若期望,则可通过标准技术对片剂进行糖包衣或肠溶衣包衣。对于肠胃外,载体将通常包含无菌水,且例如出于诸如辅助溶解度或用于防腐等的目的可包括其它成分。也可制备可注射悬浮液,在该情形下可采用适当的液体载体、悬浮剂及诸如此类。本

文的药物组合物将每剂量单位(例如,片剂、胶囊、粉末、注射剂、茶匙及诸如此类)含有递送如上所述的有效剂量所必需的量的活性成分。

[0246] 本文的药物组合物每剂量单位(例如,片剂,胶囊,悬浮液,溶液,用于重构的囊剂,粉末,注射剂,I.V.,栓剂,舌下/含剂膜剂,茶匙用药等)将含有约0.1mg至1000mg或其中的任一范围,且可以约0.01mg/kg/天至300mg/kg/天或其中的任一范围、优选地约0.5mg/kg/天至50mg/kg/天或其中的任一范围的剂量给予。在一些实施方案中,本文提供的药物组合物每剂量单位包含,约25mg至约500mg本文提供的化合物(例如,约25mg至约400mg,约25mg至约300mg,约25mg至约250mg,约25mg至约200mg,约25mg至约150mg,约25mg至约100mg,约25mg至约75mg,约50mg至约500mg,约100mg至约500mg,约150mg至约500mg,约200mg至约500mg,约250mg至约500mg,约300mg至约500mg,约400mg至约500mg,约50至约200mg,约100至约250mg,约50至约150mg)。在一些实施方案中,本文提供的药物组合物每剂量单位包含,约25mg,约50mg,约100mg,约150mg,约200mg,约250mg,约300mg,约400mg,或约500mg本文提供的化合物。然而,剂量可根据患者需求、所治疗病症的严重程度及所采用化合物而变化。在一些实施方案中,剂量为每日一次(QD)或每日两次(BID)给药。

[0247] 优选地,这些组合物呈例如以下的单位剂型形式:片剂、丸剂、胶囊、粉末、颗粒、无菌肠胃外溶液或悬浮液、定量气溶胶或液体喷雾剂、滴剂、安瓿(ampoule)、自动注射器装置或栓剂;对于经口肠胃外、经鼻内、舌下或经直肠给药或对于通过吸入或吹入给药而言。或者,组合物可呈现为适于每周一次或每月一次给药的形式;例如,活性化合物的不溶性盐(例如癸酸盐)可适于提供用于肌肉注射的长效制剂。对于制备诸如片剂等固体组合物,将晶型(I-HS)与药物载体(例如常规制片剂成分,例如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石粉、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或胶质)及其它药物稀释剂(例如水)混合以形成含有晶型(I-HS)的均质混合物的固体预调配组合物。当提及这些预调配组合物为均质时,意指活性成分为均匀分散于整个组合物中,以使得可容易地将组合物再分成相等有效的剂型,例如,片剂、丸剂及胶囊。然后,将此固体预调配组合物再分成含有0.1mg至约1000mg或其任一量或范围的本文所提供活性成分的上文所述类型的单位剂型。所述组合物的片剂或丸剂可经包衣或者复合以提供具有持久作用优点的剂型。例如,片剂或丸剂可包含内部剂量组分及外部剂量组分,后者为包封前者的形式。该两种组分可通过肠溶性层分开,该肠溶性层用以抵抗胃内的崩解并允许内部组分完整地进入十二指肠或延迟释放。这些肠溶性层或包衣可使用各种材料,这些材料包括大量聚合酸及诸如虫胶、鲸蜡醇及乙酸纤维素等材料。

[0248] 可纳入本文所提供新颖组合物用于经口或通过注射给药的液体形式包括水溶液、环糊精、适当矫味的糖浆、水性或油性悬浮液及利用可食用油(例如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)矫味的乳液以及酞剂及类似药物媒剂。适于水性悬浮液的分散剂或悬浮剂包括合成及天然胶质,例如黄蓍胶、阿拉伯胶、海藻酸盐、葡聚糖、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯基吡咯啉酮或明胶。对于肠胃外给药,无菌悬浮液及溶液为合意的。在期望静脉内给药时采用通常含有适宜防腐剂的等渗制剂。

[0249] 晶型(I-HS)可经由局部使用适宜鼻内媒介物以鼻内形式或经由本领域技术人员熟知的透皮贴剂给药。当以透皮递送体系形式给药时,在整个剂量方案中剂量给药当然将为连续的而非间歇的。

[0250] 为制备本文所提供的药物组合物,根据常规药物混合技术将作为活性成分的晶型

(I-HS) 与药物载体充分混合,该载体可根据给药(例如经口或肠胃外)所期望的制剂形式而采用众多形式。本领域熟知适宜的药学上可接受的载体。一些这些药学上可接受的载体的阐述可参见由美国制药协会(American Pharmaceutical Association)及英国制药协会(Pharmaceutical Society of Great Britain)出版的The Handbook of Pharmaceutical Excipients。

[0251] 配制药物组合物的方法已阐述于众多出版物中,例如由Marcel Dekker公司出版的Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Second Edition,Revised and Expanded,第1卷至第3卷,由Lieberman等人编辑;Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,第1卷至第2卷,由Avis等人编辑;及Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse systems,第1卷至第2卷,由Lieberman等人编辑。

[0252] 每当需要治疗癌症、疼痛、发炎、神经变性疾病或克氏锥虫感染时,本文所提供的化合物均可以上述组合物中的任一者且根据本领域确立的剂量方案进行给药。

[0253] 晶型(I-HS)的每日剂量可在1.0mg/成年人/天至10,000mg/成年人/天或更高的宽范围内或其中的任一范围内变化。就口服给药而言,组合物优选地以含有0.01毫克、0.05毫克、0.1毫克、0.5毫克、1.0毫克、2.5毫克、5.0毫克、10.0毫克、15.0毫克、25.0毫克、50.0毫克、100毫克、150毫克、200毫克、250毫克及500毫克活性成分(根据症状调节剂量)的片剂形式提供给待治疗的患者。药物的有效量通常以约0.1mg/kg体重/天至约1000mg/kg体重/天或其中的任一范围的剂量水平提供。优选地,该范围为约0.5mg/kg体重/天至约500mg/kg体重/天或其中的任一范围。更优选,约1.0mg/kg体重/天至约250mg/kg体重/天或其中的任一范围。更优选,约0.1mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天或其中的任一范围。在一实例中,该范围可为约0.1mg/kg体重/天至约50.0mg/kg体重/天或其中的任一量或范围。在另一实例中,该范围可为约0.1mg/kg体重/天至约15.0mg/kg体重/天或其中的任一范围。在再一实例中,该范围可为约0.5mg/kg体重/天至约7.5mg/kg体重/天或其中的任一量至范围。晶型(I-HS)可基于每天1次至4次或以单一日剂量的方案给药。

[0254] 期望给药的最佳剂量可易于由本领域技术人员来确定,且将随给药模式、制剂强度、给药模式及疾病病症的进展而变化。另外,与所治疗的具体患者相关的因素(包括患者年龄、重量、饮食及给药时间)将使得需要调节剂量。

[0255] 本领域技术人员将认识到,使用适宜的已知且通常被接受的细胞和/或动物模型的体内及体外试验可预测测试化合物治疗或预防给定病症的能力。

[0256] 本领域技术人员将进一步认识到,在健康患者和/或那些罹患给定病症者中的人类临床试验(包括初次用于人类试验、剂量范围确定试验及功效试验)可根据临床及医学界内熟知的方法来完成。

[0257] 见于说明书中的首字母缩略词具有以下含义:

[0258]

ATP	三磷酸腺苷
DI	去离子
EtOH	乙醇
GC	气相色谱法
MOPS	3-(N-吗啉代)-丙烷磺酸
MTBE	甲基叔丁基醚

PDA	光电二极管阵列
RRT	相对保留时间
RT	室温
THF	四氢呋喃
TMB	3,3',5,5'-四甲基联苯胺

[0259] 以下实施例图解说明本发明且经阐述以辅助了解本发明,且其并非意欲且不应视为以任一方式限制权利要求中所阐述的本发明。

[0260] 除非另有指示,否则在下述实施例中,所有温度皆以摄氏度阐述。试剂为购自商业供应商(例如Sigma-Aldrich Chemical公司、EMD、JTBaker或Pharco-Aaper),且除非另有指示,否则其未经进一步纯化即使用。四氢呋喃(THF)、庚烷及其它有机溶剂为购自商业供应商(例如Sigma-Aldrich Chemical公司、ACROS、Alfa-Aesar、Lancaster、TCI或Maybridge),且原样使用。

[0261] 本领域技术人员将认识到,倘若未另外说明,否则反应步骤为在适宜条件下根据已知方法来实施,以提供期望的产品。本领域技术人员将也认识到,倘若如本文所揭示的反应步骤可在多种溶剂或溶剂体系中实施,则该反应步骤也可在适宜溶剂或溶剂体系的混合物中实施。本领域技术人员将认识到,在如本文所呈现的说明书及权利要求中,倘若试剂或试剂类别/类型(例如碱、溶剂等)在方法的一个以上步骤中提及,则各个试剂经独立地选择用于每一反应步骤且彼此可相同或不同。例如,倘若方法的两个步骤提到有机碱或无机碱作为试剂,则经选择用于第一步骤的有机或无机碱与第二步骤的有机或无机碱可相同或不同。

[0262] 下文所阐述的反应通常为在正氮压力下(除非另有说明)在“ACS级”溶剂中进行,且反应烧瓶通常配备有橡胶隔膜用于经由注射器或加料漏斗引入底物及试剂。

[0263] 使用两个反相高效液相层析(HPLC)体系用于过程监测及分析,使用乙腈及水/三氟乙酸作为流动相。一体系采用Agilent Zorbax Extend C18柱(在264nm下),而另一体系(下文中,“TRK1PM1 HPLC”)包括Waters Xbridge Phenyl柱(在268nm下)。除非另有说明,否则使用前一体系。在具有化合物的烧瓶中搅拌用于两体系的二氧化硅,且然后经由聚丙烯布过滤,之后进行分析。

[0264] 式I化合物的非晶型游离碱形式:将约1克(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺溶于最少量的水且冷却至约-26℃的温度,随后在冷冻干燥机中干燥24小时。将自冷冻干燥机获得的约20mg非晶型材料称重于小瓶中,向该小瓶中添加5体积等份的适当溶剂体系。检查混合物的溶解且若溶解不明显,则将混合物加热至约40℃并再次检查。继续此程序直至观察到溶解为止或直至已添加100体积的溶剂为止。自冷冻干燥实验获得的非晶型材料的XRPD图谱显示于图7中。

[0265] 式I化合物的非晶型硫酸氢盐如WO 2010/048314中的实施例14A中所阐述制备(参见实施例3)。通过此方法制备的两个不同批次的非晶型材料的XRPD图谱显示于图28中。

[0266] 本文也提供制备晶型(I-HS)的方法。在一些实施方案中,该方法包括如方案1中所示的步骤。

[0267] 在一些实施方案中,本文提供制备晶型(I-HS)的方法,包括:

[0268] (a) 向(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-

基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺在EtOH中的溶液添加浓硫酸以形成(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺的硫酸氢盐;

[0269] (b) 向步骤(a)中的溶液添加庚烷以形成浆液;

[0270] (c) 过滤该浆液以分离(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐;

[0271] (d) 将所述(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐与5:95w/w水/2-丁酮溶液混合;

[0272] (e) 在搅拌下在约65-70℃加热源自步骤(d)的混合物直到乙醇的重量百分比为约0.5%以形成(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐的晶型的浆液;和

[0273] (f) 通过过滤分离(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐的晶型。

[0274] 在一些实施方案中,上述方法进一步包括:(b1)在室温用(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐向该源自步骤(a)的溶液接晶且使该溶液搅拌直到浆液形成。

[0275] 在一些实施方案中,本文提供制备晶型(I-HS)的方法,包括:

[0276] (a) 在碱的存在下使5-氯-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶与(R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷(R)-2-羟基琥珀酸盐反应形成(R)-5-(2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-

[0277] 基)-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶;

[0278] (b) 用Zn和盐酸处理所述(R)-5-(2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶以形成(R)-5-(2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-胺;

[0279] (c) 用碱和氯甲酸苯基酯处理所述(R)-5-(2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-胺以形成(R)-(5-(2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)氨基甲酸苯基酯;

[0280] (d) 使所述(R)-(5-(2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)氨基甲酸苯基酯与(S)-吡咯烷-3-醇反应形成(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺反应;

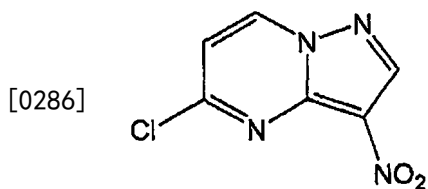
[0281] (e) 向所述(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺添加硫酸以形成(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐;和

[0282] (f) 分离(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐的晶型。

[0283] 在上述步骤(a)的一些实施方案中,所述碱为胺碱,如三乙胺。

[0284] 在上述步骤(c)的一些实施方案中,所述碱为碱金属碱,如碱金属碳酸盐,如碳酸钾。

[0285] 制备A



[0287] 5-氯-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶的制备

[0288] 步骤A-吡唑并[1,5-a]嘧啶-5-醇钠的制备:将1H-吡唑-5-胺和1,3-二甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(1.05当量)的溶液添加装配机械搅拌器、蒸锅、回流冷凝器、J-Kem温度探针和用于正N₂压力控制的N₂适配器的至圆底烧瓶。在机械搅拌下在氮气氛将固体悬浮于4体积(4mL/g)无水EtOH,然后添加2.1当量的NaOEt(21wt%溶液在EtOH中),然后用1体积(1mL/g)的无水EtOH进行管线冲洗。将浆液温热至约75℃且在轻微回流下搅拌直到通过TRK1PM1 HPLC跟踪反应进程(使用20μL在4mL去离子水中稀释的浆液及5μL注射液在220nm下)直至观察到小于1.5面积%的1H-吡唑-5-胺为止。

[0289] 再过1小时后,将2.5vol.(2.5mL/g)庚烷添加至混合物且然后在70℃下回流1小时。然后使浆液冷却至室温过夜。通过在台式漏斗及聚丙烯过滤布上过滤来收集固体。冲洗反应器并在滤饼上装填4体积(4mL/g)庚烷,并取出滤饼,并将固体转移至配衡干燥盘中并在45℃下在高真空中烘干,直至其重量恒定为止。以93-96%产率(经校正)获得浅黄色固体吡唑并[1,5-a]-嘧啶-5-醇钠且通过HPLC(在去离子水中的1mg/mL稀释液,TRK1PM1在220nm下)观察到大于99.5面积%。

[0290] 步骤B-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶-5(4H)-酮的制备:用在40-45℃下溶解于3.0体积(3.0mL/g)去离子水中的吡唑并[1,5-a]嘧啶-5-醇钠装填配衡圆底烧瓶,且然后在高真空中在65℃下在水浴中在旋转蒸发器上浓缩直至观察到2.4×起始材料的重量(1.4vol/1.4mL/g去离子水含量)。针对残余EtOH(30μL溶解于约1mL MeOH中的溶液)实施的气相层析(GC)显示小于100ppm,其中在稍后添加HNO₃后在下面观察到痕量硝酸乙酯烟雾。在一些情形下,用另一1.5体积(1.5mL/g)DI水装填初始溶液,然后在高真空中在65℃下在旋转蒸发器上的水浴中浓缩,直至观察到起始材料的2.4x重量(1.4vol/1.4mL/g DI水含量)。针对残余EtOH(30μL溶解于约1mL MeOH中的溶液)实施的气相层析显示<<100ppm的残余EtOH,且在稍后添加HNO₃后在下面未观察到任何硝酸乙酯烟雾。

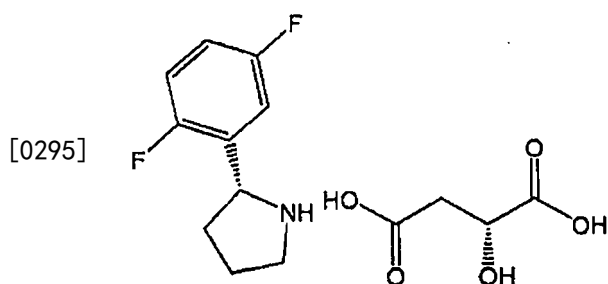
[0291] 在氮气氛向装配机械搅拌器、蒸锅、回流冷凝器、J-Kem温度探针和用于正N₂压力控制的N₂适配器的圆底容器添加3体积(3mL/g,10当量)>90wt%HNO₃且使用外部冰-水冷却浴在氮气氛冷却至约10℃。使用压力均衡加料漏斗,以在冷却下维持35-40℃内部温度的速率向HNO₃溶液添加1.75-1.95体积的吡唑并[1,5-a]嘧啶-5-醇钠的去离子水溶液(1.16-1.4mL DI水/g吡唑并[1,5-a]嘧啶-5-醇钠)。观察到两种共沸物且没有任何硝酸乙酯烟雾。用2×0.1体积(2×0.1mL/g)去离子水冲洗共沸物烧瓶、转移管线(若适用)及加料漏斗,添加至反应混合物中。在完成添加后,使温度逐渐增加至约45-50℃并保持约3小时,且HPLC显示吡唑并[1,5-a]嘧啶-5-醇钠向3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶-5(4H)-酮的>99.5面积%的转化。

[0292] 步骤C-5-氯-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶的制备:将3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶-5(4H)-酮装入装配机械搅拌器、加热罩、回流冷凝器、J-Kem温度探针和用于正N₂压力控制的N₂适配器的圆底烧瓶中。在机械搅拌下将固体悬浮于8体积(8mL/g)的CH₃CN中,然后添加2,

6-二甲基吡啶 (2,6-lutidine) (1.05当量),然后将浆液温热至约50℃。使用压力均衡加料漏斗,向混合物滴加0.33当量的POCl₃。此加料得到浓稠米色的三聚体浆液,在搅拌的同时将该浆液均质化,直至观察到半流动物质为止。将另外1.67当量POCl₃装填至混合物中,同时允许温度稳定,随后使反应混合物升温至轻微回流(78℃)。在使混合物升温后观察到些许吹喷,此后来在浓稠浆液变稀时有所减退。

[0293] 使反应混合物回流直至完全溶解为深色溶液且直至HPLC (在5mL CH₃CN中稀释的20μL, TRK1PM1 HPLC, 5μL注射液, 268nm) 证实通过自面积积分手动去除任何干扰峰及早期洗脱峰 (与二甲基吡啶相关) 不再存在三聚体 (RRT 0.92) 且观察到小于0.5面积%的3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶-5(4H)-酮 (RRT 0.79)。在1.9kg规模上,在19小时轻轻回流后使用TRK1PM1 HPLC在268nm下观察到0面积%的三聚体、0.25面积%的3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶-5(4H)-酮及99.5面积%的5-氯-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶。

[0294] 制备B



[0296] (R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷(R)-2-羟基琥珀酸盐的制备

[0297] 步骤A-(4-(2,5-二氟苯基)-4-氧代丁基)-氨基甲酸叔丁酯的制备:将2-溴-1,4-二氟苯(1.5eq.)溶于4体积的THF (基于2-氧代吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯的重量) 且冷却至约5℃。经2小时向混合物添加2.0M iPrMgCl在THF (1.4eq.) 中的溶液同时保持反应温度低于25℃。使溶液冷却至约5℃并搅拌1小时 (GC分析证实Grignard形成)。经约30min添加2-氧代吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯(1.0当量)于1体积THF中的溶液,同时将反应温度维持在低于25℃。将反应在约5℃下搅拌90min (证实2-氧代吡咯烷-1-甲酸叔丁基酯小于0.5面积% (通过HPLC))。用5体积2M HCl水溶液淬灭反应,同时将反应温度维持在低于45℃。然后,将反应物转移至分液漏斗中,添加10体积庚烷并去除水层。用4体积饱和NaCl水溶液洗涤有机层,随后添加2 x 1体积的饱和NaCl水溶液。将有机层的溶剂替换为庚烷(<1%wt THF,通过GC证实),蒸馏温度为35-55℃且蒸馏压力为100-200mm Hg,代为添加2 x 4体积的庚烷且最小蒸馏体积为约7体积。然后,用庚烷将混合物稀释至10体积,同时加热至约55℃,得到密实固体,且使混合物冷却至室温过夜。使浆液冷却至小于5℃且经由聚丙烯过滤布过滤。用2 x 2体积的庚烷洗涤湿滤饼。将固体在真空下在55℃干燥,直至重量恒定为止,得到约75%至85%理论产率的白色固体状(4-(2,5-二氟苯基)-4-氧代丁基)-氨基甲酸叔丁酯。

[0298] 步骤B-5-(2,5-二氟苯基)-3,4-二氢-2H-吡咯的制备:将(4-(2,5-二氟苯基)-4-氧代丁基)-氨基甲酸叔丁酯溶解于5vol. 甲苯中,且添加2.2当量12M HCl,观察到轻微放热及气体释放。将反应物加热至65℃并保持12-24小时且通过HPLC监测。完成后,用冰/水浴使反应物冷却至低于15℃。用3当量2M NaOH水溶液(4.7vol.) 将pH调节至约14。将反应物在室温下搅拌1-2小时。将混合物用甲苯转移至分液漏斗中。去除水层并用3体积饱和NaCl水溶液洗涤有机层。将有机层浓缩为油并再溶解于1.5体积庚烷中。经由GF/F过滤纸过滤所得悬

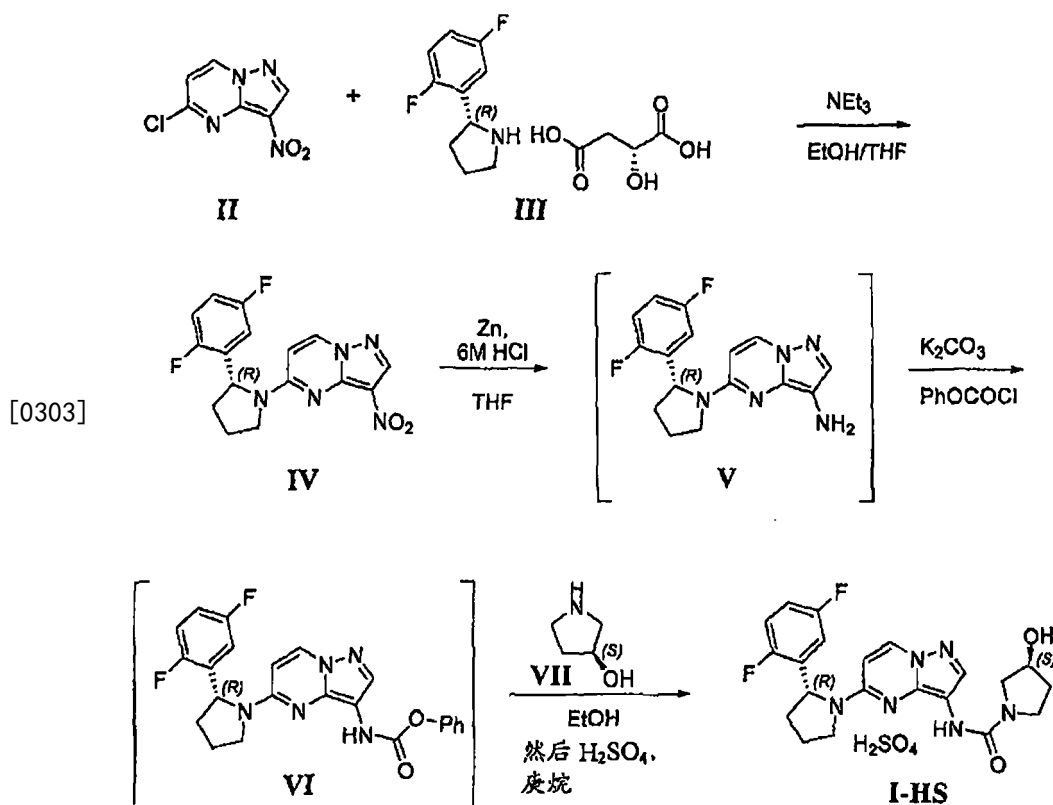
浮液并浓缩为90%至100%理论产率的5-(2,5-二氟苯基)-3,4-二氢-2H-吡咯的浅黄色油。

[0299] 步骤C-(R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷的制备:在室温将氯-1,5-环辛二烯铱二聚体(0.2mol%)和(R)-2-(2-(二苯基膦基)苯基)-4-异丙基-4,5-二氢噁唑(0.4mol%)悬浮于5体积的MTBE(基于5-(2,5-二氟苯基)-3,4-二氢-2H-吡咯)中。将混合物搅拌1小时且大多数固体溶解,且溶液变为深红色。使用HPLC/PDA检测器监测催化剂形成。使反应物冷却至小于5℃且添加5-(2,5-二氟苯基)-3,4-二氢-2H-吡咯(1.0当量),使用0.5体积MTBE冲洗。经约20分钟添加二苯基硅烷(1.5当量),同时将反应温度维持在低于10℃。将反应物在低于10℃搅拌30分钟,然后升温至室温。在室温下将反应物搅拌过夜。通过HPLC证实反应的完成且然后冷却至小于5℃。用5体积2M HCl水溶液淬灭反应,将温度维持在低于20℃。10分钟后,去除冰/水浴且使反应温度增加至室温同时搅拌2小时。将混合物转移至具有3体积MTBE的分液漏斗中。用3.5体积MTBE洗涤水层,随后将5体积MTBE添加至水层中,同时通过添加0.75体积50%NaOH水溶液将pH调节至约14。用5体积饱和NaCl水溶液洗涤有机层,然后浓缩为油,并用3体积MTBE稀释。经由聚丙烯过滤布过滤溶液且用1体积MTBE冲洗。将滤液浓缩为95%至100%理论产率及75-85% ee的(R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷的油状物。

[0300] 步骤D-(R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷(R)-2-羟基-琥珀酸盐的制备:将(R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷(1.0当量)转移至装填有15体积(针对效能校正)的EtOH(200prf)的圆底烧瓶中。添加D-苹果酸(1.05当量)且将混合物加热至65℃。在约64℃下固体全部溶解。使溶液冷却至RT。在约55℃下,利用(R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷(R)-2-羟基-琥珀酸盐(约50mg, >97% ee)对溶液接晶并在室温下搅拌过夜。然后经由聚丙烯过滤布过滤悬浮液并用2×1体积的EtOH(200prf)洗涤。在真空下在55℃下干燥固体,得到75%至90%理论产率及>96% ee的(R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷(R)-2-羟基-琥珀酸盐。

[0301] 参考方案1,合适的碱包括叔胺碱,如三乙胺和K₂CO₃。合适的溶剂包括乙醇、庚烷和四氢呋喃(THF)。该反应在介于5℃与50℃之间的温度下便利地进行。通常通过HPLC TRK1PM1监测反应进展。

[0302] 方案1



[0304] 将化合物II (5-氯-3-硝基吡唑并[1,5-a]嘧啶) 和III ((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷(R)-2-羟基琥珀酸盐, 1.05eq.) 添加至装配机械搅拌器、J-Kem温度探针和用于正N₂压力控制的N₂适配器的圆底烧瓶中。通过加料漏斗添加4:1 EtOH:THF (10mL/g化合物II) 的溶液, 然后添加三乙胺 (NEt₃, 3.50eq.), 且在添加过程中温度达到约40℃。一旦添加完成, 将反应混合物加热至50℃且搅拌0.5-3小时以得到化合物IV。

[0305] 向配备有机机械搅拌器、J-Kem温度探针及N₂入口的圆底烧瓶中添加化合物IV且随后添加四氢呋喃 (10mL/g化合物IV)。使溶液在冰浴中冷却至小于5℃, 且添加Zn (9-10当量)。然后以使得将温度保持在低于30℃的速率逐滴添加6M HCl (9-10当量) (对于1kg规模, 添加耗费约1.5小时)。在放热减退后, 使反应物升温至室温且搅拌30-60min直至通过HPLC检测不到化合物IV。此时, 一次性添加碳酸钾 (K₂CO₃, 2.0当量) 的水溶液 (5mL/g化合物IV) 且随后快速滴加氯甲酸苯基酯 (PhOCOC1, 1.2当量)。在上述两次添加期间均观察到气体释放 (CO₂), 且在添加氯甲酸苯基酯后温度增加至约30℃。将氨基甲酸酯形成物在室温下搅拌30-90min。随后立即进行HPLC分析以确保在溶液中存在小于1面积%的胺及高产率的化合物VI。

[0306] 向上述溶液中添加胺VII ((S)-吡咯烷-3-醇, 1.1当量, 基于化合物VI的理论产率) 及EtOH (10mL/g化合物VI)。在EtOH之前或与EtOH同时添加化合物VII以避免形成氨基甲酸乙酯杂质。在减压下使用分批浓缩器将上述EtOH溶液浓缩至最小体积 (4-5mL/g) (THF含量应<5%, 通过GC), 且返添加EtOH (10mL/g化合物VI) 从而得到总共10mL/g。然后, 将反应物在50℃下加热9-19小时或直至HPLC显示化合物VI小于0.5面积%为止。然后, 使反应物冷却至室温, 且经由加料漏斗添加硫酸 (H₂SO₄, 相对于化合物VI为1.0当量) 以得到化合物I-HS, 且温度通常在约30℃下放热。

[0307] 实施例1

[0308] 晶型 (I-HS) 的制备 (方法1)

[0309] 将 (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) -吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺 (0.500g, 1.17mmol) 溶于 EtOH (2.5mL) 且冷却至约 5℃。将浓硫酸 (0.0636mL, 1.17mmol) 添加至冷却的溶液中且搅拌约 10 分钟, 同时温热至室温。将甲基叔丁基醚 (MTBE) (2mL) 缓慢添加至混合物, 使得产物以胶体析出。然后将 EtOH (2.5mL) 添加至混合物且加热至约回流直到所有固体溶解。在冷却至室温且搅拌约 1 小时后, 形成一些固体。冷却至约 5℃ 后, 将固体过滤且用 MTBE 洗涤。过滤且风干约 15 分钟后, 将 (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) -吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐分离为固体。

[0310] 实施例2

[0311] 晶型 (I-HS) 的制备 (方法2)

[0312] 将浓硫酸 (392mL) 添加至 3031g (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) -吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺在 18322mL EtOH 中的溶液中以形成硫酸氢盐。将溶液用 2g (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) -吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐接晶且溶液在室温搅拌至少 2 小时以形成硫酸氢盐浆液。添加庚烷 (20888g) 且将浆液在室温搅拌至少 60min。将浆液过滤且滤饼用 1:1 庚烷/EtOH 洗涤。将固体然后在环境温度真空干燥 (烘箱温度设定为 15℃)。

[0313] 将干燥的硫酸氢盐 (源自 4 个批次的组合的 6389g) 添加至 5:95 w/w 水/2-丁酮溶液 (总重量 41652g)。将混合物在约 68℃ 在搅拌下加热直到乙醇的重量百分比为约 0.5%, 此时形成浆液。将浆液过滤, 且滤饼用 5:95 w/w 水/2-丁酮溶液洗涤。将固体然后在环境温度真空干燥 (烘箱温度设定为 15℃) 以提供 (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) -吡咯烷-1-基) -吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐的晶型。

[0314] 实施例3

[0315] 非晶型形式 AM(HS) 的制备

[0316] 在环境温度在快速搅拌下向 (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) 吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺 (9.40g, 21.94mmol) 在 MeOH (220mL) 中的溶液中缓慢添加硫酸 (0.1M 在 MeOH 中, 219.4mL, 21.94mmol)。30 分钟后, 将反应首先通过旋转式蒸发器浓缩至接近干燥, 然后在高真空保持 48h 以提供 (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) 吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸盐的非晶型形式 (11.37g, 21.59mmol, 98.43% 产率)。LCMS (apci m/z 429.1, M+H)。

[0317] 实施例4

[0318] 式 I 的结晶 HCl 盐的制备

[0319] 将 (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) 吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺 (0.554g, 1.29mmol) 在 EtOH (6mL, 200proof) 和 MTBE (10mL) 中的混合物加热至 50℃ 同时搅拌以得到溶液, 然后一次性添加盐酸 (浓) (0.108mL, 1.29mmol)。然后将反应混合物首先冷却至环境温度, 然后在冰-水浴中冷却至约 5℃ 同时搅拌以诱导结晶。将悬浮液在冰-水浴中搅拌 4h, 然后将其真空-过滤, 且滤饼用 MTBE 冲洗且真空在 55℃ 干燥至恒重, 得到结晶 (S) -N- (5- ((R) -2- (2,5-二氟苯基) 吡咯烷-1-基) 吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基) -3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺盐酸盐 (0.534g, 89% 产率)。LCMS (apci m/z 429.2, M+H)。

[0320] 式I的结晶HBr盐的制备

[0321] 将(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺(0.505g,1.18mmol)在EtOH(6mL,200proof)和MTBE(10mL)中的混合物加热至50℃同时搅拌以得到溶液,然后一次性添加溴化氢(33%水溶液)(0.213mL,1.18mmol)。将反应混合物加热至回流以得到主要为澄清溶液,且具有少量油状残余物在反应容器的玻璃壁上。冷却至环境温度后,形成沉淀且油状残余物固化。将混合物再次加热至50℃,然后冷却至室温且搅拌过夜。悬浮液真空-过滤,且滤饼用MTBE冲洗且在55℃真空干燥至恒重,得到结晶(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺氢溴酸盐(0.51g,85%产率)。LCMS(apci m/z 429.3,M+H)。

[0322] 式I的结晶甲磺酸盐的制备

[0323] 将(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺(0.532g,1.24mmol)在EtOH(2.7mL,200proof)和MTBE(5.3mL)中的混合物加热至50℃同时搅拌以得到溶液,然后一次性添加甲磺酸(0.076mL,1.24mmol)。将反应混合物加热至回流以得到主要为澄清的溶液,且具有少量颗粒。冷却至环境温度后,出现沉淀以及一些油状残余物。添加另外的EtOH(0.5mL,200-标准酒精度)和甲磺酸(0.010mL)以得到溶液。将混合物再次加热至50℃,然后冷却至室温且搅拌1h。悬浮液真空-过滤,且滤饼用MTBE冲洗且在55℃真空干燥至恒重,得到结晶(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺甲磺酸盐(0.51g,78%产率)。LCMS(apci m/z 429.4,M+H)。

[0324] 式I的结晶樟脑磺酸盐的制备

[0325] 将(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺(0.500g,1.17mmol)和S-(+)-樟脑磺酸(0.271g,1.17mmol)在EtOH(3mL,200标准酒精度)和MTBE(5mL)中的混合物加热至回流同时搅拌以得到溶液。冷却至环境温度后,出现沉淀。悬浮液在室温搅拌过夜,然后真空-过滤,且滤饼用MTBE冲洗且在55℃真空干燥至恒重,得到结晶(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)吡咯烷-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺((1S,4R)-7,7-二甲基-2-氧代双环[2.2.1]庚-1-基)甲磺酸盐。

[0326] 实施例5

[0327] (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺盐的比较

[0328] (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺的其它盐形式,例如,盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐和樟脑磺酸盐(参见实施例4),与晶型(I-HS)比较,其通过测定它们的差示扫描量热法(DSC)熔点、动态蒸气吸附(DVS)增重和在40℃和75%相对湿度(RH)下在铝载物片上的稳定性。DSC和DVS测量如上所述进行,且结果总结于表14。

[0329] 表14. (S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺的结晶盐的物理化学性质

[0330]

结晶盐	DSC 熔点 开始至最大	DVS 增重 (结果)	在 40°C/75%RH 的稳定性 (铝载物片)
硫酸氢盐 (I-HS)	186-206°C	在 80% RH 增重 ~1% 在 95% RH 增重 2% 无变化	10 天 无形式变化
HCl	124-134°C	在 50% RH 增重 ~1% 在 50-60% RH 发生 形式变化	1 小时后发生形 式变化
HBr	177-185°C	在 80% RH 增重 ~3.9% 在 90% RH 增重 ~25% (潮解)	2 周后变为 非晶型
甲磺酸盐	183-186°C	在 80% RH 增重 ~9% 在 90% RH 增重 ~50% (结晶)	潮解过夜
樟脑磺酸盐	170-183°C	未测试	未测试

[0331] 实施例6

[0332] TrkA和TrkB酶测试

[0333] 使用Invitrogen的LanthaScreen™ Eu激酶结合技术测量化合物与Trk激酶结合的亲和力。简言之,在由25mM MOPS (pH 7.5)、5mM MgCl₂、0.005% Triton X-100及2% DMSO组成的缓冲液中将来自Invitrogen的His标记的重组人类Trk细胞质结构域(5nM TRK A-目录号PV3144或10nM TRK B-目录号PV3616)与5nM **Alexa-Fluor®** Tracer 236 (PR9078A)、2nM生物素化的抗His (目录号M4408)及2nM钼标记的抗生蛋白链菌素 (Streptavidin) (目录号PV5899) 连同测试化合物一起培育。通常以DMSO中的三倍连续稀释准备化合物并添加至测试中以得到适当的最终浓度。在22°C下培育60分钟后,使用PerkinElmer EnVision多模式板读取器经由TR-FRET双波长检测来测量反应,且使用比率发射因子计算控制百分比(POC)。100POC使用无测试化合物测定且0POC使用完全抑制酶的对照化合物的浓度测定。将POC值拟合至4参数逻辑曲线且IC₅₀值为其中曲线与50POC交叉的点。晶型(I-HS)在此分析中针对TrkA测试时具有8.4nM的平均IC₅₀,且在此分析中针对TrkB测试时具有4.2的平均IC₅₀。

[0334] 实施例7

[0335] TRK融合蛋白驱动肿瘤发生且被晶型(I-HS)抑制

[0336] 实施一组实验以确定晶型(I-HS)在具有不同Trk基因融合的三种不同癌症细胞系模型:CUTO-3F细胞系、KM12细胞系及MO-91细胞系中是否可抑制细胞增殖。CUTO-3F细胞源于患有具有MPRIP-NTRK1基因融合的肺腺癌的患者。KM12细胞系为具有TPM3-NTRK1融合的结肠直肠癌细胞系(Vaishnavi等人,Nature Med.19:1469-1472,2013)。MO-91细胞系源于

具有ETV6-NTRK3融合的急性髓细胞性白血病患者(Taipale等人,Nature Biotech.31:630-637,2013)。在利用晶型(I-HS)治疗后对细胞增殖的测量证实所有三种经测试细胞系中细胞增殖的剂量依赖性抑制(图8-10)。对于CUT0-3F细胞 IC_{50} 小于100nm(图8)且对于KM12细胞及MO-91细胞 IC_{50} 小于10nm(分别为图9及图10)。

[0337] 与对细胞增殖的抑制一致,使用低剂量的晶型(I-HS)在CUT0-3F细胞中观察到对MPRIIP-TRKA癌蛋白及ERK1/2的磷酸化的抑制(图11),使用低剂量的晶型(I-HS)在KM12细胞中观察到对TPM3-TRKA、pAKT及pERK1/2的磷酸化的抑制(图12),及使用低剂量的晶型(I-HS)在MO-91细胞中观察到对TEL-TRKC癌蛋白(由ETV6-NTRK3编码)、pAKT及pERK1/2的磷酸化的抑制(图13)。这些数据一起显示Trk融合蛋白具有组成性活性,且调控关键下游信号传导路径(例如MAPK及AKT),且受晶型(I-HS)抑制。这些数据也指示晶型(I-HS)可用于治疗表达失调的Trk(例如,Trk蛋白的组成性活性形式(例如,Trk融合蛋白或Trk点突变))的不同癌症。

[0338] 实施例8

[0339] 晶型(I-HS)成功治疗具有未分化肉瘤的受试者

[0340] 41岁女性在其左腹股沟中出现坚硬肿块。使用初始成像来证实其大腿前的肌肉系统中的10cm肿块。开放性活检揭露未分化肉瘤。初始分段扫描证实与转移性疾病一致的多个双侧4-13mm的肺小结节。该女性加入伴有化学疗法、手术前放射及保肢手术的索拉非尼2期试验(临床试验政府编号:NCT02050919)。在每日给药400mg的索拉非尼2周之后,患者接受每日30mg/m²的表柔比星及每日2,500mg/m²的异环磷酰胺以及连续3天的美司钠(mesna),且继续每日给药索拉非尼。在该5周的系统疗法期间肿瘤变得愈来愈疼痛。在模拟手术前放射期间,在腰肌内注意到肿瘤头盖形地扩展,此由于预计肠毒性而阻碍有效辐射剂量的安全给药。因此,患者停止了该方案且转至手术切除。

[0341] 原发性肿瘤的切除得到阴性边缘且病理样本的检查证实90%肿瘤坏死。在初始扫描后9周获得的再分期胸部CT(显示于图21A中)显示恶化转移性疾病,且现在所测量的最大的小结节为18mm。患者的手术后病程并发有多种微生物的创伤感染,其需要重复的创伤清创术和延长的抗生素疗法。在恢复化学疗法之前获得重复胸部CT,且证实在前9周期间急剧进展,且多个肺小结节大于3cm,最大的接近7cm,和大量左胸腔积液。在实施隧道式胸膜引流及开始补充性家庭氧气后,患者接受一次75mg/m²的多柔比星,同时等候加入利用晶型(I-HS)的治疗。

[0342] 使用FoundationOneHeme面板(Foundation Medicine,Cambridge,MA)测试患者的诊断性开放性肿瘤活检。使用数百个癌症相关的基因的DNA及RNA定序的此多靶标全面基因组剖析(CGP)测试证实存在产生LMNA-NTRK1融合基因的编码核纤层蛋白A/C基因(LMNA)的外显子1-2及NTRK1基因的外显子11-17的基因融合(图14)。CGP也显示丧失肿瘤抑制因子CDKN2A/B(未显示),但没有其它已知的致癌突变。

[0343] 随后,对患者的肿瘤样品实施的分离荧光原位杂交(FISH)分析在64%的肿瘤细胞核中展现占主要的单一3' NTRK1(红色荧光信号)图案,此与涉及NTRK1基因座的基因组改变一致,鉴于LMNA及NTRK1于染色体1的大臂上的位置及定向,此最可能继发于两个基因之间的基因体缺失(图15)。通过RT-PCR及定序证实来自基因融合的新颖融合转录本的mRNA表达(图16)。

[0344] 使用患者的肿瘤样品实施新颖邻位连接测试 (PLA) 以便评价融合癌蛋白的蛋白质表达及功能活性。PLA为独特的,因其可原位检测激酶与其适配体之一之间的功能信号传导复合物。在此测试中,测量与结合至TRKA激酶结构域中的Y496的其优选适配体SHC1复合的TRKA(图17)。该测试在人细胞系及福尔马林固定的患者源性肿瘤异种移植物(PDX)肿瘤样品中均得到验证(图18)。发现NTRK1的RNAi敲除如同用晶型(I-HS)抑制(图18D及18E)一样可破坏具有MPRIIP-NTRK1融合基因的CUTO-3细胞系中的TRKA-SHC1复合物(图18A-C)。TRK PLA检测来自具有MPRIIP-NTRK1基因融合的患者源性异种移植物(PDX)CULC001,而非没有已知致癌驱动子突变的PDX CULC002的FFPE肿瘤样品中的功能信号传导复合物(图18F及18G)。TRK-SHC PLA也可检测非致癌的信号传导复合物,如通过CULC001 PDX的外周神经组织的区域中的阳性信号所示,其中TRK家族的受体具有高表达(由神经营养因子介导的活性)。将此测试应用至患者的肿瘤样品证实与肿瘤细胞核相关的稳健信号传导,但在血管中仅微弱信号(人内皮细胞表达TRKA,与通过LMNA-TRKA癌蛋白的致癌信号传导一致(图19A及B)。TRK-SHC1 PLA在来自ALK+NSCLC患者的肿瘤样品上证实阴性结果,而ALK-GRB2 PLA为阳性(图20),此进一步证实此测试检测人类肿瘤样品中的致癌信号传导的能力。

[0345] LMNA-NTRK1融合的存在通过FoundationOneHeme测试检测,然后通过FISH及RT-PCR验证,连同患者肿瘤样品中的TRKA蛋白表达及TRK路径的功能活性的证据证明,该存在表明患者具有适于利用TRK特异性抑制剂治疗的TRK驱动的癌症。

[0346] 基于表明存在TRK驱动子致癌基因的多列遗传及功能生物标记物数据,建议患者考虑加入晶型(I-HS)的1期试验中。1个月,发现患者有资格进行该试验且提供书面知情同意书。基线CT扫描显示持续的肿瘤进展以及两个肺中多个大的肺转移,但在实施胸膜引流后胸腔积液消退(图21C)。基于临床表现,患者具有显著的运动性呼吸困难且需要5L补充性氧来维持90%的氧饱和度。基线实验室值因升高的CA125肿瘤标记物水平而值得注意(图22)。患者在开始连续给药前3天接受初始剂量的100mg晶型(I-HS),随后在同一天在约12小时后接受相同剂量,且根据研究方案进行48小时的药物动力学及安全性评价。患者在3天后开始循环1第1天。每周看望该患者以进行药物动力学及安全性分析。未注意到药物相关的不良事件,且患者在此4周的时段期间每周均经历运动性呼吸困难的改良。CA125水平在经历循环1后正常化。在开始循环2第1天之前实施CT,该CT证实多个肺转移的显著改良且通过RECIST 1.1认为部分响应。在循环3第1天之前实施重复CT且证实持续反应,且因此通过RECIST 1.1证实部分响应(图21C)。临床上,患者具有显著改良的运动性呼吸困难且不再需要补充性氧,且在室内空气中具有97%的氧饱和度。在给药4个月后,患者没有任何归因于晶型(I-HS)的不良事件。这些数据显示,晶型(I-HS)能够治疗受试者的未分化肉瘤,以及具有失调的Trk蛋白(例如,Trk蛋白的组成性活性形式,例如,Trk融合蛋白或Trk点突变)的其它癌症。

[0347] LMNA-NTRK1基因融合已于先前在Spitzoid痣中报道且在细胞中表达时经组成性活化从而引起ERK1/2、AKT及PLC γ 的活化,此证实其致癌性(Taipale等人,Nature Biotech.31:630-637,2013)。基础医学(Foundation Medicine,FM)先前已利用FoundationOneHeme CGP试验测试了1272个软组织肉瘤样品,检测到8种NTRK1或NTRK3融合,包括阐述于此宗报道中的患者(表15)。值得注意的是,具有NTRK融合的8名肉瘤患者中的6名在25岁以下(Fisher精确,P值=4x10⁻⁴),且8名中的4名在5岁以下(Fisher精确,P值=

2×10^{-5}), 指示在小儿患者中 (4.1%; 95%CI 1.8%-9.3%) 且具体而言在5岁以下者 (14.3%; 95%CI 5.7%-31.5%) 中NTRK融合的检测率有所增加。也感兴趣的是, 检测的基因融合中之一将NTRK3基因的大部分 (外显子1-17) 与HOMER2基因 (外显子2-9) 的3'端组合, 其含有二聚合结构域 (缠绕线圈结构域), 且因此代表已针对多种其它RTK编码基因 (例如EGFR、AXL及FGFR3) 阐述的3'基因融合事件 (Sleijfer等人, Eur.J.Cancer 46:72-83, 2010; Linch等人, Clin.Oncol. 11:187-202, 2014; Rutkowski等人, J.Eur.Acad.Dermatol.Venereol. 25:264-270, 2011)。

[0348] 表15. 软组织肉瘤患者的临床表征和NTRK融合基因详情

组织学	5'基因	5'最后一个外显子	3'基因	3'第一个外显子	性别	年龄
软组织肉瘤(nos) (n=179)	LMNA	2	NTRK1	11	F	41
软组织肉瘤(nos) (n=179)	LMNA	10	NTRK1	11	M	22
软组织纤维肉瘤 (n=28)	LMNA	10	NTRK1	12	M	不到5岁
软组织纤维肉瘤 (n=28)	SQSTM1	2	NTRK1	10	F	不到5岁
软组织神经鞘瘤 (n=3)	TPM3	7	NTRK1	10	M	不到5岁
软组织血管瘤 (n=4)	ETV6	5	NTRK3	15	F	不到5岁
软组织孤立性纤维肉瘤 (n=28)	TFG	6	NTRK3	14	M	17
软组织肉瘤(nos) (n=179)	NTRK3	17	HOMER2	2	F	68

[0350] 另外, 进行实验以显示晶型 (I-HS) 特异性地抑制Trk激酶的活性。例如, 晶型 (I-HS) 未抑制源于表达SLC34A2-R0S1融合蛋白的非小细胞肺癌的HCC78细胞系的细胞增殖 (图23) (Vaishnavi等人, Nat Med. 19:1469-72, 2013)。

[0351] 材料及方法

[0352] 临床试验

[0353] NCT02122913为持续的多中心1期剂量递增研究, 其评估晶型 (I-HS) (选择性pan-TRK) 在没有标准治疗选项的患有转移性或晚期实体肿瘤的未经选择的患者中的安全性及药物动力学。该研究在所有登记患者的机构处皆经Institutional Review Boards批准, 且合格患者提供书面知情同意书以参加。晶型 (I-HS) 以100mg胶囊提供。经登记患者根据修改的3+3设计接受递增剂量的晶型 (I-HS), 且每天一次或每天两次接受晶型 (I-HS) 直至不可耐受的毒性、疾病进展或撤销同意书为止。在患有可测量疾病的患者中, 根据RECIST 1.1标准评价功效。

[0354] 下一代定序 (NGS)

[0355] 提取DNA及RNA且通过使用靶向405个癌症相关的基因及31个频繁重排基因 (通过DNA-seq) 及265个频繁重排基因 (通过RNA-seq) (FoundationOne Heme) 的定制诱饵集进行溶液杂交来捕获适配体连接的定序文库。所有经捕获文库皆在CLIA认证的CAP认可的实验室 (Foundation Medicine) 中经高深度定序 (Illumina HiSeq), 平均>500x (对于DNA而言) 和>6M独特对 (对于RNA而言)。将gDNA及cDNA的序列数据映射至参考人类基因组 (hg19) 且通过计算分析管线进行分析以获知样品中存在的基因组改变, 包括取代、短插入及缺失、重排及拷贝数变化。

[0356] 荧光原位杂交 (FISH)

[0357] 使用Vysis LSI NTRK1 (Cen) SpectrumGreen (目录号08N43-030) 及Vysis LSI NTRK1 (Tel) SpectrumRed (Abbott Molecular, 分别编号08N43-030和08N43-020) 对如先前所阐述的福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 的肿瘤样品的4微米载玻片实施NTRK1分离FISH (Vaishnavi等人, Cancer Discov. 5:25-34, 2015)。

[0358] RT-PCR和DNA定序

[0359] 如先前所阐述使用LMNA的正向引物(LMNA F1,5' gagggcgagctgcatgat3';SEQ ID NO:1)(Weisner等人,Nat.Comm.5:3116,2014)及NTRK1的反向引物(NTRK1 Y490rev,5' cggcgcttgatgtggtgaac3';SEQ ID NO:2)实施反转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)。在科罗拉多大学的Pathology Core处使用Sanger DNA定序实施RT-PCR产物的DNA定序。

[0360] 细胞系

[0361] 获得知情同意书以自患者取得永生细胞系。CUTO-3细胞系及其衍生物为源于具有如先前所阐述的MPRIP-NTRK1基因融合的IV期肺腺癌患者的恶性胸腔积液(Vaishnavi等人,Cancer Discov.5:25-34,2015;Davies等人,PLoS One 8:e82236,2013)。KM12和M0-91之前已描述(Vaishnavi等人,Nature Med.19:1469-1472,2013;Taipale等人,Nat.Biotech.31:630-637,2013)。

[0362] 患者源性异种移植物生成

[0363] 自患者获得知情同意书以生成患者源性鼠类异种移植物。将来自致癌基因阴性肺腺癌患者(CULC001)的肿瘤组织切割成 $3 \times 3 \times 3$ mm碎片,将这些碎片转移至补充有10%胎牛血清(FBS)及200单位/mL青霉素及200ug/mL链霉素的DMEM中。将肿瘤碎片浸入基质胶(Corning)中并将其插入5只裸小鼠的每一侧腹上的切口中。将来自具有MPRIP-NTRK1基因融合的肺腺癌患者的胸膜液体(CULC002)离心并将所得细胞团粒于5ml ACK缓冲液(Lonza)中悬浮2min,使得红细胞完全溶解。通过添加20mL PBS停止溶解并将样品离心。用PBS将团粒洗涤两次,之后将其悬浮于上述DMEM补充培养基中。将悬浮于DMEM及基质胶的1:1混合物(BD)中的100 μ l细胞(1×10^6 个/侧腹),经皮下注射至5只裸小鼠的侧腹中。所得异种移植物的繁殖及维持为如先前所阐述(Keysar等人,Mol.Oncol.7:776-790,2013)。

[0364] 邻位连接测试

[0365] 以25-75k细胞/孔将细胞接种至玻璃盖玻片(在48孔板中)或腔室载玻片上。用指示剂量及次数处理细胞,然后通过室温下在4%多聚甲醛中振荡固定15分钟。将细胞在PBS中冲洗两次,且然后根据制造商的方案(目录号DUO92101)在鼠/兔(Red)中使用来自SigmaAldrich的Duolink®原位PLA®试剂盒。在PLA实验前使用免疫荧光优化抗体浓度。如组织学中所阐述制备小鼠或患者的FFPE组织PLA。另外,在阻断步骤之前利用300mM甘氨酸将样品处理15分钟,否则根据制造商的方案进行测试。使用Prolong®金抗衰减试剂(具有DAPI)固定细胞且固化过夜,之后使其成像。在Nikon标准倒置荧光显微镜上在40 $\times$ 下或在University of Colorado Anschutz Medical Campus Advance Light Microscopy Core中的3I Marianas旋转盘式共焦上在40 $\times$ 或100 $\times$ 下拍摄影像。使用以下抗体:来自Cell Signaling的TRK(C17F1)及ALK(D5F3)、来自Novus的SHC1,及来自BD的Grb2(610111)。

[0366] 增殖测试

[0367] 所有增殖测试皆在如先前所阐述的补充有5%FBS的培养基中使用Cell Titer 96 MTS(Promega)来实施(Bouhana等人,EORTC-NCI-AACR 26th Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics,Barcelona,Spain 2014)。以500-2000个细胞/孔接种细胞并在对每一图表中所述的药物浓度下处理72小时。以至少3个独立的生物复制物一式三份实施每一测试。绘制数据的图形且使用GraphPad软件计算IC50值。

[0368] 免疫印迹

[0369] 如先前所阐述进行免疫印迹 (Vaishnavi 等人, Nature Med. 19:1469-1472, 2013)。简言之, 在具有 Halt 蛋白酶及磷酸酶抑制剂混合剂 (Thermo Scientific) 的 RIPA 缓冲液中裂解细胞并在负载缓冲液 (LI-COR Biosciences) 中稀释。扫描膜且使用 Odyssey Imaging System 及软件 (LI-COR) 进行分析。使用来自 Cell Signaling 的以下抗体: pTRK Y490 (兔多克隆, 编号 9141)、pERK1/2 XP T202/Y204 (编号 9101)、总 ERK1/2、pAKT S473 (兔 mAb, 编号 4060) 及总 AKT 小鼠克隆 D3A7 (编号 2920)。TRK (C-14) 兔多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology。GAPDH (MAB374) 及 pTYR (4G10) 为来自 Millipore。

[0370] 统计学分析

[0371] 使用 1-样品比例测试计算肉瘤患者的样品中的 NTRK 融合的检测率的置信区间。疾病组织学分类基于基础医学疾病本体。使用 Fisher 精确测试测试 NTRK 融合在较年轻患者群组中的富集。所有统计测试皆根据 R v 3.1.3 实施。

[0372] 实施例 9

[0373] 具有 NTRK 基因融合的实体肿瘤患者中晶型 (I-HS) (一种选择性 TRKA/B/C 抑制剂) 的 1 期研究的临床安全性及活性

[0374] 方法

[0375] 在晶型 (I-HS) 的此持续的开放性标记的多中心 3+3 剂量递增 I 期研究中, 招募了 23 名患有对标准疗法不显疗效、具有正常的造血及主要器官功能的实体肿瘤患者。以单一剂量口服给药晶型 (I-HS), 随后 QD 或 BID 剂量保持连续 28 天的循环。通过 RECIST 标准版本 1.1 测量反应。在循环 1 第 1 天及第 8 天收集血清用于药物动力学分析。对所有患者收集安全性信息, 且无论与研究产品的关系如何均将剂量限制性毒性的定义应用至不良事件。

[0376] 结果

[0377] 迄今, 以在 50mg QD 至 150mg BID 范围内的前 5 个剂量水平的每一个治疗 23 名患者。晶型 (I-HS) 耐受良好; 尚未达到 MTD 且最常见的不良事件为 1 级及 2 级疲劳 (35%)、晕眩 (26%) 及贫血 (22%)。两个患者具有剂量限制性毒性 (升高的 AST, 3 级 (剂量水平 150mg BID) 及谵妄, 3 级不相关 (剂量水平 100mg BID))。

[0378] PK 分析显示在给药后 30-60 分钟达到晶型 (I-HS) 的最大血浆浓度且暴露以与剂量近似成比例增加。晶型 (I-HS) 的未结合药物水平对于在峰浓度下在所有剂量水平下对 TRKA/B/C 的约 98% 抑制似乎为足够的。

[0379] 23 名患者中的 3 名具有 NTRK 融合且在 100mg BID 或 150mg BID 下进行治疗。这些患者达成部分反应: 具有 LMNA-NTRK1 融合的未分化肉瘤 (59% 降低; 7 个循环+)、具有 ETV6-NTRK3 融合的 c-kit 阴性 GI 基质瘤 (GIST) (30% 降低; 2 个循环+), 及具有 ETV6-NTRK3 融合的乳房类似分泌型癌 (64% 降低; 2 个循环+)。这些数据通过 TRK 融合的异种移植小鼠模型中的体内肿瘤生长抑制及消退来支持。

[0380] 结论

[0381] 晶型 (I-HS) 耐受良好且对于 NTRK 融合的稳健抑制具有足够的全身暴露, 如通过药代动力学药物水平及在纳入此研究的 3 名 NTRK 融合患者中观察到的持续临床反应来证实。这些数据进一步验证此分子靶标为多种肿瘤组织学中的致癌驱动子。

[0382] 实施例 10

[0383] 晶型 (I-HS) 和非晶型硫酸盐的比较

[0384] 进行多个实验以比较非晶型(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐和晶型(I-HS)的性质。这些研究包括杂质概况、稳定性、流动性质及吸湿性。在以下研究中,将两批非晶型材料(AM(HS) 1及AM(HS) 2)与单一批次晶型(I-HS)相比较。AM(HS) 1和AM(HS) 2如实施例3所述制备。晶型(I-HS)如实施例2所述制备。

[0385] 方法

[0386] 残余溶剂

[0387] AM(HS) 1、AM(HS) 2和晶型(I-HS)的溶液使用GC-MS顶部空间分析进行分析。

[0388] 热重量分析(TGA)

[0389] 将样品置于铂盘上并经受10°C/分钟至300°C。

[0390] 差示扫描量热法(DSC)

[0391] 将样品置于在盖中具有针孔的卷边铝坩埚中并在氮下经受10°C/分钟至250°C。

[0392] X-射线衍射(XRD)

[0393] 在44kV下,40mA,使Cu K α 照射通过Ni过滤器,利用2/3°的发散狭缝,10mm的发散H.L.狭缝,散射狭缝设为“Auto”(散射狭缝通过计算机/仪器来确定),0.3mm的接收狭缝。以2°/min自3°至40°2 θ 连续扫描;0.02°/秒的取样宽度(步长大小),0.4点/秒的步长时间。将样品在平行于样品表面的平面上以60rpm旋转。

[0394] 偏振光显微术(PLM)

[0395] 将样品置于玻璃显微镜载玻片上,将其浸没于低粘度油中并用玻璃盖玻片覆盖。利用正交偏光镜片及530nm截止滤波器在20×物镜下检查。利用PAX-It相机进行成像且通过PAX-It软件处理。

[0396] 动态蒸气吸附(DVS)

[0397] 1.使用IGAsorp分析仪在25°C下研究吸湿性。

[0398] 2.将约15mg样品置于配衡网式样品架中,将初始环境室内湿度设为约35%。

[0399] 3.在整个研究中使用250cc/min的总湿/干氮气流速。

[0400] 4.通过实施一个以下程序的完整循环研究固体:在40°C下在干N₂下干燥60分钟,随后设定0%RH、10%RH、20%RH、30%RH、40%RH、50%RH、60%RH、70%RH、80%RH、90%RH及95%RH,其中在每一湿度设定点下的暴露时间取决于F1拟合模型中的99.5%置信度或60分钟。任何一个湿度设定点下的允许最大时间为120min。在完成循环后在干N₂下保持样品。

[0401] 以干重量为基础计算重量增加%。

[0402] 第一部分:晶型(I-HS)的物理表征

[0403] 通过外观、残余溶剂、热重分析(TGA)、Karl Fischer水含量(KF)、差示扫描量热法(DSC)、X射线衍射(XRD)、偏振光显微术(PLM)及通过动态蒸气吸附(DVS)的吸湿性来表征AM(HS) 1、AM(HS) 2及晶型(I-HS)。三个批料的物理表征的数据可参见表16-19及图24至38。

[0404] 表16.外观

[0405]

化合物	外观	Munsell#
AM(HS) 1	黄色粉末,无聚集体	7.5Y 9/10
AM(HS) 2	黄色粉末,无聚集体	7.5Y 9/10
结晶I-HS	橙色粉末,无聚集体	2.5YR 7/10

[0406] 表17.残余溶剂

化合物	溶剂 (ppm)					
	乙醇	甲醇	甲基叔丁基醚	庚烷	四氢呋喃	甲基乙基酮
[0407] AM(HS)1	未检测到	1075	未测试	未测试	未测试	未测试
AM(HS)2	174	7369	未测试	未测试	未测试	未测试
结晶 I-HS	4783	未测试	未检测到	未检测到	未检测到	3046

[0408] 表18.热重和Karl Fischer(水含量)分析

化合物	热重量分析			KF (w/w %)
	起始 (°C)	停止 (°C)	变化 (%)	
[0409] AM(HS)1	24.78	111.94	3.78	2.00
	111.94	186.94	3.09	
AM(HS)2	31.53	100.21	1.94	0.88
	100.21	174.86	3.07	
结晶 I-HS	23.77	218.58	6.01	0.28

[0410] 表19.差示扫描量热法分析

化合物	差示扫描量热法					
	类型	起始 (°C)	发生(°C)	最大(°C)	停止 (°C)	ΔH (J/g)
[0411] AM(HS)1	吸热	28.7	29.9	68.3	115.8	153.7
	吸热	124.1	126.1	152.8	191.0	58.3
	吸热	204.7	205.6	211.2	220.1	7.5
AM(HS)2	吸热	29.6	29.8	70.7	107.2	70.0
	吸热	113.7	116.0	140.3	167.0	32.7
	吸热	205.6	207.2	213.8	221.3	4.8
结晶 I-HS	吸热	181.9	193.7	204.6	213.8	98.9

[0412] 物理表征结论

[0413] API形式AM(HS)1及AM(HS)2为通过偏振光显微术无双折射的非晶型,且两个批次的XRPD图谱也为明显的非晶型,其中无可辨别的x射线衍射峰。非晶型化合物的TGA显示逐步重量损失,此与在差示扫描量热法中观察到的吸热事件一致。前两个吸热事件相当宽且可指示蒸发和/或去溶剂化。最后的吸热事件在结晶材料中观察到的熔融的近似温度下发生。两个非晶型批次的吸湿性相当强,且在解吸附后显著滞后。AM(HS)1在80%RH下增加了其初始质量的大于13%。同样,AM(HS)2在80%RH下增加了其起始质量的近12%。DVS后的XRPD指示在动态蒸气吸附期间无形式变化,然而观察到在样品架中潮解的粉末使得难以自样品架去除潮解粉末。

[0414] 晶型(I-HS)具有结晶性质,其中呈其积聚物状形态时具有许多衍射峰(通过x射线衍射)和真实的双折射(通过偏振光显微术)。晶型(I-HS)显示6%的热重量损失,此与在193.7°C下发生的吸热熔融合起始一致。晶型(I-HS)不具有吸湿性,且在80%RH下仅增加其起始质量的1%。

[0415] 第二部分:晶型(I-HS)的粉末性质

[0416] 以下研究将结晶硫酸氢盐与非晶型硫酸盐粉末相比较,包括每一形式的对于制造固体口服剂型(例如片剂或胶囊)较为重要的流动性质的研究。所进行的工作包括堆积密

度、振实密度、静止角及压缩概括。

[0417] 共混物

[0418] 根据表20及21中呈现的配方产生共混物。这些共混物可作为基于直接压缩或碾压的片剂或经配制的胶囊制造的片剂制剂的典型。首先,将API(即,AM(HS)或晶型(I-HS))、微晶纤维素(MCC)及淀粉或乳糖添加至30cc琥珀色玻璃瓶中并在TURBULA® Shaker混合器上以25rpm混合3分钟。然后,将剩余赋形剂添加至瓶中并在TURBULA®上以25rpm再混合3分钟。

[0419] 表20.具有2:1 MCC:乳糖、50%药物负载的片剂制剂

组分	级别	目的	百分比	目标质量(g)	结晶	非结晶
					实际质量(g)	实际质量(g)
API	NA	药物物质	50.00	2.500	2.5004	2.5009
MCC	PH102 NF	稀释剂	30.30	1.515	1.5152	1.5153
乳糖	Fast-Flo 316	稀释剂	15.20	0.760	0.7603	0.7602
交联羧甲基纤维素钠	Ac-Di-Sol	崩解剂	3.00	0.150	0.1503	0.1498
二氧化硅	Cabosil	助流剂	1.00	0.050	0.0502	0.0497
硬脂酸镁	USP-NF	润滑剂	0.50	0.025	0.0248	0.0254
总计			100.00	5.000	5.0012	5.0013

[0421] 表21.具有1:1 MCC:淀粉、50%药物负载的片剂制剂

组分	级别	目的	百分比	目标质量(g)	结晶	非结晶
					实际质量(g)	实际质量(g)
API	N/A	药物物质	50.00	2.500	2.4994	2.4998
MCC	PH102 NF	稀释剂	22.75	1.138	1.1385	1.1387
预胶化淀粉	StarCap 1500	稀释剂	22.75	1.138	1.1385	1.1376
交联羧甲基纤维素钠	Ac-Di-Sol	崩解剂	3.00	0.150	0.1507	0.1503
二氧化硅	Cabosil	助流剂	1.00	0.050	0.0500	0.0498
硬脂酸镁	USP-NF	润滑剂	0.50	0.025	0.0252	0.0250
总计			100.00	5.000	5.0023	5.0012

[0423] 静止角

[0424] 静止角为通过表面的水平基线与颗粒的圆锥体样堆的边缘形成的角度。其为自以下等式来计算:

$$[0425] \quad \theta = \tan^{-1}\left(\frac{h}{r}\right)$$

[0426] 通过以下测量静止角:通过具有3/16"出口内径的漏斗缓慢倾倒约1g样品。然后使粉末降落1 11/16"以着陆于颠倒的结晶皿的表面上,在其上形成粉末堆。在添加所有材料后拍摄堆的图片。经由量角器在图片上测量结晶皿表面与堆表面之间的角度。在不同样品间的设置中小心地复制相同位置及降落距离。

[0427] 堆积密度和振实密度

[0428] 通过与量筒不直接接触的漏斗将粉末添加至预称重的10mL量筒中以避免振动的转移。添加粉末直至达到10mL体积且然后称重具有粉末的量筒。通过以下计算堆积密度:

$$\text{堆积密度} = \frac{(\text{量筒+粉末的质量}) - \text{空量筒的质量}}{10\text{mL}}$$

量筒中的该样品用以下顺序敲击:100次敲

击、150次敲击、250次敲击、250次敲击。在每一间隔后测量体积。通过通过以下计算振实密度:

$$\text{振实密度} = \frac{(\text{量筒+粉末的质量}) - \text{空量筒的质量}}{\text{总共 750 次敲击后的体积}}$$

[0429] 根据以下等式计算卡尔指数:

$$\text{CI} = \frac{\rho_{\text{敲击}} - \rho_{\text{散装}}}{\rho_{\text{敲击}}} \times 100$$

[0431] 利用以下等式计算Hausner比:

$$\text{HR} = \frac{\rho_{\text{敲击}}}{\rho_{\text{散装}}}$$

[0433] 压缩概况

[0434] 通过针对每一共混物在5个不同的压缩压力下产生5/16”直径的圆形片剂生成压缩概况。压制设定为1秒停留时间及15%泵速度。使用700kg、1000kg、1500kg及2000kg的压缩力针对所有四种粉末共混物产生片剂。基于先前片剂的结果选择最高压缩力。然后测量片剂质量、尺寸及破裂力。使用模板绘制这些数据的图形,产生压缩压力对拉伸强度的图形(图39)。

[0435] 结果

[0436] 表22. 参考值

流动特征	静止角	Hausner比	压缩指数(%)
优异	25-30°	1.00-1.11	≤10
良好	31-35°	1.12-1.18	11-15
一般	36-40°	1.19-1.25	16-20
尚可	41-45°	1.26-1.34	21-25
差	46-55°	1.35-1.45	26-31
非常差	56-65°	1.46-1.59	32-27
非常非常差	≥66°	≥1.60	≥38

[0438] 结果呈现于表23及24及图39中。根据美国药典规约(U.S. Pharmacopeial Convention, USP), 所有样品皆归入流动尚可或较差的类别, 如通过静止角所测量。角度愈大指示流动愈差。根据USP卡尔指数(压缩指数)及Hausner比归于尚可与非常差之间。结晶API与非晶型API显著不同且这些差异存在于所有调配共混物中(无论非晶型或结晶API的含量如何)。对于结晶API, Hausner比及卡尔指数指示流动性质“尚可”。非晶型API具有相当差的流动性质, 根据Hausner比及卡尔指数被归类为“非常差”。对于相关USP表, 参见表22..

[0439] 当产生用于所述压缩概况的片剂时, 结晶API共混物产生多个在自工具加工喷出后破裂的片剂。非晶型API共混物似乎产生视觉上更好的片剂, 即极少破裂甚至无破裂。

[0440] 表23. 静止角

样品	$\theta(^{\circ})$	$\varphi(^{\circ})$	平均($^{\circ}$)
L-ARR10-118	50.28	50.28	50.28
AR00457470-33	47.79	43.6	45.70
2:1 MCC:乳糖 L-ARR10-118	45.21	41.81	43.51
2:1 MCC:乳糖 AR00457470-33	41.01	42.64	41.83
1:1 MCC:淀粉 L-ARR10-118	39.52	41.01	40.27
1:1 MCC:淀粉 AR00457470-33	40.44	48.59	44.52

[0442] * θ 和 φ 为在锥体任一侧的角(2D)。

[0443] 表24. 堆积密度和振实密度

样品	堆积密度 (mg/mL)	振实密度 (mg/mL)	卡尔指 数	Hausner 比
L-ARR10-118	594.8	762.6	22%	1.28
AR00457470-33	423.6	622.9	32%	1.47
2:1 MCC:乳糖 L-ARR10-118	435.3	621.9	30%	1.43
2:1 MCC:乳糖 AR00457470-33	408.1	583.0	30%	1.43
1:1 MCC:淀粉 L-ARR10-118	437.9	625.5	30%	1.43
1:1 MCC:淀粉 AR00457470-33	411.4	605.0	32%	1.47

[0446] 粉末性质结论

[0447] 根据静止角,所测试的晶型(I-HS)配制共混物、非晶型API及非晶型API配制共混物具有“非常差”流动特征。然而,根据卡尔指数及Hausner比,结晶API(晶型(I-HS))具有“尚可”的流动特征。此处明显更好的流动性质有利于固体口服剂型研发及制造。具有两批粉末的两种共混物的压缩概况方面也没有大的差异。此指示(S)-N-(5-((R)-2-(2,5-二氟苯基)-吡咯烷-1-基)-吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)-3-羟基吡咯烷-1-甲酰胺硫酸氢盐(非结晶或结晶)均不会正性及负性地影响50%药物负荷下的共混物的流动。

[0448] 第三部分:AM(HS)1及晶型(I-HS)的稳定性

[0449] 将AM(HS)1及晶型(I-HS)的粉末的等分样品置于非加盖(开放)的20mL闪烁小瓶中,并将小瓶置于放入在40°C/75%RH下维持5周的稳定性室中的LDPE袋中。在自室移出后,通过外观、KF、TGA、DSC、XRD及PLM来物理表征样品。也通过HPLC分析样品的色谱纯度、手性完整性及效能。若适用,稳定性部分中呈现的数据也包括初始T=0数据用于比较目的。数据可参见表25-29及图40至44。

[0450] 表25. 稳定性样品的外观

化合物	条件	时间点 (周)	外观	Munsell #
AM(HS)1	NA	0	黄色粉末, 无聚集体	7.5Y 9/10
AM(HS)1	40 °C/75% RH	5	橙色粉末, 有一些聚集体	2.5YR 7/10
晶型(I-HS)	NA	0	橙色粉末, 无聚集体	2.5YR 7/10
晶型(I-HS)	40 °C/75% RH	5	橙色粉末, 无聚集体	2.5YR 7/10

[0452] 表26. 稳定性样品的TGA和KF

化合物	条件	时间点 (周)	热重量分析			KF (w/w %)
			起始 (°C)	停止 (°C)	变化 (%)	
AM(HS)I	NA	0	24.78	111.94	3.78	2.00
			111.94	186.94	3.09	
AM(HS)I	40 °C/75% RH	5	36.27	217.16	5.32	0.56
晶型(I-HS)	NA	0	23.77	218.58	6.01	0.28
晶型(I-HS)	40 °C/75% RH	5	36.66	217.87	6.00	0.21

[0454] 表27. 稳定性样品的DSC

化合物	条件	时间 点 (周)	差示扫描量热法					ΔH (J/g)
			类型	起始 (°C)	发生 (°C)	最大 (°C)	停止 (°C)	
AM(HS)I	NA	0	吸热	28.7	29.9	68.3	115. 8	153. 7
			吸热	124.1	126.1	152.8	191. 0	58.3
			吸热	204.7	205.6	211.2	220. 1	7.5
AM(HS)I	40 °C/75% RH	5	吸热	182.7	196.7	206.3	217. 7	95.9
晶型 (I-HS)	NA	0	吸热	181.9	193.7	204.6	213. 8	98.9
晶型 (I-HS)	40 °C/75% RH	5	吸热	181.3	193.4	204.1	214. 1	99.4

[0456] 表28. 稳定性样品的HPLC数据

化合物	条件	时间点 (周)	总杂质 (%)	测试 (%)	手性能力 (%)
AM(HS)I	NA	0	1.10	79.5	99.6
AM(HS)I	40 °C/75% RH	5	1.16	80.3	99.6
晶型(I-HS)	NA	0	0.14	79.4	99.6
晶型(I-HS)	40 °C/75% RH	5	0.07	79.6	99.6

[0458] 表29. HPLC数据: 稳定性样品的峰面积百分比, 通过RRT

样品	条件	时间点 (周)	RRT				
			0.793	0.863	0.981	1.000	1.535
AM(HS)I	NA	0	0.00	0.98	0.12	98.89	0.00
	40 °C/75% RH	5	0.00	1.04	0.12	98.83	0.00
晶型(I-HS)	NA	0	0.07	0.00	0.00	99.86	0.07
	40 °C/75% RH	5	0.07	0.00	0.00	99.93	0.00

[0460] 稳定性结论

[0461] 非晶型化合物AM (HS) I在潮湿条件下不稳定且经一定时间段倾向于结晶。此可通过在湿度室中保存的样品的潮解及变化的外观(通过眼睛及偏振光显微术)来证实(未显示数据)。非晶型材料从自由流动的黄色粉末变为橙色积聚的非自由流动粉末。非晶型API的

偏振光显微术、XRPD、DSC、TGA及KF在加速稳定性研究的过程期间也发生显著变化,从而变为与晶型(I-HS)相同的多晶型。在加速稳定性研究的过程期间非晶型化合物AM(HS) 1的XRPD图谱转变为晶型(I-HS)的XRPD图谱。偏振光显微术在正交偏振光下自非双折射变为双折射,此指示非晶型变化为结晶API。 $t=0$ 时的DSC具有两个吸热事件,其熔融最大值为68.3℃及152.8℃,这些事件在 $t=5$ 周时间点时消失。对于非晶型材料只剩下熔融最大值为206℃的单一吸热事件。此熔融最大值匹配结晶API的温谱图。 $t=5$ 周时的非晶型材料的TGA曲线也发生变化以匹配结晶API的曲线及重量损失。晶型(I-HS)在加速条件下储存后无论在吸湿性还是色彩、形态或结晶性方面都未出现任何变化。

[0462] AM(HS) 1或晶型(I-HS)的API化学纯度在稳定性研究的过程期间未发生显著变化。然而,非晶型及晶型(I-HS)的杂质概况为显著不同的。非晶型材料含有显著高于晶型(I-HS)的杂质含量(表22及23)。据信在相对保留时间(RRT) 0.863(0.00%相对于0.98%)及1.535(0.00%相对于0.12%)下晶型(I-HS)相对于非晶型AM(HS) 1的减少的杂质为经由该结晶方法分离晶型(I-HS)引起的,该方法排斥这些杂质且优于分离非晶型AM(HS) 1的方法。非晶型AM(HS) 1分离方法似乎不会有效排斥这些杂质。

[0463] 研究的总体概述

[0464] 1.晶型(I-HS)具有好于非晶型形式AM(HS)的流动性质。相对于AM(HS),流动性质的差异将改良固体口服剂型晶型(I-HS)的研发。

[0465] 2.在LDPE袋中在40℃/75%RH下保持5周的稳定性研究对于化合物的任何形式均未显示化学杂质水平的显著变化。然而,其揭露晶型(I-HS)在该研究的过程期间在其物理化学性质方面未发生显著变化。相反,根据XRPD、DSC、TGA、KF及偏振光显微术,AM(HS)转化为基本上类似于晶型(I-HS)的晶型。另外,AM(HS)在稳定性测试的过程期间变为流动性质有所降低的积聚粉末。在储存AM(HS)后非晶型AM(HS)性质变为流动能力有所降低的结晶材料和/或积聚粉末将使得无法制造供患者使用的基于非晶型化合物的固体口服剂型。

[0466] 3.AM(HS)在暴露于湿度时有所潮解。此在储存及制造期间将需要取显著处置防范措施以预防此发生,而在晶型(I-HS)及使用晶型(I-HS)制备的任一固体口服剂量产品的制造期间,晶型(I-HS)不需要这些防范措施。

[0467] 4.晶型(I-HS)提供与AM(HS)相比显著改良的杂质概况。控制杂质概况的能力对于患者安全性较为重要且为监管机构所要求的。

[0468] 实施例11

[0469] 晶型(I-HS)降低特征在于表达Trk融合蛋白的肿瘤的生长

[0470] 进行一组实验以确定晶型(I-HS)是否会抑制小鼠中三种不同的异种移植瘤(人)肿瘤的生长,其中每一异种移植瘤均源于癌症细胞系。该三种不同的癌症细胞系为CUTO-3F细胞系、KM12细胞系及M0-91细胞系,每一者均表达不同的Trk基因融合。如实施例7中所阐述,CUTO-3F细胞系源于患有具有MPRIIP-NTRK1基因融合的肺腺癌的患者,KM12细胞系为具有TPM3-NTRK1融合的结肠直肠癌细胞系(Vaishnavi等人,Nature Med.19:1469-1472,2013),且M0-91细胞系源于具有ETV6-NTRK3融合的急性髓细胞性白血病患者(Taipale等人,Nature Biotech.31:630-637,2013)。在小鼠中植入该三种不同异种移植瘤(人类)肿瘤之一之后,监测每一肿瘤的体积的变化。在植入异种移植瘤后对所得小鼠用载体治疗或经口服给药60mg/kg或200mg/kg的日剂量的晶型(I-HS)(分别为图45至47)。

[0471] 这些数据显示晶型(I-HS)的给药能有效阻止哺乳动物中特征在于表达致癌Trk融合蛋白的人类肿瘤的生长,或降低这些肿瘤生长的速率。

[0472] 尽管上述说明书教导本发明的原理,且实施例为出于图解说明的目的来提供,但应理解本发明的实践涵盖所有常见变化、改动及/或修改,其同样在以下权利要求及其等效物的范围内。

[0473] 参考文献:

[0474] 1.Wiesner等人,Nature Comm.5:3116,2014.

[0475] 2.Vaishnavi等人,Nature Med.19:1469-1472,2013.

[0476] 3.Greco等人,Mol.Cell.Endocrinol.28:321,2010.

[0477] 4.Kim等人,PloS ONE 9(3):e91940,2014.

[0478] 5.Vaishnavi等人,Nature Med.19:1469-1472,2013.

[0479] 6.Fernandez-Cuesta等人,“Cross-entity mutation analysis of lung neuroendocrine tumors sheds light into their molecular origin and identifies new therapeutic targets,”AACR Annual Meeting 2014,Abstract,April 2014.

[0480] 7.Stransky等人,Nature Comm.5:4846,2014.

[0481] 8.Ross等人,Oncologist 19:235-242,2014.

[0482] 9.Doebele等人,J.Clin.Oncol.32:5s,2014.

[0483] 10.Jones等人,Nature Genetics 45:927-932,2013.

[0484] 11.Wu等人,Nature Genetics 46:444-450,2014.

[0485] 12.WO 2013/059740

[0486] 13.Zheng等人,“Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing,”Nature Med.,published online on November 10,2014.

[0487] 14.Carria等人,Cancer Genet.Cytogenet.203:21-29,2010.

[0488] 15.Frattini等人,Nature Genet.45:1141-1149,2013.

[0489] 16.Martin-Zanca等人,Nature 319:743,1986.

[0490] 17.Meyer等人,Leukemia 21:2171-2180,2007.

[0491] 18.Reuther等人,Mol.Cell.Biol.20:8655-8666,2000.

[0492] 19.Marchetti等人,Human Mutation 29(5):609-616,2008.

[0493] 20.Tacconelli等人,Cancer Cell 6:347,2004.

[0494] 21.Walch等人,Clin.Exp.Metastasis 17:307-314,1999.

[0495] 22.Papatsoris等人,Expert Opin.Invest.Drugs 16(3):303-309,2007.

[0496] 23.Van Noesel等人,Genes 325:1-15,2004.

[0497] 24.Zhang等人,Oncology Reports 14:161-171,2005.

[0498] 25.Truzzi等人,J.Invest.Dermatol.128(8):2031,2008.

[0499] 26.Kolokythas等人,J.Oral Maxillofacial Surgery 68(6):1290-1295,2010.

[0500] 27.Ni等人,Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 13:1511,2012.

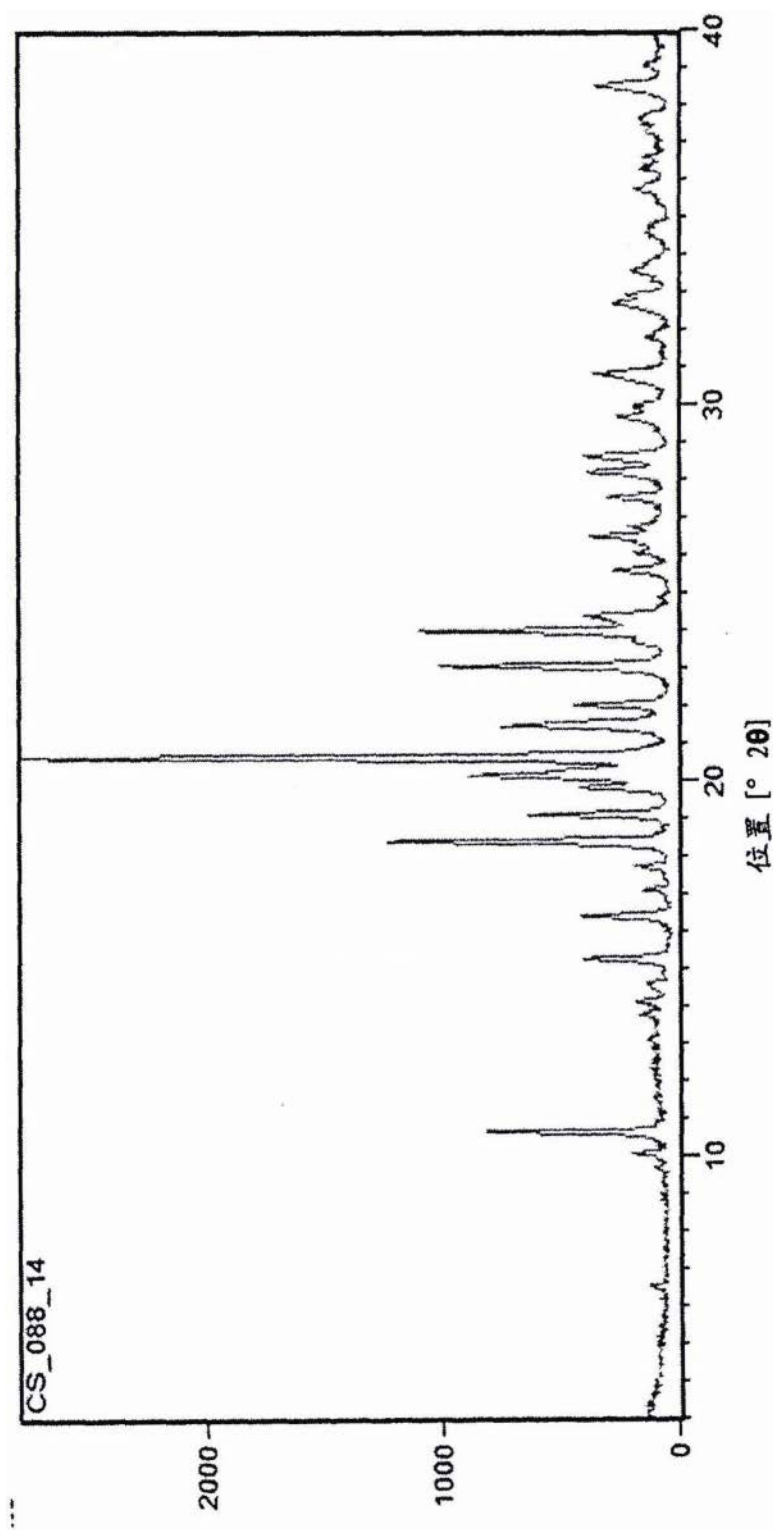


图1

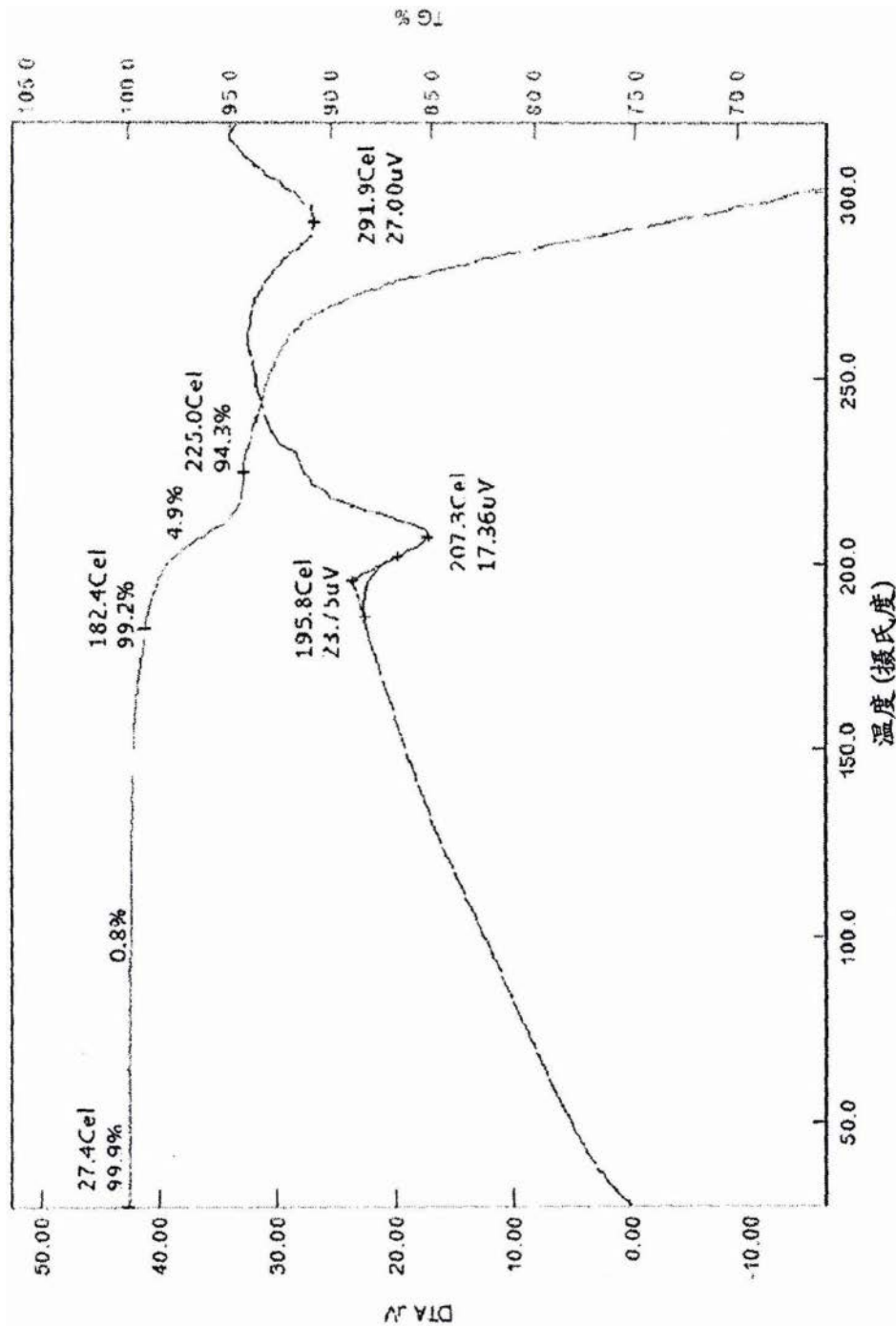


图2

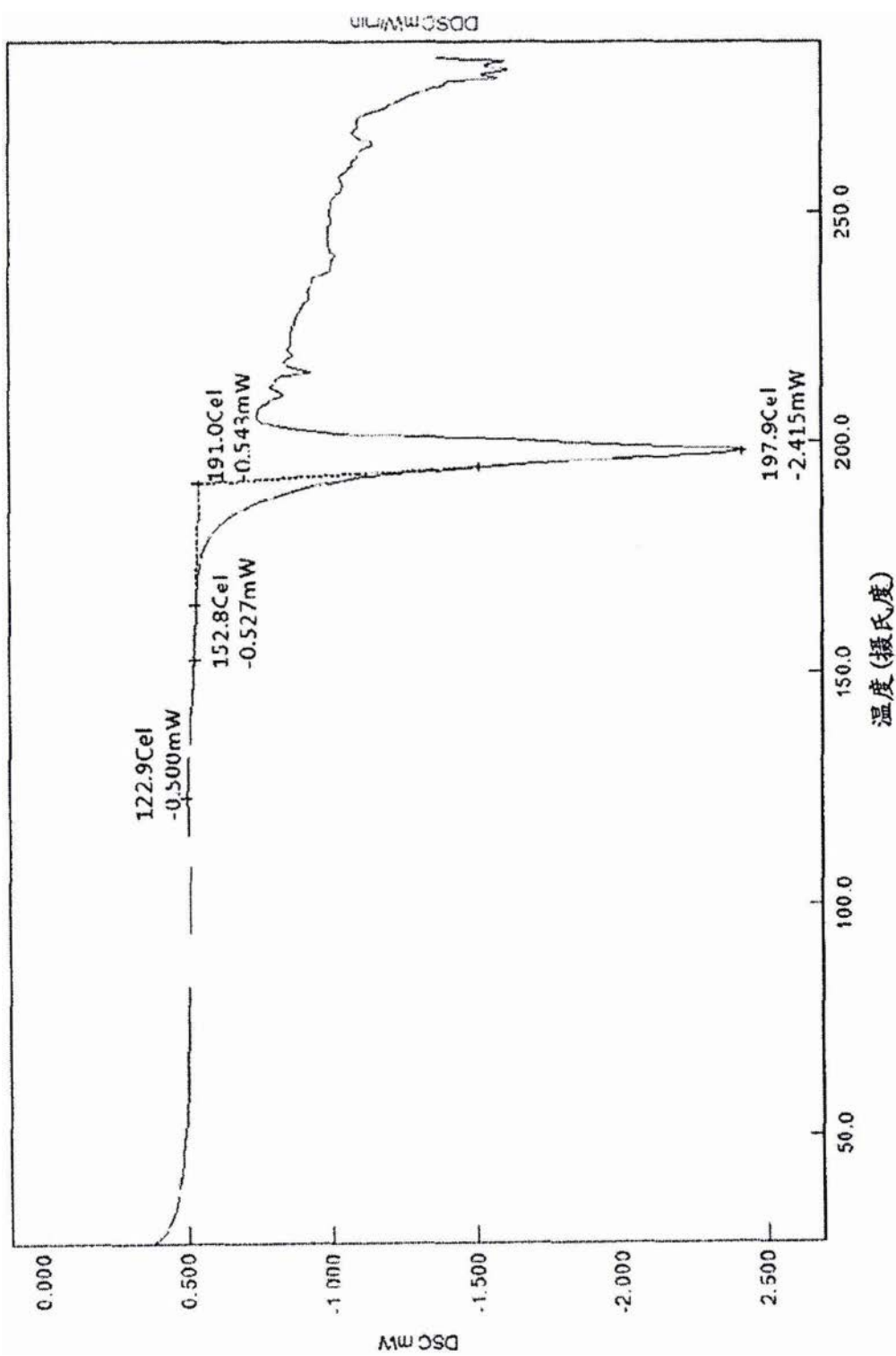
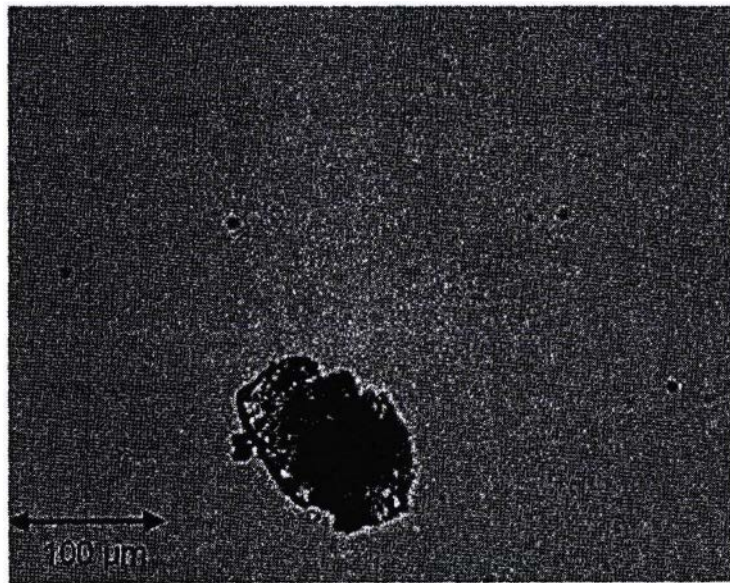
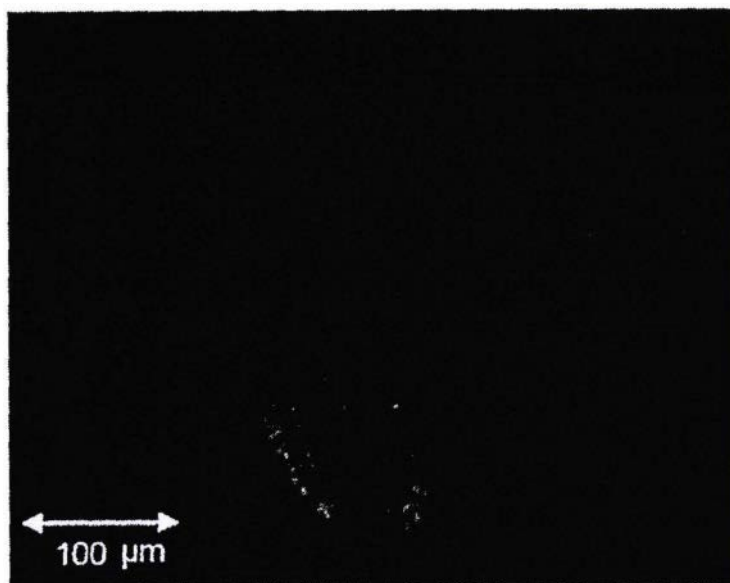


图3



非偏振光

图4A



偏振光

图4B

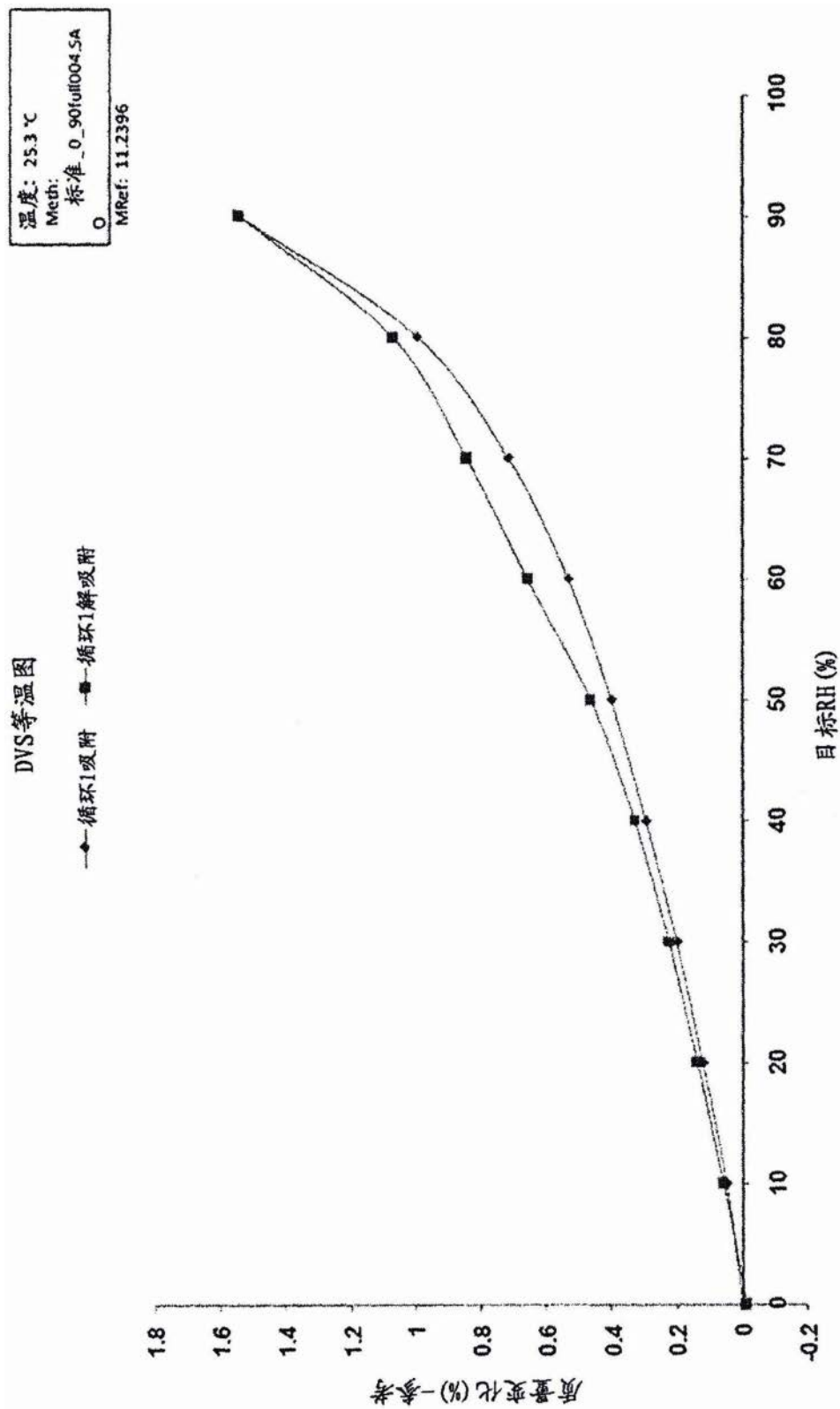


图5

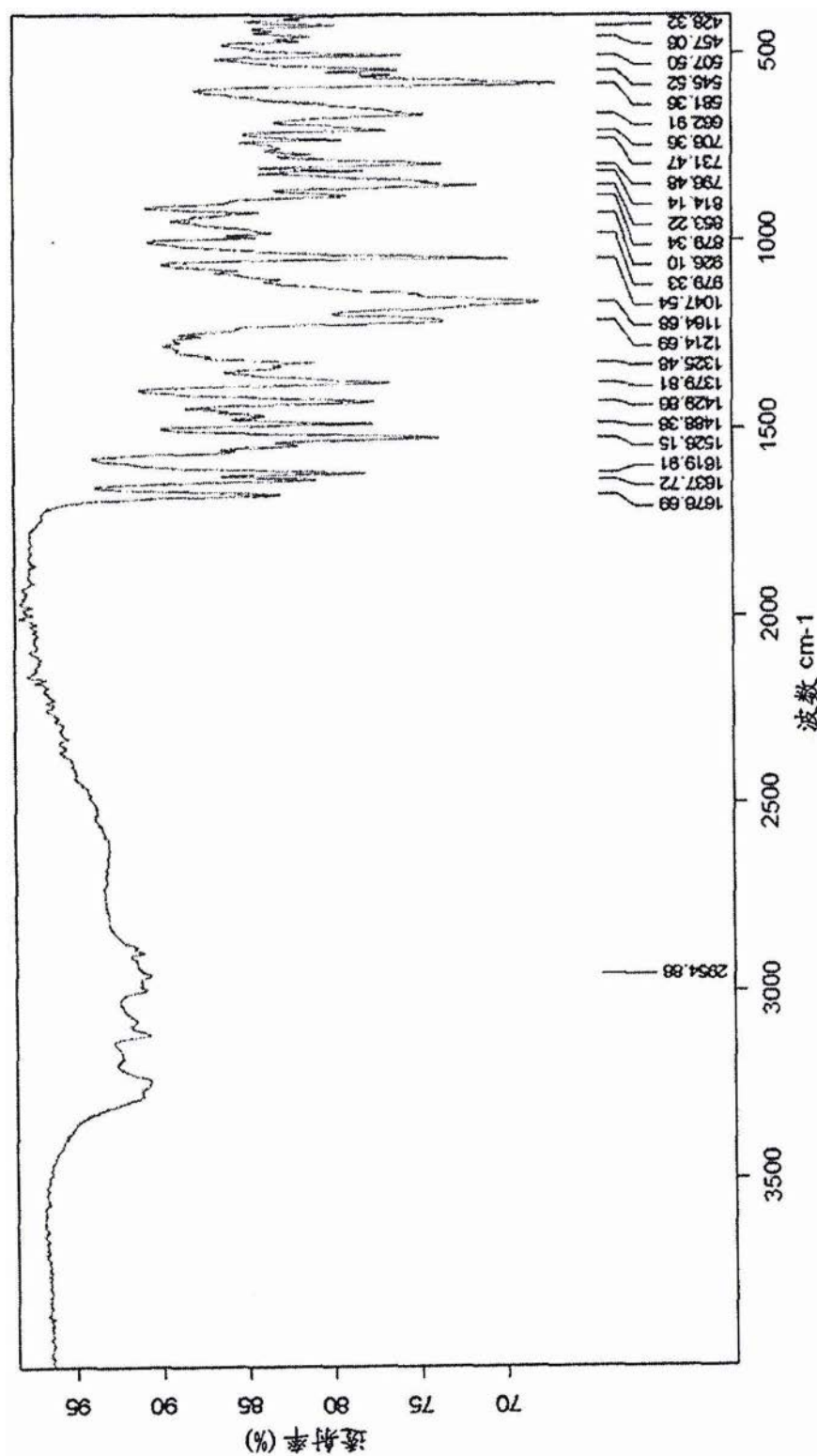


图6

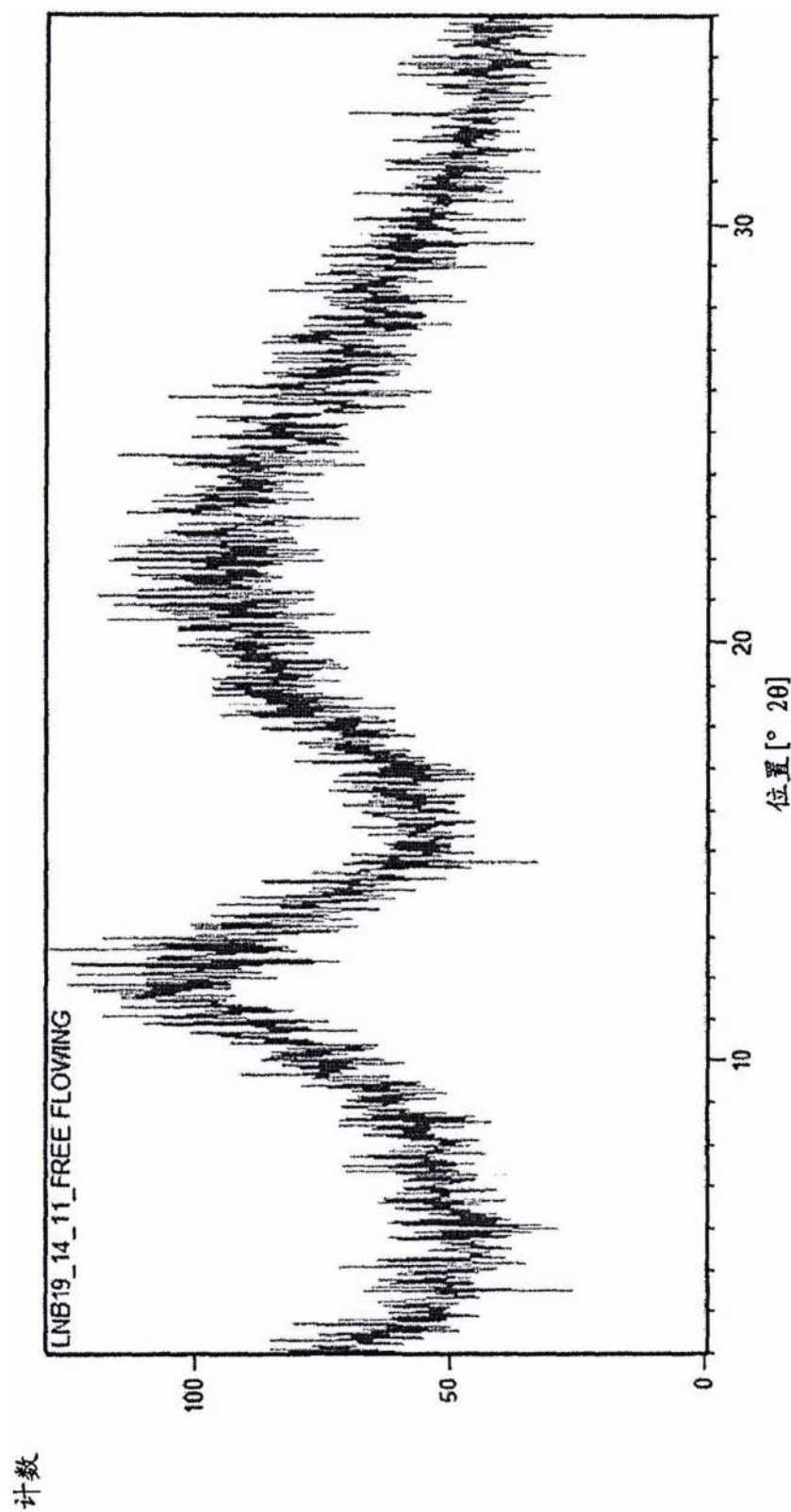


图7

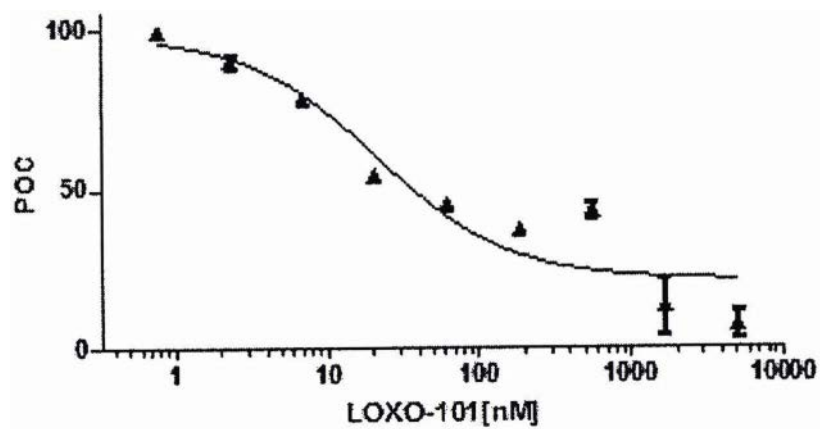


图8

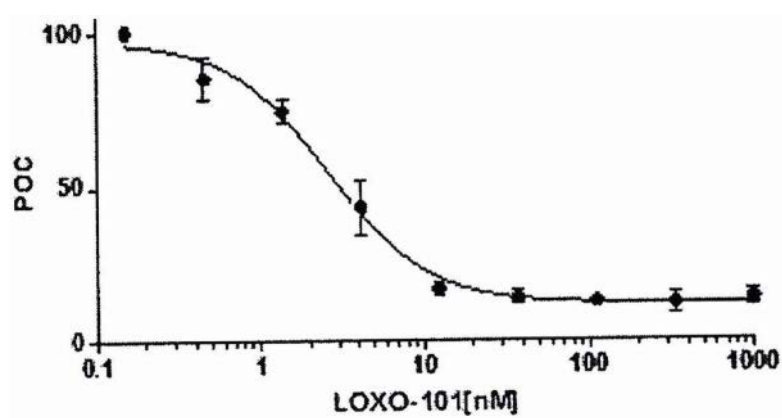


图9

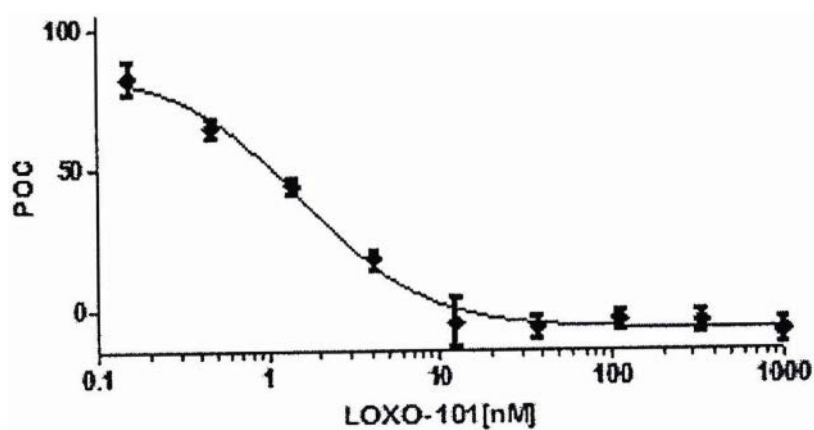


图10

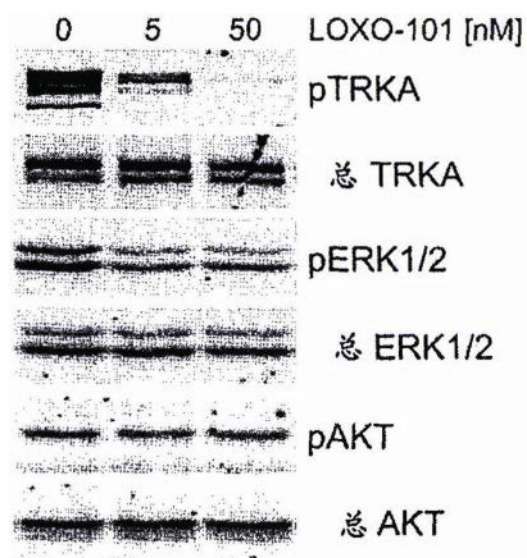


图11

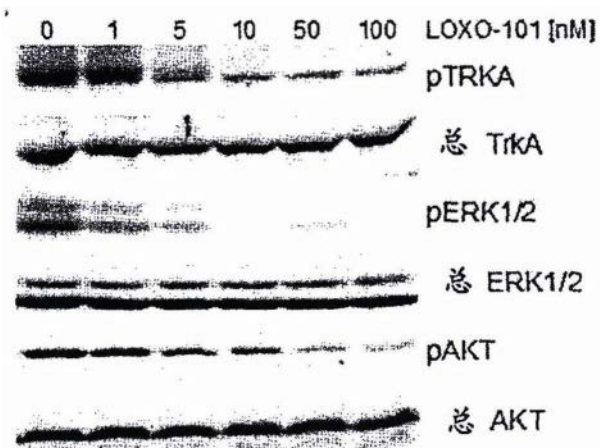


图12

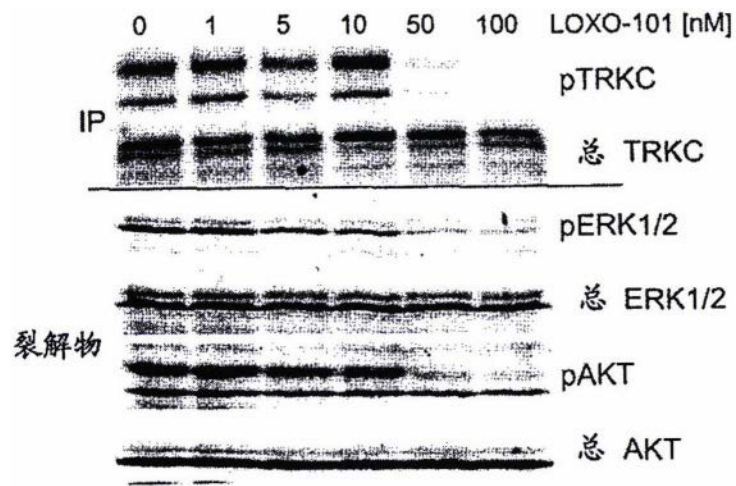


图13

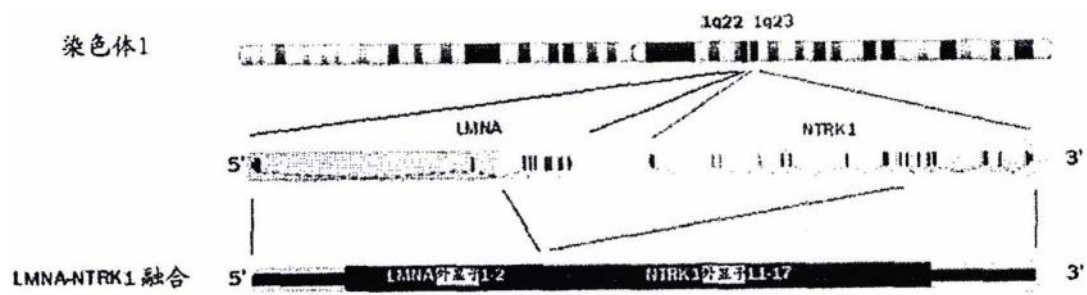


图14



图15

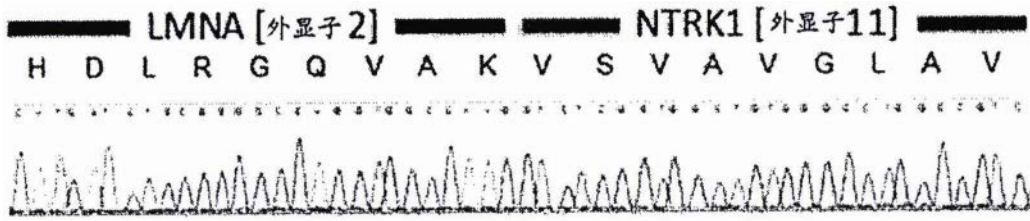


图16

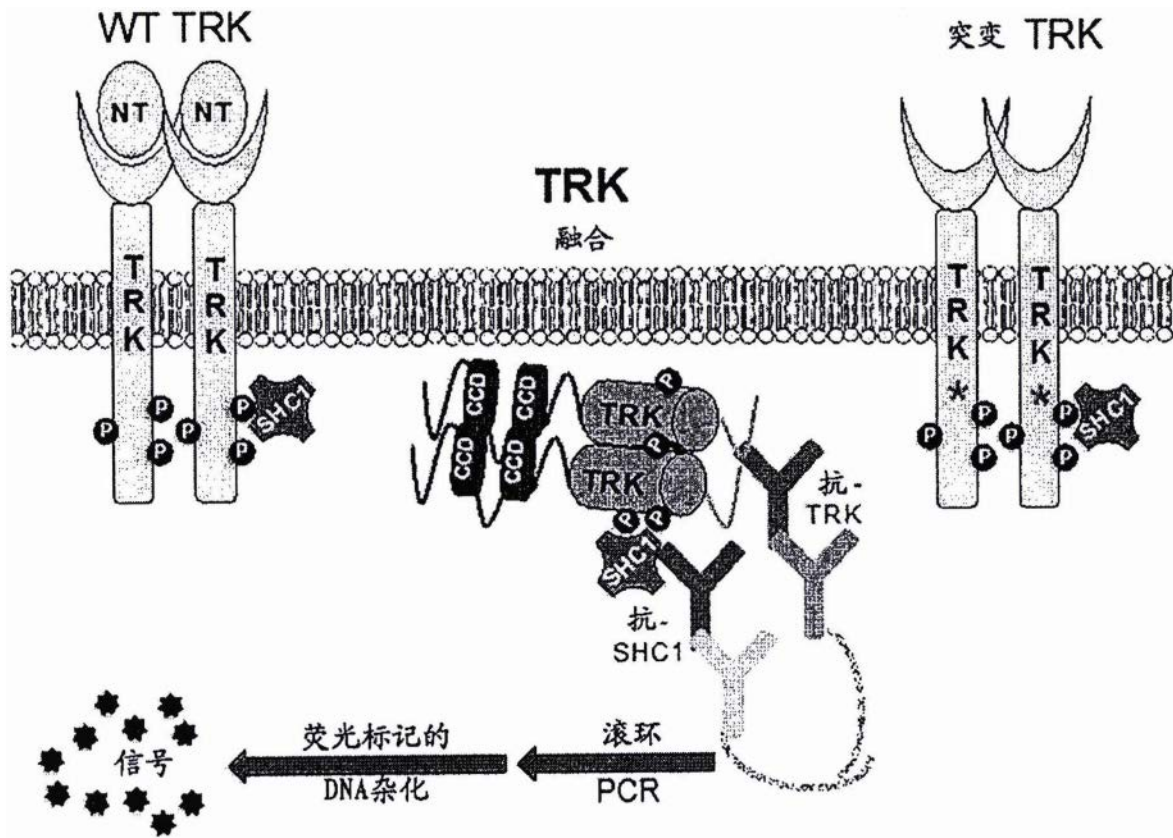


图17

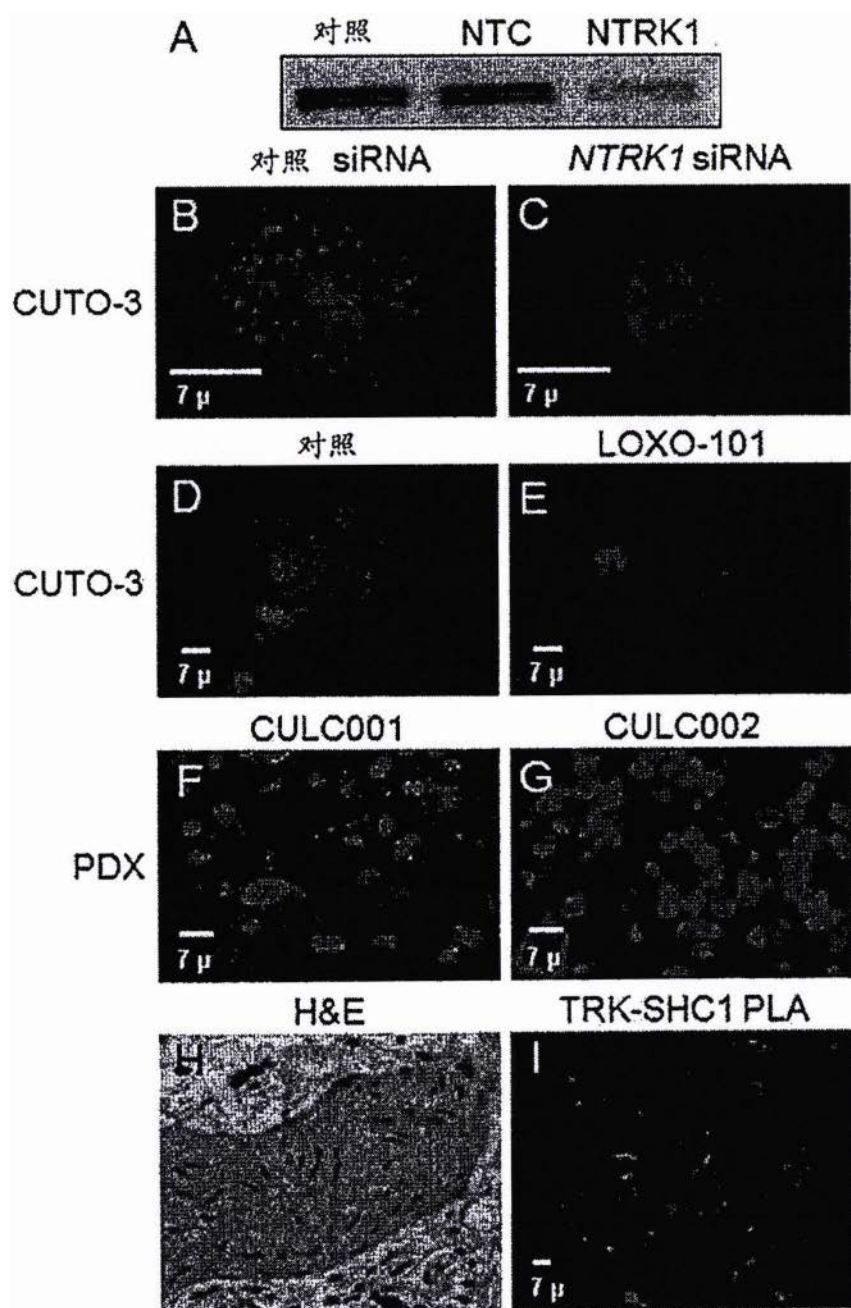


图18

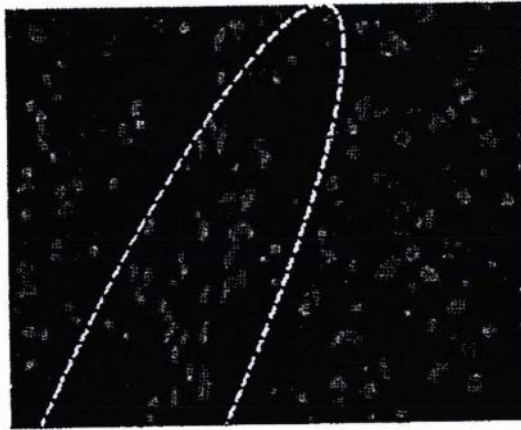
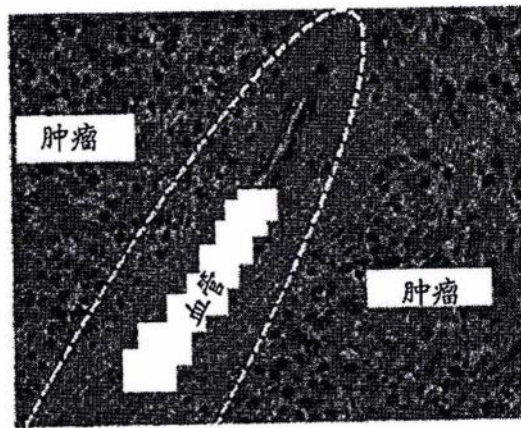
A**B**

图19

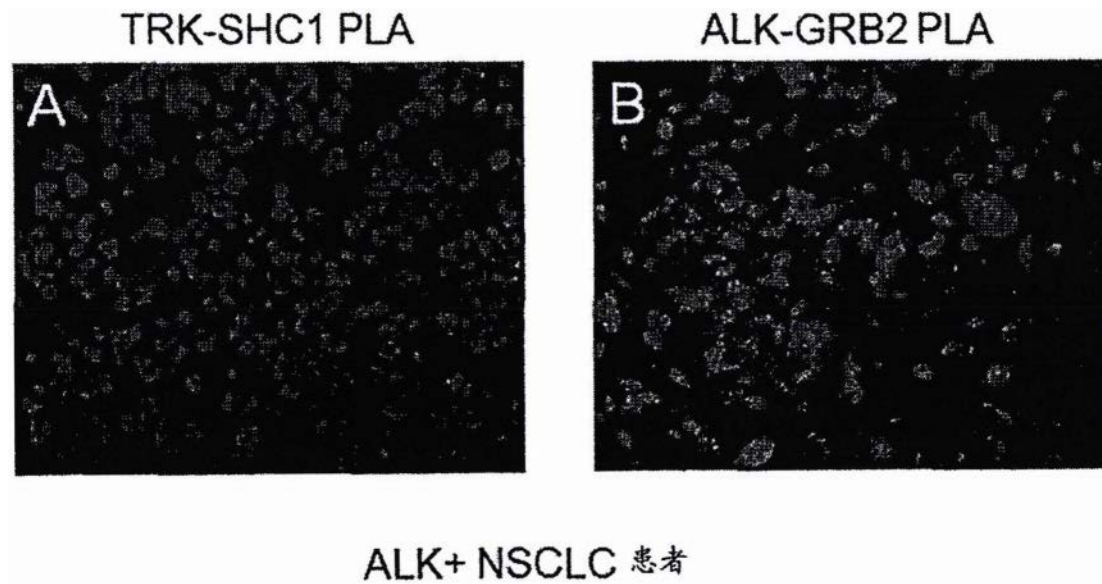


图20

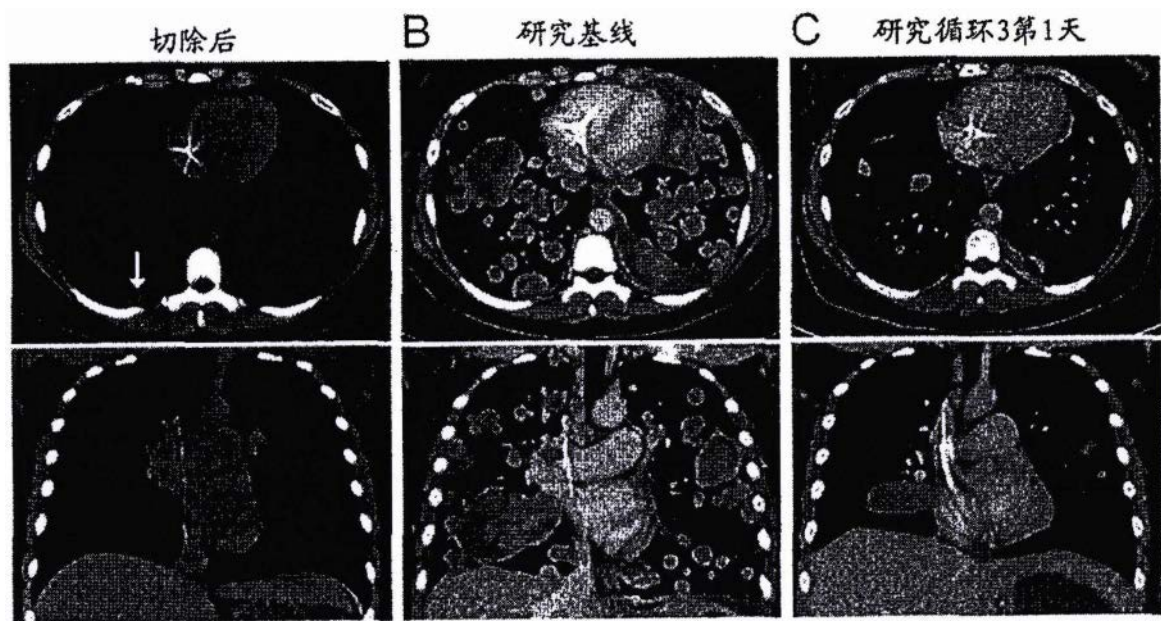


图21

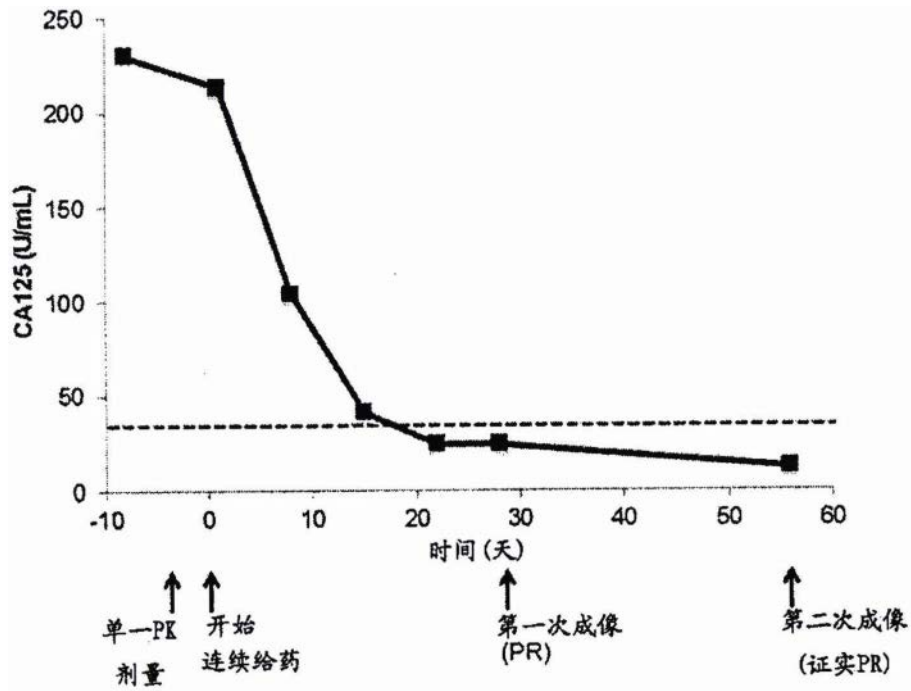


图22

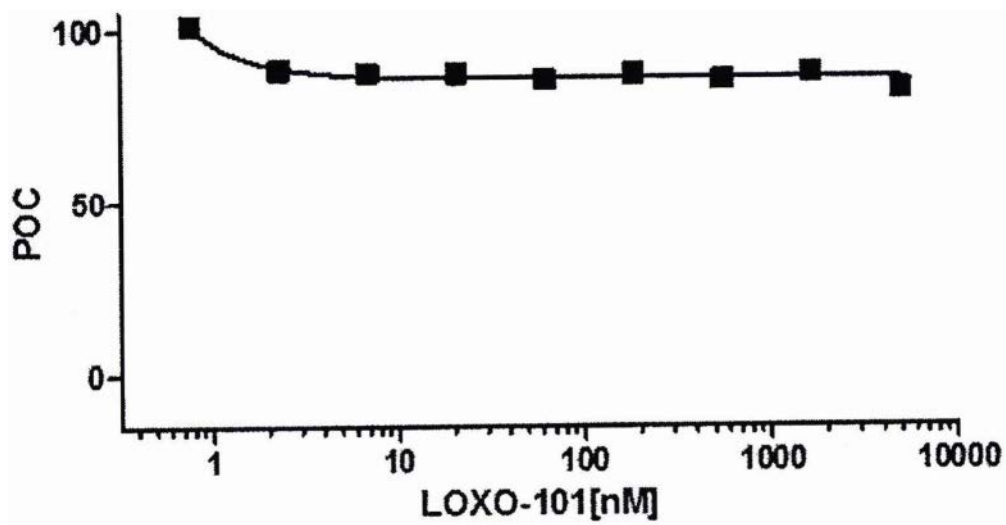


图23

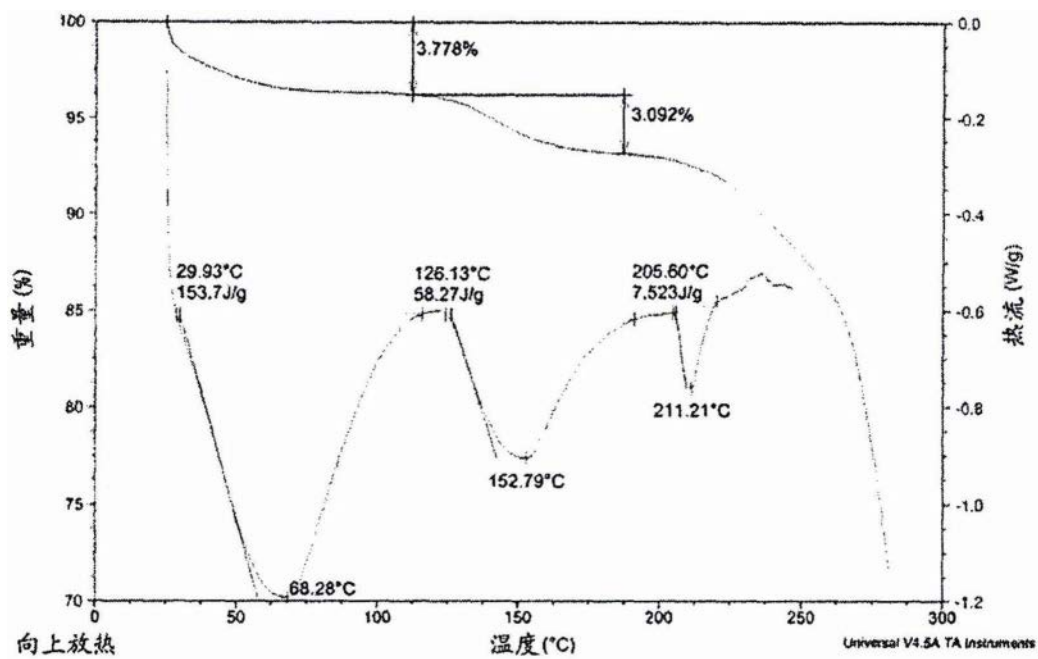


图24

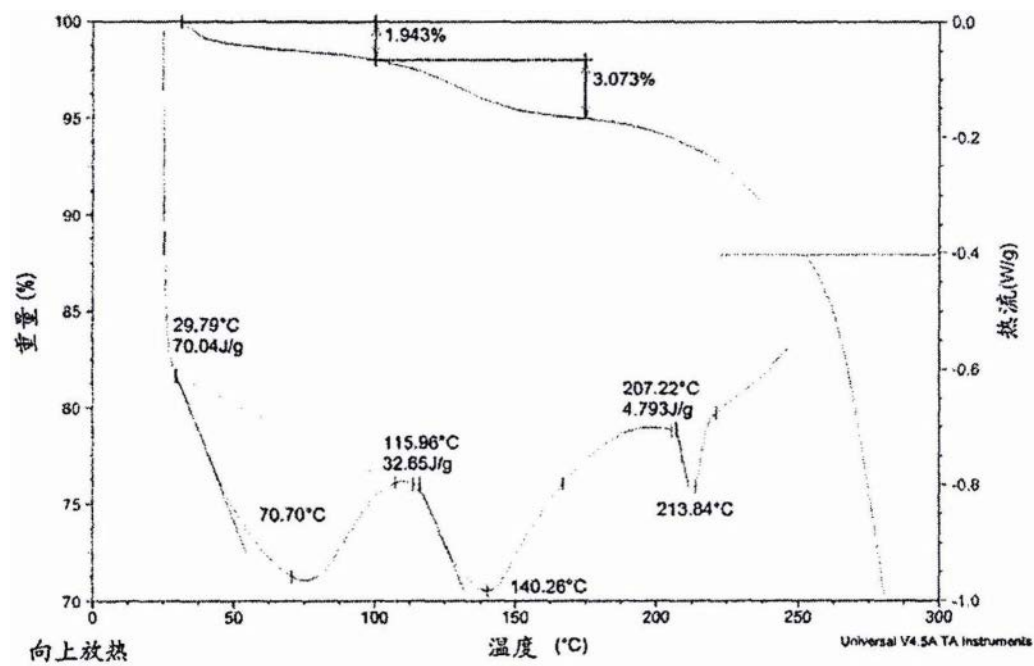


图25

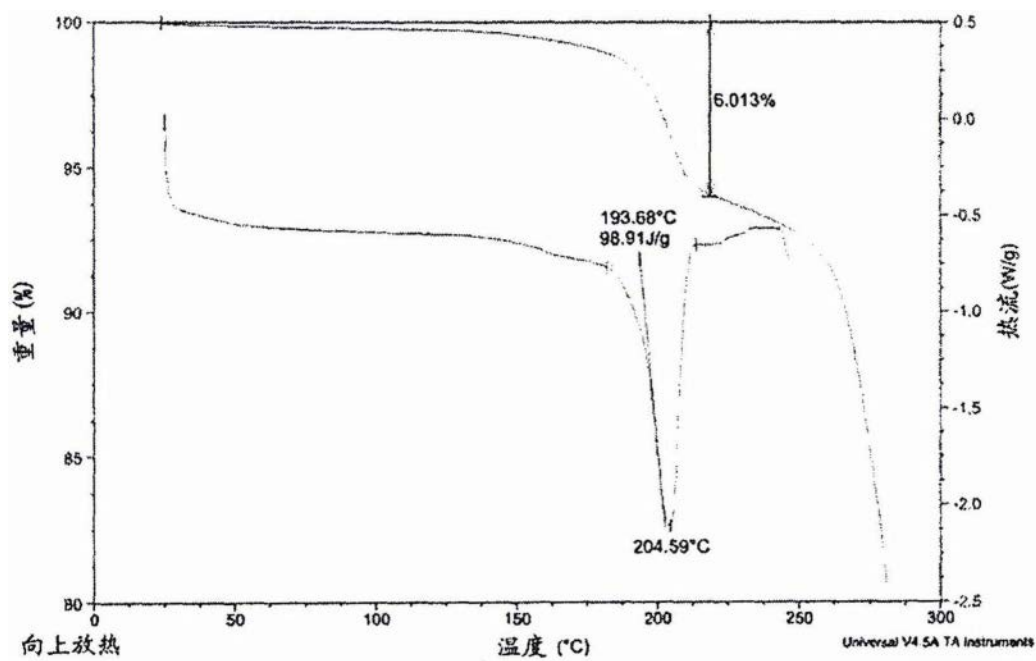


图26

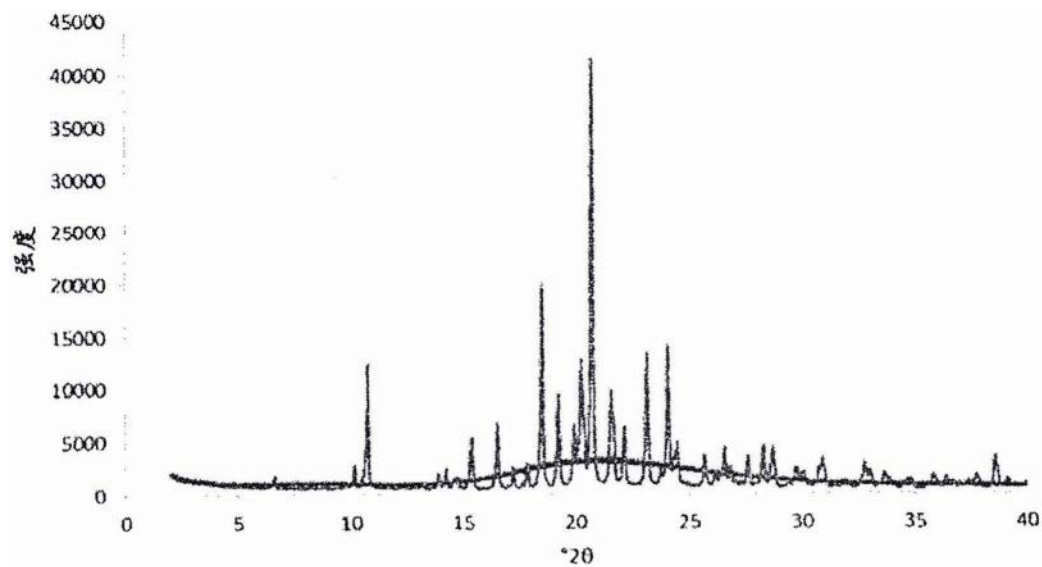


图27

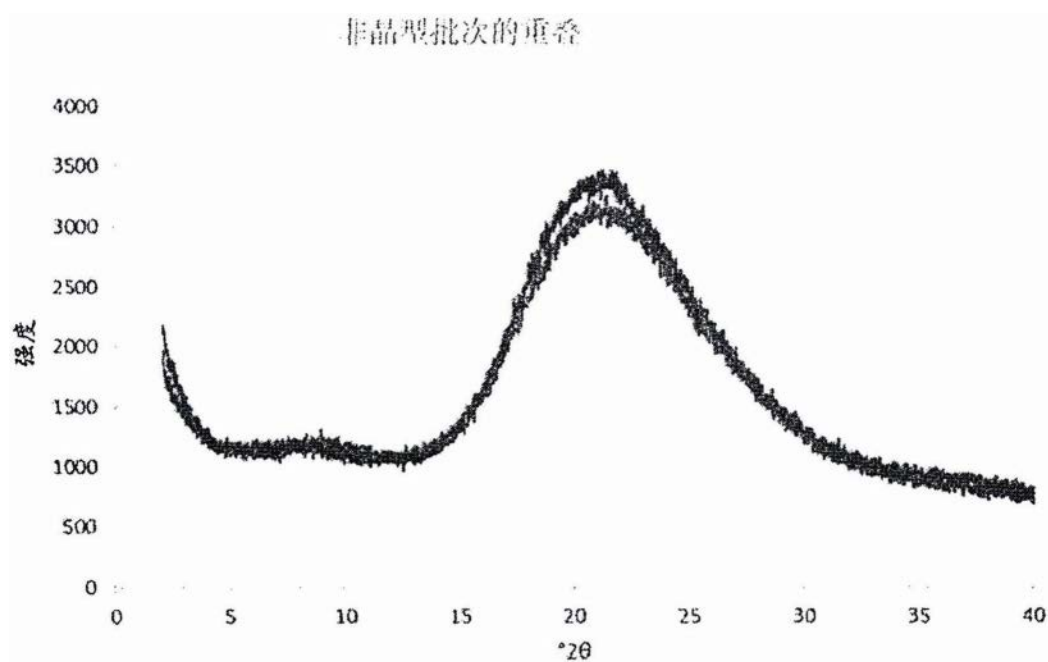


图28

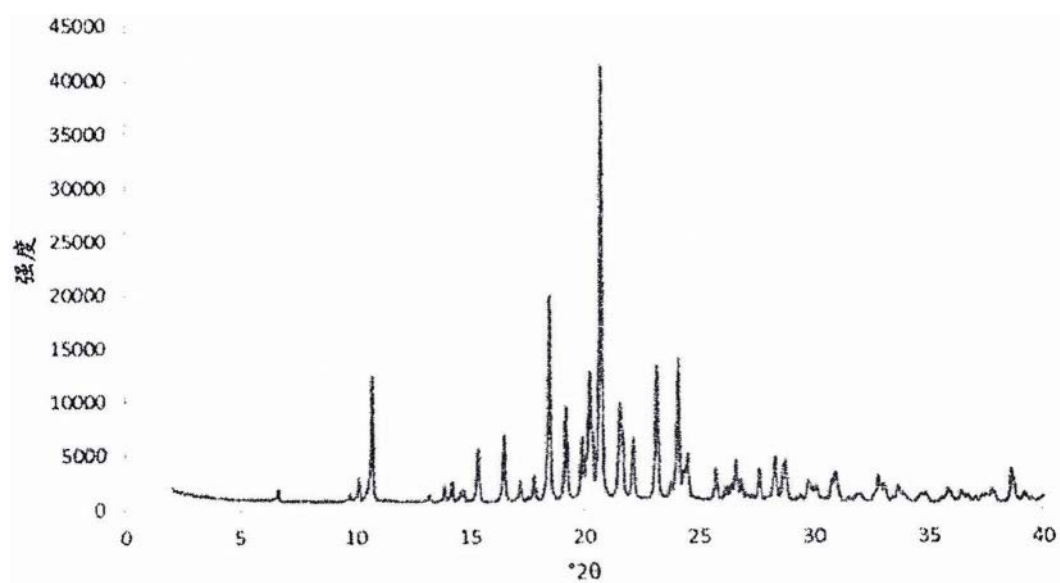


图29

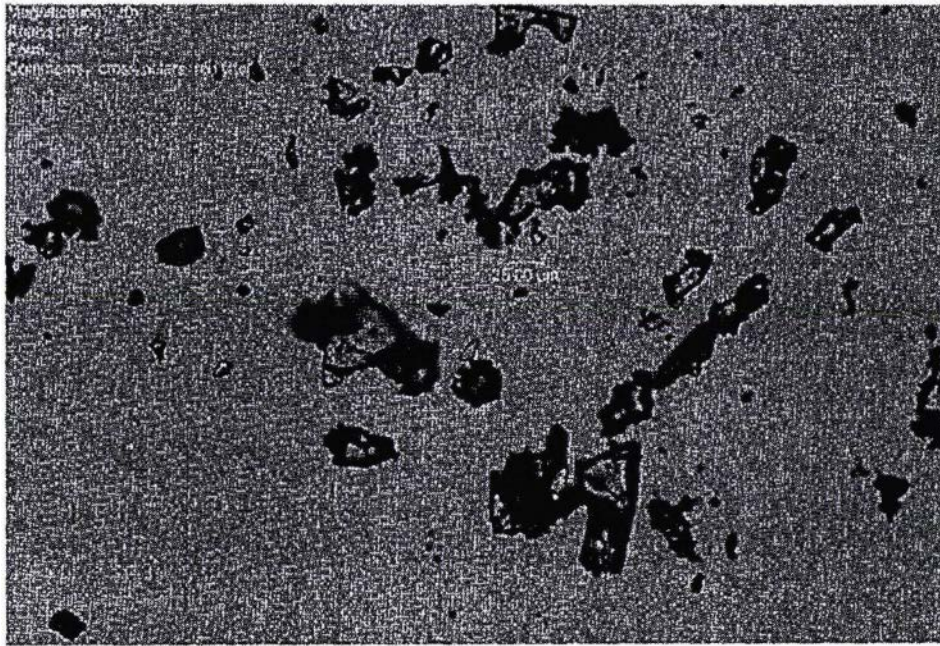


图30

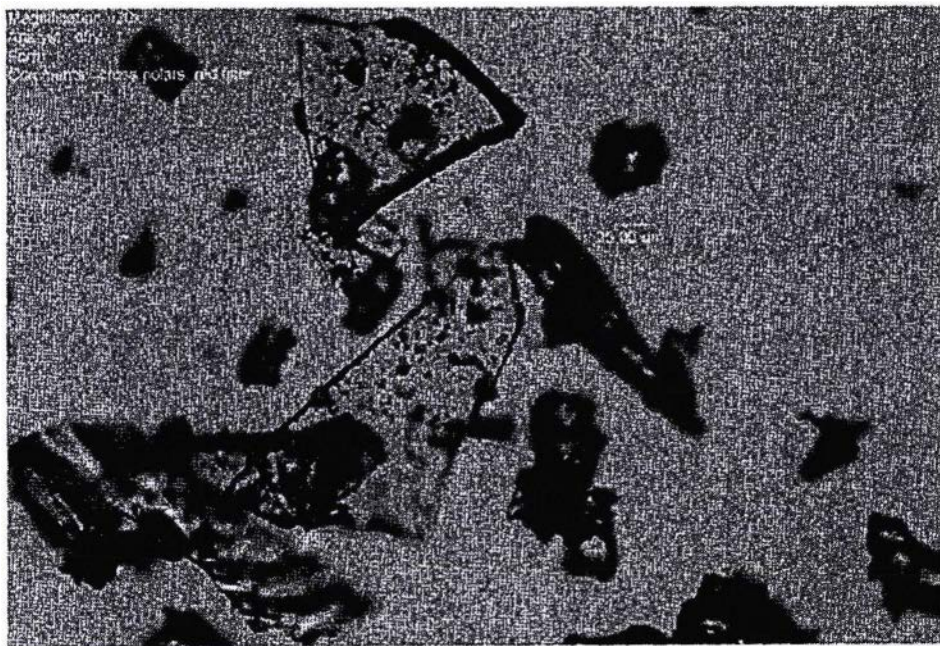


图31

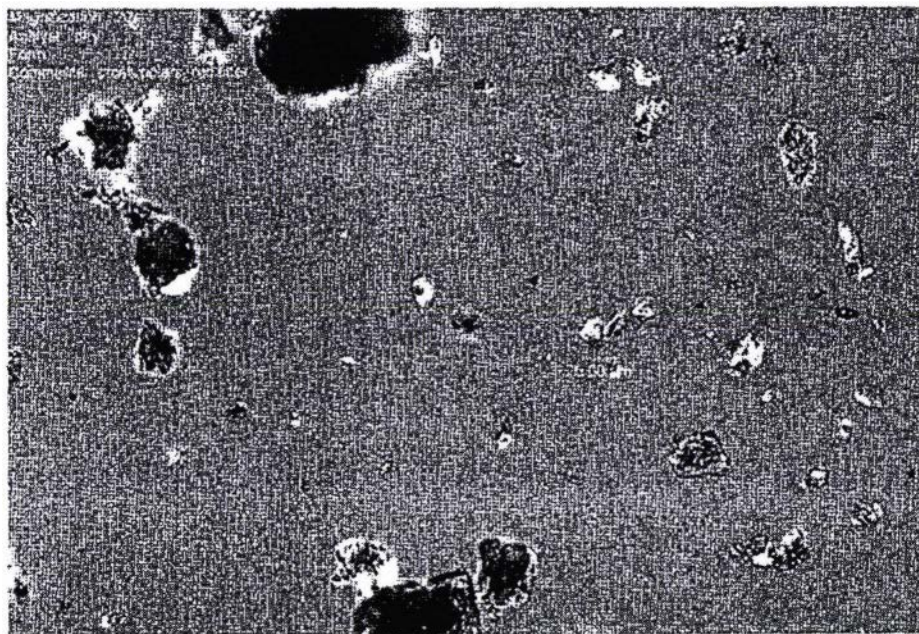


图32

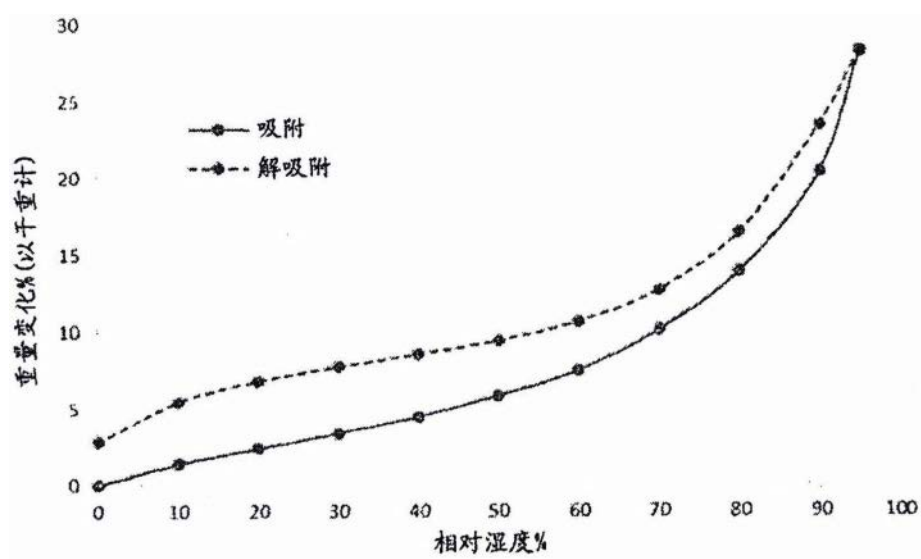


图33

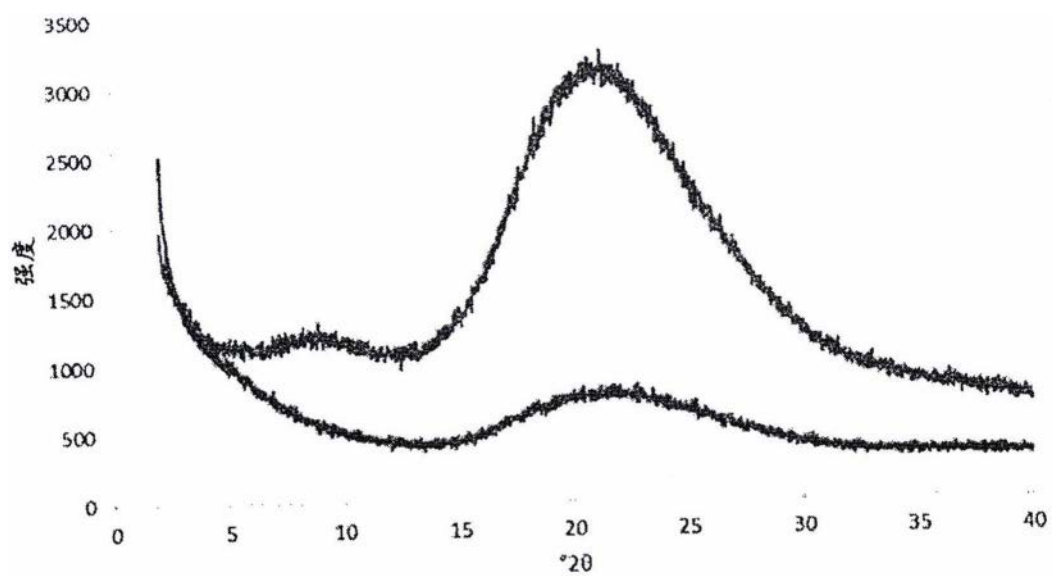


图34

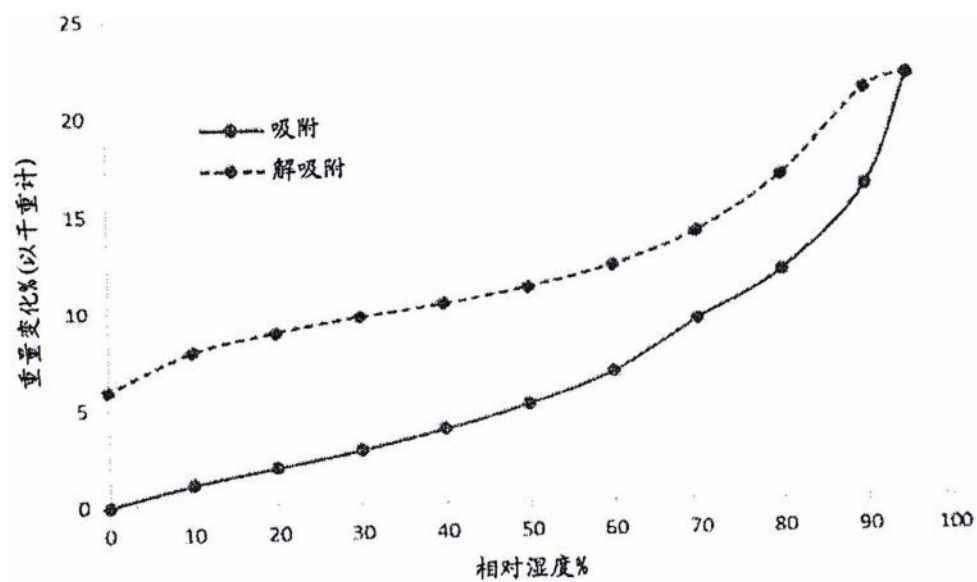


图35

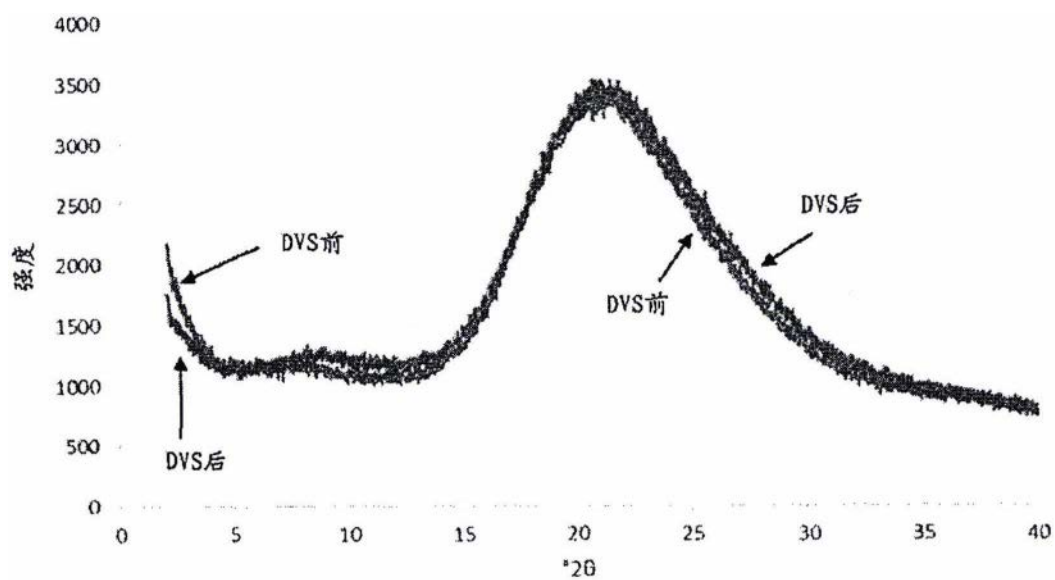


图36

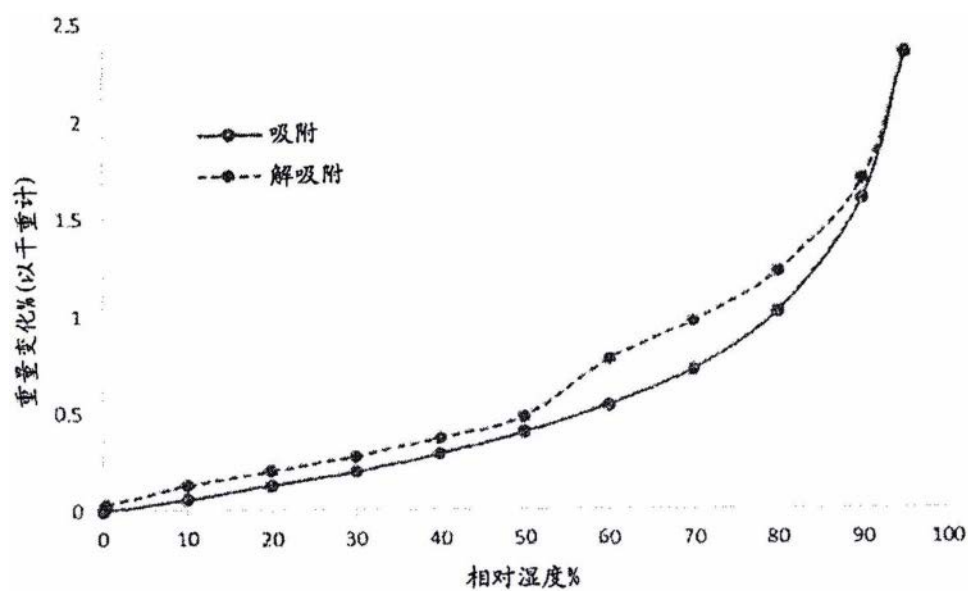


图37

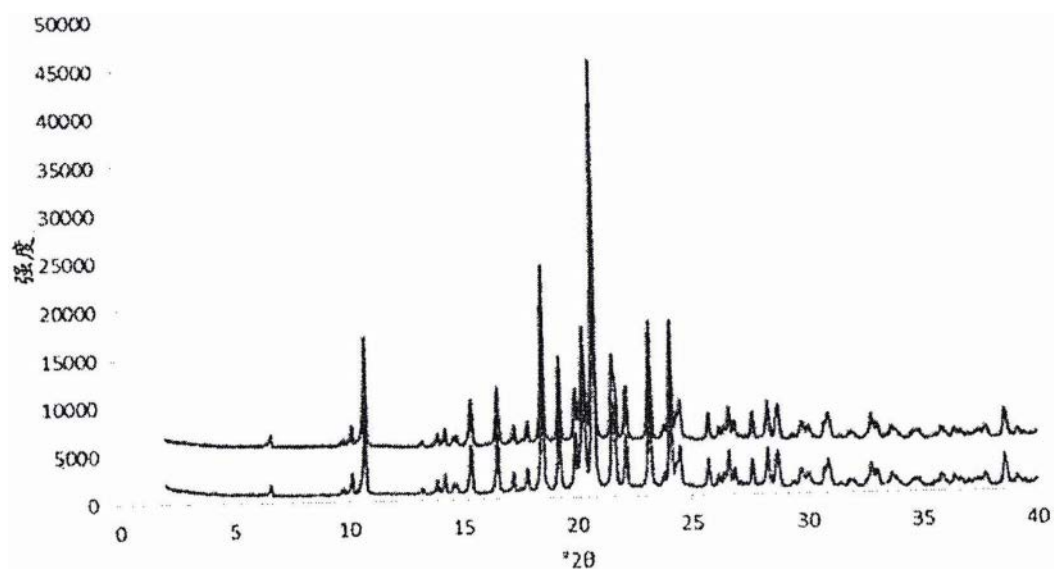


图38

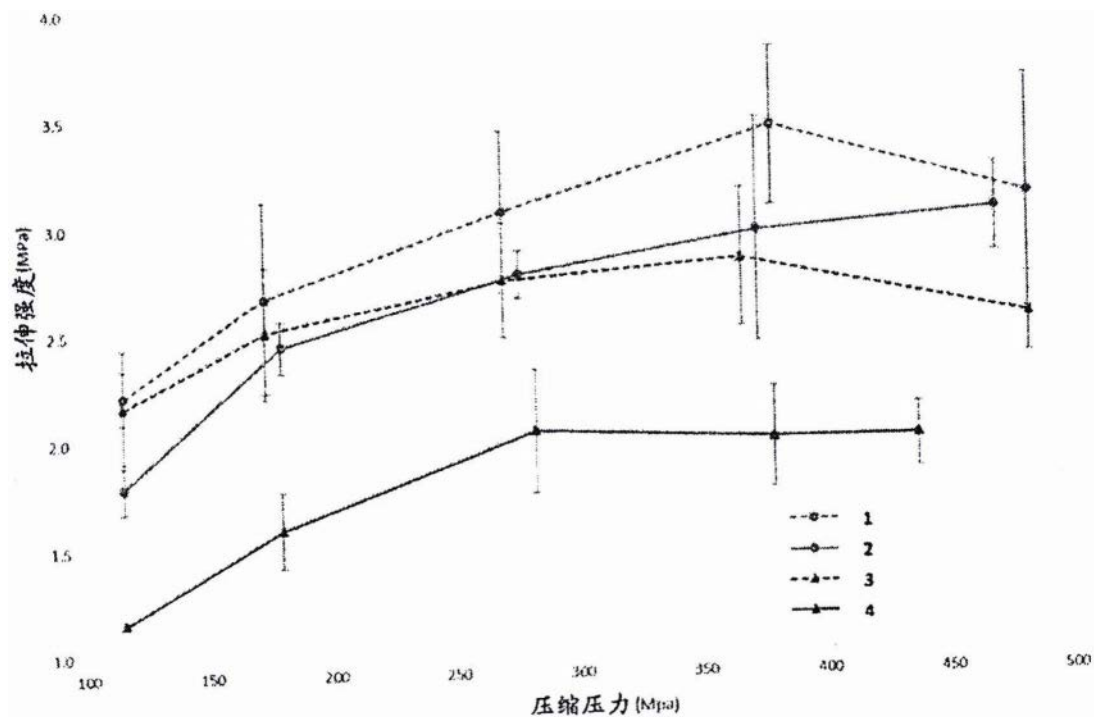


图39

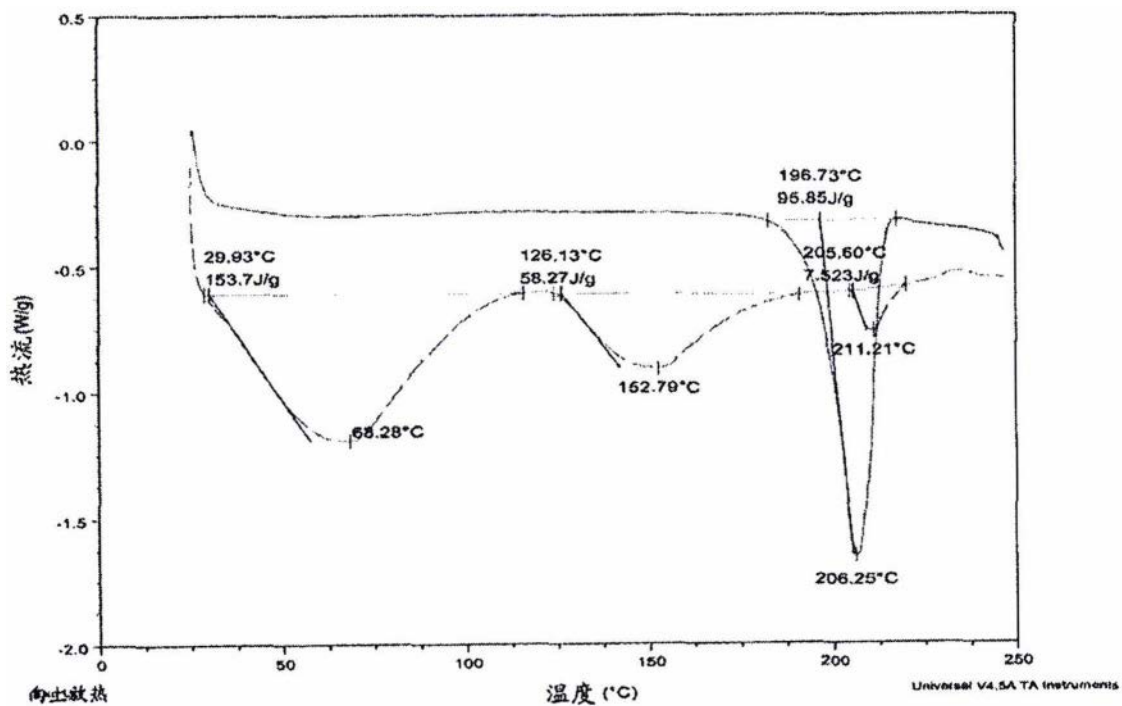


图40

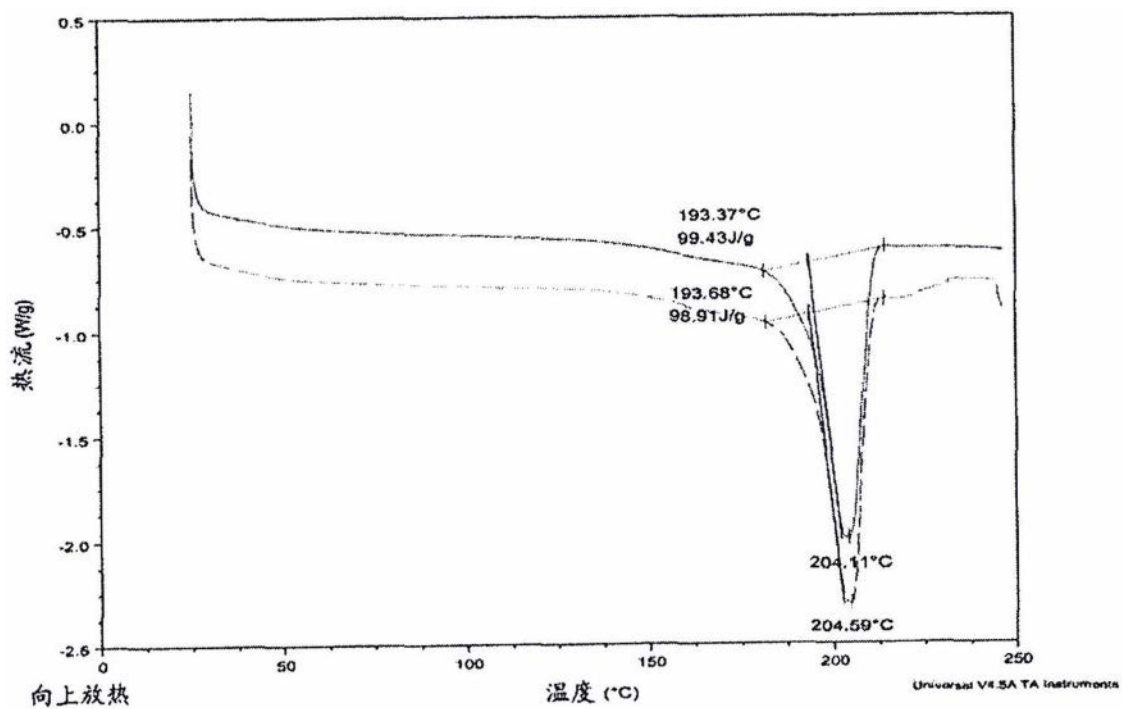


图41

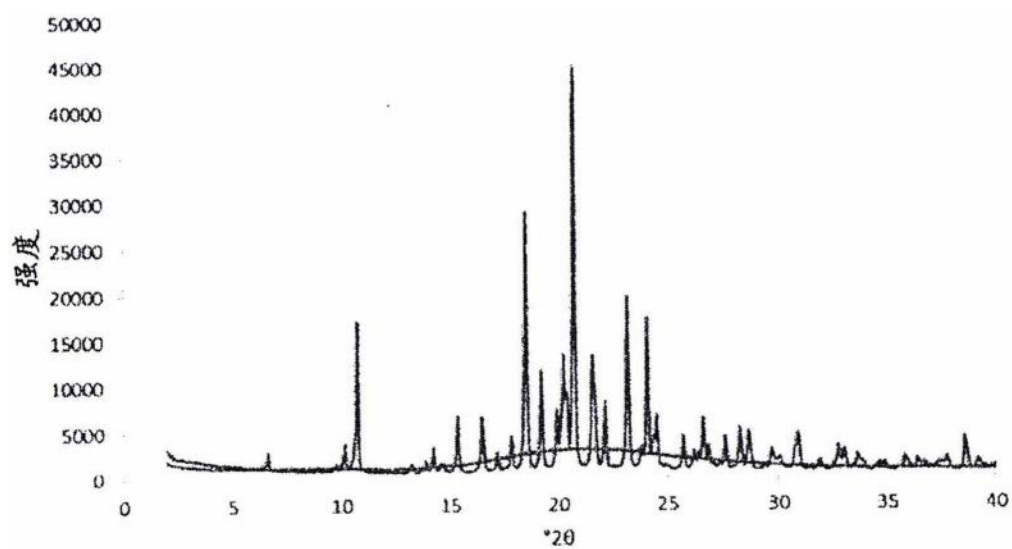


图42

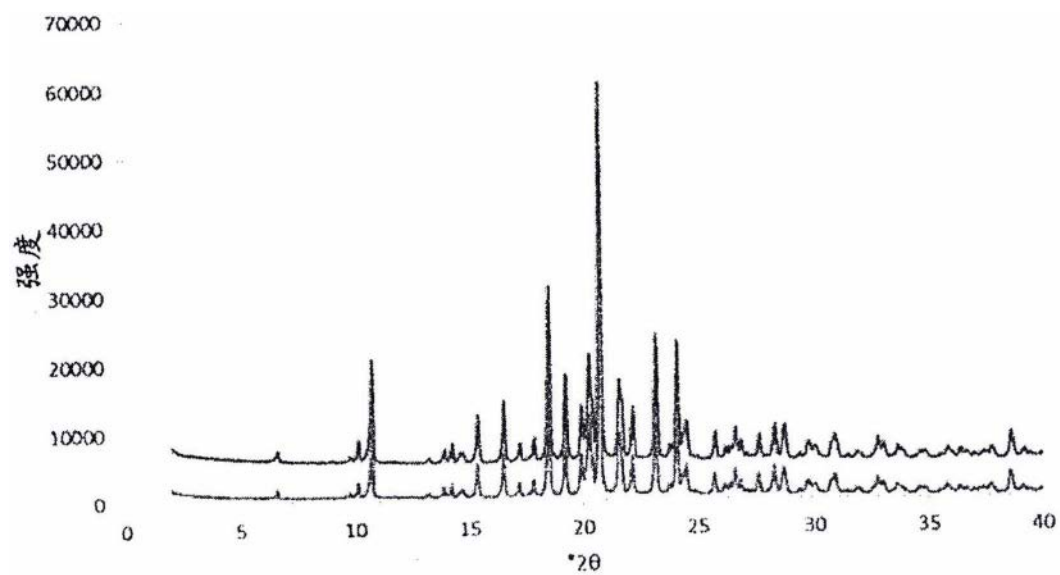


图43

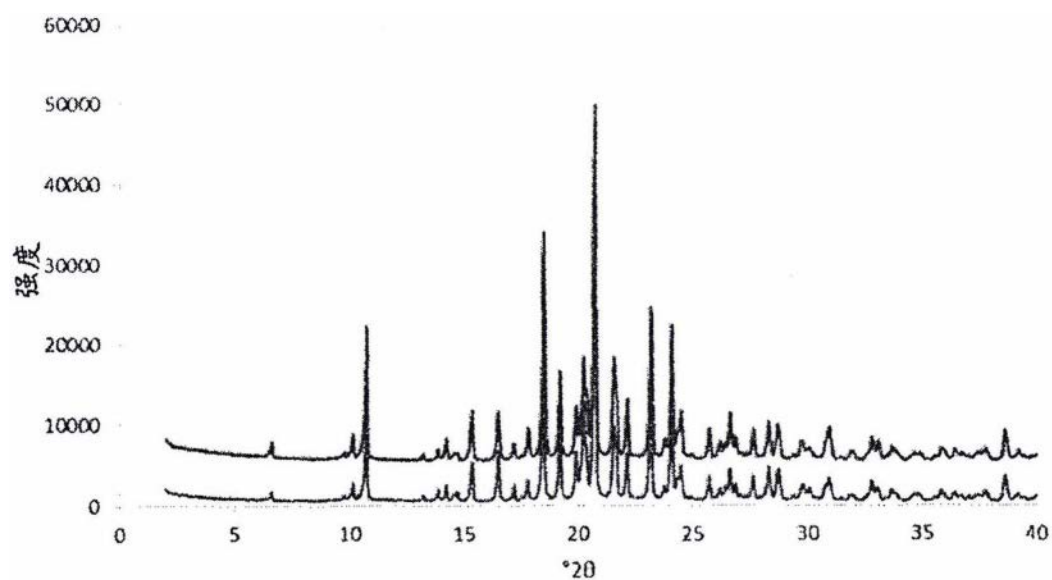


图44

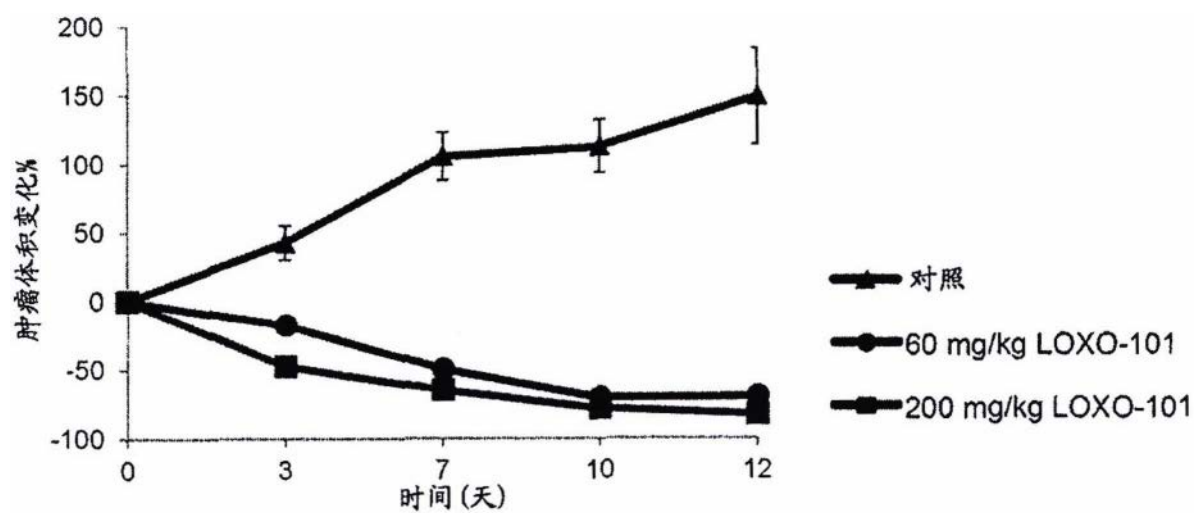


图45

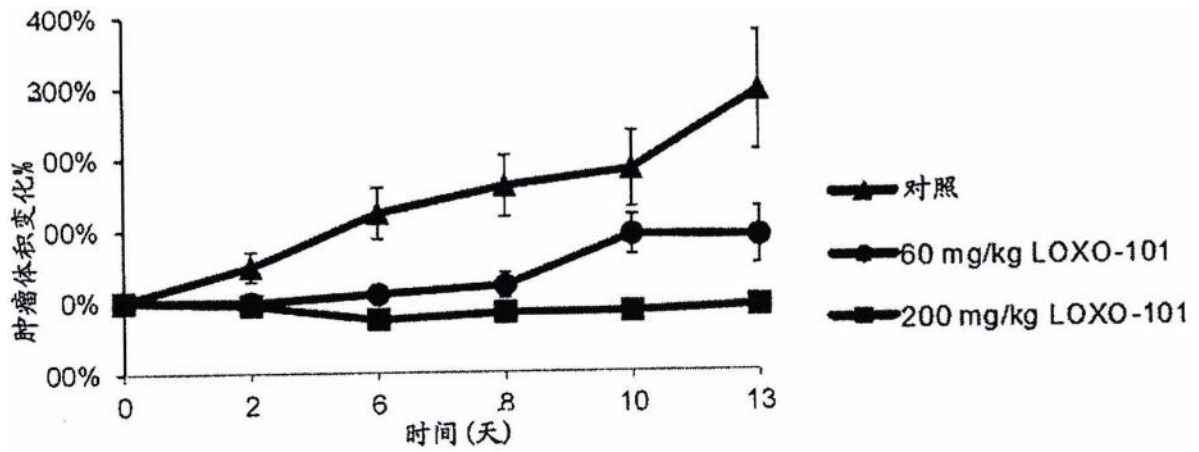


图46

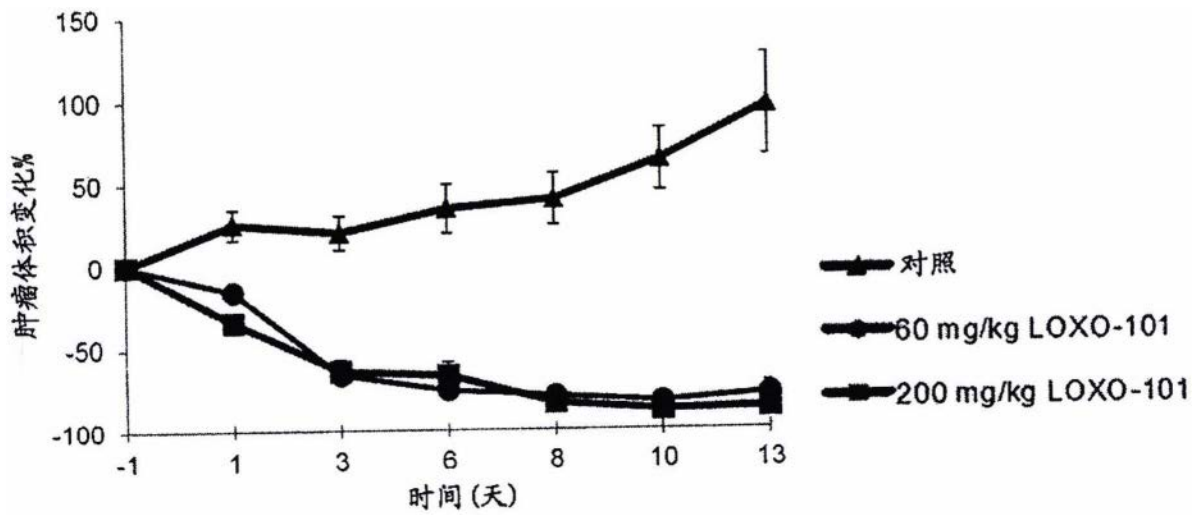


图47