



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102648182 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 22

(21) 申请号 201080053380. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 10. 21

C07D 215/56 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07D 487/08 (2006. 01)

61/254, 634 2009. 10. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 05. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/053628 2010. 10. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/050215 EN 2011. 04. 28

(71) 申请人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 N·B·安姆贝卡 R·休斯

D·J·赫尔利 E·C·李

B·利特勒 M·努马 S·勒佩尔

U·谢斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李华英

权利要求书 8 页 说明书 58 页 附图 15 页

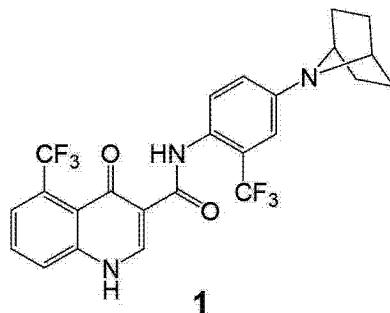
(54) 发明名称

用于制备囊性纤维化跨膜传导调节因子的调节剂的方法

(57) 摘要

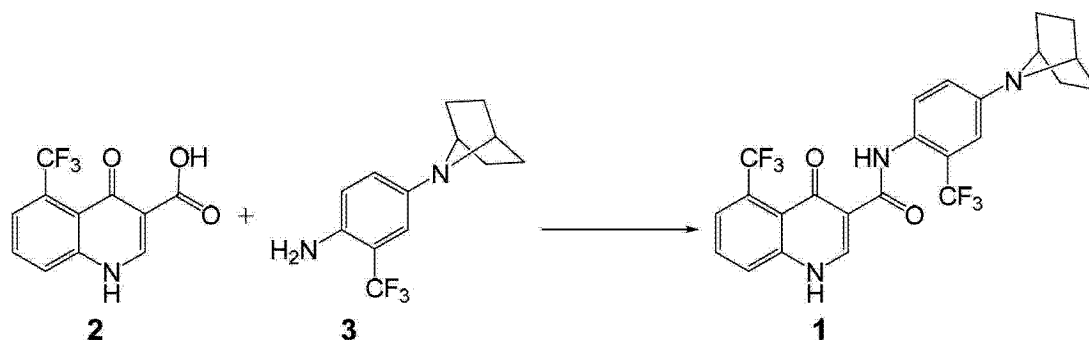
本发明涉及 N-(4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合) 的基本上晶体和固态形式, 其药物组合物, 及采用其的治疗方法。

1. 用于制备化合物 1 的基本上晶体形式的方法：



所述方法包括：

(a) 使化合物 2 与化合物 3 在偶联剂的存在下反应



其中偶联剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**。

2. 权利要求 1 的方法，其中在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N-甲基吗啉 (NMM)、吡啶或二异丙基乙基苯胺 (DIEA) 的碱的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中在吡啶或 DIEA 的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

4. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中在吡啶的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

5. 权利要求 1-4 任一项的方法，其中在极性非质子溶剂的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

6. 权利要求 1-5 任一项的方法，其中极性非质子溶剂选自乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、甲基乙基酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺或 2-甲基四氢呋喃。

7. 权利要求 1-6 任一项的方法，其中在 2-甲基四氢呋喃的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

8. 权利要求 1-7 任一项的方法，其中在保持在 30°C 至 80°C 的反应温度进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法，其中化合物 1 是固体形式 A。

10. 权利要求 1-9 任一项的方法，其中在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N-甲基吗啉 (NMM)、吡啶或二异丙基乙基苯胺 (DIEA) 的碱的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

11. 权利要求 1-10 任一项的方法，其中在吡啶或 DIEA 的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

12. 权利要求 1-11 任一项的方法，其中在吡啶的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

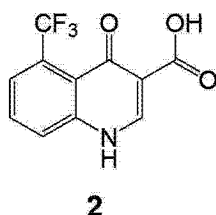
13. 权利要求 1-12 任一项的方法, 其中在极性非质子溶剂的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

14. 权利要求 1-13 任一项的方法, 其中极性非质子溶剂选自乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、甲基乙基酮、N- 甲基 -2- 吡咯烷酮、乙腈、N, N- 二甲基甲酰胺或 2- 甲基四氢呋喃。

15. 权利要求 1-14 任一项的方法, 其中在 2- 甲基四氢呋喃的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

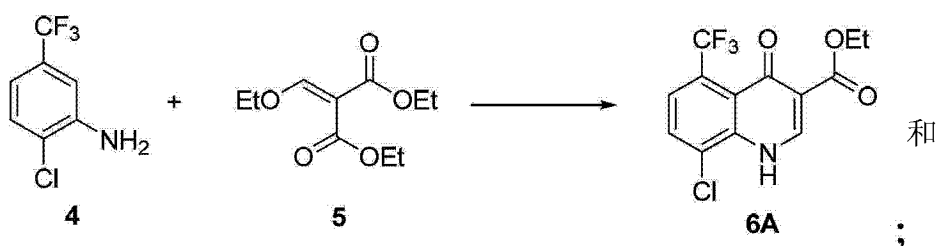
16. 权利要求 1-15 任一项的方法, 其中在保持在 30℃ 至 80℃ 的反应温度进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

17. 用于制备化合物 2 的方法:

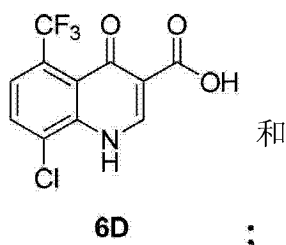


所述方法包括:

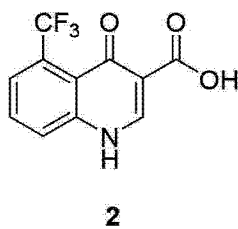
(a) 将化合物 4 与 2-(乙氧亚甲基) 丙二酸二乙酯 5 反应以产生酯 6A



(b) 用碱处理酯 6A 以产生化合物 6D



(c) 在催化剂的存在下用原子氢源处理化合物 6D 以制备化合物 2



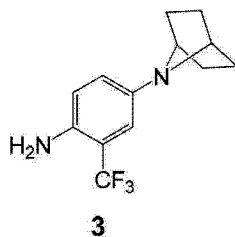
18. 权利要求 17 的方法, 其中原子氢源包含氢气。

19. 权利要求 17 或 18 的方法, 其中原子氢源包含甲酸盐。

20. 权利要求 17-19 任一项的方法, 其中催化剂包含钯催化剂。

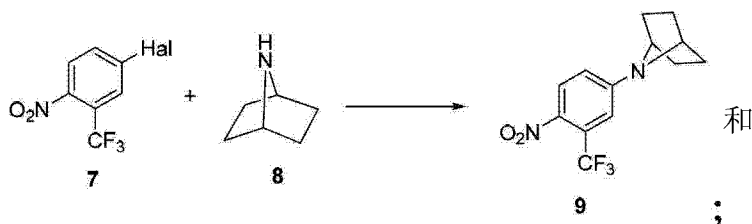
21. 权利要求 17-20 任一项的方法, 其中碱包含氢氧化钠水溶液或氢氧化钾水溶液。

22. 用于制备化合物 3 的方法

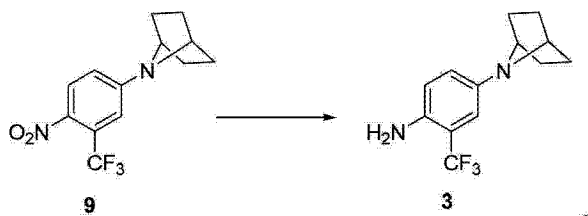


所述方法包括：

(a) 将化合物 7, 其中 Hal 是 F、Cl、Br 或 I, 与 7-氮杂双环 [2.2.1] 庚烷 8, 或其盐反应, 以产生化合物 9



(b) 还原化合物 9 中的硝基部分以提供苯胺 3



23. 权利要求 22 的方法, 其中在碱的存在下在极性非质子溶剂中进行步骤 (a)。

24. 权利要求 22 或 23 的方法, 其中碱是三乙胺或二异丙基乙胺, 溶剂是乙腈。

25. 权利要求 22-24 任一项的方法, 其中在醇溶剂中使用氢气和过渡金属催化剂进行步骤 (b)。

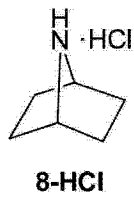
26. 权利要求 22-25 任一项的方法, 其中催化剂包含第 9 族或第 10 族的过渡金属, 所述过渡金属选自 Pt、Pd 或 Ni。

27. 权利要求 22-26 任一项的方法, 其中催化剂包含 Pd。

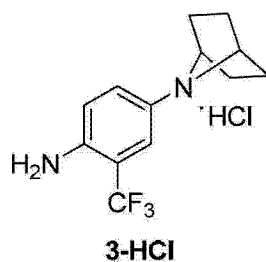
28. 权利要求 22-27 任一项的方法, 其中溶剂包括异丙醇、乙醇或甲醇。

29. 权利要求 22-28 任一项的方法, 其中溶剂包括乙醇。

30. 权利要求 22-29 任一项的方法, 其中化合物 8 呈盐的形式, 化合物 8-HCl :



31. 权利要求 22-30 任一项的方法, 所述方法还包括使化合物 3 接触 HCl 以提供盐酸盐 3-HCl :



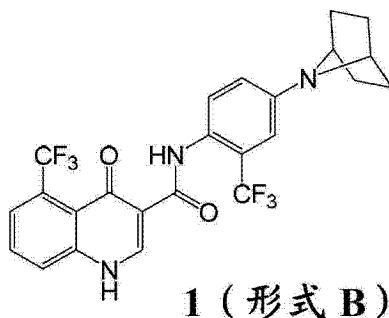
32. 权利要求 22-31 任一项的方法, 其中在例如碳酸钠的无机碳酸盐的碱的存在下和在例如 DMSO 的极性非质子溶剂的存在下进行步骤 (a)。

33. 权利要求 22-32 任一项的方法, 其中在醇溶剂中使用氢气和过渡金属催化剂进行步骤 (b)。

34. 权利要求 22-33 任一项的方法, 其中催化剂包含从 Pt、Pd 或 Ni 衍生的第 9 族或第 10 族过渡金属催化剂, 溶剂包括异丙醇、乙醇或甲醇。

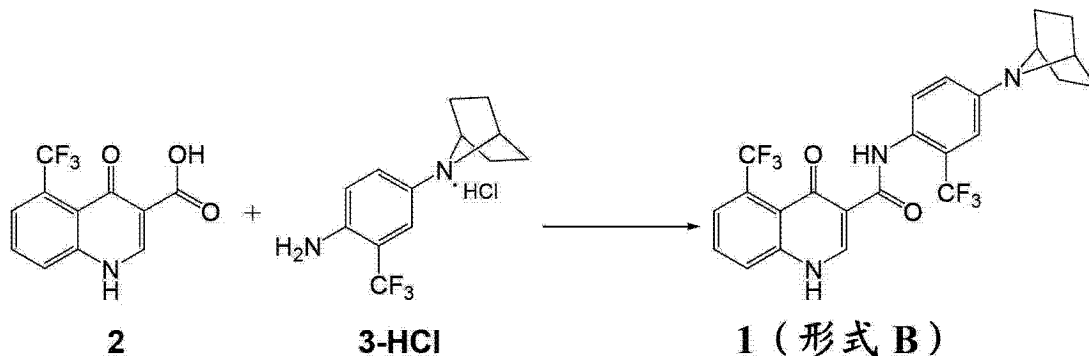
35. 权利要求 22-34 任一项的方法, 其中催化剂包含 Pd, 溶剂包括乙醇。

36. 用于制备具有固体形式 B 的化合物 1 的方法:



所述方法包括:

(a) 使化合物 2 与化合物 3 的盐酸盐 (3-HCl) 在偶联剂的存在下反应, 所述偶联剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**



37. 权利要求 36 的方法, 其中在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N-甲基吗啉 (NMM)、吡啶或 DIEA 的碱的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

38. 权利要求 36 或 37 的方法, 其中在吡啶或 DIEA 的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

39. 权利要求 36-38 任一项的方法, 其中在吡啶的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

40. 权利要求 36-39 任一项的方法, 其中在例如 EtOAc、IPAc、THF、MEK、NMP、乙腈、DMF

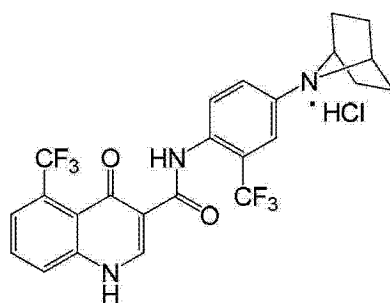
或 2- 甲基四氢呋喃的溶剂的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

41. 权利要求 36-40 任一项的方法, 其中在 2- 甲基四氢呋喃的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

42. 权利要求 36-41 任一项的方法, 其中在保持在 15℃ 至 70℃ 的反应温度进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

43. 权利要求 36-42 任一项的方法, 其中搅拌偶联反应, 持续从约 1.5 小时至约 10 小时的持续时间。

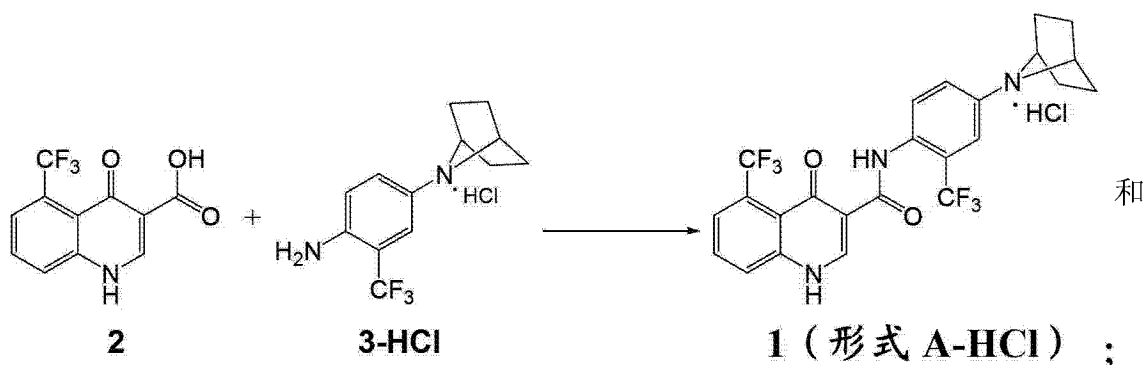
44. 用于制备具有固体形式 A-HCl 的化合物 1 的盐酸盐的方法:



1 (形式 A-HCl)

所述方法包括:

(a) 使化合物 2 与式 3 的盐酸盐 (3-HCl) 在偶联剂的存在下反应, 所述偶联剂选自 2- 氯 -1,3- 二甲基 -2- 咪唑鎓 四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2- 氯 -4,6- 二甲氧基 -1,3,5- 三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**:



(b) 用 HCl 处理步骤 (a) 的产物混合物。

45. 权利要求 44 的方法, 其中在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N- 甲基吗啉 (NMM)、吡啶或二异丙基乙基苯胺 (DIEA) 的碱的存在下进行步骤 (a)。

46. 权利要求 44 或 45 的方法, 其中在吡啶或 DIEA 的存在下进行步骤 (a)。

47. 权利要求 44-46 任一项的方法, 其中在吡啶的存在下进行步骤 (a)。

48. 权利要求 44-47 任一项的方法, 其中在极性非质子溶剂的存在下进行步骤 (a)。

49. 权利要求 44-48 任一项的方法, 其中极性非质子溶剂选自乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、甲基乙基酮、N- 甲基 -2- 吡咯烷酮、乙腈、N,N- 二甲基甲酰胺或 2- 甲基四氢呋喃。

50. 权利要求 44-49 任一项的方法, 其中在 2- 甲基四氢呋喃的存在下进行化合物 2 和 3-HCl 的偶联。

51. 权利要求 44-50 任一项的方法, 其中在保持在 10℃ 和 80℃ 之间的反应温度进行步

骤 (a)。

52. 权利要求 44-51 任一项的方法, 其中在保持在 15℃ 至 70℃ 的反应温度进行步骤 (a)。

53. 权利要求 44-52 任一项的方法, 其中步骤 (a) 的时间是从约 1.5 小时至约 72 小时。

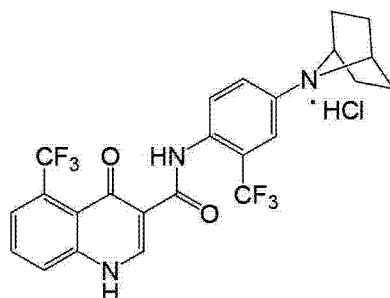
54. 权利要求 44-53 任一项的方法, 其中 HCl 气体用于步骤 (b)。

55. 权利要求 44-54 任一项的方法, 其中将 HCl 气体鼓泡进入包括步骤 (a) 的产物和极性非质子溶剂的混合物。

56. 权利要求 44-55 任一项的方法, 其中极性非质子溶剂是 2- 甲基四氢呋喃。

57. 权利要求 44-56 任一项的方法, 其中将 HCl 气体鼓泡进入步骤 (a) 的产物和极性非质子溶剂的混合物, 持续在从约 0.5 小时至约 5 小时的时期。

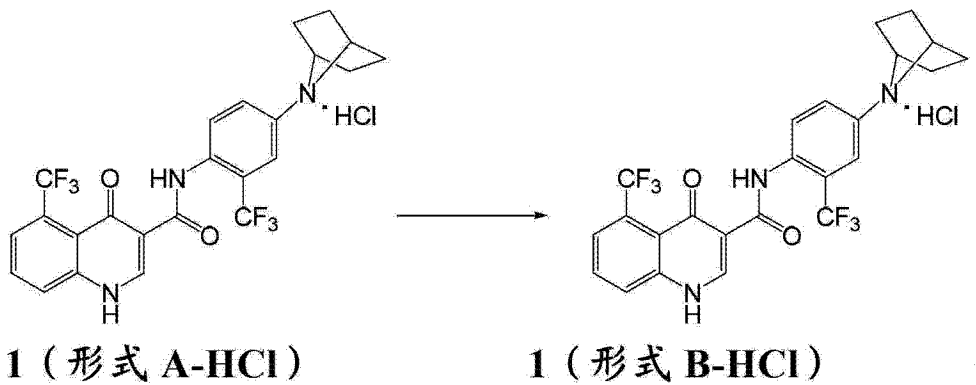
58. 用于制备具有固体形式 B-HCl 的化合物 1 的盐酸盐的方法



1 (形式 B-HCl)

所述方法包括：

(a) 将化合物 1 的盐酸盐形式 A-HCl 与有机溶剂和水混合以产生混合物；



和

(b) 加热混合物。

59. 权利要求 58 的方法, 其中有机溶剂包括二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、二氧六环、六甲基磷酰三胺、四氢呋喃、EtOAc、IPAc、THF、MEK、NMP、乙腈、DMF、EtOH、MeOH、异丙醇或 2- 甲基四氢呋喃。

60. 权利要求 58 或 59 的方法, 其中非质子溶剂包括 2- 甲基四氢呋喃。

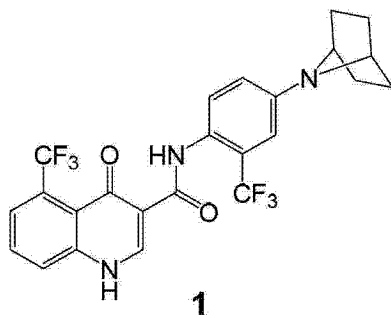
61. 权利要求 58-60 任一项的方法, 其中温度保持在从约 30℃ 至约 80℃。

62. 权利要求 58-61 任一项的方法, 其中混合物保持在约 30℃ 至约 80℃ 的温度, 持续从约 12 小时至约 72 小时的时期。

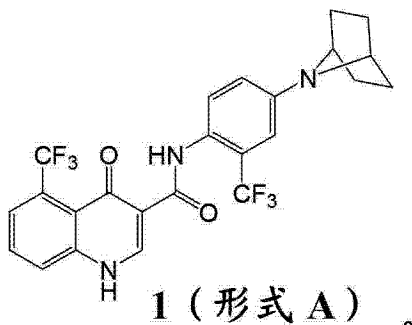
63. 权利要求 58-62 任一项的方法, 其中过滤混合物以产生滤饼。

64. 权利要求 58-63 任一项的方法,其中过滤之后用非质子溶剂洗涤滤饼。

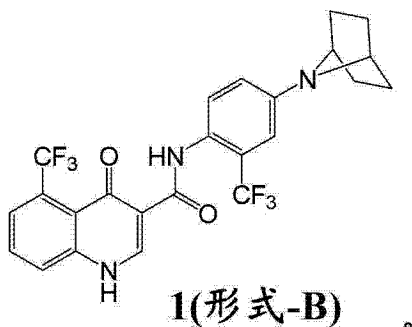
65. 通过权利要求 1 的方法制备的化合物 1



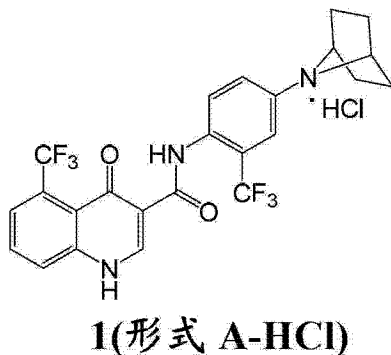
66. 通过权利要求 9 的方法制备的化合物 1 形式 -A



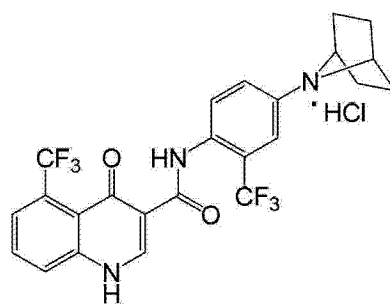
67. 通过权利要求 36 的方法制备的化合物 1 形式 -B



68. 通过权利要求 44 的方法制备的化合物 1 形式 A-HCl



69. 通过权利要求 58 的方法制备的化合物 1 形式 B-HCl



1(形式 B-HCl) 。

用于制备囊性纤维化跨膜传导调节因子的调节剂的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在 2009 年 10 月 23 日提交的临时申请 U.S. 序列号 61/254,634 的优先权。其内容通过引用完整地并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于制备囊性纤维化跨膜传导调节因子 (“CFTR”) 的调节剂的方法。

背景技术

[0004] 囊性纤维化 (CF) 是隐性遗传病,其在美国影响约 30,000 儿童和成人,在欧洲影响约 30,000 儿童和成人。尽管有 CF 的治疗方法,但没有治愈方法。

[0005] CF 由囊性纤维化跨膜传导调节因子 (CFTR) 基因突变引起,所述基因编码上皮氯离子通道,所述通道在多种组织中负责辅助调节盐和水的吸收和分泌。增加 CFTR 通道开放可能性的称作强化因子的小分子药物代表一种治疗 CF 的有效治疗策略。

[0006] 特定地,CFTR 是 cAMP/ATP- 介导的阴离子通道,其在多种细胞类型中表达,所述细胞类型包括吸收和分泌上皮细胞,其中它调节跨膜的阴离子流通,并调节其他离子通道和蛋白质的活性。在上皮细胞中,CFTR 的正常功能对于维持包括呼吸和消化组织在内的整个身体的电解质转运是非常关键的。CFTR 是由约 1480 个氨基酸构成的,这些氨基酸编码由跨膜结构域的串联重复构成的蛋白质,每个跨膜结构域包含 6 个跨膜螺旋和 1 个核苷酸结合结构域。2 个跨膜结构域通过一个具有多个磷酸化位点的大的、极性的、调节性 (R)- 结构域相连,所述磷酸化位点调节通道活性和细胞运输。

[0007] 已经鉴定出了编码 CFTR 的基因并测定了其序列 (参见 Gregory, R. J. 等人 (1990) Nature 347 :382-386 ;Rich, D. P. 等人 (1990) Nature 347 :358-362), (Riordan, J. R. 等人 (1989) Science 245 :1066-1073)。这个基因的缺陷引起 CFTR 突变,导致囊性纤维化 (“CF”),是人体最常见致命的遗传性疾病。在美国,囊性纤维化影响约 2,500 分之一的婴儿。在一般的美国人口中,高达 1 千万的人携带有单个拷贝这样的缺陷基因,但没有明显的不良效果。与此不同的是,具有 2 拷贝与 CF 有关的基因的个体会发生 CF 的致虚弱和致命作用,包括慢性肺病。

[0008] 在 CF 患者中,在呼吸上皮中内源性表达的 CFTR 突变导致顶膜的阴离子分泌减少,使离子和液体转运失衡。所导致的阴离子转运的减少使得 CF 患者的肺粘液蓄积增加并伴随最终导致死亡的微生物感染。除了呼吸性疾病,CF 患者典型地具有胃肠方面的问题和胰功能不全,如果不治疗的话,会导致死亡。此外,大部分患有囊性纤维化的男性都不能生育,而患囊性纤维化的女性则生育力降低。与 2 拷贝和 CF 有关的基因所带来的严重后果不同的是,携带有单个拷贝与 CF 有关的基因的个体显示出对霍乱和腹泻导致的脱水的抵抗力增强——可能解释了 CF 基因在这个人群中的相对高频率出现。

[0009] CF 染色体的 CFTR 基因的序列分析显示了很多导致疾病的突变 (Cutting, G. R. 等人 (1990) Nature 346 :366-369 ;Dean, M. 等人 (1990) Cell 61 :863 :870 ;和 Kerem, B-S. 等

人 (1989) *Science* 245 :1073-1080 ;Kerem, B-S 等人 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 8447-8451)。迄今为止,已经鉴定出了 >1000 种引起疾病的 CF 基因突变 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>)。最常见的突变是在 CFTR 氨基酸序列的 508 位上苯丙氨酸的缺失,一般称作 $\Delta F508$ -CFTR。这种突变在约 70% 的囊性纤维化病例中都会发生,与严重的疾病有关。

[0010] $\Delta F508$ -CFTR 中残基 508 的缺失妨碍了初生蛋白正确折叠。这导致该突变蛋白不能退出 ER,和抵达质膜。结果,膜中存在的通道数量远小于表达野生型 CFTR 的细胞中所观察到的数量。除了运输受损,该突变导致通道门控缺陷。这样加起来,膜中通道数量减少和门控缺陷导致通过上皮的阴离子转运减少,导致离子和液体转运出现缺陷 (Quinton, P. M. (1990), *FASEB J.* 4 :2709-2727)。但是,研究已经显示出,尽管比野生型 CFTR 少,膜中数量减少的 $\Delta F508$ -CFTR 是有功能的。(Dalemans 等人 (1991), *Nature Lond.* 354 :526-528 ; Denning 等人,出处同前 ;Pasyk 和 Foskett (1995), *J. Cell. Biochem.* 270 :12347-50)。除了 $\Delta F508$ -CFTR 以外,导致运输、合成和 / 或通道门控缺陷的其他的引起疾病的 CFTR 突变可以被上调或下调,以改变阴离子分泌并改变疾病进程和 / 或严重性。

[0011] 尽管除了阴离子外 CFTR 还转运多种分子,但是显然,这种作用 (转运阴离子) 代表了跨上皮细胞转运离子和水的重要机制中的一个要素。其他要素包括上皮 Na^+ 通道、ENaC、 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运蛋白、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道,它们负责将氯离子吸收到细胞中。

[0012] 这些要素一起运作,以通过它们在细胞中的选择性表达和定位实现跨上皮细胞的定向转运。通过存在于顶膜上的 ENaC 和 CFTR 与在细胞的基底外侧表面上表达的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和 Cl^- 离子通道之间的协调性活性,发生了氯离子的吸收。氯离子从腔侧的继发性主动转运导致细胞内的氯离子蓄积,接着可被动地通过 Cl^- 通道离开细胞,导致矢量转运。基底外侧表面上的 $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ 共转运蛋白、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶泵和基底外侧膜 K^+ 通道和腔侧上的 CFTR 的排列,通过腔侧上的 CFTR 来协调氯离子的分泌。由于水可能从不自己主动转运,因此它依靠钠和氯离子的总体流量产生的微小的跨上皮渗透梯度流过上皮。

[0013] 如上所述,据认为, $\Delta F508$ -CFTR 中残基 508 的缺失会妨碍初生蛋白正确折叠,导致该突变蛋白不能退出 ER,并被运输至质膜。结果,质膜中存在的成熟蛋白量不足,上皮组织内的氯离子转运显著减少。事实上,经由 ER 机制加工 ABC 转运蛋白的 ER 缺陷的这种细胞现象已经显示出,其不仅是 CF 疾病的潜在基础,也是范围广泛的其他独立和遗传疾病的潜在基础。

[0014] 因此,对人 CFTR 野生型和突变型的有效和选择性 CFTR 增强剂存在需求。这些突变型 CFTR 包括、但不限于 $\Delta F508\text{del}$ 、G551D、R117H、2789+5G→A。

[0015] 对 CFTR 活性调节剂及其组合物也存在需求,它们可以用于调节哺乳动物细胞膜中的 CFTR 活性。

[0016] 对使用这种 CFTR 活性调节剂治疗因 CFTR 中突变导致的疾病的方法存在需求。

[0017] 对调节哺乳动物离体细胞膜中 CFTR 活性的方法存在需求。

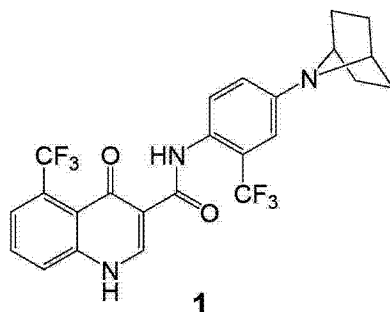
[0018] 此外,对易于用于适合于用作治疗剂的药物组合物的所述化合物的稳定固体形式存在需求。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明涉及合成用作 CFTR 调节剂的化合物的方法。

[0021] 一方面,本发明提供用于制备化合物 1 的晶体形式的方法:

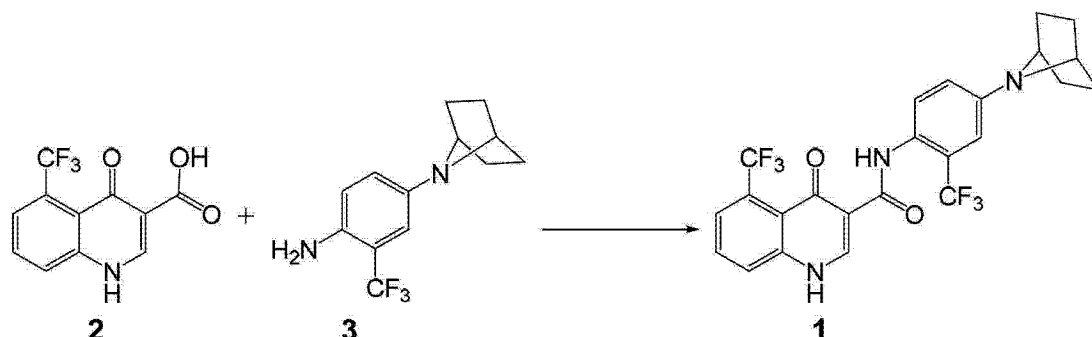
[0022]



[0023] 所述方法包括:

[0024] (a) 在偶联剂的存在下化合物 2 与化合物 3 反应:

[0025]



[0026] 其中偶联剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓(四)氟硼酸酯、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**。

[0027] 式 I 的化合物及其药学可接受的组合物适用于治疗多种疾病、障碍或病症或者减轻其严重性,所述疾病、障碍或病症包括但不限于囊性纤维化、哮喘、吸烟导致的 COPD、慢性支气管炎、鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰腺功能不全、先天性双侧输精管缺失导致的雄性不育(CBAVD)、轻度肺病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲菌病(ABPA)、肝病、遗传性肺气肿、遗传性血色素沉着、凝血-纤维蛋白溶解缺陷,例如蛋白质 C 缺乏、1 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷(processing deficiencies)、例如家族性高胆固醇血症、1 型乳糜微粒血症、无 β -脂蛋白血症、溶酶体贮积病、例如 I-细胞病/假性胡尔勒病、粘多糖病、桑霍夫病/泰-萨病、克-纳综合征 II 型(Crigler-Najjar type II)、多内分泌腺病/高胰岛素血症(hyperinsulemia)、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺陷(myeloperoxidase deficiency)、原发性甲状旁腺机能减退、黑素瘤、glycanosis CDG 1 型、先天性甲状腺机能亢进、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺陷(ACT deficiency)、尿崩症(DI)、神经生长性 DI(neurophyseal DI)、肾性 DI(nephrogenic DI)、夏-马-图三氏综合征(Charcot-Marie Tooth syndrome)、佩-梅病(Perlizaeus-Merzbacher disease)、神经变性疾病、例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、皮克病、若干聚谷氨酰胺神经病学障碍(polyglutamine neurological disorder)、例如亨廷顿氏病、I 型脊髓小脑性共济失调类、脊髓与延髓肌肉萎缩、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩和肌强直性营养不良,以及海绵状脑病、例如遗传性克-雅病(由于朊病毒蛋白加

工缺陷(processing defect))、法布里病、Straussler-Scheinker 综合征、COPD、干眼病或斯耶格伦病(Sjogren's disease)、骨质疏松症、骨质减少、骨治愈和骨发育(包括骨修复、骨再生、骨质吸收减少和骨沉积增加)、Gorham 综合征、氯离子通道病(chloride channelopathies)、例如先天性肌强直(Thomson 和 Becker 型)、巴特综合征 III 型、Dent 病、震惊综合征(hyperekplexia)、癫痫症、震惊综合征、溶酶体贮积病、Angelman 综合征、原发性纤毛运动障碍(PCD)、该术语用于表示纤毛结构和/或功能的遗传性障碍、包括具有左右转位的 PCD(也称作卡塔格内综合征)、没有左右转位和纤毛发育不良(ciliary aplasia)的 PCD)。

[0028] 在一方面,化合物 1 在称为形式 A 的晶体形式中。

[0029] 在另一方面,化合物 1 在称为形式 B 的晶体形式中。

[0030] 在又一方面,化合物 1 在称为形式 A-HCl 的晶体形式中。

[0031] 在另一方面,化合物 1 在称为形式 B-HCl 的晶体形式中。

[0032] 本文描述的方法可用于制备本发明的组合物,所述组合物包括形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl,或这些形式的任意组合。

[0033] 附图简述

[0034] 图 1 是化合物 1 形式 A 的代表性样品的 X 射线粉末衍射图。

[0035] 图 2 是化合物 1 形式 A 的代表性样品的 FTIR 光谱。

[0036] 图 3 是基于单晶 X 射线分析的化合物 1 形式 A 的构象结构的图解。

[0037] 图 4 是化合物 1 形式 A-HCl 的示例性样品的 X 射线粉末衍射图。

[0038] 图 5 是化合物 1 形式 A-HCl 的代表性样品的 DSC 曲线。

[0039] 图 6 是通过化合物 1 形式 A-HCl 的代表性样品的热重分析产生的曲线,其表示样品重量是温度的函数。

[0040] 图 7 是化合物 1 形式 A-HCl 的代表性样品的 FTIR 光谱。

[0041] 图 8 是化合物 1 形式 A-HCl 的代表性样品的固相 ^{13}C NMR 光谱。

[0042] 图 9 是化合物 1 形式 A-HCl 的代表性样品的固相 ^{19}F NMR 光谱。

[0043] 图 10A 是用仪器 1 记录的化合物 1 形式 B 的代表性样品的 X 射线粉末衍射图。

[0044] 图 10B 是用仪器 2 记录的化合物 1 形式 B 的代表性样品的 X 射线粉末衍射图。

[0045] 图 11 是化合物 1 形式 B 的代表性样品的 DSC 曲线。

[0046] 图 12 是通过化合物 1 形式 B 的代表性样品的热重分析产生的曲线,其表示样品重量是温度的函数。

[0047] 图 13 是化合物 1 形式 B 的代表性样品的 FTIR 光谱。

[0048] 图 14 是化合物 1 形式 B 的代表性样品的固相 ^{13}C NMR 光谱。

[0049] 图 15 是化合物 1 形式 B 的代表性样品的固相 ^{19}F NMR 光谱。

[0050] 图 16 是化合物 1 形式 B-HCl 的 X 射线粉末衍射图。

[0051] 图 17 是化合物 1 形式 B-HCl 的代表性样品的 DSC 曲线。

[0052] 图 18 是通过化合物 1 形式 B-HCl 的代表性样品的热重分析产生的曲线,其表示样品重量是温度的函数。

[0053] 图 19 是化合物 1 形式 B-HCl 的代表性样品的 FTIR 光谱。

[0054] 图 20 是化合物 1 形式 B-HCl 的代表性样品的固相 ^{13}C NMR 光谱。

[0055] 图 21 是化合物 1 形式 B-HCl 的代表性样品的固相 ^{19}F NMR 光谱。

[0056] 发明详述

[0057] 定义

[0058] 除非另作陈述,否则本文所用的下列定义应适用。

[0059] 本文使用的术语“ABC- 转运蛋白”是指 ABC- 转运蛋白蛋白质或其包含至少一个结合结构域的片段,其中所述蛋白或其片段存在于体内或体外。本文使用的术语“结合结构域”是指可以与调节剂结合的 ABC- 转运蛋白上的结构域。参见,例如 Hwang, T. C. 等人, J. Gen. Physiol. (1998):111(3), 477-90。

[0060] 本文所用的术语“CFTR”意指囊性纤维化跨膜传导调节因子或具有其调节剂活性的突变体,包括但不限于 $\Delta\text{F508CFTR}$ 、R117H CFTR 和 G551D CFTR(关于 CFTR 突变例如参见 <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>)。

[0061] 本文所用的术语“调节”意指以可测量的量增加或降低。

[0062] 本文所用的术语“正常 CFTR”或“正常 CFTR 功能”是指不具有任何因环境因素导致的损伤的类似于野生型的 CFTR,所述的环境因素例如吸烟、污染或任何在肺中产生炎症的情况。

[0063] 本文所用的术语“减少的 CFTR”或“降低的 CFTR 功能”是指少于正常 CFTR 或低于正常 CFTR 功能。

[0064] 术语“晶体”意指化合物或组合物,其中结构单元以固定几何模式或晶格排列,使得晶体固体具有刚性大范围次序。构成晶体结构的结构单元可以是原子、分子或离子。晶体固体显示确定的熔点。

[0065] 术语“基本上晶体”是指主要以具有刚性大范围次序的固定几何模式或晶格排列的固体物质。例如基本上晶体物质具有大于约 85% 的结晶度(例如大于约 90% 的结晶度、大于约 95% 的结晶度或大于约 99% 的结晶度)。还应注意术语“基本上晶体”包括在前述段落中定义的主题词“晶体”。

[0066] 为本发明的目的,依照第 75 版化学和物理学手册, CAS 版元素周期表确定化学元素。此外,有机化学的一般原则描述于“Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito:1999, 和“March's Advanced Organic Chemistry”, 第 5 版, 编辑: Smith, M. B. 和 March, J., John Wiley & Sons, New York:2001, 其全部内容通过引用并入本文。

[0067] 本文使用的术语“稳定的”意指当其经历它们的制备、测定,和优选地它们的回收、纯化,和用于一种或多种本文公开的目的的情况时,化合物基本上不变。在某些实施方案中,稳定的化合物或化学可行的化合物是当保持 40°C 或更低的温度,无潮湿或其它化学反应条件时,至少 1 周基本上不变的化合物。

[0068] 可用于本发明的适宜的溶剂的实例是,而不限于,水、甲醇、二氯甲烷(DCM)、乙腈、二甲基甲酰胺(DMF)、乙酸甲酯(MeOAc)、乙酸乙酯(EtOAc)、乙酸异丙酯(IPAc)、乙酸叔丁基酯(叔-BuOAc)、异丙醇(IPA)、四氢呋喃(THF)、甲基乙基酮(MEK)、叔-丁醇、乙醚(Et_2O)、甲基-叔-丁基醚(MTBE)、1,4-二氧六环和 N-甲基吡咯烷酮(NMP)。

[0069] 可用于本发明的适宜的偶联剂的实例是,而不限于,1-(3-(二甲氨基)丙基)-3-乙基-碳二亚胺盐酸盐(EDCI)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六

氟磷酸盐 (HBTU)、1-羟基苯并三唑 (HOBT)、2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 (HATU)、2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、1-H-苯并三唑鎓-1-[双(二甲氨基)亚甲基]-5-氯六氟磷酸盐 (HCTU)、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪和 2-丙烷膦酸酐(**T3P**[®])。

[0070] 可用于本发明的适宜的碱的实例是,而不限于,碳酸钾 (K_2CO_3)、N-甲基吗啉 (NMM)、三乙胺 (Et_3N ; TEA)、二异丙基-乙胺 ($i-Pr_2EtN$; DIEA)、吡啶、氢氧化钾 (KOH)、氢氧化钠 (NaOH) 和甲醇钠 ($NaOMe$; $NaOCH_3$)。

[0071] 此外,除非另有说明,本文描述的结构也意欲包括仅在一个或多个同位素富集原子上存在不同的化合物。例如,具有本文所述结构的化合物,但是用氘或氚代替氢,或用 ^{13}C - 或 ^{14}C - 代替碳,在本发明的范围内。这类化合物用于,例如,在生物学测试中作为分析工具或探针。

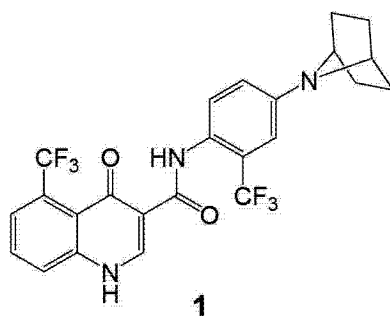
[0072] 本发明的方法

[0073] 通常,本发明提供用作 CFTR 调节剂的化合物的合成方法。

[0074] 化合物 1 的制备

[0075] 在某些实施方案中,本发明提供用于制备化合物 1 的晶体形式的方法:

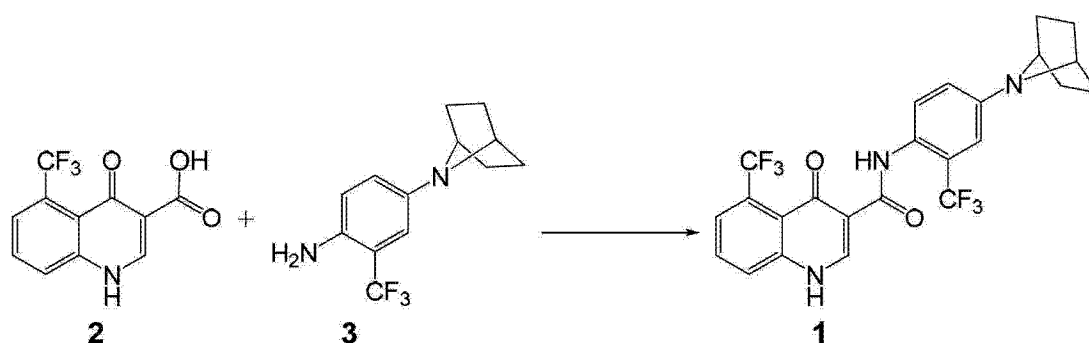
[0076]



[0077] 所述方法包括:

[0078] (a) 使化合物 2 与化合物 3 在偶联剂的存在下反应

[0079]



[0080] 其中偶联剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P**[®]。

[0081] 在本实施方案的另一方案,化合物 3 可以是 HCl 盐。

[0082] 在本实施方案的一个方面,在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N-甲基吗啉 (NMM)、吡啶或二异丙基乙胺 (DIEA) 的碱存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

[0083] 在本实施方案的另一方案,在吡啶或 DIEA 的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶

联。

[0084] 在本实施方案的另一方面,在吡啶的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

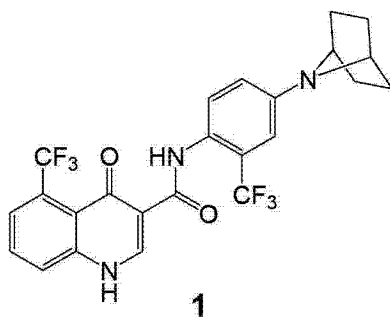
[0085] 在本实施方案的另一方面,在溶剂的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。在一方面,溶剂是极性非质子溶剂。例如,溶剂选自乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、甲基乙基酮、N- 甲基-2- 吡咯烷酮、乙腈、N, N- 二甲基甲酰胺或 2- 甲基四氢呋喃。更具体地,溶剂是 2- 甲基四氢呋喃。

[0086] 在本实施方案的另一方面,在保持在 30℃至 80℃的反应温度进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。在其它方面,在保持在 30℃至 80℃的反应温度进行化合物 2 和式 3 的苯胺的偶联(例如,在约 40℃和 78℃之间,在约 45℃和 75℃之间,在约 50℃和 70℃之间,在约 62℃和 68℃之间,或约 65℃。)例如,在保持在约 65℃的反应温度进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

[0087] 在本实施方案的另一方面, 化合物 1 是固体形式 A。

[0088] 在另一个实施方案中,本发明提供通过描述于先前段落的方法制备的化合物 1。

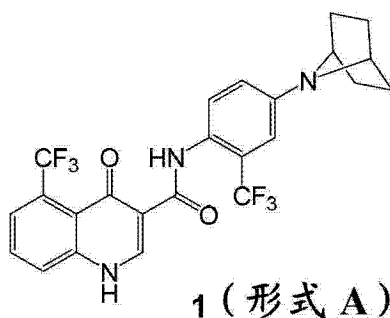
[0089]



[0090] 化合物 1 形式 A 的制备

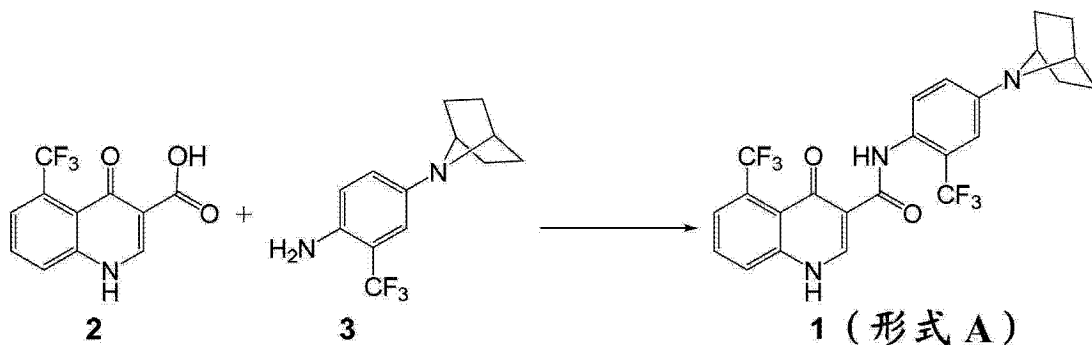
[0091] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备具有固体形式 A 的化合物 1 的方法,

[0092]



[0093] 在偶联剂的存在下将化合物 2 与化合物 3 进行反应

[0094]



[0095] 其中偶联剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**。

[0096] 在本实施方案的某些其它方面,化合物 3 可以是 HCl 盐。

[0097] 在本实施方案的一个方面,在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N-甲基吗啉 (NMM)、吡啶或二异丙基乙胺 (DIEA) 的碱的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

[0098] 在本实施方案的另一方面,在吡啶或 DIEA 的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的反应。

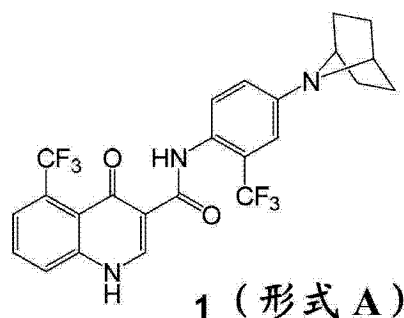
[0099] 在本实施方案的另一方面,在吡啶的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

[0100] 在本实施方案的另一方面,在极性非质子溶剂的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。例如,极性非质子溶剂选自乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、甲基乙基酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺或 2-甲基四氢呋喃。更具体地,在 2-甲基四氢呋喃的存在下进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

[0101] 在本实施方案的另一方面,在保持在 30°C 至 80°C 的反应温度进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。在其它方面,在保持在 30°C 至 80°C 的反应温度 (例如,在约 40°C 和 78°C 之间,在约 45°C 和 75°C 之间,在约 50°C 和 70°C 之间,在约 62°C 和 68°C 之间,或约 65°C), 进行化合物 2 和式 3 的苯胺的偶联。例如,在保持在约 65°C 的反应温度进行化合物 2 和化合物 3 的偶联。

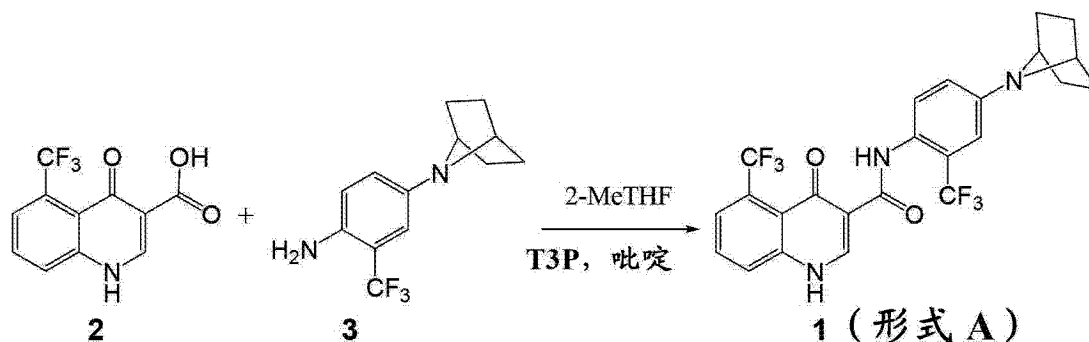
[0102] 在另一个实施方案中,本发明提供通过前述段落描述的方法制备的化合物 1 形式 A。

[0103]



[0104] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 1 形式 A 的方法,所述方法包括在 **T3P®** 和吡啶的存在下,在约 65°C 的温度,将化合物 2 与化合物 3 在溶剂 2-MeTHF 中反应约 10 小时。

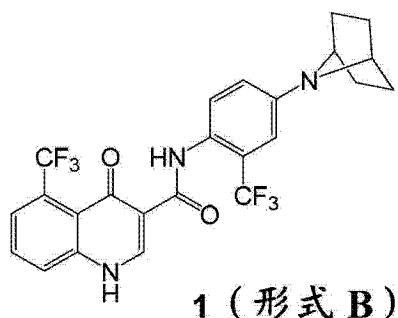
[0105]



[0106] 化合物 1 形式 B 的制备

[0107] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备具有固体形式形式 B 的化合物 1 的方法:

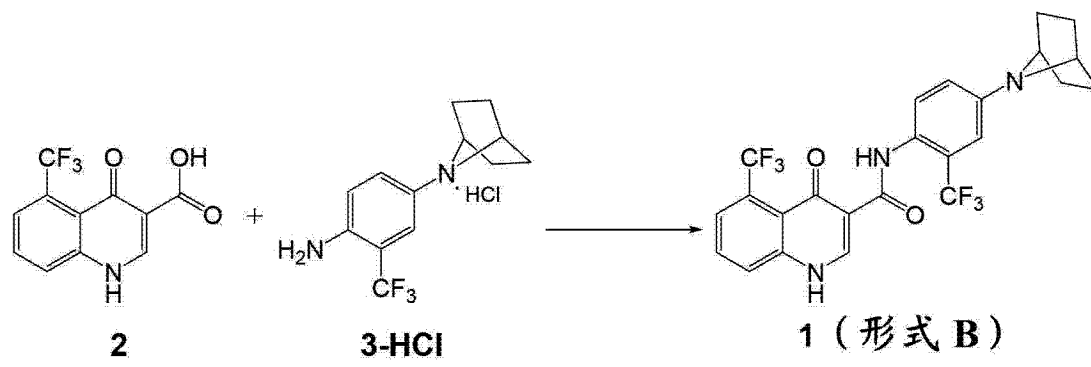
[0108]



[0109] 所述方法包括:

[0110] (a) 在偶联剂的存在下将化合物 2 与化合物 3 的盐酸盐 (3-HCl) 反应,所述偶联剂选自 2-氯-1,3-二甲基-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**

[0111]



[0112] 在本实施方案的一个方面,在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N-甲基吗啉 (NMM)、吡啶或 DIEA 的碱的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

[0113] 在本实施方案的某些其它方面,盐酸盐 3-HCl 可以是化合物 3。

[0114] 在本实施方案的另一方面,在吡啶或 DIEA 的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

[0115] 在本实施方案的另一方面,在吡啶的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

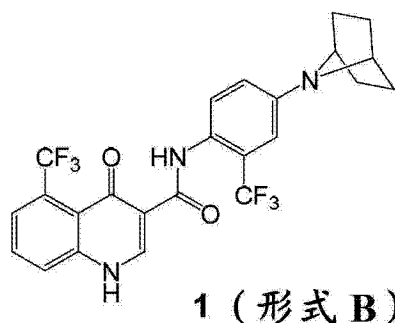
[0116] 在本实施方案的另一方面,在例如 $EtOAc$ 、 $IPAc$ 、THF、MEK、NMP、乙腈、DMF、或 2-甲基四氢呋喃的溶剂的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。更具体地,在 2-甲基四氢呋喃的存在下进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。

[0117] 在本实施方案的另一方面,在保持在 $15^{\circ}C$ 至 $70^{\circ}C$ 的反应温度进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。在其它方面,在保持在 $15^{\circ}C$ 至 $70^{\circ}C$ 的反应温度 (例如,在约 $20^{\circ}C$ 和 $65^{\circ}C$ 之间,在约 $25^{\circ}C$ 和 $60^{\circ}C$ 之间,在约 $30^{\circ}C$ 和 $55^{\circ}C$ 之间,在约 $35^{\circ}C$ 和 $50^{\circ}C$ 之间,或约 $45^{\circ}C$), 进行化合物 2 和盐酸盐 3-HCl 的偶联。在本实施方案一个优选的方面,在保持在约 $45^{\circ}C$ 的反应温度进行化合物 2 和化合物 3 的 HCl 盐的偶联。

[0118] 在另一方面,搅拌偶联反应,持续从约 1.5 小时至约 10 小时的持续时间。在其它方面,搅拌偶联反应,持续约 1.5 小时至约 10 小时的持续时间 (例如,从约 2 小时至约 7 小时,从约 3 小时至约 6 小时,从约 4 小时至约 5.5 小时,或约 5 小时)。

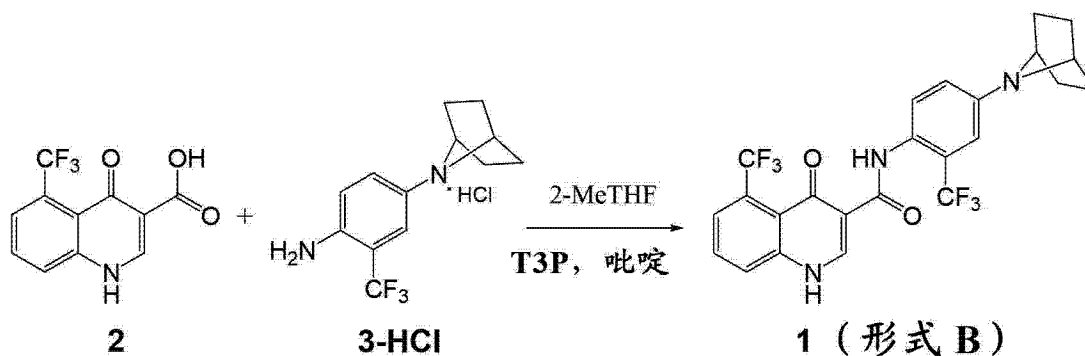
[0119] 在另一个实施方案中,本发明提供通过前述段落描述的方法制备的化合物 1 形式 B。

[0120]



[0121] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 1 形式 B 的方法,所述方法包括在 **T3P®** 和吡啶的存在下在约 45°C 的温度在溶剂 2-MeTHF 中将化合物 2 与化合物 3-HCl 反应约 5-6 小时。

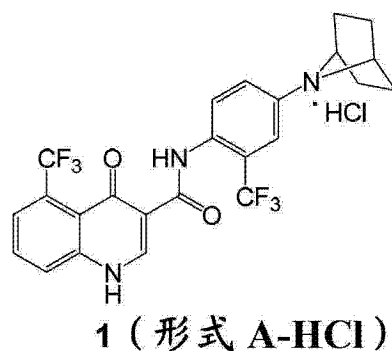
[0122]



[0123] 化合物 1 形式 A-HCl 的制备

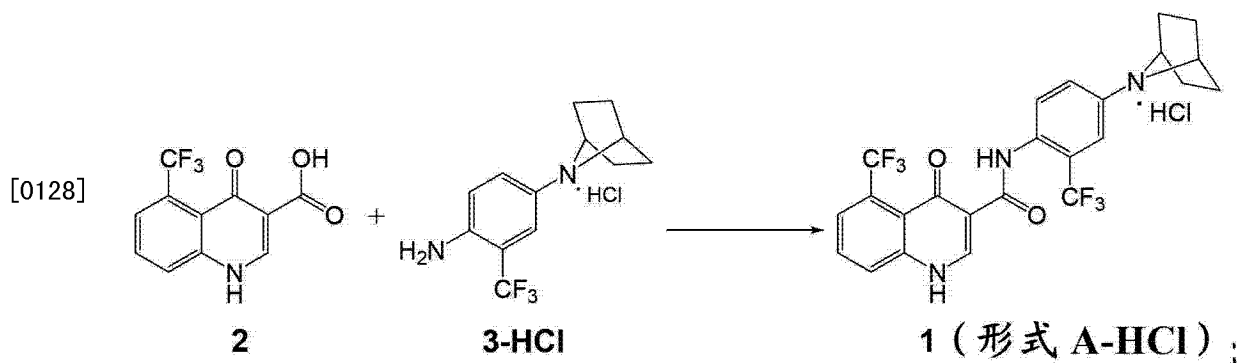
[0124] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备具有固体形式 A-HCl 的化合物 1 的盐酸盐的方法:

[0125]



[0126] 所述方法包括:

[0127] (a) 在偶联剂的存在下将化合物 2 与化合物 3 的盐酸盐 (3-HCl) 反应,所述偶联剂选自 2-氯-1,3-二甲氧-2-咪唑鎓四氟硼酸盐、HBTU、HCTU、2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、HATU、HOBT/EDC 和 **T3P®**:



和

[0129] (b) 将步骤 (a) 的产物的混合物用 HCl 处理。

[0130] 在本实施方案的一个方面,在例如 K_2CO_3 、 Et_3N 、N- 甲基吗啉 (NMM)、吡啶或二异丙基乙胺 (DIEA) 的碱的存在下进行步骤 (a)。

[0131] 在本实施方案的另一方面,在吡啶或 DIEA 的存在下进行步骤 (a)。

[0132] 在本实施方案的另一方面,在吡啶的存在下进行步骤 (a)。

[0133] 在本实施方案的另一方面,在极性非质子溶剂的存在下进行步骤 (a)。例如,极性非质子溶剂选自乙酸乙酯、乙酸异丙酯、四氢呋喃、甲基乙基酮、N- 甲基-2- 吡咯烷酮、乙腈、N,N- 二甲基甲酰胺或 2- 甲基四氢呋喃。更具体地,在 2- 甲基四氢呋喃的存在下进行化合物 2 和 3-HCl 的偶联。

[0134] 在本实施方案的另一方面,在保持在 $10^{\circ}C$ 和 $80^{\circ}C$ 之间的反应温度进行步骤 (a)。在本实施方案的另一方面,在保持在 $15^{\circ}C$ 至 $70^{\circ}C$ 的反应温度进行步骤 (a)。在其它方面,在保持在 $15^{\circ}C$ 至 $70^{\circ}C$ 的反应温度 (例如,在约 $20^{\circ}C$ 和 $65^{\circ}C$ 之间,在约 $25^{\circ}C$ 和 $60^{\circ}C$ 之间,在约 $30^{\circ}C$ 和 $55^{\circ}C$ 之间,在约 $35^{\circ}C$ 和 $50^{\circ}C$ 之间,或约 $45^{\circ}C$),进行化合物 2 和化合物 3 的 HCl 盐的偶联。例如,在保持在约 $45^{\circ}C$ 的反应温度进行化合物 2 和 3-HCl 的偶联。

[0135] 在本实施方案的另一方面,步骤 (a) 的时间是从约 1.5 小时至约 72 小时。在其它方面,搅拌偶联反应,持续约 1.5 小时至约 72 小时或更久的持续时间 (例如,从约 2 小时至约 48 小时,从约 3 小时至约 24 小时,从约 5 小时至约 20 小时,或从约 12 小时至约 15 小时)。

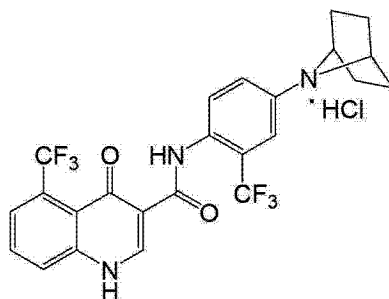
[0136] 在本实施方案的另一方面,将在步骤 (a) 中的偶联产物在步骤 (b) 中用氯化氢 (HCl) 处理。例如,将 HCl 气体鼓泡进入包括步骤 (a) 的偶联反应的产物和例如 2- 甲基四氢呋喃的极性非质子溶剂的混合物。

[0137] 典型地,将至少约 1 当量的 HCl 气体,和至多约 50 当量的 HCl 气体鼓泡进入混合物。更典型地,将从约 2 当量 (eq.) 至约 20 当量 (从约 5eq 至约 15eq,从约 8eq 至约 12eq,或约 10eq) 的 HCl 气体鼓泡进入包括步骤 (a) 的偶联产物的反应混合物。

[0138] 典型地,将 HCl 气体以约 0.5 小时至约 5 小时的时期鼓泡进入步骤 (a) 的产物和例如非质子溶剂的溶剂的混合物,更典型地,以约 0.5 小时至约 5 小时的时期 (例如,从约 0.75 小时至约 3 小时,或约 2 小时)。

[0139] 在另一个实施方案中,本发明提供通过前述段落描述的方法制备的化合物 1 形式 A-HCl。

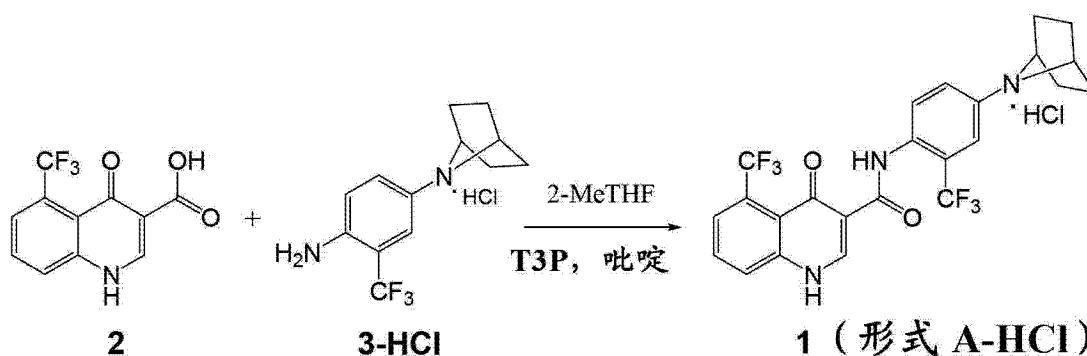
[0140]



1 (形式 A-HCl)

[0141] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 1 形式 A-HCl 的方法,所述方法包括在**T3P®**和吡啶的存在下在约 45°C 的温度在溶剂 2-MeTHF 中将化合物 2 与化合物 3-HCl 反应约 12-15 小时,接着用气态的 HCl 处理。

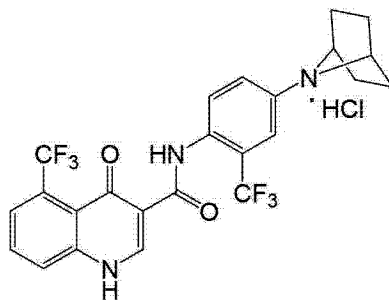
[0142]



[0143] 化合物 1 形式 B-HCl 的制备

[0144] 在另一方面,本发明提供用于制备具有固体形式形式 B-HCl 的化合物 1 的盐酸盐的方法:

[0145]

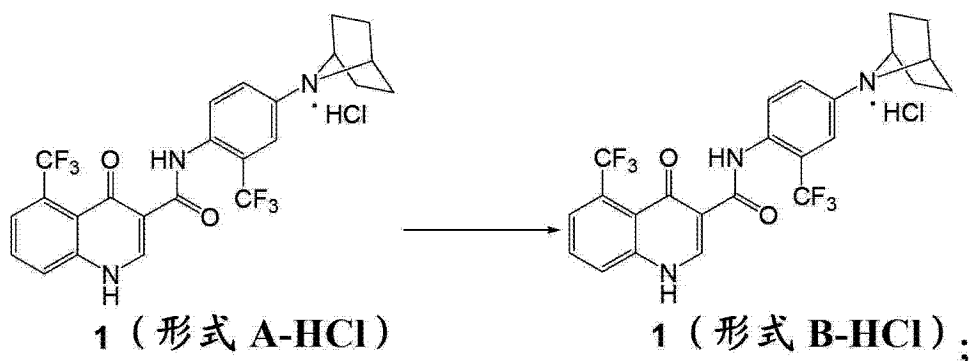


1 (形式 B-HCl)

[0146] 所述方法包括:

[0147] (a) 将如本文所述的化合物 1 形式 A-HCl 的盐酸盐与有机溶剂和水混合以产生混合物:

[0148]



[0149] 和

[0150] (b) 加热混合物。

[0151] 在本实施方案的一个方面,有机溶剂包括二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、二氧六环、六甲基磷酰三胺、四氢呋喃、EtOAc、IPAc、THF、MEK、NMP、乙腈、DMF、EtOH、MeOH、异丙醇或2-甲基四氢呋喃。更具体地,非质子溶剂包括2-甲基四氢呋喃。

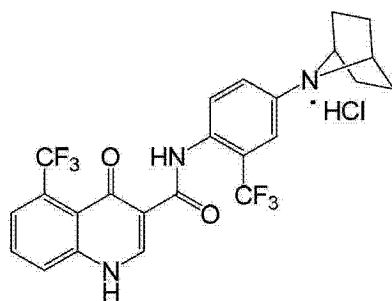
[0152] 在另一方面,在步骤(b)中继续在步骤(a)中的混合,将混合物保持在从约30℃至约80℃的温度(例如,从约40℃至约70℃,从约50℃至约65℃,或约60℃)。权利要求40-43的方法,其中将混合物保持在30℃至约80℃的温度,持续从约12小时至约72小时的时间。

[0153] 在另一方面,在步骤(b)中在加热之后,将混合物过滤以产生滤饼。

[0154] 在另一方面,过滤后,用例如2-甲基四氢呋喃的非质子溶剂洗涤滤饼。

[0155] 在另一个实施方案中,本发明提供通过前述段落描述的方法制备的化合物1形式B-HCl。

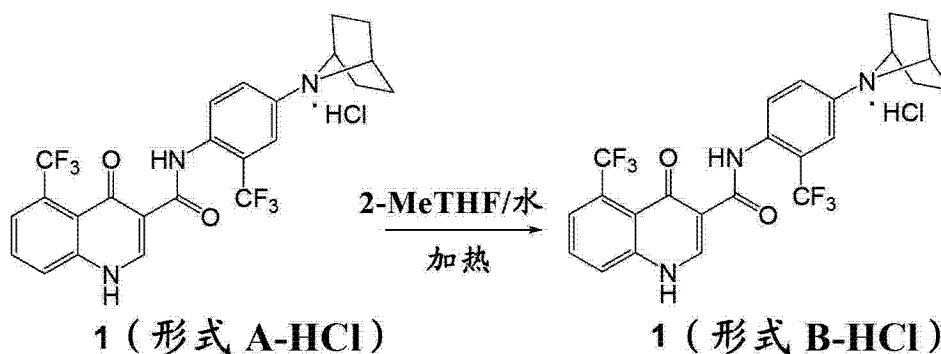
[0156]



1 (形式 B-HCl)

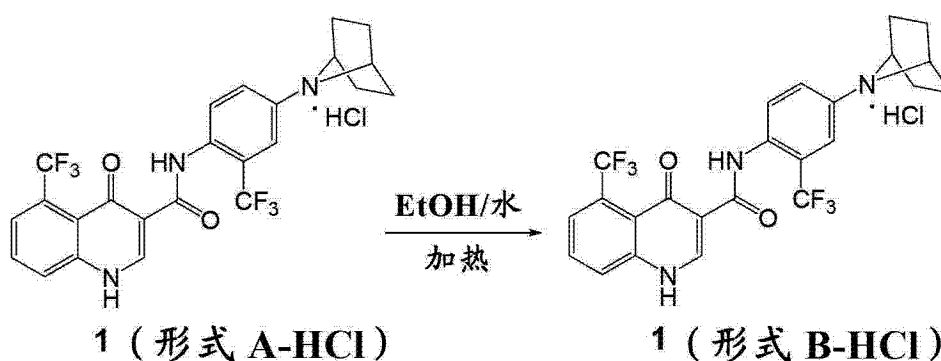
[0157] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物1形式B-HCl的方法,所述方法包括在2-MeTHF和水的混合物中的化合物1形式A-HCl在60℃的温度加热48小时;冷却至室温和过滤沉淀的产物;和在真空下在60℃的温度干燥产物。

[0158]



[0159] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 1 形式 B-HCl 的方法,所述方法包括将 EtOH 和水的混合物中的化合物 1 形式 A-HCl 加热至回流温度;冷却至 20℃,并搅拌 3 小时;过滤沉淀的产物;在真空下在 45℃ 的温度干燥产物。

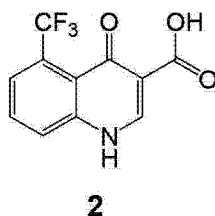
[0160]



[0161] 化合物 2、3 和 3-HCl 的制备

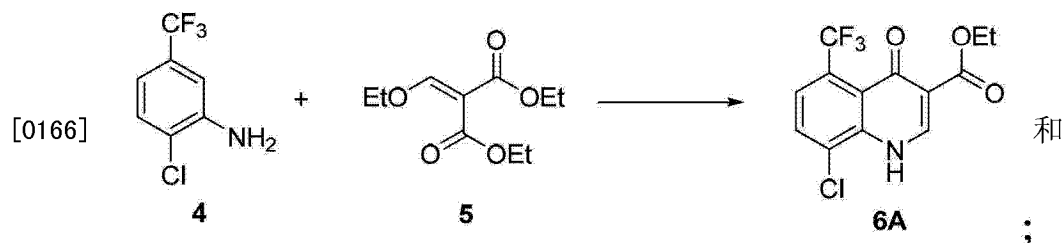
[0162] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 2 的方法:

[0163]



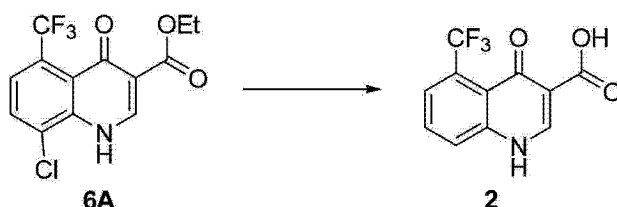
[0164] 所述方法包括:

[0165] (a) 将化合物 4 与二乙基 2-(乙氧亚甲基)丙二酸酯 5 反应以产生酯 6A



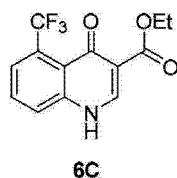
[0167] (b) 在催化剂和碱的存在下在单独的步骤中将酯 6A 用例如氢气或甲酸盐 (formate) 的原子氢源处理,以产生化合物 2

[0168]



[0169] 在一方面,在催化剂的存在下将化合物 6A 用例如氢气或甲酸盐的原子氢源处理,以制备化合物 6C

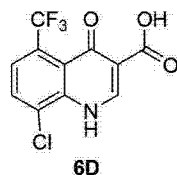
[0170]



[0171] 然后将化合物 6C 用碱处理以制备化合物 2。

[0172] 在另一方面,将化合物 6A 用碱处理以制备化合物 6D

[0173]



[0174] 然后在催化剂的存在下将化合物 6D 用例如氢气或甲酸盐的原子氢源处理,以制备化合物 2。

[0175] 在某些方面中,氢源是氢气。在其它方面,氢源是甲酸盐。

[0176] 在某些方面中,催化剂是钯催化剂。

[0177] 在某些方面中,碱是氢氧化钠水溶液或氢氧化钾水溶液。例如,碱是氢氧化钠水溶液。

[0178] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 2 的方法,所述方法包括如下步骤:

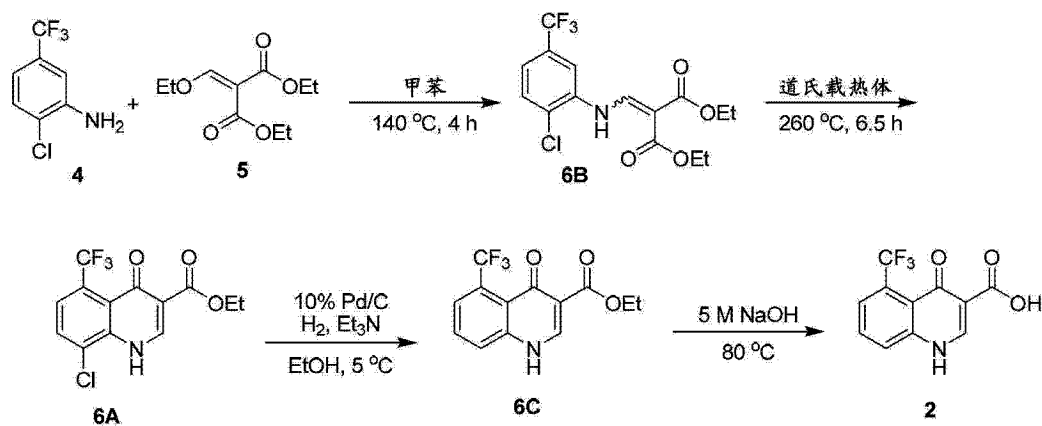
[0179] a) 将化合物 4 与化合物 5 在甲苯中在回流温度在迪-斯二氏仪器中反应以产生化合物 6B;

[0180] b) 在道氏载热体中,在约 260°C 的温度加热化合物 6B 以制备环化的产物化合物 6A;

[0181] c) 在 EtOH 中使用 Pd/C 作为催化剂在氢气和三乙胺的存在下氢化化合物 6A 以制备化合物 6C;和

[0182] d) 使用 5M NaOH 水解化合物 6C 以制备化合物 2

[0183]



[0184] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 2 的方法,所述方法包括如下步骤:

[0185] a) 将化合物 4 与化合物 5 在甲苯中在回流温度在迪-斯二氏仪器中反应以产生化合物 6B;

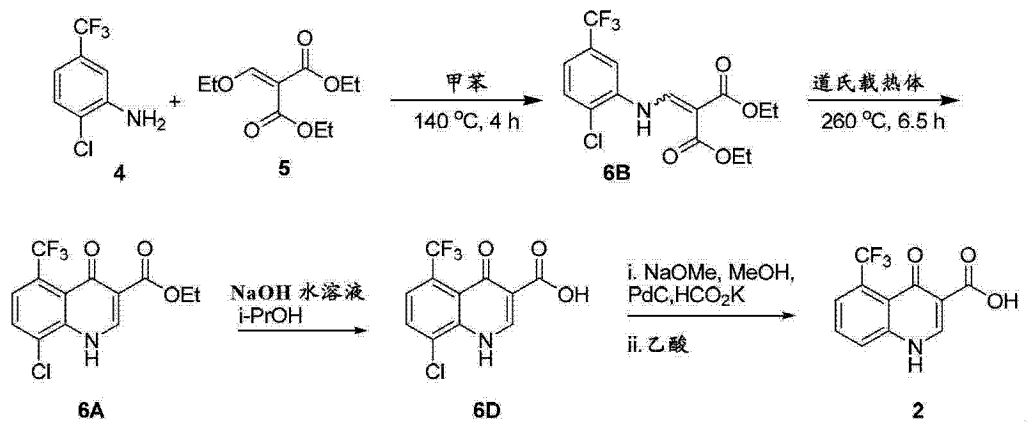
[0186] b) 在道氏载热体中,在约 260 °C 的温度加热化合物 6B 以制备环化的产物化合物 6A;

[0187] c) 使用 NaOH 在异丙醇和水的混合物中水解化合物 6A 以制备化合物 6D;和

[0188] d) 在 EtOH 中使用 Pd/C 作为催化剂在甲酸盐、甲醇钠和甲醇的存在下氢化化合物 6D;和

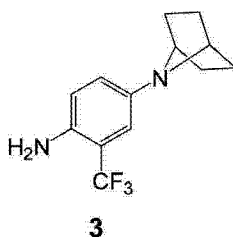
[0189] e) 用乙酸酸化溶液以制备化合物 2

[0190]



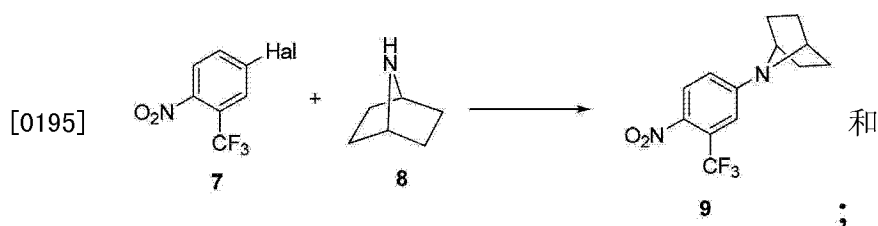
[0191] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 3 的方法

[0192]



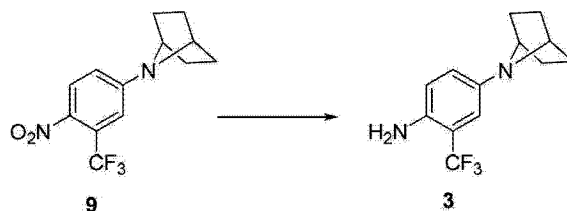
[0193] 所述方法包括:

[0194] (a) 将化合物 7,其中 Ha1 是 F、Cl、Br 或 I,与 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 8,或其盐反应,以产生化合物 9



[0196] (b) 还原化合物 9 中的硝基部分以提供苯胺 3。

[0197]

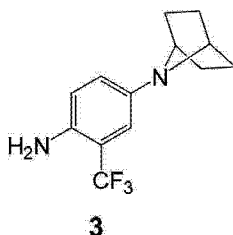


[0198] 在本实施方案的一个方面,在碱的存在下在极性非质子溶剂中进行步骤 (a)。例如,碱是叔胺碱,例如三乙胺,或二异丙基乙胺等,溶剂例如乙腈。

[0199] 在本实施方案的另一方面,在醇溶剂中使用氢气和过渡金属催化剂进行步骤 (b)。例如,催化剂包含从 Pt、Pd 或 Ni 衍生的第 9 族或第 10 族过渡金属催化剂。更具体地,催化剂包含 Pd。醇溶剂包括例如异丙醇、乙醇、甲醇等的醇。例如,溶剂包括乙醇。

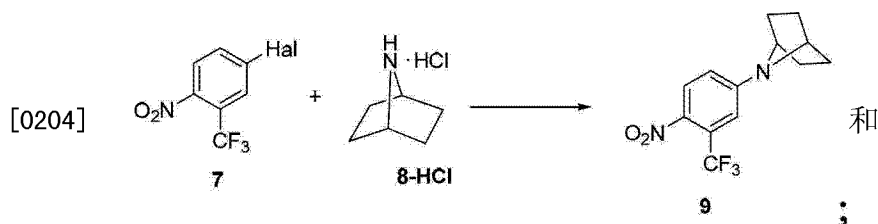
[0200] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 3 的方法:

[0201]



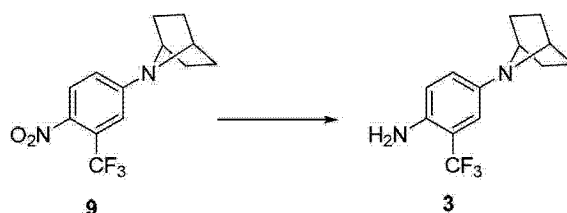
[0202] 所述方法包括:

[0203] (a) 将化合物 7,其中 Hal 是 F、Cl、Br 或 I,与 7-氮杂双环 [2.2.1] 庚烷 (8-HCl) 的盐酸盐反应以产生化合物 9



[0205] (b) 还原化合物 9 中的硝基部分以提供化合物 3。

[0206]

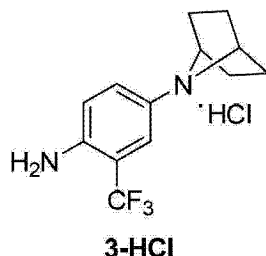


[0207] 在本实施方案的一个方面,在例如碳酸钠的无机碳酸盐的碱,和例如 DMSO 的极性非质子溶剂的存在下进行步骤 (a)。

[0208] 在本实施方案的另一面,在醇溶剂中使用氢气和过渡金属催化剂进行步骤 (b)。例如,催化剂包含从 Pt、Pd 或 Ni 衍生的第 9 族或第 10 族过渡金属催化剂。更具体地,催化剂包含 Pd。醇溶剂包括例如异丙醇、乙醇、甲醇等的醇。例如,溶剂包括乙醇。

[0209] 在另一个实施方案中,本发明提供用于制备盐酸盐 3-HCl 的方法:

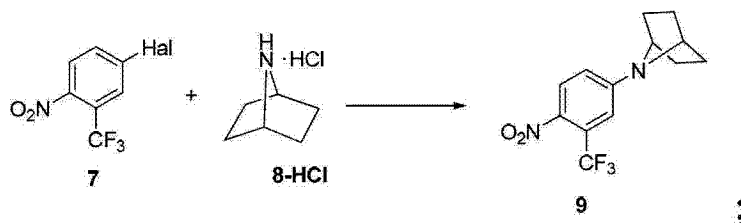
[0210]



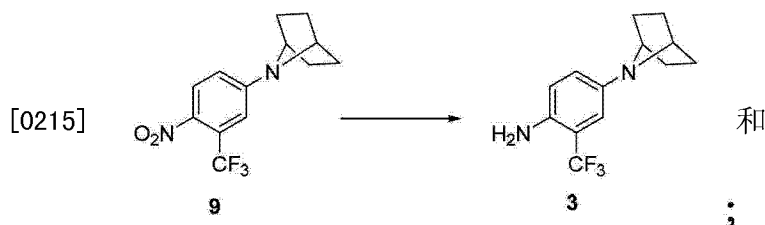
[0211] 所述方法包括:

[0212] (a) 将化合物 7, 其中 Hal 是 F、Cl、Br 或 I, 与 7-氮杂双环 [2.2.1] 庚烷盐酸盐 8-HCl 反应以产生化合物 9

[0213]



[0214] (b) 还原化合物 9 中的硝基部分以提供苯胺 3 ;



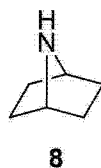
[0216] (c) 将步骤 (c) 的产物用 HCl 气体处理以提供 3-HCl。

[0217] 在本实施方案的一个方面,在例如碳酸钠的无机碳酸盐的碱,和例如 DMSO 的极性非质子溶剂的存在下进行步骤 (a)。

[0218] 在本实施方案的一个方面,在醇溶剂中使用氢气和过渡金属催化剂进行步骤 (b)。例如,催化剂包含从 Pt、Pd 或 Ni 衍生的第 9 族或第 10 族过渡金属催化剂。更具体地,催化剂包含 Pd。醇溶剂包括例如异丙醇、乙醇、甲醇等的醇。例如,溶剂包括乙醇。

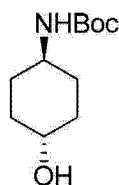
[0219] 在另一个实施方案中,本发明包括用于制备化合物 8 或其药学上可接受的盐的方法,

[0220]



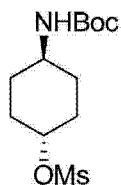
[0221] 所述方法包括使反式 -4- 氨基环己醇与 Boc 酸酐接触以制备式 A 的化合物

[0222]

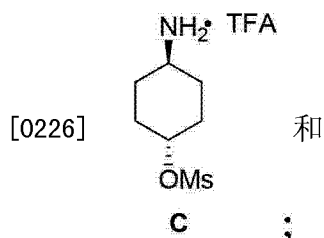
**A** ;

[0223] 使式 A 的化合物与甲磺酸接触以制备式 B 的化合物

[0224]

**B** ;

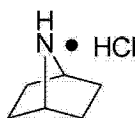
[0225] 使式 B 的化合物与三氟乙酸接触以制备式 C 的化合物



[0227] 使式 C 的化合物与氢氧化物接触以制备式 8 的化合物。

[0228] 在另一个实施方案中,本发明包括产生式 8-HCl 的化合物的方法,

[0229]

**8-HCl**

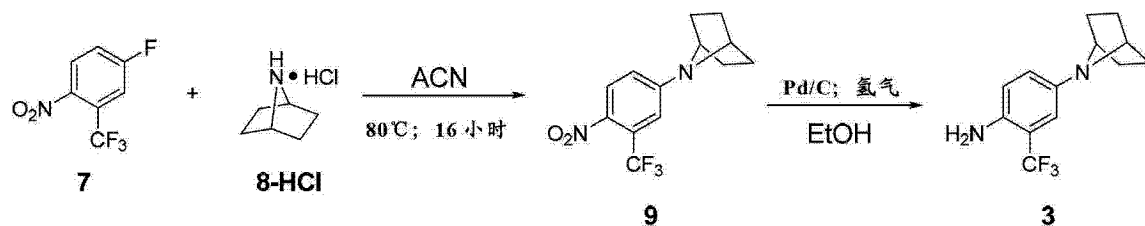
[0230] 所述方法包括使式 8 的化合物与盐酸接触。

[0231] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 3 的方法,所述方法包括如下步骤:

[0232] a) 将化合物 7 与化合物 8-HCl 在乙腈中,在三乙胺的存在下在约 80℃ 反应约 16 小时以制备化合物 9;和

[0233] b) 在乙醇中,使用 Pd/C 作为催化剂在氢气的存在下氢化化合物 9

[0234]

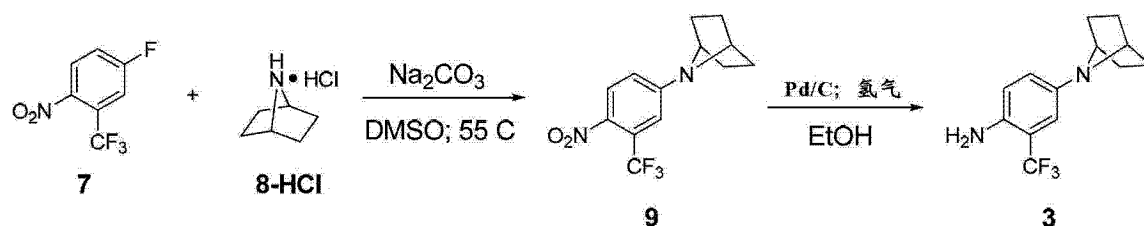


[0235] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 3 的方法,所述方法包括如下步骤:

[0236] a) 将化合物 7 与化合物 8-HCl 在 DMSO 中,在碳酸钠的存在下在约 55℃ 反应以制备化合物 9 ;和

[0237] b) 在乙醇中,使用 Pd/C 作为催化剂在氢气的存在下氢化化合物 9

[0238]

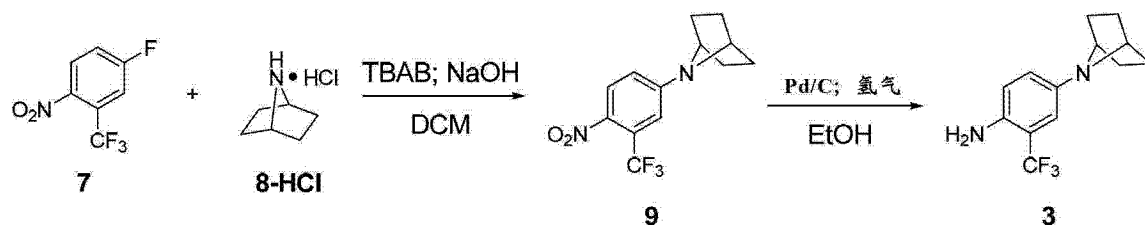


[0239] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 3 的方法,所述方法包括如下步骤:

[0240] a) 将化合物 7 与化合物 8-HCl 在二氯甲烷中,在氢氧化钠和四丁基溴化铵的存在下反应以制备化合物 9 ;和

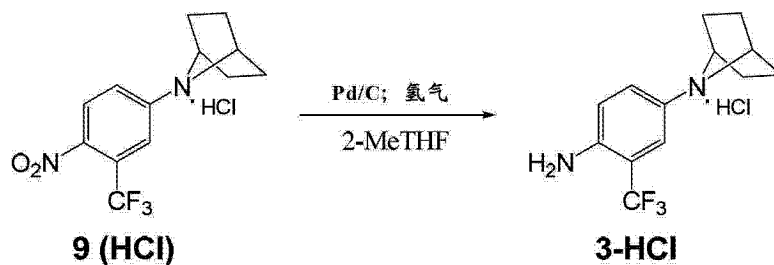
[0241] b) 在乙醇中,使用 Pd/C 作为催化剂在氢气的存在下氢化化合物 9

[0242]



[0243] 在一个实施方案中,本发明提供用于制备化合物 3-HCl 的方法,所述方法包括在 2-MeTHF 中在氢气的存在下使用 Pd/C 作为催化剂氢化化合物 9 的盐酸盐。

[0244]



[0245] 本发明的其它方面

[0246] 在一方面,本发明特征为包含化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或其任意组合和药学上可接受的助剂或载体的药物组合物。

[0247] 在一方面,本发明特征为在人类中治疗 CFTR 介导的疾病的方法,所述方法包括将有效量的化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或其任意组合给予人。

[0248] 在某些实施方案中,所述方法包含给予附加的治疗剂。

[0249] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗与因编码 CFTR 的基因突变或环境因素(例如吸烟)导致的 CFTR 功能降低相关的疾病的方法。这些疾病包括囊性纤维化、哮喘、吸烟导致的 COPD、慢性支气管炎、鼻鼻窦炎、便秘、胰腺炎、胰腺功能不全、先天性双侧输精管缺失导致的雄性不育(CBAVD)、轻度肺病、特发性胰腺炎、变应性支气管肺曲菌病(ABPA)、

肝病、遗传性肺气肿、遗传性血色素沉着、凝血-纤维蛋白溶解缺陷、例如蛋白质C缺乏、I型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷、例如家族性高胆固醇血症、I型乳糜微粒血症、无 β -脂蛋白血症、溶酶体贮积病、例如I-细胞病/假性胡尔勒病、粘多糖病、桑霍夫病/泰-萨病、克-纳综合征II型、多内分泌腺病/高胰岛素血症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺陷、原发性甲状旁腺机能减退、黑素瘤、glycanosis CDG 1型、先天性甲状腺机能亢进、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT缺陷、尿崩症(DI)、神经生长性DI、肾性DI、夏-马-图三氏综合征、佩-梅病、神经变性疾病、例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、皮克病、若干聚谷氨酰胺神经病学障碍、例如亨廷顿氏病、I型脊髓小脑性共济失调、脊髓与延髓肌肉萎缩、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩和肌强直性营养不良,以及海绵状脑病、例如遗传性克-雅病(由于)、法布里病、Straussler-Scheinker综合征、COPD、干眼病或斯耶格伦病、骨质疏松症、骨质减少、骨治愈和骨发育(包括骨修复、骨再生、骨质吸收减少和骨沉积增加)、Gorham综合征、氯离子通道病、例如先天性肌强直(Thomson和Becker型)、巴特综合征III型、Dent病、震惊综合征、癫痫症、震惊综合征、溶酶体贮积病、Angelman综合征、原发性纤毛运动障碍(PCD)、该术语用于表示纤毛结构和/或功能的遗传性障碍、包括具有左右转位的PCD(也称作卡塔格内综合征)、没有左右转位和纤毛发育不良的PCD。

[0250] 在某些实施方案中,该方法包括在患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在某些实施方案中,患者具有人CFTR的突变型。在其它实施方案中,患者具有一种或多种下列突变:人CFTR的 Δ F508、R117H和G551D。在一个实施方案中,该方法包括在具有人CFTR的 Δ F508突变的患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在具有人CFTR的G551D突变的患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在至少1个等位基因上具有人CFTR的 Δ F508突变的患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在2个等位基因上具有人CFTR的 Δ F508突变的患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在至少1个等位基因上具有人CFTR的G551D突变的患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在2个等位基因上具有人CFTR的G551D突变的患者中治疗囊性纤维化或减轻其严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。

[0251] 在某些实施方案中,该方法包括在患者中减轻囊性纤维化的严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在某些实施方案中,患者具有人CFTR的突变型。在其它实施方案中,患者具有一种或多种下列突变:人CFTR的 Δ F508、R117H和G551D。在一个实施方案中,该方法包括在具有人CFTR的 Δ F508突变的患者中减轻囊性纤维化的严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在具有人CFTR的G551D突变的患者中减轻囊性纤维化的严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在至

少 1 个等位基因上具有人 CFTR 的 $\Delta F508$ 突变的患者中减轻囊性纤维化的严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在 2 个等位基因上具有人 CFTR 的 $\Delta F508$ 突变的患者中减轻囊性纤维化的严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在至少 1 个等位基因上具有人 CFTR 的 G551D 突变的患者中减轻囊性纤维化的严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。在一个实施方案中,该方法包括在 2 个等位基因上具有人 CFTR 的 G551D 突变的患者中减轻囊性纤维化的严重性,所述方法包括将如本文所定义的组合物之一给予所述患者。

[0252] 在某些方面,本发明提供在患者中治疗骨质疏松症或减轻其严重性的方法,所述方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0253] 在某些实施方案中,在患者中治疗骨质疏松症或减轻其严重性的方法包括将如本文所述的药物组合物给予所述患者。

[0254] 在某些方面,本发明提供在患者中治疗骨质减少或减轻其严重性的方法,所述方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0255] 在某些实施方案中,在患者中治疗骨质减少或减轻其严重性的方法包括将如本文所述的药物组合物给予所述患者。

[0256] 在某些方面,本发明提供在患者中骨治愈和 / 或骨修复的方法,所述方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0257] 在某些实施方案中,在患者中骨治愈和 / 或骨修复的方法包括将如本文所述的药物组合物给予至所述患者。

[0258] 在某些方面,本发明提供在患者中减少骨质吸收的方法,所述方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0259] 在某些实施方案中,在患者中减少骨质吸收的方法,所述方法包含将如本文所述的药物组合物给予至所述患者。

[0260] 在某些方面,本发明提供在患者中增加骨沉积的方法,所述方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0261] 在某些实施方案中,在患者中增加骨沉积的方法,所述方法包含将如本文所述的药物组合物给予至所述患者。

[0262] 在某些方面,本发明提供在患者中治疗 COPD 或减轻其严重性的方法,所述方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0263] 在某些实施方案中,在患者中治疗 COPD 或减轻其严重性的方法包括将如本文所述的药物组合物给予所述患者。

[0264] 在某些方面,本发明提供在患者中治疗吸烟导致的 COPD 或减轻其严重性的方法,所述方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0265] 在某些实施方案中,在患者中治疗吸烟导致的 COPD 或减轻其严重性的方法包括将如本文所述的药物组合物给予所述患者。

[0266] 在某些方面,本发明提供在患者中治疗慢性支气管炎或减轻其严重性的方法包括将如本文所述的化合物 1 给予所述患者。

[0267] 在某些实施方案中,在患者中治疗慢性支气管炎或减轻其严重性的方法,所述方

法包括将如本文所述的药物组合物给予所述患者。

[0268] 在一个实施方案中,本发明提供了在人类中治疗囊性纤维化的方法,所述方法包括将有效量的化合物 1 形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或其任意组合给予所述人。

[0269] 在一方面,本发明特征为包括化合物 1 形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合,和药学上可接受的载体的药物包或试剂盒。

[0270] 在一方面,本发明特征为 N-(4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺的晶体形式,所述晶体形式具有三角晶系, R-3 空间群,和下列晶胞参数: **$a=19.1670(4)\text{\AA}$, $b=19.1670(4)\text{\AA}$, $c=33.6572(12)\text{\AA}$** , $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, 和 $\gamma=120^\circ$ 。

[0271] 在一个实施方案中,本发明提供了在形式 B 中的 N-(4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺的晶体,所述晶体具有单斜晶系, P21/c 空间群,和下列晶胞参数: **$a=13.5429(4)\text{\AA}$, $b=13.4557(4)\text{\AA}$, $c=12.0592(4)\text{\AA}$** , $\alpha=90^\circ$, $\beta=101.193^\circ$, 和 $\gamma=90^\circ$ 。

[0272] 用途、制剂和给药

[0273] 在本发明的一个方面,提供药学上可接受的组合物,其中这些组合物包含如本文所描述的形式 A,和任选地包含药学上可接受的载体、助剂或赋形剂。在某些实施方案中,这些组合物还任选地包含一种或多种附加的治疗剂。

[0274] 如上所述,本发明的药学上可接受的组合物另外包含药学上可接受的载体、助剂或赋形剂,其,如本文所用,包括适于特定剂型所需的任意和所有溶剂、稀释剂或其它液体赋形剂、分散体或悬浮助剂、表面药物、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington's Pharmaceutical Sciences,第 16 版,E. W. Martin(Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 公开了多种用于制备药学上可接受的组合物的载体和已知的制备其的技术。只要不是任何常规载体介质与本发明的化合物不兼容,例如通过产生任何不期望的生物学作用或另外以有害的方式与药学上可接受的组合物的任何其它成分相互作用,考虑其用途在本发明的范围内。可以用作药学上可接受的载体的材料的某些实例包括,但不限于,离子交换剂、矾土、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白,例如人血清白蛋白、缓冲物质,例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸或山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯的混合物、水、盐或电解质、例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、羊毛脂、糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素和其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油;红花油;芝麻油;橄榄油;玉米油和大豆油;二醇;例如丙二醇或聚乙二醇;酯类,例如乙基油酸酯和乙基月桂酸酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格溶液;乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及其它非毒性兼容的润滑剂,例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂,根据配制者的判断,在组合中也可以存在防腐剂和抗氧化剂。

[0275] 化合物和药学上可接受的组合物的用途

[0276] 仍在另一方面,本发明提供了治疗涉及 CFTR 突变的病症、疾病或障碍或减轻其严

重性的方法。在某些实施方案中,本发明提供了治疗涉及 CFTR 活性缺陷的病症、疾病或障碍的方法,所述方法包括给予包含化合物 1 形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合的组合物至需要其的受试者,所述受试者优选哺乳动物。

[0277] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗与因编码 CFTR 的基因突变或环境因素(例如吸烟)导致的 CFTR 功能降低相关的疾病的方法。这些疾病包括囊性纤维化、慢性支气管炎、复发性支气管炎、急性支气管炎、先天性双侧输精管缺失导致的雄性不育(CBAVD)、先天性子宫和阴道缺失(CAUV)导致的雌性不孕、特发性慢性胰腺炎(ICP)、特发复发性胰腺炎、特发性急性胰腺炎、慢性鼻鼻窦炎、原发性硬化性胆管炎、变应性支气管肺曲霉病、糖尿病、干眼病、便秘、变应性支气管肺曲霉病(ABPA)、骨病(例如,骨质疏松)和哮喘。

[0278] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗与正常 CFTR 功能相关的疾病的方法。这些疾病包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)、慢性支气管炎、复发性支气管炎、急性支气管炎、鼻鼻窦炎、便秘、胰腺炎、包括慢性胰腺炎、复发性胰腺炎和急性胰腺炎、胰腺功能不全、先天性双侧输精管缺失(CBAVD)导致的雄性不育、轻度肺疾病、特发性胰腺炎、肝病、遗传性肺气肿、胆石、胃食管返流病、胃肠道恶性肿瘤、炎性肠病、便秘、糖尿病、关节炎、骨质疏松症和骨质减少。

[0279] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗与正常 CFTR 功能相关的疾病的方法,所述疾病包括遗传性色素沉着、凝血-纤维蛋白溶解缺陷、例如蛋白质 C 缺乏症、1 型遗传性血管性水肿、脂质加工缺陷、例如家族性高胆固醇血症、1 型乳糜微粒血症、无 β 脂蛋白血症、溶酶体贮积病、例如 I-细胞病/假性胡尔勒病、粘多糖病,桑霍夫病/泰-萨病,克-纳综合征 II 型、多内分泌腺病/高胰岛素血症、糖尿病、拉伦侏儒症、髓过氧化物酶缺乏症、原发性甲状旁腺功能减退、黑素瘤、glycanosis CDG 1 型、先天性甲状腺功能亢进症、成骨不全、遗传性低纤维蛋白原血症、ACT 缺陷、尿崩症(DI)、神经生长性 DI、肾性 DI、夏-马-图三氏综合征、佩-梅病、神经变性疾病、例如阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上麻痹、匹克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍、例如亨廷顿病、I 型脊髓小脑性共济失调、脊髓延髓肌肉萎缩症、齿状核红核苍白球丘脑下部核萎缩,和强直性肌营养不良,以及海绵样脑病,例如遗传性克雅病(由朊病毒蛋白加工缺陷导致)、法布里病、Straussler-Scheinker 综合征、Gorham 综合征、氯化物通道病变、先天性肌强直(Thomson 和 Becker 型)、巴特综合征 III 型、Dent 病、震惊综合征、癫痫症、震惊综合征、溶酶体贮积病、Angelman 综合征、原发性纤毛运动障碍(PCD)、具有左右转位的 PCD(也称作卡塔格内综合征)、没有左右转位和纤毛发育不良的 PCD)或斯耶格仑病,该方法包括对所述哺乳动物施用有效量的包含本文所述的化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合的组合物步骤。

[0280] 根据一个可替代的优选实施方案,本发明提供一种治疗囊性纤维化的方法,包括给所述哺乳动物施用组合物步骤,包括对所述哺乳动物施用有效量的包含本文所述的化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合的组合物步骤。

[0281] 根据本发明,化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物“有效量”是有效治疗如上所述一种或多种疾病、障碍或病症或减轻其严重性的用量。

[0282] 可以使用有效治疗一种或多种如上所述疾病、障碍或病症或减轻其严重性的任意量和任意给药途径给予化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物。

[0283] 在一些实施方案中,化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物适用于治疗患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者的呼吸上皮或非呼吸上皮的顶膜中显示残留的 CFTR 活性。使用本领域已知的方法,例如标准的电生理学、生化或组织化学技术可以容易地检测上皮细胞表面残留的 CFTR 活性的存在。这些方法使用体内或离体的电生理技术、汗液或唾液的 Cl^- 浓度测定或者离体生化或组织化学技术来监测细胞表面密度,以鉴定 CFTR 活性。使用这些方法,可以容易地在各种不同突变体的杂合或纯合的患者,包括最常见的突变 $\Delta F508$ 的杂合或纯合的患者中检测残留的 CFTR 活性。

[0284] 在另一个实施方案中,本文所述的化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物适用于治疗患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者具有用药理学方法或基因疗法诱导或增强的残留 CFTR 活性。这些方法增加细胞表面上存在的 CFTR 的量,因此在患者中诱导迄今不存在的 CFTR 活性或在患者中提高残留 CFTR 活性的现存水平。

[0285] 在另一个实施方案中,本文所述的化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物适用于患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者具有某些显示残留 CFTR 活性的基因型,例如,III 类突变(调节或门控受损)、IV 类突变(传导改变)或 V 类突变(合成减少)(Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521-529, 2000)。显示残留 CFTR 活性的其他患者基因型包括这些类型之一的纯合或与任何其他类型突变的杂合的患者,所述其他类型的突变包括 I 类突变、II 类突变或无分类的突变。

[0286] 在一个实施方案中,本文所述的化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物适用于治疗患者的囊性纤维化或减轻患者的囊性纤维化的严重性,该患者具有某些临床表型,例如,典型地与上皮细胞顶膜中的残留 CFTR 活性的量相关的轻度至中度临床表型。这些表型包括显示胰腺功能不全的患者或者诊断为特发性胰腺炎和输精管的先天性双侧缺失或者轻度肺病的患者。

[0287] 所需的确切的量对于不同的受试者而言是不同的,这取决于受试者的种类、年龄和总体状况、感染的严重度、具体的药物、其给药方式等。本发明的化合物优选配制成易于给药和剂量均匀的剂量单位形式。本文使用的表述“剂量单位形式”是指适于所要治疗的患者的药物的物理上分离的单位。但是,应当理解,本发明的化合物和组合物的每日总使用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何具体的患者或生物的具体有效剂量水平将取决于多种因素,包括所要治疗的疾病和该疾病的严重性;所使用的具体化合物的活性;所使用的具体组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;给药时间、给药途径和所使用的具体化合物的排泄率;治疗的持续时间;与所使用的具体化合物联合或同时使

用的药物等,以及医学领域公知的其他因素。本文使用的术语“患者”是指动物,优选哺乳动物,最优选人。

[0288] 本发明的药学可接受的组合物可以通过口服、直肠、胃肠外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉剂、软膏、滴剂或贴剂)、经颊以及作为口腔或鼻喷雾剂等方式施用于人和其他动物,这取决于所要治疗的感染的严重性。在一些实施方案中,本发明的化合物可以以每日约 0.01mg/kg—约 50mg/kg,优选约 0.5mg/kg—约 25mg/kg 受试者体重的剂量水平经口服或胃肠外施用,每日一次或多次,以获得期望的治疗效果。

[0289] 用于口服给药的液体剂型包括但不限于,药学可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬剂、糖浆和酏剂。除了活性化合物以外,该液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯,以及它们的混合物。除了惰性稀释剂,该口服组合物也可以包含助剂,例如湿润剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0290] 可以根据已知的技术,使用适当的分散剂或湿润剂和助悬剂配制可注射制剂,例如无菌注射用水或油性混悬液。无菌注射制剂也可以是在无毒性的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液、混悬剂或乳剂,例如在 1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的赋形剂或溶剂包括水、林格液, U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油一般也用作溶剂或助悬介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸(例如油酸)可用于注射制剂中。

[0291] 注射制剂可以通过例如细菌截留性过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,其中所述无菌固体组合物可以在临用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0292] 为了延长本发明化合物的效果,经常需要减缓吸收皮下或肌肉注射的化合物。这可以通过使用水溶性差的晶体或无定形物质的液体混悬液来实现。那么,化合物的吸收速率将取决于其溶出速度,溶出速度又可能取决于晶体大小和晶型。可替代地,延迟胃肠外给药的化合物形式的吸收可以通过将该化合物溶解或混悬于油性载体中来实现。通过在生物可降解的聚合物(例如聚丙交酯-聚乙醇酸交酯)中形成化合物的微囊基质,制备可注射的储库型剂型(depot form)。根据化合物与聚合物的比例和所使用的具体聚合物的性质,可以控制化合物的释放速率。其它生物可降解的聚合物的例子包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储库型注射剂也可以通过将化合物包埋在与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备。

[0293] 直肠或阴道施用的组合物优选是栓剂,其可以通过将本发明的化合物与适当的非刺激性赋形剂或载体例如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡混合来制备,其中所述赋形剂或载体在环境温度下是固体,但在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化并释放出活性化合物。

[0294] 口服给药的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物与至少一种惰性的、药学可接受的赋形剂或载体混合,所述赋形剂或载体例如为柠檬酸钠或磷酸二钙和/或 a) 填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸, b) 粘合剂,例如,羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶, c)

保湿剂,例如甘油,d)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,e)溶解阻滞剂,例如石蜡,f)吸收促进剂,例如季铵类化合物,g)湿润剂,例如十六醇和单硬脂酸甘油酯,h)吸收剂,例如高岭土和膨润土,和 i)润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,及它们的混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,该剂型也可以包含缓冲剂。

[0295] 相似类型的固体组合物也可以在软和硬的填充性明胶胶囊中用作填充剂,胶囊使用例如乳糖或奶糖,以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂。可以用包衣和壳、例如肠溶衣和药物配制领域公知的其它包衣来制备片剂、糖衣片(dragees)、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型。它们任选可以包含遮光剂,也可以是这样一种组合物:它们只在或优选在肠道的某一部分(任选地以延迟方式)释放一种或多种活性成分。可以使用的包埋组合物的例子包括聚合物物质和蜡。相似类型的固体组合物也可以在软和硬的填充性明胶胶囊中用作填充剂,胶囊使用赋形剂、例如乳糖或奶糖,以及高分子量聚乙二醇等。

[0296] 活性化合物也可以存在于具有一种或多种上述赋形剂的微囊形式中。可以用包衣和壳例如肠溶衣、控释包衣和药物配制领域公知的其它包衣来制备片剂、糖衣片、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型。在这些固体剂型中,活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂,例如蔗糖、乳糖或淀粉混合。这些剂型也可以例如如一般实践,包含惰性稀释剂以外的其它物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂,例如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,该剂型也可以包含缓冲剂。它们任选可以包含遮光剂,也可以是这样一种组合物:它们只在或优选在肠道的某一部分任选地以延迟方式释放一种或多种活性成分。可以使用的包埋组合物的例子包括聚合物和蜡。

[0297] 本发明化合物的局部或经皮给药的剂型包括软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂或贴剂。活性组分在无菌条件下与药学可接受的载体和任何需要的防腐剂或可能需要的缓冲剂混合。眼用制剂、滴耳剂和滴眼剂也涵盖在本发明的范围内。此外,本发明涵盖透皮贴剂的使用,它的附加优点在于向机体可控地递送化合物。这类剂型可以通过将化合物溶解或分散于适当的介质中来制备。也可以使用吸收增强剂来增加化合物通过皮肤的流量。可以通过提供速率控制膜或通过将化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0298] 也应当认识到,本文所述的化合物 1 形式 A、化合物 1 形式 A-HCl、化合物 1 形式 B、化合物 1 形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物可以用在联合治疗中,也就是说,本文所述的形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物可以在一种或多种另外的所需治疗或医学操作的同时、之前或之后施用。在联合治疗方案中使用的治疗(治疗或操作)的具体组合将考虑所要实现的所需治疗效果与所需的治疗和/或操作的相容性。也应当认识到,所使用的治疗可以对相同的疾病达到期望的效果(例如,本发明的化合物可以与另一种用于治疗相同疾病的药物同时施用)或者它们可以实现不同的效果(例如,控制任何不良反应)。本文所用的通过正常给药来治疗或预防特定疾病或病症的另外的治疗剂被称作“适合所要治疗的疾病或病症”。

[0299] 在一个实施方案中,另外的药物选自黏液溶解药(mucolytic agent)、支气管扩张剂、抗生素、抗感染剂、抗炎剂、本发明化合物以外的 CFTR 调节剂或营养剂。

[0300] 在一个实施方案中,另外的药物是抗生素。本文所用的典型抗生素包括妥布霉素、

包括妥布霉素吸入粉末 (TIP)、阿奇霉素、氨曲南、包括氨曲南的气雾剂形式、阿米卡星、包括其脂质体制剂、环丙沙星、包括其适合于通过吸入给药的制剂、左氧氟沙星、包括其气雾剂制剂和两种抗生素的组合,例如磷霉素和妥布霉素。

[0301] 在另一个实施方案中,另外的药物是黏液溶解药 (mucolyte)。本文所用的典型黏液溶解药包括 **Pulmozyme®**。

[0302] 在另一个实施方案中,另外的药物是支气管扩张剂。典型支气管扩张剂包括沙丁胺醇、硫酸奥西那林 (metaprotenerol sulfate)、醋酸吡布特罗、沙美特罗或硫酸 tetrabuline。

[0303] 在另一个实施方案中,另外的药物有效恢复肺气道表面液体。这种药物改善盐在细胞内和外的运动,使得肺气道中的粘液更易于水化且由此更易于被清除。典型的这种药物包括高张生理盐水、地纽福索钠 ([[(3S, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代嘧啶-1-基)-3-羟基氧杂环戊烷-2-基] 甲氧基-羟基磷酰基] [[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(2, 4-二氧代嘧啶-1-基)-3, 4-二羟基氧杂环戊烷-2-基] 甲氧基-羟基磷酰基] 氧基-羟基磷酰基] 磷酸氢盐) 或 bronchitol (甘露糖醇的吸入制剂)。

[0304] 在另一个实施方案中,另外的药物是抗炎药,即可以减轻肺中的炎症的药物。本文所用的典型的这种药物包括布洛芬、二十二碳六烯酸 (DHA)、西地那非、吸入谷胱甘肽、吡格列酮、羟氯喹或辛伐他汀 (simvastatin)。

[0305] 在另一个实施方案中,另外的药物降低上皮钠通道阻滞剂 (ENaC) 的活性 (通过阻断通道直接降低活性或通过调节导致 ENaC 活性增加的蛋白酶 (例如丝氨酸蛋白酶、通道活化蛋白酶) 间接降低活性)。典型的这种药物包括卡莫司他 (胰蛋白酶样蛋白酶抑制剂)、QAU145、552-02、GS-9411、INO-4995、Aerolytic 和阿米洛利。降低上皮钠通道阻滞剂 (ENaC) 活性的另外的药物可以在例如 PCT 公开号 W02009/074575 中找到,将该文献的全部内容完整地引入本文参考。

[0306] 在本文所述的其他疾病中, CFTR 调节剂,例如本文所描述的那些,与降低 ENaC 活性的药物的组合用于治疗 Liddle 综合征、炎性或变应性病症,包括囊性纤维化、原发性纤毛运动障碍、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、呼吸道感染、肺癌、口干干燥症和干燥性角结膜炎 (keratoconjunctivitis sicca)、呼吸道感染 (急性和慢性;病毒和细菌性) 和肺癌。

[0307] CFTR 调节剂,例如本文所描述的那些,与降低 ENaC 活性的药物的组合还用于治疗阻断上皮钠通道介导的疾病,包括并非呼吸性疾病的疾病,它们与通过上皮的流体调节异常相关,可能涉及其表面上的保护性表面液体的生理学异常,例如口腔干燥症 (口干) 或干燥性角结膜炎 (干眼)。此外,阻断肾中的上皮钠通道可用于促进利尿且由此诱导降血压效应。

[0308] 哮喘包括内源性 (非变应性) 哮喘和外源性 (变应性) 哮喘、轻度哮喘、中度哮喘、重度哮喘、支气管哮喘、运动诱发哮喘、职业性哮喘和细菌感染后诱发的哮喘。对哮喘的治疗还应理解为包括治疗例如显示哮喘症状的低于 4 或 5 岁和诊断或可诊断为 “喘鸣婴儿” 的受试者,主要医学关注的确立的患者类别和目前通常鉴定为初始或早期哮喘患者 (为便利起见,这种特定哮喘病症称作 “喘鸣婴儿综合征”)。治疗哮喘的预防性功效通过例如急性哮喘或支气管收缩发作的症状发作频率或严重性减少、肺功能改善或气道高反应性改善得

到证实。可以进一步通过对其他治标疗法的需求减少得到证实,所述治标疗法即用于或预期在发作时限制或中断症状发作的疗法,例如抗炎(例如皮质类固醇)或支气管扩张疗法。特别地,哮喘中的预防有益性对易于“晨降”的受试者而言显而易见。“晨降”是公认的哮喘综合征,常见于较大百分比的哮喘患者且特征在于哮喘发作,例如在约 4-6am 之间的几小时,即在通常基本上远离任何预先给予的治标性哮喘疗法的时间。

[0309] 慢性阻塞性肺疾病包括慢性支气管炎或与之相关的呼吸困难、肺气肿以及其他药物疗法特别是其他吸入药物疗法之后的气道高反应性加剧。在一些实施方案中,CFTR 调节剂,例如本文所描述的那些,与降低 ENaC 活性的药物的组合用于治疗无论何种类型或起源的支气管炎、包括,例如急性支气管炎、花生仁吸入性支气管炎、卡他性支气管炎、格鲁布性支气管炎、慢性支气管炎或结核性支气管炎。

[0310] 在另一个实施方案中,另外的药物是除了形式 A、形式 B、形式 B-HCl 和形式 A-HCl 的 CFTR 调节剂,即具有调节 CFTR 活性的效应的药物。典型的这种药物包括阿他卢仑 (“PTC124®”; 3-[5-(2-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-3-基]苯甲酸)、西那普肽、兰可夫肽、地来司他(人重组中性白细胞弹性蛋白酶抑制剂)、考前列酮(7-{(2R,4aR,5R,7aR)-2-[(3S)-1,1-二氟-3-甲基戊基]-2-羟基-6-氧代八氢环戊[b]吡喃-5-基}庚酸)或(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸。在另一个实施方案中,另外的药物是(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸。

[0311] 在另一个实施方案中,另外的药物是营养剂。典型的这种药物包括胰脂肪酶(胰腺酶替代物)、包括肠溶胰酶胶囊®(**Pancrease®**)、**Pancreacarb®**、**Ultrase®**或得每通®(**Creon®**)、**Liprotomase®**(在先的**Trizyte®**)、**Aquadeks®**或谷胱甘肽吸入。在一个实施方案中,另一种营养剂是胰脂肪酶。

[0312] 在一个实施方案中,另外的药物是非本发明化合物的 CFTR 调节剂。

[0313] 其他治疗剂在本发明组合物中的含量将不超过在包含该治疗剂作为唯一活性成分的组合物中的通常给药量。优选地,其他治疗剂在目前所公开的组合物中的量将是通常的包含该治疗剂作为唯一治疗药物的组合物中的含量的约 50% — 100%。

[0314] 本文所述的化合物 1 形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物也可以引入到涂覆可植入医药装置的组合物中,如假肢、人工瓣膜、血管移植物、移植片固定模(stents)和导管。因此,本发明在另一方面包括涂覆可植入装置的组合物,其包含如上一一般性描述和在本文的大类与亚类中所述的本发明化合物,和适合于涂覆所述可植入装置的载体。在另一方面,本发明包括涂有组合物的可植入装置,所述组合物包含如上一一般性描述和在本文大类与亚类中所述的本发明化合物,和适合于涂覆所述可植入装置的载体。适合的涂料和涂覆可植入装置的一般制备描述在美国专利 US6,099,562、5,886,026 和 5,304,121 中。涂料通常是生物可相容的聚合材料,如水凝胶聚合物、聚甲基二硅氧烷、聚己内酯、聚乙二醇、聚乳酸、乙烯乙酸乙烯酯和它们的混合物。涂料可以可选地进一步被适合的氟硅氧烷、多糖、聚乙二醇、磷脂或其组合的表层所覆盖,以赋予组合物的控释特征。

[0315] 本发明的另一方面涉及在生物样品或患者中调节 CFTR 活性(例如体外或体内)、该方法包括给予患者或者使所述生物样品接触本文所述的化合物 20 形式 A、形式 A-HCl、形

式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物。本文所用的术语“生物样品”非限制性地包括细胞培养物及其提取物；从哺乳动物获得的活组织检查材料或其提取物；和血液、唾液、尿、粪便、精液、泪液或其他体液或者其提取物。

[0316] 在生物样品中调节 CFTR 可用于本领域技术人员已知的多种目的。这类目的的实例包括但不限于 CFTR 在生物学与病理学现象中的研究；和新型 CFTR 调节剂的对比评价。

[0317] 在另一个实施方案中，提供了体外或体内调节阴离子通道活性的方法，所述方法包括使所述通道与本文所述的化合物 20 形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物接触的步骤。在优选的实施方案中，该阴离子通道是氯离子通道或碳酸氢根 (bicarbonate) 通道。在其他优选的实施方案中，该阴离子通道是氯离子通道。

[0318] 按照可替代选择的实施方案，本发明提供增加细胞膜中功能性 CFTR 数量的方法，所述方法包括使所述细胞与本文所述的化合物 20 形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或这些形式的任意组合或其药学可接受的组合物接触的步骤。

[0319] 根据另一种优选的实施方案，通过测定跨膜电压电位来测定 CFTR 的活性。测定生物样品中跨膜电压电位的手段可以采用本领域的任意已知方法，如光学膜电位测定法或其他电生理学方法。

[0320] 光学膜电位测定法采用如 Gonzalez 和 Tsien 所述的电压 - 敏感性 FRET 传感器 (参见 Gonzalez, J. E. 和 R. Y. Tsien(1995)“Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells.”Biophys J 69(4):1272-80 和 Gonzalez, J. E. and R. Y. Tsien(1997) ;“Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer”Chem Biol 4(4):269-77) 与测定荧光变化的仪器的组合，如电压 / 离子探针读数器 (VIPR) (参见 Gonzalez, J. E., K. Oades 等人 (1999) “Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets”Drug Discov Today 4(9):431-439)。

[0321] 这些电压敏感性测定法基于膜溶性、电压敏感性染料 DiSBAC₂(3) 与荧光磷脂 CC2-DMPE 之间荧光共振能量转移 (FRET) 的变化，所述荧光磷脂连接于质膜的外部小叶，充当 FRET 供体。膜电位 (V_m) 的变化导致带负电的 DiSBAC₂(3) 跨越质膜重新分布，从 CC2-DMPE 转移的能量的量相应地改变。荧光发射的变化可以利用 VIPRTM II 监测，VIPRTM II 是一种整合的液体处理器和荧光检测器，被设计用来在 96- 或 384- 孔微量滴定板中进行基于细胞的筛选。

[0322] 在另一方面中，本发明提供试剂盒，其用于体外或体内测定生物样品中 CFTR 或其片段的活性，所述试剂盒包含：(i) 包含化合物 20 形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或其任意组合或任意上述实施方案的组合物；和 (ii) 关于下列内容的说明书：a) 使另外的组合物与该生物样品接触；和 b) 测定所述 CFTR 或其片段的活性。在一个实施方案中，试剂盒进一步包含关于下列内容的说明书：a) 使另外的组合物与该生物样品接触；b) 测定在所述另外的化合物的存在下所述 CFTR 或其片段的活性；和 c) 比较在另外的化合物的存在下 CFTR 活性与在本文所述的形式 A、形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl 或其任意组合的存在下 CFTR 的密度。在优选的实施方案中，所述试剂盒用于测定 CFTR 的密度。

[0323] 为了可以更加充分地理解本文所述发明，提供下列实施例。应当理解，这些实施例

仅供说明,不以任何方式被解释为限制本发明。

实施例

[0324] 方法和材料

[0325] XRPD(X-射线粉末衍射)

[0326] 仪器 1

[0327] 在室温使用 Rigaku/MS MiniFlex Desktop 粉末 X-射线衍射仪(Rigaku, The Woodlands, TX) 记录 X-射线粉末衍射(XRPD)数据。使用在 30kV 和 15mA 下操作的 Cu 管与 K β 抑制滤波器生成 X-射线。发散狭缝随散射和接收狭缝而可变,所述狭缝分别设定在 4.2 度和狭缝 0.3mm。扫描模式是采用 0.02 度步长的固定时间(FT)和 2.0 秒计数时间。使用参比标准品校准粉末 X-射线衍射仪:75% 方钠石($\text{Na}_3\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{12}\text{Cl}$)和 25% 硅(Rigaku, Cat#2100/ALS)。使用具有零背景样品试样架的 6 份样品台(SH-LBSI511-RNDB)。将粉末样品置于凹入的区域上并且用载玻片压平坦。

[0328] 仪器 2

[0329] 或者,在室温使用 PANalytical's X-pert Pro 衍射仪,用铜辐射(1.54060Å)进行粉末 X 射线衍射测量。入射束光源(the incident beam optic)包含可变的发散狭缝以确保在样品上和衍射光线片(side)上的照射长度恒定。使用快速线性固态检测器,在扫描模式中测量的活性长度为 2.12 度 2θ 。将粉末样品填充在零背景硅座的凹入区域上,进行旋转以实现更好的统计。进行从 4 - 40 度 2θ 的对称扫描,步长 0.017 度,步长扫描时间 15.5 秒。

[0330] 仪器 3

[0331] 或者,在室温在 beamline ID31(在法国格勒诺布尔的欧洲同步加速器辐射设备)上采集高分辨率数据。通过 3 个 11 毫米狭缝的超(ex-)真空波动器生成 X 射线。通过制冷冷却双晶体单色仪(Si(111)晶体)将光线单色化。用水冷却的狭缝限定单色仪上入射束(beam incident)的尺寸,和透射至样品上的单色光的尺寸,其范围为 0.5 至 2.5mm(水平),0.1 至 1.5mm(垂直)。实验所用波长是 **1.29984 (3)Å**。衍射仪由一系列(a bank of)9 个检测器组成,所述检测器垂直扫描以测量作为 2θ 函数的发散强度。各检测器均在 Si(111)分析仪晶体后方,检测器通道大约间隔是 2° 。该衍射仪能够产生非常精确的高分辨率衍射图,其中峰宽低至 0.003° ,峰位置的精确度数量级是 0.0001° 。使用 Materials Studio(反射模块(Reflex module))将粉末衍射数据处理并编入索引。使用 Materials Studio 的粉末解析模块解析结构。评价所得解析的结构活力,随后使用 Rietveld 精细化方法进行精细化。

[0332] 使用仪器 1(图 7A)或仪器 2(图 7B),用上文所述的设置记录描述于形式 B 的实施例中的 XRPD 光谱。使用仪器 2,用上文所述的设置记录描述于形式 B-HCl 和形式 A-HCl 的实施例中的 XRPD 光谱。使用仪器 3 测定形式 A-HCl 和形式 B-HCl 的晶系、空间群和晶胞参数。

[0333] 示差扫描量热法(DSC)

[0334] 使用 TA DSC Q2000 差示扫描量热仪(TA Instruments, New Castle, DE)进行示差扫描量热法(DSC)。使用钢校正仪器。将约 2-3mg 的样品称重,加入至密封盘,所述密

封盘用具有一个洞的盖子盖住。从 25℃ 至 315℃, 以 10℃ /min 的加热速率扫描 DSC 样品。通过 Thermal Advantage Q Series™ 软件收集数据, 通过 Universal Analysis 软件 (TA Instruments, New Castle, DE) 进行分析。

[0335] 热重分析 (TGA) 法

[0336] 在 TA Q500 热重分析仪 (TA Instruments, New Castle, DE) 上采集热重分析 (TGA) 数据。从 25℃ 至 350℃, 以 10℃ /min 的加热速率扫描约 3-5mg 重的样品。通过 Thermal Advantage Q Series™ 软件采集数据, 通过 Universal Analysis 软件 (TA Instruments, New Castle, DE) 进行分析。

[0337] FTIR 光谱法

[0338] FTIR 光谱采集自具有智能轨道采样隔室 (多次反弹减弱的全反射附件) 和在 45 度的金刚石窗的 Thermo Scientific, Nicolet 6700FT-IR 光谱仪。用于数据采集和分析的软件是: Omnic, 7.4。采集设置如下:

[0339] 检测器: DTGS KBr;

[0340] 分光镜: 在 KBr 上的 Ge;

[0341] 源: EverGlo IR;

[0342] 扫描范围: 4000 - 400cm⁻¹;

[0343] 增益: 8.0;

[0344] 光学速度: 0.6329cm/sec;

[0345] 孔径: 100;

[0346] 扫描次数: 32; 和

[0347] 分辨率: 4cm⁻¹

[0348] 将粉末样品直接放置在金刚石晶体上, 加压以使样品表面与金刚石晶体表面贴合。收集背景光谱, 然后收集样品光谱。

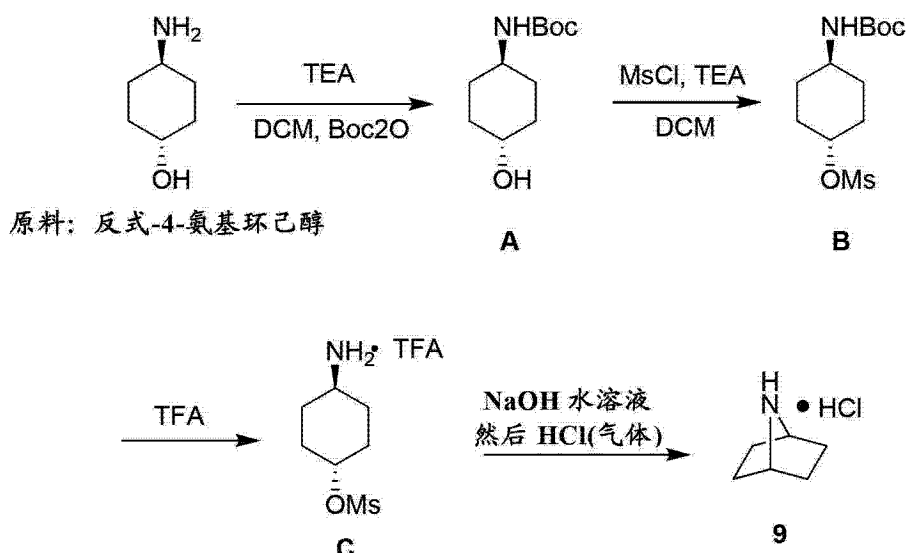
[0349] 固态核磁共振光谱学

[0350] 在 Bruker 400MHz 质子频率宽孔径色谱仪上获得固态核磁共振光谱学 (SS NMR) 光谱。通过将质子测定的质子饱和和回收数据拟合至指数函数得到质子弛豫纵向弛豫时间 (¹H T₁)。使用这些值设定碳交叉极化魔角旋转实验 (¹³C CPMAS) 的最佳循环延迟, 其典型地设置在 1.2x¹H T₁ 和 1.5x¹H T₁ 之间。在 2 毫秒接触时间中使用在质子通道上的线性振幅变速 (从 50% 至 100%) 和 100kHz TPPM 去耦得到碳谱。通常魔角旋转 (MAS) 速度是 15.0kHz。使用质子去耦的直接极化 MAS 实验得到氟光谱。使用 100kHz TPPM 去耦。循环延迟设置为 ≥ 5x¹⁹F T₁。通过将氟测定的质子去耦饱和和回收数据拟合至指数函数得到氟纵向弛豫时间 (¹⁹F T₁)。使用设置为 29.5ppm 的固相金刚烷的高磁场共振对碳以及氟光谱进行外部对照。使用该方法, 碳谱在 0ppm 间接对照四甲基硅烷, 氟光谱在 0ppm 间接对照硝基甲烷。

[0351] 合成实施例

[0352] 制备实施例: 7-氮杂双环 [2.2.1] 庚烷盐酸盐 (8-HCl)。

[0353]



[0354] 反式-4-(叔-丁氧基羰基氨基)环己醇 (A) 的制备, 方法 1。将碳酸钠 (920.2g, 8.682mol, 2 当量) 加入至反应容器中, 接着加入水 (3.000L, 6 体积) 并搅拌。加入二氯甲烷 (DCM, 4.000L, 4 体积), 接着加入反式-4-氨基环己醇 (500.0g, 4.341mol) 以产生两相反应混合物, 将其在室温剧烈搅拌。然后将 Boc_2O (947.4g, 997.3mL, 4.341mol, 1 当量) 在 DCM (2 体积) 中的溶液快速地逐滴加入至容器, 将所得反应混合物在室温搅拌过夜。然后过滤反应混合物, 将滤饼用水 (2×8 体积) 洗涤。将产物抽吸干燥直到其成为致密的饼。然后将饼在真空干燥箱中在 35°C 干燥 24 小时得到 830g 作为晶体固体的反式-4-(叔-丁氧基羰基氨基)环己醇 (A)。

[0355] 反式-4-(叔-丁氧基羰基氨基)环己醇 (A) 的制备, 方法 2。将两个 50L 的三颈圆底烧瓶各自配备机械搅拌器和热电偶。将烧瓶放置在冷却的桶中, 然后将各个烧瓶装入水 (8.87L) 和反式-4-氨基环己醇 (1479g)。在约 10 至 30 分钟之后, 反式-4-氨基环己醇溶解, 将碳酸钾 (1774.6g) 加入至各烧瓶。在约 10 至 20 分钟之后, 碳酸钾溶解, 将 DCM (2.96L) 装入各烧瓶。然后将 DCM (1479mL) 中的 Boc 酸酐 (3082.6g) 以维持温度在 20 至 30°C 的速率加入至各烧瓶。使用冰/水浴以控制放热和加速加入, 其耗时约 1 至 2 小时。在加入期间形成悬浮液, 将反应混合物加热至室温, 并搅拌过夜, 直到根据 Boc 酸酐消失, 反应完成。然后将庚烷 (6L) 装入各烧瓶, 将混合物冷却至约 0 至 5°C 。通过过滤, 使用相同的过滤器从各烧瓶收集固体。将合并的固体用庚烷 (6L) 洗涤, 接着用水 (8L) 洗涤。将固体装入适当尺寸的配有机机械搅拌器的壶中。加入水 (12L) 和庚烷 (6L), 将所得悬浮液机械搅拌 30 至 60 分钟。通过过滤收集固体, 然后用水 (8L) 和庚烷 (8L) 洗涤过滤器, 在过滤器上风干 3 天, 然后在真空下在 30 至 35°C 干燥至恒重以提供作为白色固体的产物。

[0356] 反式-4-(叔-丁氧基羰基氨基)环己基甲磺酸酯 (B) 的制备, 方法 1。将 12L 烧瓶配备氮吹和机械搅拌器。引入反式-4-(叔-丁氧基羰基氨基)环己醇 (750g, 3.484mol), 接着引入四氢呋喃 (THF, 6.000L, 8 体积), 搅拌混合物。加入三乙胺 (370.2g, 509.9mL, 3.658mol, 1.05 当量), 将混合物冷却至 0°C 。小心地逐滴加入甲磺酰氯 (419.0g, 283.1mL, 3.658mol, 1.05 当量), 保持混合物的温度低于 5°C 。在加入之后, 将混合物在 0°C 搅拌 3 小时, 然后逐渐加热至室温 (17°C), 并搅拌过夜 (约 15h)。将混合物用水 (6 体积) 淬灭, 并搅拌 15 分钟。加入乙酸乙酯 (EtOAc, 9.000L, 12 体积), 并持续搅拌 15 分钟。停止搅拌,

将混合物静置 10 分钟,移除水相。加入 1N HCl (6 体积, 4.5L), 并持续搅拌 15 分钟。停止搅拌, 移除水相。加入 10%w/v NaHCO₃ (4.5L, 6 体积), 将混合物搅拌 10 分钟。停止搅拌, 移除水相。加入水 (6 体积, 4.5L), 将混合物搅拌 10 分钟。移除水层, 将有机层磨光 (polish) 过滤, 浓缩至 4 体积。加入庚烷 (5.5 体积, 4L), 将混合物再次浓缩至干燥, 以得到 988g 的反式 -4-(叔-丁氧基羰基氨基) 环己基甲磺酸酯。

[0357] 反式 -4-(叔-丁氧基羰基氨基) 环己基甲磺酸酯 (B) 的制备, 方法 2。将配备机械搅拌器、加料漏斗、氮气入口、热电偶和干燥管的三颈圆底烧瓶放置进冷却的桶中。将反式 -4-(叔-丁氧基羰基氨基) 环己醇 (2599g, 12.07mol, 1.0 当量)、四氢呋喃 (THF) (20.8L) 和三乙胺 (1466g, 14.49mol, 1.2 当量) 加入至烧瓶。将混合物用冰水浴冷却并搅拌。通过加料漏斗历经 1 小时的时间滴加甲磺酰氯 (1466g, 12.80mol, 1.06 当量)。一旦完成加入, 移除冷水浴, 将反应混合物搅拌直到 TLC 表明原料耗尽 (约 30 分钟)。然后用盐酸水溶液 (在 6.7L 水中 223mL HCl) 和 EtOAc (10.4L) 淬灭反应混合物。在室温将混合物搅拌约 10 至 20 分钟, 然后转移至分液漏斗。分层, 弃去水层。用水 (2×4.5L)、饱和碳酸氢钠水溶液 (1×4.5L) 洗涤有机层, 用无水硫酸镁搅拌 5 至 10 分钟以干燥。将混合物过滤, 将滤饼用 EtOAc (2×600mL) 洗涤。将合并的洗出物和滤液在 40℃减压浓缩, 留下白色固体。将固体加入至庚烷 (3L) 中, 在冰 / 甲醇冷却桶中冷却。再加入庚烷 (5L), 将混合物在 0 至 5℃搅拌不少于 1 小时。然后通过过滤收集固体, 用冷庚烷 (0 至 5℃, 2×1.3L) 洗涤, 在真空下在 40℃干燥至恒重以提供标题化合物。

[0358] 注意: 加套的反应器可用于代替用冷却桶和冰浴的圆底烧瓶。

[0359] 反式 -4-氨基环己基甲磺酸酯 (C) 的制备, 方法 1。将反式 -4-(叔-丁氧基羰基氨基) 环己基甲磺酸酯 (985g, 3.357mol) 引入配备在氮气环境下的搅拌器和排气口的三颈 12L 烧瓶。在室温加入 DCM (1.970L, 2 体积), 并开始搅拌。将三氟乙酸 (TFA) (2.844kg, 1.922L, 24.94mol, 2 体积) 分两批, 每批 1L 缓慢加入至混合物。在第一次加入之后, 将混合物搅拌 30 分钟, 接着进行第二次加入。将混合物在室温搅拌过夜 (15 小时), 形成澄清溶液。然后将 2-甲基四氢呋喃 (4 体积) 加入至反应混合物, 将其搅拌 1 小时。然后将混合物在通风橱中小心过滤, 抽干以生成 1100g 含有过量 TFA 的反式 -4-氨基环己基甲磺酸酯的 TFA 盐。

[0360] 反式 -4-氨基环己基甲磺酸酯 (C) 的制备, 方法 2。将 50L 三颈圆底烧瓶配备机械搅拌器、加料漏斗和热电偶, 将其放置进冷却的桶中。将反式 -4-(叔-丁氧基羰基氨基) 环己基甲磺酸酯 (3474g, 1.0 当量) 和 DCM (5.9L) 加入至烧瓶。在室温将所得悬浮液搅拌 5 至 10 分钟, 然后通过加料漏斗历经 2.5 小时的时间缓慢加入三氟乙酸 (TFA, 5.9L) 以控制所产生的放热和气体释放速率。将反应混合物在室温搅拌过夜, 然后使用冰水浴冷却至 15℃至 20℃。然后通过加料漏斗以保持内部温度低于 25℃的速率 (约 1.5 小时) 加入 2-甲基四氢呋喃 (2-MeTHF, 11.8L)。开始 4-5L 2-MeTHF 的加入是放热的。将所得悬浮液搅拌 1 小时。通过过滤收集固体, 然后用 2-MeTHF (2×2.2L) 洗涤, 然后在室温在真空下干燥至恒重以提供作为白色固体的标题化合物。

[0361] 7-氮杂双环 [2.2.1] 庚烷盐酸盐 (8-HCl) 的制备, 方法 1。将反式 -4-氨基环己基甲磺酸酯 (200g, 650.9mmol) 的 TFA 盐引入三颈烧瓶, 接着加入水 (2.200L, 11 体积)。缓慢加入 NaOH (78.11g, 1.953mol, 3 当量)、保持反应混合物的温度低于 25℃, 将混合物

搅拌过夜。然后加入 DCM(1.4L, 7 体积), 搅拌混合物, 分离有机层。然后再用 DCM(1.4L, 7 体积) 萃取水层, 合并 DCM 层。然后加入 HCl(108.5mL, 12M, 1.3020mol, 2 当量)、将混合物搅拌 30 分钟, 然后在旋转蒸发仪上浓缩至干燥。加入乙腈(10 体积), 浓缩混合物。将其重复 3 次直到所有痕量水被共沸移除, 以提供 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷盐酸盐。将粗制的产物从乙腈(10 体积)重结晶以提供作为无色晶体固体的 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷盐酸盐(8-HCl)。¹H NMR(DMSO-d⁶)ppm 8.02-8.04(d); 7.23-7.31(m); 4.59(s); 3.31(s); 2.51-3.3(m); 1.63-1.75(m); 1.45-1.62(m)。

[0362] 注意, 粗制的产物也可以在约 95°C 至 97°C 蒸馏和进一步重结晶以替代为提取而加入 DCM。

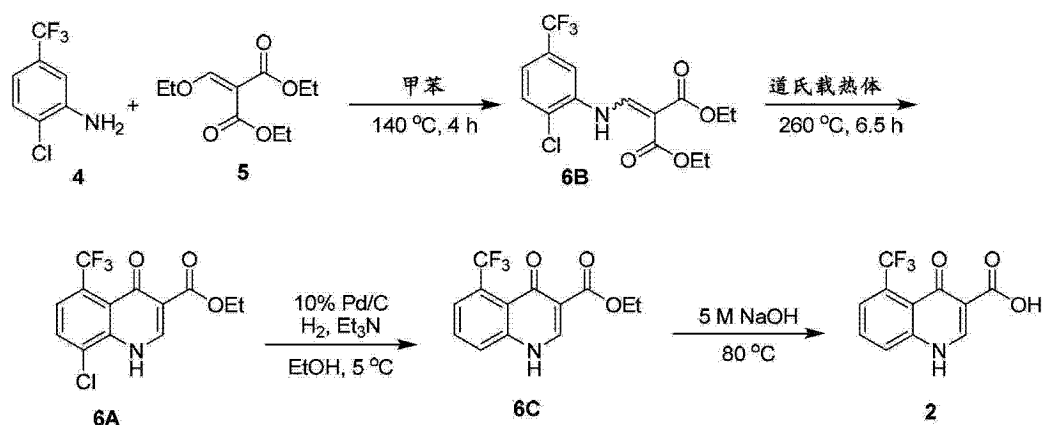
[0363] 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷盐酸盐(8-HCl)的制备, 方法 2。将 50L 三颈圆底烧瓶配备机械搅拌器、加料漏斗和热电偶, 将其放置进加热套中。将反式-4-氨基环己基甲磺酸酯三氟乙酸盐(3000g, 1 当量)和水(30L)加入至烧瓶。因为加入是轻微放热的, 搅拌混合物, 通过加料漏斗以保持温度低于 25°C 的速率加入 50%NaOH(2343g, 29.29mol, 3 当量)。一旦 NaOH 加入完成, 将反应混合物在室温搅拌过夜。在回流温度(约 100°C), 初始温度 95°C 至 98°C 通过分馏回收产物。通过添加 HCl 将各级分的 pH 调节至 2, 在 55°C 减压浓缩以生成稠的糊状物。加入乙腈(ACN 1.5L), 将所得悬浮液搅拌 30 分钟, 然后冷却至 0°C 至 5°C 1 小时。通过过滤收集固体, 用冷(0 至 5°C)ACN(2×600mL)洗涤, 在真空下在 50°C 干燥至恒重。

[0364] 将 22L 三颈圆底烧瓶配备机械搅拌器、热电偶和冷凝器, 将其放置进加热套中。将收集的固体(2382g)、甲醇(4.7L)和 2-MeTHF(4.7L)加入至烧瓶。搅拌所得悬浮液, 加热回流(约 65°C)。将反应烧瓶转移至冷却的桶中, 搅拌混合物。然后通过加料漏斗在历经 30 分钟的时间加入 2-MeTHF(4.7L)。将所得悬浮液冷却至 0 至 5°C, 并在该温度搅拌 30 分钟。通过过滤收集固体, 用冷(0 至 5°C)2-MeTHF(2×600mL)洗涤, 然后在真空下在 55°C 干燥至恒重。

[0365] 将配备机械搅拌器、热电偶、氮气入口和冷凝器的 12L 三颈圆底烧瓶放置进加热套中。将粗制的产物(2079g)和 ACN(6.2L)加入至烧瓶。将所得悬浮液搅拌和加热回流(约 82°C)30 分钟。将烧瓶转移至冷却的桶中, 将悬浮液缓慢冷却至 0 至 5°C, 在该温度保持 1 小时。通过过滤收集固体, 用冷(0 至 5°C)ACN(3×600mL)洗涤, 在真空下在 55°C 干燥至恒重以提供提供标题产物。

[0366] 实施例 1A: 4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸(2)的制备。

[0367]



[0368] 2-((2-氯-5-(三氟甲基)苯基氨基)亚甲基)丙二酸二乙酯 (6B) 的制备。将 2-氯-5-(三氟甲基)苯胺 (4) (200g, 1.023mol)、2-(乙氧亚甲基)丙二酸二乙酯 (5) (276g, 1.3mol) 和甲苯 (100mL) 在氮气环境下在配备迪斯二氏冷凝器的 1L 的三颈圆底烧瓶中混合。加热溶液并搅拌至 140℃, 保持该温度 4 小时。将反应混合物冷却至 70℃, 缓慢加入己烷 (600mL)。将所得浆液搅拌并冷却至室温。通过过滤收集固体, 用在己烷 (2x 400mL) 中 10% 的乙酸乙酯洗涤, 然后在真空下干燥以提供白色固体 (350g, 94% 收率), 作为所需沉淀产物 2-((2-氯-5-(三氟甲基)苯基氨基)亚甲基)丙二酸二乙酯 (6B)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d⁶) δ 11.28 (d, J=13.0Hz, 1H), 8.63 (d, J=13.0Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.80 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.50 (dd, J=1.5, 8.4Hz, 1H), 4.24 (q, J=7.1Hz, 2H), 4.17 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.27 (m, 6H)。

[0369] 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯 (6A) 的制备方法 1。将 1L 的三颈烧瓶装入道氏热载体® (200mL, 8mL/g), 将其在 200℃ 脱气 1 小时。将溶剂加热至 260℃, 在历经 10 分钟的时间分次加入 2-((2-氯-5-(三氟甲基)苯基氨基)亚甲基)丙二酸二乙酯 (6B) (25g, 0.07mol)。将所得混合物在 260℃ 搅拌 6.5 小时 (h), 通过蒸馏移除所得乙醇副产物。将混合物缓慢冷却至 80℃。在历经 30 分钟 (min) 的时间缓慢加入己烷 (150mL), 接着再一次性加入 200mL 己烷。将浆液搅拌直到其达到室温。过滤固体, 用己烷 (3x 150mL) 洗涤, 然后在真空下干燥以提供作为黄褐色固体的 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯 (6A)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d⁶) δ 11.91 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.06 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.81 (d, J=8.4Hz, 1H), 4.24 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.29 (t, J=7.1Hz, 3H)。

[0370] 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯 (6A) 的制备方法 2。将化合物 6B (2000g, 5.468mol) 引入反应器。将道氏热载体 (4.000L) 装入反应器中, 并在室温过夜氮吹脱气。然后搅拌并加热至 260℃。将生成的 EtOH 蒸馏除去。监测反应, 在 5.5 小时之后完成, 反应基本完成。移除热源, 将反应混合物冷却至 80℃, 加入庚烷 (2.000L)。将混合物搅拌 30 分钟。将庚烷 (6.000L) 加入至搅拌的混合物, 并持续搅拌过夜。滤除固体, 用庚烷 (4.000L) 洗涤, 在真空干燥箱中在 50℃ 干燥以提供化合物 6A。

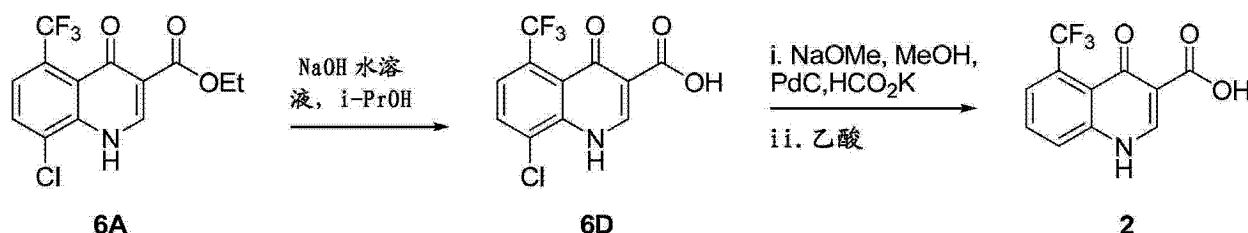
[0371] 4-氧代-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸乙酯 (6C) 的制备。将 5L 的三颈烧瓶装入 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯 (6A) (100g, 0.3mol)、乙醇 (1250mL, 12.5mL/g) 和三乙胺 (220mL, 1.6mol)。然后在 5℃ 将容器装入 10g 的 10%Pd/C (50% 重量)。将反应在氢气气氛下在 5℃ 剧烈搅拌 20 小时, 之后将反应混合物浓缩至约 150mL 的体积。将作为具有 Pd/C 的浆液的产物 4-氧代-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸

乙酯 (6C) 直接用于下一步。

[0372] 4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (2) 的制备。将 4-氧代-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸乙酯 (6C) (58g, 0.2mol, 粗制的含有 Pd/C 的反应浆液) 悬浮于在具有回流冷凝器的 1L 烧瓶中的 NaOH (814mL 的 5M, 4.1mol) 中, 在 80°C 加热 18 小时, 接着再在 100°C 加热 5 小时。将反应通过填充的硅藻土过滤加热以移除 Pd/C, 将硅藻土用 1N NaOH 漂洗。将滤液酸化至约 pH 1 以得到浓白色沉淀。过滤沉淀, 然后用水和冷乙腈漂洗。然后在真空下干燥固体以提供作为白色固体的 4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (2)。¹H NMR (400.0MHz, DMSO-d₆) δ 15.26 (s, 1H), 13.66 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.13 (dd, J=1.6, 7.8Hz, 1H), 8.06-7.99 (m, 2H)。

[0373] 实施例 1B: 4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (2) 可代替的制备。

[0374]



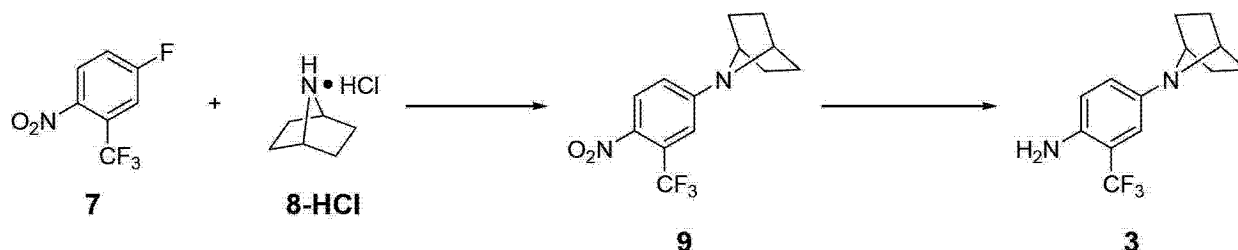
[0375] 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (6D) 的制备。将 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯 (6B) (1200g, 3.754mol) 装入容器, 接着加入 2-丙醇 (1.200L) 和水 (7.200L), 并搅拌。将 NaOH (600.6g, 7.508mol) 和水 (1.200L) 混合, 冷却至室温。将所得 NaOH 溶液装入反应容器。将反应混合物加热至 80°C, 并搅拌 3.5 小时以产生深色均匀混合物。再过 1 小时后, 通过滴液漏斗历经 45 分钟的时间加入乙酸 (9.599L [20%w/v 溶液], 31.97mol)。将反应混合物以 6°C / 小时的速率冷却至 22°C, 并搅拌。将所得固体过滤, 用水 (3L) 洗涤以生成湿的饼 (1436g)。将滤液在放出氮气的真空干燥箱中通过 **drierite®** 干燥以生成作为棕色固体的 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸。通过在 1.5L 甲醇中成浆液并搅拌 6 小时以纯化 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸。然后将其过滤并干燥以提供 968.8g 纯化的 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (6D)。

[0376] 4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (2) 的制备。将 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (6D) (18.5g, 1.00 当量, 限制试剂) 装入反应容器中, 在惰性气氛下搅拌加入 MeOH (118mL, 6.4 体积)。历经 10 分钟的时间将 NaOMe (3.53g, 1.00 当量) 逐滴加入至反应器。将混合物搅拌直到所有固体在溶液中 (5-10 分钟)。然后将碳载钯 (2.7g, 0.03 当量) 加入至反应混合物。将溶解在 MeOH (67mL, 3.6 体积) 中的甲酸钾 (10.78g, 2 当量) 历经 30 分钟的时间加入至反应混合物。然后将其在室温搅拌约 4.5 小时。当 8-氯-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸相对于 4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸不多于 1.0% 时判断反应完成。当反应完成时, 通过硅藻土垫 (37g [大约是原料 6D 用量的两倍]) 过滤混合物以移除固体。将硅藻土饼用 MeOH (37mL, 2 体积) 洗涤。将滤液装入干净的反应容器并搅拌。历经至少 45 分钟的时间将乙酸 (7.22mL, 2 当量) 持续装入至搅拌的溶液, 将所得浆液搅拌 5-16 小时。过滤固体, 将饼用 MeOH (56mL, 3 体积) 洗涤, 抽吸干燥, 然后真空干燥, 以提供标题的羧酸 2。

[0377] 或者, 甲酸钾试剂可以用氢气代替。

[0378] 实施例 2A: 4-(7-氮杂双环[2.2.1]庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺 (3) 的制备。

[0379]



[0380] 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 (9) 的制备, 方法 1。将 4-氟-1-硝基-2-(三氟甲基)苯 (7) (6.0g, 28.69mmol) 和三乙胺 (8.7g, 12.00ml, 86.07mmol) 在乙腈 (50ml) 中的溶液加入至含有 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷盐酸盐 (8-HCl) (4.6g, 34.43mmol, 在氮气环境下得到) 的烧瓶。将反应烧瓶在 80℃ 在氮气环境下加热 16 小时。将反应混合物冷却, 然后将其在水和二氯甲烷之间分配。用 1M HCl 洗涤有机层, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩至干燥。通过硅胶色谱法 (在己烷中 0-10% 的乙酸乙酯) 纯化, 得到作为黄色固体的 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 (9)。¹H NMR (400.0MHz, DMSO-d₆) δ 8.03 (d, J=9.1Hz, 1H), 7.31 (d, J=2.4Hz, 1H), 7.25 (dd, J=2.6, 9.1Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 1.69-1.67 (m, 4H), 1.50 (d, J=7.0Hz, 4H)。

[0381] 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 (9) 的制备, 方法 2。在氮气气氛下将 4-氟-1-硝基-2-(三氟甲基)苯 (7) (901g, 4.309mol) 与碳酸钠 (959.1g, 9.049mol) 和 DMSO (5L, 5.5 体积) 一起引入 30L 加套的容器, 并搅拌。然后将 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷盐酸盐 (8-HCl) (633.4g, 4.740mol) 分次加入至容器, 将温度逐渐升高至 55℃。当反应基本完成时, 将混合物用 10 体积 EtOAc 稀释, 用水 (5.5 体积) 洗涤 3 次, 直到水层中的 DMSO 消失 (HPLC)。将有机层浓缩至 4 体积, 然后将溶剂与环己烷交换, 直到移除所有 EtOAc, 在烧瓶中的总体积约是含有环己烷的 4 体积。将反应混合物在旋转蒸发仪上加热至 60℃ 持续 30 分钟。然后将溶液冷却至室温, 并搅拌或旋转 3 小时。当所有固体结晶时, 将溶液浓缩至干燥, 以提供 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 (9)。

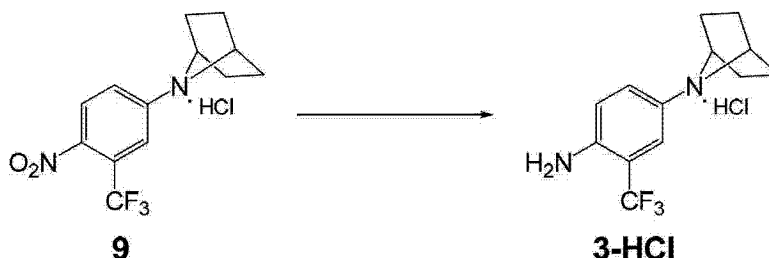
[0382] 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 (9) 的制备, 方法 3。将 4-氟-1-硝基-2-(三氟甲基)苯溶于 3 体积 DCM。加入四丁基溴化铵 (0.05 当量) 和 KOH (50 重量%, 3.6 当量)。然后在 0-5℃ 加入 7-氮杂双环[2.2.1]庚烷盐酸盐 (8-HCl)。将反应加热至室温, 通过 HPLC 监测。一旦基本上完成, 分层, 用 1M HCl 洗涤有机层。分层, 弃去水层。将有机层用水洗涤 1 次, 用盐水洗涤 1 次, 然后蒸馏。将所得物质从环己烷回流重结晶。过滤固体, 用环己烷洗涤, 在真空干燥箱中在 45℃ 用 N₂ 气体吹扫干燥以提供 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 (9)。

[0383] 4-(7-氮杂双环[2.2.1]庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺 (3) 的制备。将装有 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷 (26) (7.07g, 24.70mmol) 和 10% Pd/C (0.71g, 6.64mmol) 的烧瓶抽成真空, 然后充满氮气。加入乙醇 (22ml), 反应烧瓶配有氢气球。在搅拌剧烈 12 小时之后, 将反应混合物用氮气吹扫, 通过过滤移除 Pd/C。在减压下将滤液浓缩成深色油, 将残余物通过硅胶色谱法 (在己烷中 0-15% 的乙酸

乙酯) 纯化以提供作为紫色固体的 4-(7-氮杂双环[2.2.1]庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺(3)(5.76g, 91% 收率)。¹H NMR(400.0MHz, DMSO-d⁶) δ 6.95(dd, J=2.3, 8.8Hz, 1H), 6.79(d, J=2.6Hz, 1H), 6.72(d, J=8.8Hz, 1H), 4.89(s, 2H), 4.09(s, 2H), 1.61-1.59(m, 4H) 和 1.35(d, J=6.8Hz, 4H)。

[0384] 实施例 2B: 4-(7-氮杂双环[2.2.1]庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺的盐酸盐(3-HCl) 的制备。

[0385]

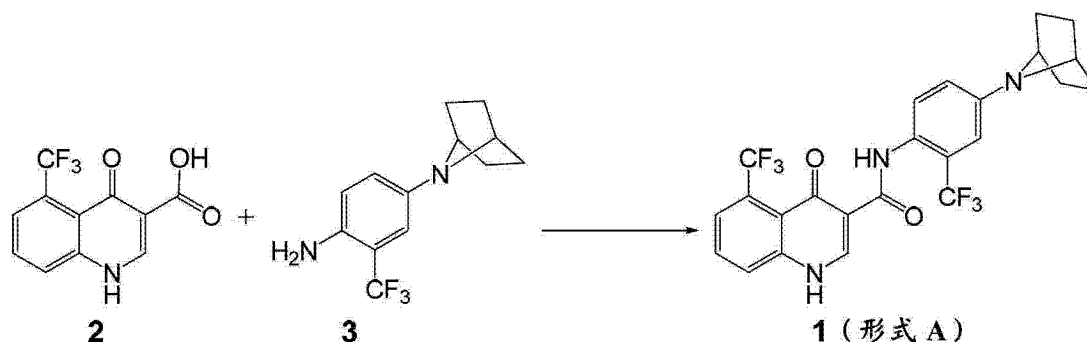


[0386] 4-(7-氮杂双环[2.2.1]庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺的盐酸盐(3-HCl) 的制备, 方法 1。在氮气环境下将碳载钯(150g, 5%w/w) 装入 Büchi 氢气发生器(20L 容量), 接着加入 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮杂双环[2.2.1]庚烷的盐酸盐(9)(1500g) 和 2-甲基四氢呋喃(10.5L, 7 体积)。将氢气装入封闭的容器, 使压力高于大气压 +0.5bar。应用真空约 2 分钟, 接着引入氢气至 0.5bar 的压力。该过程重复 2 次。然后在高于大气压 +0.5bar 的压力下持续充入氢气。搅拌混合物, 通过冷却加套的容器使温度保持在 18℃ 和 23℃ 之间。一旦反应不再消耗氢气和不再放热, 再次应用真空。在 0.5bar 将氮气充入容器, 再次应用真空, 接着第二次充入 0.5bar 氮气。当反应基本完成时, 在氮气气氛下通过过滤漏斗使用硅藻土过滤器将反应混合物转移至接收烧瓶。将硅藻土滤饼用 2-甲基四氢呋喃(3L, 2 体积) 洗涤。将洗出物和滤液装入配备有搅拌、温度控制和氮气气氛的容器。将 4M 在 1,4-二氧六环(1 体积) 中的 HCl 历经 1 小时的时间在 20℃ 持续加入至容器。将混合物再搅拌 10 小时(或过夜), 过滤, 用 2-甲基四氢呋喃(2 体积) 洗涤和干燥以产生 1519g 作为白色晶体固体的 4-(7-氮杂双环[2.2.1]庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺盐酸盐(3-HCl)。

[0387] 在该实施例中也可以取代可代替的溶剂。例如, MeOH 和 / 或 EtOH 可以代替 2-MeTHF。

[0388] 实施例 3A: 作为形式 A(化合物 1 形式 A) 的 N-(4-(7-氮杂双环[2.2.1]庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺的制备。

[0389]



[0390] 将丙基膦酸环酐（在乙酸乙酯中 50% 的溶液，52.68mL，88.48mmol）和吡啶（5.6g，5.73mL，70.78mmol）在室温加入至 4-氧代-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸 (2) (9.1g，35.39mmol) 和 4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺 (3) (9.2g，35.74mmol) 在 2-甲基四氢呋喃 (91.00mL) 中的溶液。将反应烧瓶在 65°C 在氮气环境下加热 10 小时。在冷却至室温之后，然后用乙酸乙酯稀释反应，用饱和的 Na_2CO_3 溶液 (50mL) 淬灭。分层，将水层用乙酸乙酯萃取两次。用水洗涤合并的有机层，用 Na_2SO_4 干燥，过滤并浓缩成黄褐色固体。将粗制的固体产物在乙酸乙酯/乙醚 (2 : 1) 中成为浆液，通过真空过滤收集，用乙酸乙酯/乙醚 (2 : 1) 洗涤两次以提供作为淡黄色晶体粉末的粗制的产物。将粉末溶于温热的乙酸乙酯中，吸收在硅藻土上。通过硅胶色谱法（在二氯甲烷中 0-50% 的乙酸乙酯）纯化以提供白色晶体固体的 N-(4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺的形式 A (化合物 1 形式 A)。LC/MS m/z 496.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ，保留时间 1.48 分钟 (RP- C_{18} ，10-99% CH_3CN /0.05% TFA 历经 3 分钟)。 ^1H NMR (400.0MHz， $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.08 (s, 1H)，12.16 (s, 1H)，8.88 (s, 1H)，8.04 (dd, $J=2.1$, 7.4Hz, 1H)，7.95-7.88 (m, 3H)，7.22 (dd, 2.5, 8.9Hz, 1H)，7.16 (d, $J=2.5$ Hz, 1H)，4.33 (s, 2H)，1.67 (d, $J=6.9$ Hz, 4H)，1.44 (d, $J=6.9$ Hz, 4H)。

[0391] 化合物 1 形式 A 的粉末衍射图如图 1 所示。

[0392] 表 1 提供了代表化合物 1 形式 A 的 XRPD 峰的列表。

[0393] 表 1 : 化合物 1 形式 A 的代表性的 XRPD 峰。

[0394]

2- θ (度)	相对强度 (%)
7.9	100.0
9.3	10.8
11.9	12.8
14.4	35.2
15.1	12.6
15.8	34.1
17.0	25.2
17.7	13.8
19.3	39.4
20.1	20.2
21.4	14.5

至 45℃, 并搅拌 12-15 小时。HPLC 分析显示 4- 氧代 -5-(三氟甲基)-1, 4- 二氢喹啉 -3- 甲酸存在的量小于 2%。然后将混合物冷却至室温, 加入 2- 甲基四氢呋喃 (4 体积, 2.292L), 接着加入水 (6.9 体积, 4L), 使温度保持低于 30℃。移除水层, 将有机层用 NaHCO₃ 饱和水溶液小心地洗涤两次。然后用 10%w/w 柠檬酸 (5 体积) 洗涤有机层, 最终用水 (7 体积) 洗涤。将混合物磨光过滤, 并转移至另一个干燥容器中。加入 N-(4-(7- 氮杂双环 [2.2.1] 庚 -7- 基)-2-(三氟甲基) 苯基)-4- 氧代 -5-(三氟甲基)-1, 4- 二氢喹啉 -3- 甲酰胺盐酸盐的形式 A-HCl (化合物 1 形式 A-HCl) (3.281g, 5.570mmol) 的晶种。历经 2 小时的时间鼓泡加入 HCl(g) (10 当量), 将混合物搅拌过夜。将所得悬浮液过滤, 用 2- 甲基四氢呋喃 (4 体积) 洗涤, 抽吸干燥并在 60℃ 烘箱中干燥至恒重以提供化合物 1 形式 A-HCl。

[0400] 化合物 1 形式 A-HCl 的粉末衍射图如图 4 所示。

[0401] 表 2 提供了化合物 1 形式 A-HCl 的代表性的 XRPD 峰。

[0402] 表 2. 化合物 1 形式 A-HCl 的代表性的 XRPD 峰。

[0403]

2-θ (度)	相对强度 (%)
7.1	44.3
8.2	33.3
10.8	1.5
11.7	1.5
12.1	5.8
13.7	3.3
14.1	32.1
14.7	16.9
15.0	5.7
16.1	3.0
16.4	16.9
16.6	3.7
16.8	1.9
17.6	0.6
18.7	12.4

18.9	1.9
19.7	5.4
19.8	6.9
20.3	1.5
21.2	100.0
21.7	10.6
21.9	12.3
22.2	4.0
22.8	21.9
23.4	9.8
24.6	34.3
25.0	17.9
25.2	8.6
25.9	3.6
26.5	1.5
26.9	7.0
27.5	8.3
28.0	5.3
28.3	1.6
28.7	3.5
29.0	4.8
29.2	7.5
29.8	1.40
30.1	1.8

31.0	5.4
31.3	2.6
31.9	1.7
32.3	4.6
32.4	3.7
32.8	2.3
33.3	3.9
34.3	1.8

[0404]

2- θ (度)	相对强度 (%)
34.5	3.6
34.7	8.7
35.3	3.0
35.6	12.7
35.6	18.9
36.1	3.2
36.8	3.3
37.2	1.7
37.8	3.1
38.5	2.8
39.1	3.1
39.7	2.3

[0405] 化合物 1 形式 A-HCl 的单晶测定为具有单斜晶系, $P2_1/c$ 空间群, 和下列晶胞参数: **$a=13.6175(4)\text{\AA}$, $b=21.614(3)\text{\AA}$, $c=8.3941(4)\text{\AA}$** , $\alpha=90^\circ$, $\beta=112.303^\circ$, 和 $\gamma=90^\circ$ 。

[0406] 也使用显微术评价化合物 1 形式 A-HCl 的样品。

[0407] 化合物 1 形式 A-HCl 的样品的 DSC 曲线提供在图 5 中, 化合物 1 形式 A-HCl 的代表性样品的 TGA 曲线提供在图 6 中。

[0408] 化合物 1 形式 A-HCl 的代表性样品的所示的 FTIR 光谱提供在图 7 中。

[0409] 也使用固态 ^{13}C 和 ^{19}F NMR 分析化合物 1 形式 A-HCl。各自的 NMR 谱提供在图 8 和 9 中。在 ^{13}C SSNMR 和 ^{19}F SSNMR 谱中发现的若干峰描述在表 3 和 4 中。

[0410] 表 3 : 化合物 1 形式 A-HCl 的 ^{13}C SSNMR 峰。

[0411]

峰编号	F1 (ppm)
1	175.7
2	163.7
3	142.6
4	140.8
5	137.2
6	131.5
7	129.0
8	126.0
9	124.8
10	123.8
11	121.5
12	117.8
13	112.4

[0412]

峰编号	F1 (ppm)
14	65.7
15	29.2
16	28.3
17	26.1

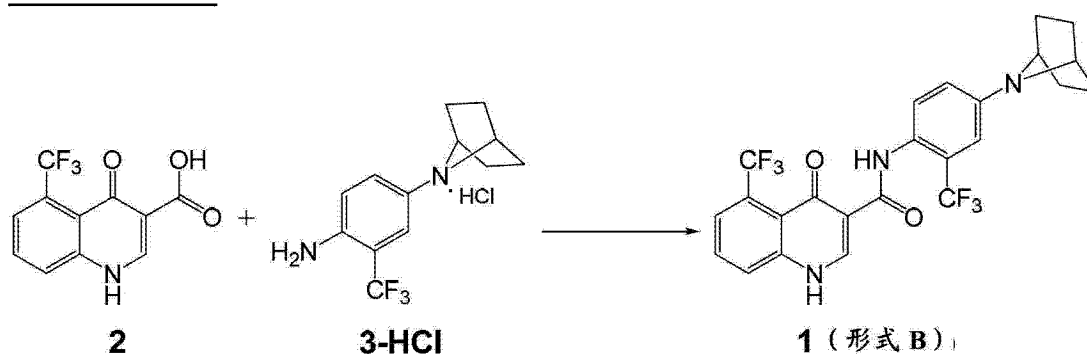
[0413] 表 4: 化合物 1 形式 A-HCl 的 ^{19}F SSNMR 峰。

[0414]

峰编号	F1 (ppm)
1	-57.0
2	-60.5

[0415] 实施例 4A: 作为形式 B (化合物 1 形式 B) 的 N-(4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺的制备。

[0416]



[0417] 将 2-甲基四氢呋喃 (1 体积) 装入 30L 加套的反应容器中, 接着加入 4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺的盐酸盐 (3-HCl) (1.2 当量) 和 4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酸 (2) (573g, 2.228mol)。再将 2-甲基四氢呋喃 (9 体积) 装入容器, 并开始搅拌。历经 15 分钟的时间将在 2-甲基四氢呋喃中的 T3P (2 当量) 加入至反应混合物。使用加料漏斗快速地以逐滴的方式加入吡啶 (3 当量)。然后历经约 30 分钟的时间将混合物边搅拌边加热至 45°C, 保持该温度约 5 小时。将混合物冷却至室温。加入 2-甲基四氢呋喃 (4 体积), 接着缓慢加入水 (6.9 体积), 将反应温度保持低于 30°C。移除水层, 将有机层用 NaHCO_3 饱和水溶液洗涤两次。然后将有机层用 10%w/w 柠檬酸 (5 体积) 小心洗涤, 并用水 (7 体积) 洗涤, 磨光过滤, 并转移至另一个干燥容器。加入 2-甲基四氢呋喃 (10 体积), 并开始搅拌。以逐滴的方式边搅拌边快速地加入庚烷 (10 体积)。将混合物搅拌约 12 小时的时间, 然后将其真空过滤。将固体滤饼引入另一个容器。将水 (15 体积) 装入容器, 将悬浮液搅拌剧烈 48 小时, 然后过滤。将固体饼用水 (5 体积) 洗涤, 在 45°C 干燥至恒重以生成化合物 1 形式 B。

[0418] 使用仪器 1 和 2 记录的化合物 1 形式 B 的粉末衍射图分别如图 10A 和 10B 所示。

[0419] 表 5 包括化合物 1 形式 B 的代表性的 XRPD 峰

[0420] 表 5. 化合物 1 形式 B 的代表性的 XRPD 峰

[0421]

2-θ (度)	相对强度 (%)
6.7	36.6

9.4	37.2
10.0	29.5
11.2	35.3
13.4	70.6
14.8	18.1
15.2	88.8
15.4	16.6
17.2	49.5
17.8	48.0
18.1	83.8
18.8	13.6
19.2	47.6
20.1	68.9
21.2	71.8
22.0	42.6
22.6	7.6
23.5	18.1
24.0	100.0
25.0	9.6
25.9	9.7
26.3	44.8
26.9	26.3
27.2	86.7
27.7	37.8

28.2	7.4
28.9	49.0
29.6	21.3
30.3	8.6
30.6	5.5
31.2	19.3
32.3	5.5
33.7	11.4

[0422]

2- θ (度)	相对强度 (%)
34.2	8.9
34.7	12.4
35.1	8.0
36.7	6.5
38.1	4.7
39.3	5.3

[0423] 化合物 1 形式 B 的样品的 DSC 曲线提供在图 11 中, 化合物 1 形式 B 的代表性样品的 TGA 曲线提供在图 12 中。

[0424] 化合物 1 形式 B 的代表性样品所示的 FTIR 光谱提供在图 13 中。

[0425] 也使用固态 ^{13}C 和 ^{19}F NMR 分析化合物 1 形式 B。各自的 NMR 谱提供在图 14 和 15 中。在 ^{13}C SSNMR 和 ^{19}F SSNMR 谱中发现的若干峰描述在表 6 和 7 中。

[0426] 表 6 : 化合物 1 形式 B 的 ^{13}C SSNMR 峰。

[0427]

峰编号	F1 (ppm)
1	175.3
2	165.3
3	145.9

4	141.4
5	132.9
6	126.8
7	123.5
8	117.4
9	113.4
10	58.3
11	29.2
12	26.9

[0428] 表 7 : 化合物 1 形式 B 的 ^{19}F SSNMR 峰。

[0429]

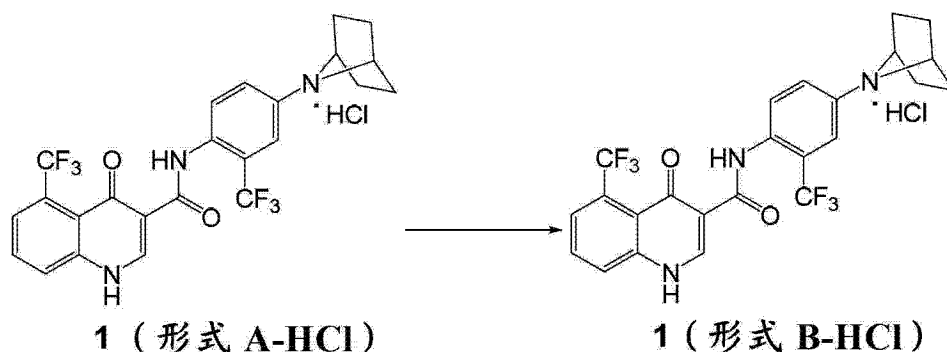
峰编号	F1(ppm)
1	-56.1
2	-62.1

[0430] 将化合物 1 形式 B 的单晶安装在微小突变 (Micro Mount) 环上, 放置于 Broker Apex II 衍射仪中心, 所述衍射仪配备密封的铜 X 射线管和 Apex II CCD 检测器。起初, 采集 40 帧的 3 个集合以测定初始晶胞。随后获得由 15 次扫描和 6084 帧组成的完整数据集合。在室温进行数据采集。使用 Bruker AXS 的 Apex II 软件将数据整合和按比例绘制。整合和按比例绘制形成 6176 个反射, 其中的 2250 是独特的。使用 SHELXTL 软件通过在空间群 P21/c 中的直接法解出结构。也使用 SHELXTL 软件在 F2 上使用全矩阵最小二乘方法进行精化。总共 392 个参数用于精化, 导致反射参数比为 5.74。最终精化指数是 $wR2=0.0962$ 和 $R1=0.0682$ (对于 $I>2\sigma(I)$ 的反射 $wR2=0.0850$ 和 $R1=0.0412$)。

[0431] 在化合物 1 形式 B 中 N-(4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺的单晶测定为具有单斜晶系, P21/c 空间群, 和下列晶胞参数: **$a=13.5429(4)\text{\AA}$, $b=13.4557(4)\text{\AA}$, $c=12.0592(4)\text{\AA}$** , $\alpha=90^\circ$, $\beta=101.193^\circ$, 和 $\gamma=90^\circ$ 。

[0432] 实施例 4B: 作为形式 B-HCl (化合物 1 形式 B-HCl) 的 N-(4-(7-氮杂双环 [2.2.1] 庚-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-氧代-5-(三氟甲基)-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺的制备

[0433]



[0434] 方法 1

[0435] 将 100mL 2- 甲基四氢呋喃装入具有氮气气氛配备搅拌器的三颈烧瓶。将化合物 1 形式 A-HCl (55g, 0.103mol) 加入至烧瓶, 接着加入 349mL 2- 甲基四氢呋喃, 并开始搅拌。将 28mL 的水加入至烧瓶, 将烧瓶温热至内部温度为 60℃, 并搅拌 48 小时。将烧瓶冷却至室温, 并搅拌 1 小时。将反应混合物真空过滤直到滤饼干燥。将固体滤饼用 2- 甲基四氢呋喃 (4 体积) 洗涤两次。将固体滤饼保持在真空下抽吸约 30 分钟的时间, 将其转移至干燥的盘子中。将滤饼在真空下在 60℃干燥至恒重。这样得以生成作为白色晶体固体的化合物 1 形式 B-HCl。

[0436] 方法 2.

[0437] 将化合物 1 形式 A-HCl (14.638g, 27.52mmol) 装入 100mL 圆底烧瓶。加入 EtOH (248.9mL) 和水 (27.82mL)。将白色浆液加热回流。在 77℃得到澄清溶液。将反应冷却至 45℃, 搅拌 30 分钟, 然后将其冷却至 20℃。将混合物在 20℃再搅拌 3 小时。过滤产物, 用 EtOH 洗涤滤饼。将固体在真空干燥箱中在 45℃用氮吹干燥以提供作为白色固体的化合物 1 形式 B-HCl。

[0438] 注意, 其它溶剂组合, 例如 MeOH/H₂O 和 IPA/H₂O 等可用于代替本实施例中描述的 EtOH/H₂O。

[0439] 可代替的溶剂组合的实例提供在表 8 中。

[0440] 表 8. 可以用于制备形式 B-HCl 的其它溶剂。

[0441]

溶剂	溶剂体积	T [°C]
MeOH	10	60
MeOH : H ₂ O	10 : 0.2	60
MeOH : H ₂ O	10 : 0.5	60
MeOH : H ₂ O	10 : 1	60
MeOH : H ₂ O	10 : 1.5	60
IPA : H ₂ O	10 : 1	75
IPA : H ₂ O	10 : 1.5	75
MeOH : H ₂ O	10 : 1	65
EtOH	10	70
EtOH : H ₂ O	10 : 0.2	70
EtOH : H ₂ O	10 : 0.5	70
EtOH : H ₂ O	10 : 1	70
EtOH : H ₂ O	10 : 1.5	70

[0442]

[0443] 化合物形式 1B-HCl 的粉末衍射图如图 16 所示。

[0444] 表 9 :化合物 1 形式 B-HCl 的代表性的 XRPD 峰

[0445]

2-θ (度)	相对强度 (%)
8.3	93.7
9.0	8.4
10.9	0.8
11.4	1.4
13.0	4.9
14.1	19.8
14.8	32.7
15.2	12.6

16.7	23.8
17.8	37.8
18.0	90.0
18.2	28.6
19.3	19.0

[0446]

2- θ (度)	相对强度 (%)
19.5	17.5
19.9	2.7
20.4	9.4
20.6	6.2
21.7	41.2
22.0	22.2
23.0	100.0
23.6	20.5
23.9	4.0
24.1	3.9
24.5	9.2
24.7	13.0
24.9	31.9
25.2	22.6
25.7	12.6
26.1	3.3
26.7	4.5

27.1	21.3
27.9	10.6
28.1	18.7
28.5	4.3
28.7	5.8
29.7	11.1
29.8	14.2
30.1	4.0
30.5	8.2
31.1	30.2
31.5	9.1
32.3	11.4
32.8	3.8
33.1	9.2
33.4	11.3
33.8	11.1
33.9	10.1
34.1	5.6
34.6	8.5
34.9	6.4
35.2	10.8
36.0	4.1
36.2	13.2
36.4	4.7

37.2	5.9
37.6	3.7
37.9	2.2
38.2	7.5
38.5	22.3
38.6	13.8
39.9	10.7

[0447] 化合物 1 形式 B-HCl 的单晶测定为具有单斜晶系, P21/a 空间群, 和下列晶胞参数 : **$a=12.57334(5)\text{\AA}$, $b=19.68634(5)\text{\AA}$, $c=8.39399(5)\text{\AA}$** , $\alpha=90^\circ$, $\beta=90.0554^\circ$, 和 $\gamma=90^\circ$ 。

[0448] 也使用显微术评价化合物形式 B-HCl 的样品。

[0449] 化合物 1 形式 B-HCl 的 DSC 曲线提供在图 17 中, 化合物 1 形式 B-HCl 的代表性样品的 TGA 曲线提供在图 18 中。

[0450] 化合物 1 形式 B-HCl 的代表性样品所示的 FTIR 光谱提供在图 19 中。

[0451] 也使用固态 ^{13}C 和 ^{19}F NMR 分析化合物 1 形式 B-HCl。各自的 NMR 谱提供在图 20 和 21 中。在 ^{13}C SSNMR 和 ^{19}F SSNMR 谱中发现的若干峰描述在表 10 和 11 中 :

[0452] 表 9 : 化合物 1 形式 B-HCl 的 ^{13}C SSNMR 峰。

[0453]

峰编号	F1(ppm)
1	176.3
2	168.2
3	148.7
4	143.2
5	138.8
6	131.6
7	129.6
8	129.1
9	126.7

10	125.8
11	122.7
12	119.8
13	112.3
14	69.0
15	66.9
16	28.3
17	23.9

[0454] 表 10 : 化合物 1 形式 B-HCl 的 ^{19}F SSNMR 峰 .

[0455]

峰编号	F1 (ppm)
1	-55.6
2	-62.0

[0456] 注意, 在实施例 3A、3B 和 4A-4C 中, EtOAc 可作为溶剂用于代替 2-MeTHF。

[0457] 用于检测和测量化合物的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 增强特性的分析

[0458] 用于测定化合物的 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 调节性质的跨膜电位光学方法

[0459] 该分析使用荧光电压传感染料以使用荧光板读出器 (例如 FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) 测定跨膜电位改变作为 NIH 3T3 细胞中功能性 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 增加的读出值。对该响应的驱动力在于在预先用化合物处理细胞、然后加载电压传感染料后, 通过单一液体添加步骤生成与通道活化相关的氯离子梯度。

[0460] 增强剂化合物的鉴定

[0461] 为了鉴定 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 增强剂, 研发了双重添加 HTS 分析形式。该 HTS 分析使用荧光电压传感染料以测定 FLIPR III 上跨膜电位改变作为温度校准的 $\Delta\text{F508CFTRNIH 3T3}$ 细胞中 $\Delta\text{F508CFTR}$ 门控增加的测量值 (电导)。对该响应的驱动力在于在预先用增强剂化合物 (或 DMSO 媒介物对照品) 处理细胞、然后加载再分布染料后, 与在使用荧光板读出器例如 FLIPR III 的单一液体添加步骤中用福司柯林进行通道活化相关的 Cl^- 离子梯度。

[0462] 溶液

[0463] 浴溶液 #1 : (以 mM 计) NaCl 160, KCl 4.5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, HEPES 10, pH7.4, 含有 NaOH。

[0464] 浴溶液 #1 的代替物包括氯化物盐被葡萄糖酸盐取代的浴溶液。

[0465] 细胞培养

[0466] 将稳定表达 $\Delta\text{F508-CFTR}$ 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于跨膜电位的光学测量。将

细胞维持在 37℃、5%CO₂ 和 90% 湿度中的在 175cm² 培养瓶中的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基内,该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、β-ME、1X pen/strep 和 25mM HEPES。就全部光学分析而言,将细胞以 ~20,000/孔接种在 384-孔基质胶-包被的培养板上,在 37℃ 培养 2 小时,然后在 27℃ 培养 24 小时,以进行增强剂分析。为了进行校准分析,在 27℃ 或 37℃ 与和与化合物一起培养细胞 16-24 小时。

[0467] 电生理分析用于分析化合物的 ΔF508-CFTR 调节特性。

[0468] 1. Ussing 室分析

[0469] 对表达 ΔF508-CFTR 的极化气道上皮细胞进行 Ussing 室实验,以进一步表征在光学测定法中鉴别的 ΔF508-CFTR 调节剂。从支气管组织中分离非-CF 和 CF 气道上皮,如上所述培养 (Galiotta, L. J. V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G. A., & Zegar-Moran, O. (1998) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 478-481), 在用 NIH3T3-条件培养基预包被的 **Costar®** Snapwell™ 滤器上铺平。4 天后,除去顶部培养基,使细胞在空气液体界面上生长 >14 天,然后使用。这产生单层完全分化的柱状细胞,它们具纤毛、特征在于气道上皮特征。从没有任何已知肺病的不吸烟者中分离非-CF HBE。从对 ΔF508-CFTR 而言纯合的患者中分离 CF-HBE。

[0470] 将生长在 **Costar®** Snapwell™ 细胞培养插入物上的 HBE 固定在 Ussing 室 (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) 上,使用电压钳系统 (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA) 测定在基底外侧到顶端 Cl⁻ 梯度 (I_{sc}) 的存在下的经上皮电阻和短路电流。简言之,在电压钳记录条件下 (V_{保持}=0mV)、在 37℃ 检验 HBE。基底外侧溶液包含 (以 mM 计) 145NaCl、0.83K₂HPO₄、3.3KH₂PO₄、1.2MgCl₂、1.2CaCl₂、10 葡萄糖、10HEPES (用 NaOH 将 pH 调整至 7.35)、顶端溶液包含 (以 mM 计) 145 葡萄糖酸钠、1.2MgCl₂、1.2CaCl₂、10 葡萄糖、10HEPES (用 NaOH 将 pH 调整至 7.35)。

[0471] 增强剂化合物的鉴定

[0472] 典型的方案使用基底外侧至顶端膜的 Cl⁻ 浓度梯度。为了产生该梯度,对基底外侧膜使用正常的林格液 (ringer)。另外,通过用等摩尔的葡萄糖酸钠 (用 NaOH 滴定至 pH7.4) 代替顶膜的 NaCl、以得到跨上皮的大幅的 Cl⁻ 浓度梯度。将福斯柯林 (10 μM) 和所有受试化合物加入到细胞培养插入物的顶面。比较推测的 ΔF508-CFTR 增强剂与已知增强剂染料木黄酮的效果。

[0473] 膜片钳记录

[0474] 如之前所述使用穿孔的膜片记录配置监测 ΔF508-NIH3T3 细胞中的总 Cl⁻ 电流 (Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) *J. Neurosci. Methods* 37, 15-26)。使用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) 在 22℃ 进行电压钳记录。移取管溶液包含 (以 mM 计) 150N-甲基-D-葡萄糖胺 (NMDG)-Cl、2MgCl₂、2CaCl₂、10EGTA、10HEPES 和 240 μg/ml 两性霉素-B (用 HCl 将 pH 调整至 7.35)。胞外培养基包含 (以 mM 计) 150NMDG-Cl、2MgCl₂、2CaCl₂、10HEPES (用 HCl 将 pH 调整至 7.35)。使用安装了 Digidata1320A/D 界面与 Clampex 8 (Axon Instruments Inc.) 的 PC 进行脉冲发生、数据采集和分析。为了活化 ΔF508-CFTR,向浴中加入 10 μM 福司柯林和 20 μM 染料木黄酮、每 30 秒监测一次电流-电压相关性。

[0475] 增强剂化合物的鉴定

[0476] 还用穿孔膜片记录技术研究了 $\Delta F508$ -CFTR 增强剂增加稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 细胞中宏观 $\Delta F508$ -CFTRCl⁻ 电流 ($I_{\Delta F508}$) 的能力。从光学测定法中鉴别的增强剂引起具有在光学测定法中观察到的类似效力和功效的 $I_{\Delta F508}$ 的剂量依赖性增加。在所有检验的细胞中,施加增强剂前和过程中的逆转电位约为 -30mV,它是计算的 E_{Cl} (-28mV)。

[0477] 细胞培养

[0478] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于全细胞记录。将细胞维持在 37℃、在 5%CO₂ 和 90% 湿度中的在 175cm² 培养瓶中的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基中,该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X pen/strep 和 25mM HEPES。为了进行全细胞记录,将 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上并且在 27℃ 培养 24-48 小时后用于测试增强剂的活性;且与或不与纠正化合物一起在 37℃ 温育,以便测定纠正剂的活性。

[0479] 单通道记录

[0480] 如上所述使用切下的膜内翻外膜片 (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R. G., Pavirani, A., Lecocq, J-P., Lazdunski, M. (1991) Nature 354, 526 - 528)、应用 Axopatch 200B 膜片钳放大器 (Axon Instruments Inc.) 观察表达在 NIH3T3 细胞中的温度校准的 $\Delta F508$ -CFTR 和 wt-CFTR 的门控活性。移取管包含 (以 mM 计): 150NMDG、150 天冬氨酸、5CaCl₂、2MgCl₂ 和 10HEPES (用 Tris 碱将 pH 调整至 7.35)。浴包含 (以 mM 计): 150NMDG-Cl、2MgCl₂、5EGTA、10TES 和 14Tris 碱 (用 HCl 将 pH 调整至 7.35)。切下后,通过添加 1mM Mg-ATP、75nM cAMP- 依赖性蛋白激酶催化亚单位 (PKA; Promega Corp. Madison, WI) 和 10mM NaF 以抑制蛋白磷酸酶从而活化 wt- 和 $\Delta F508$ -CFTR,这防止了电流下降。将移取管电位维持在 80mV。从包含 ≤ 2 活性通道的膜片中分析通道活性。同时开放的最大数量确定了实验过程中活性通道的数量。为了测定单通道电流振幅,以 100Hz “离线”过滤从 120 秒 $\Delta F508$ -CFTR 活性记录的数据,然后用于构建所有点的振幅直方图,使用 Bio-Patch 分析软件 (Bio-Logic Comp. France) 采用多高斯函数拟合。从 120 秒的通道活性确定总微观电流和开放概率 (P_o)。使用 Bio-Patch 软件或根据关系式 $P_o = I/i(N)$ 确定 P_o ,其中 I = 平均电流, i = 单通道电流振幅, N = 膜片中活性通道的数量。

[0481] 细胞培养

[0482] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR 的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞用于切下膜的膜片钳记录。将细胞维持在 37℃、在 5%CO₂ 和 90% 湿度中的在 175cm² 培养瓶中的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基中,该培养基补充了 2mM 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、1X NEAA、 β -ME、1X pen/strep 和 25mM HEPES。为了进行单通道记录,将 2,500-5,000 个细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上并且在 27℃ 培养 24-48 小时后使用。

[0483] 化合物 1 用作 ATP 结合盒转运蛋白的调节剂。经测定化合物 1 形式 A 的 EC₅₀ (μ m) 低于 2.0 μ M。将化合物 1 形式 A 的效率计算为 100% - 25%。应注意 100% 效率是使用 4-甲基-2-(5-苯基-1H-吡唑-3-基)苯酚得到的最大响应。

[0484] 其它实施方案

[0485] 在本公开内容中所提及的所有出版物和专利以相同的程度通过引用并入本文,如同各单独的公开文本或专利申请特定地和单独地通过引用并入一样。当在通过引用并入的

任何专利或出版物中的术语的含意与用于本公开内容的术语的含意矛盾时,在本公开内容中的术语的含意为准。此外,前述讨论仅仅公开和描述了本发明的示例性实施方案。本领域的技术人员将容易地从这些讨论和附图和权利要求中识别,本文可以产生多种变化、修饰和变体,其没有偏离如下列权利要求所定义的本发明的精神和范围。

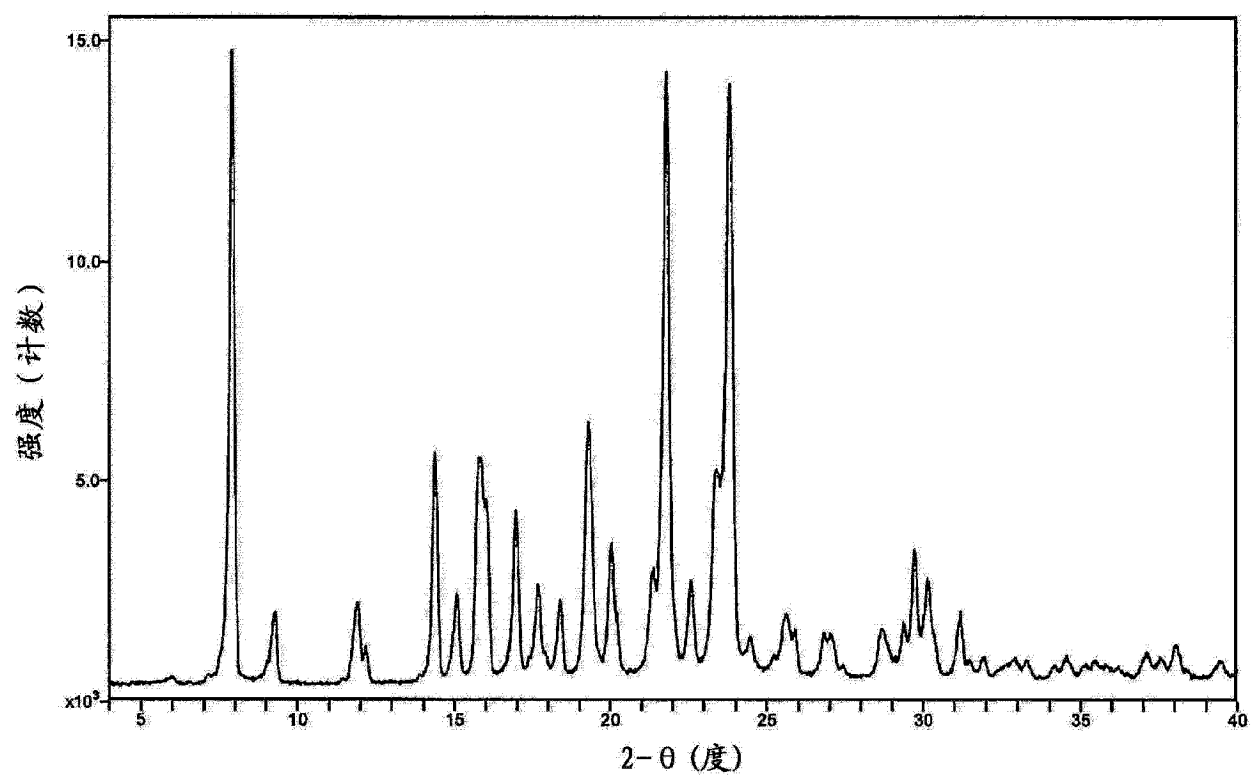


图 1

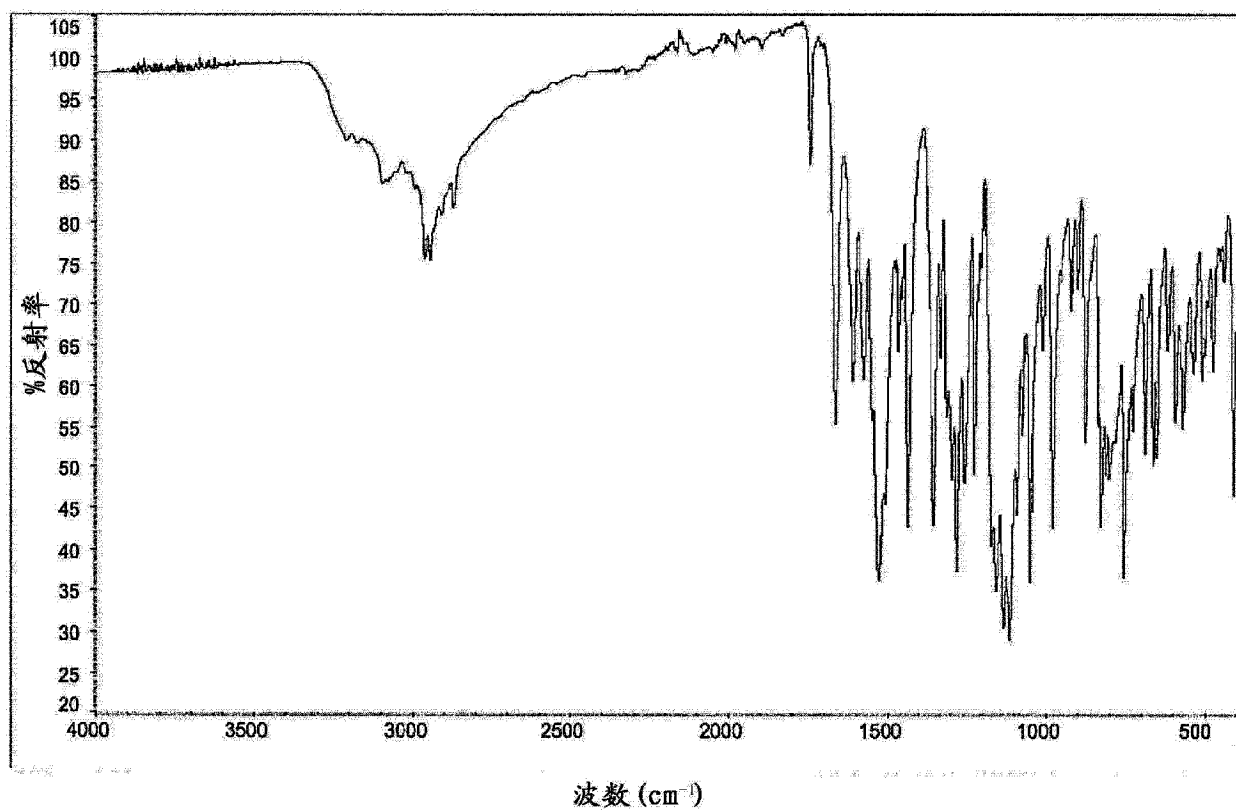


图 2

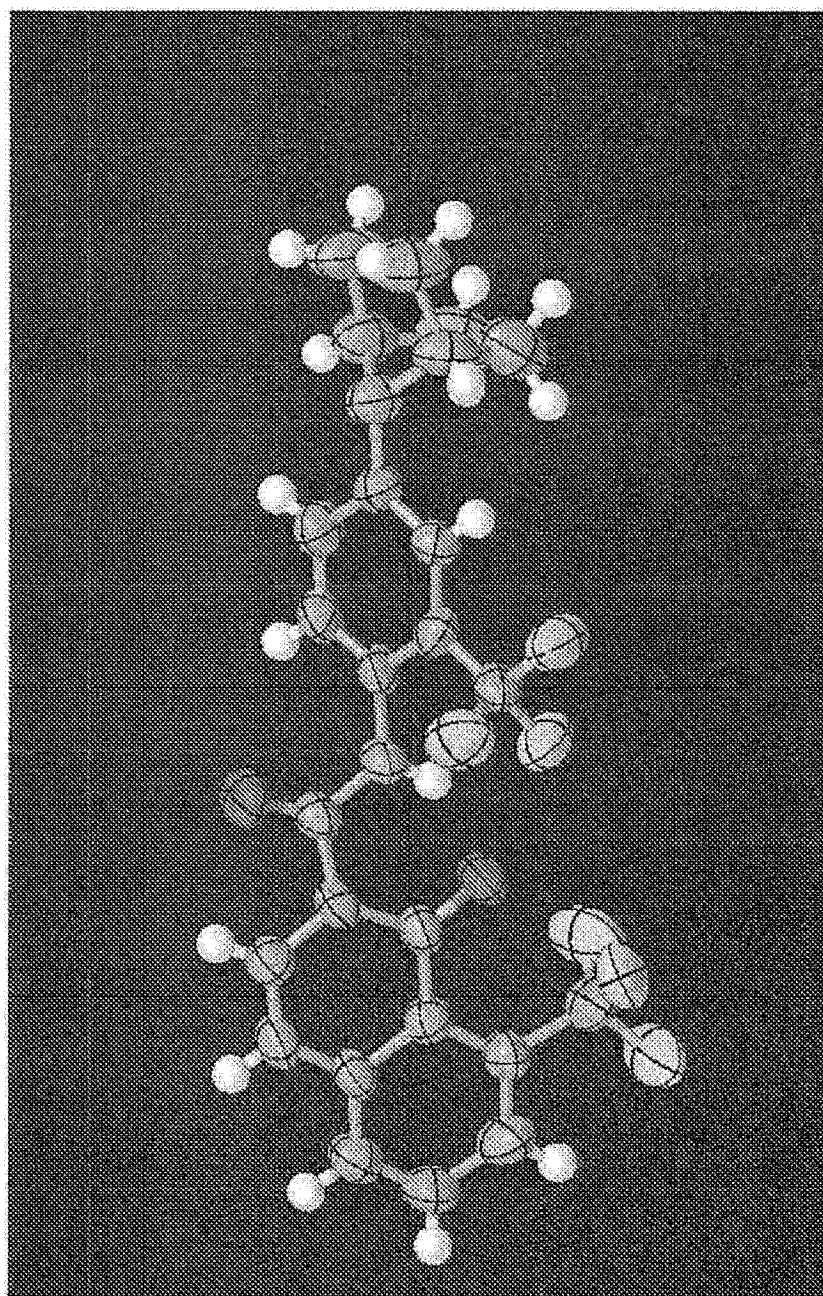


图 3

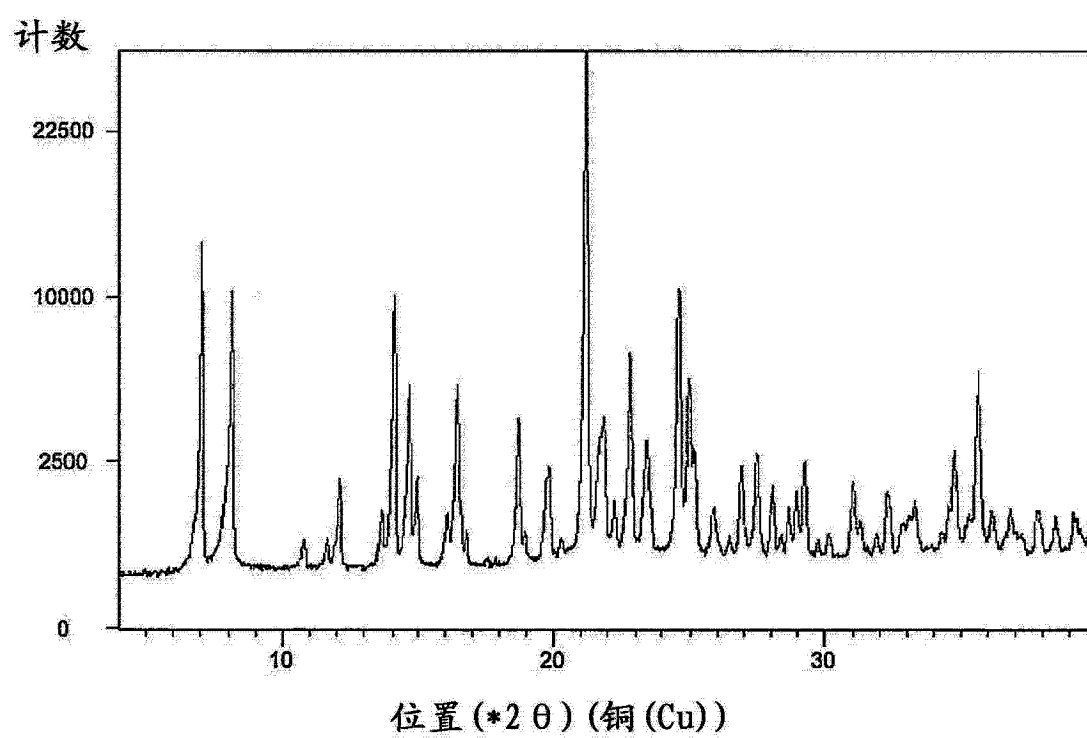


图 4

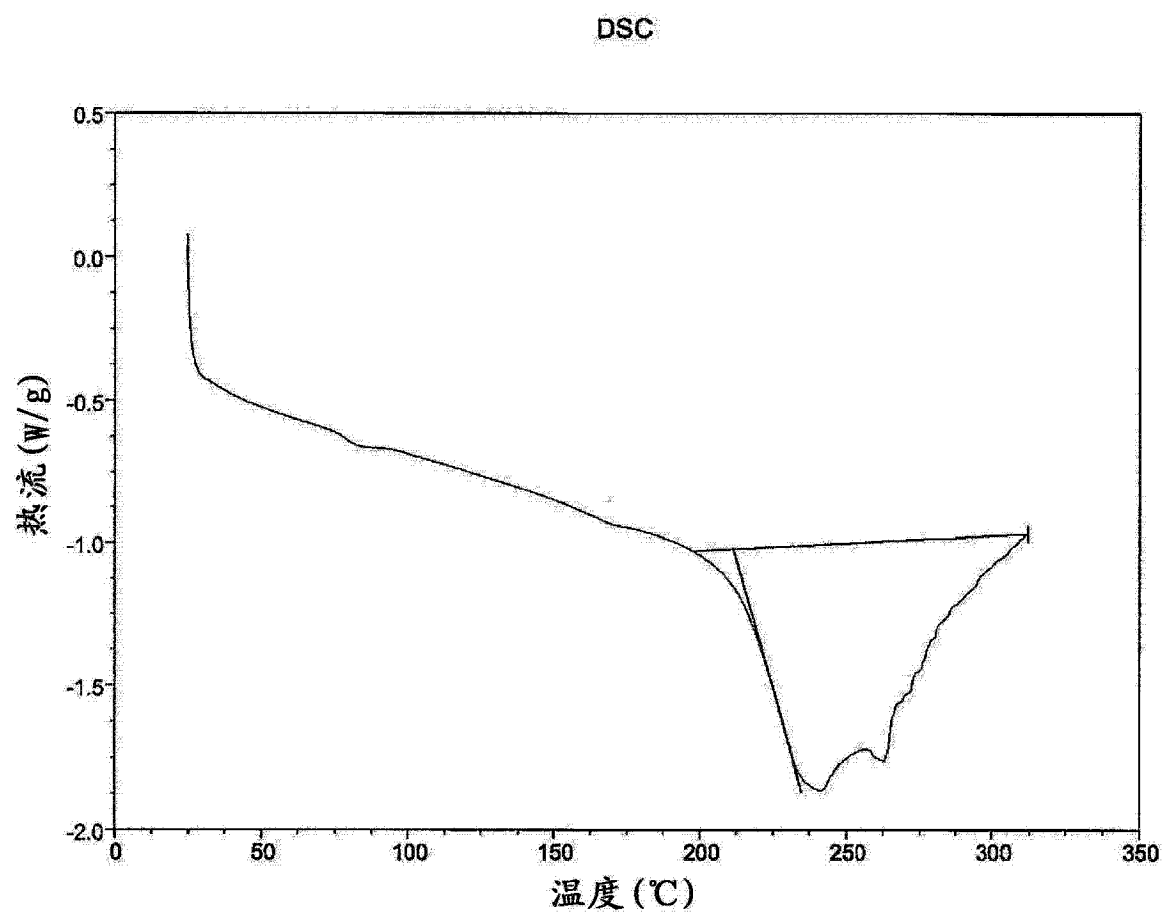


图 5

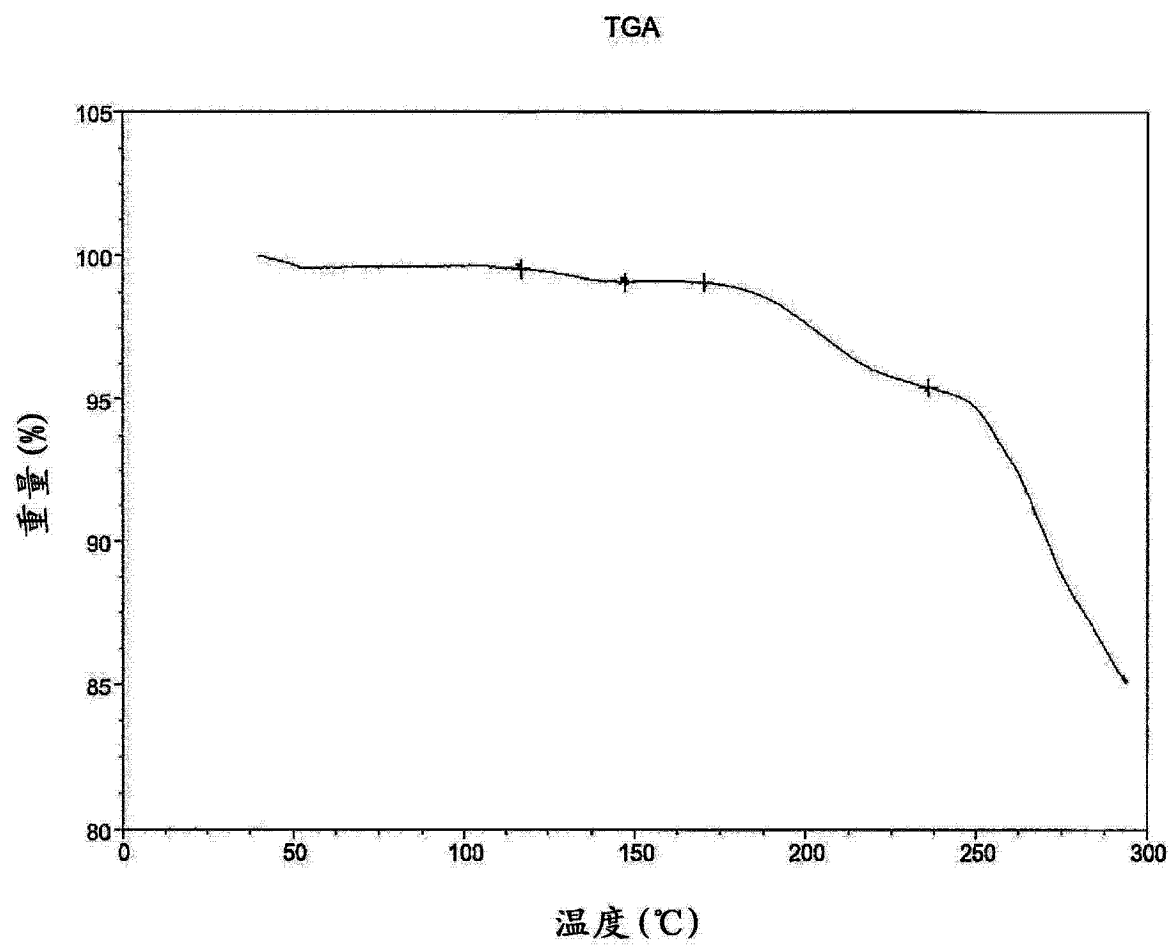


图 6

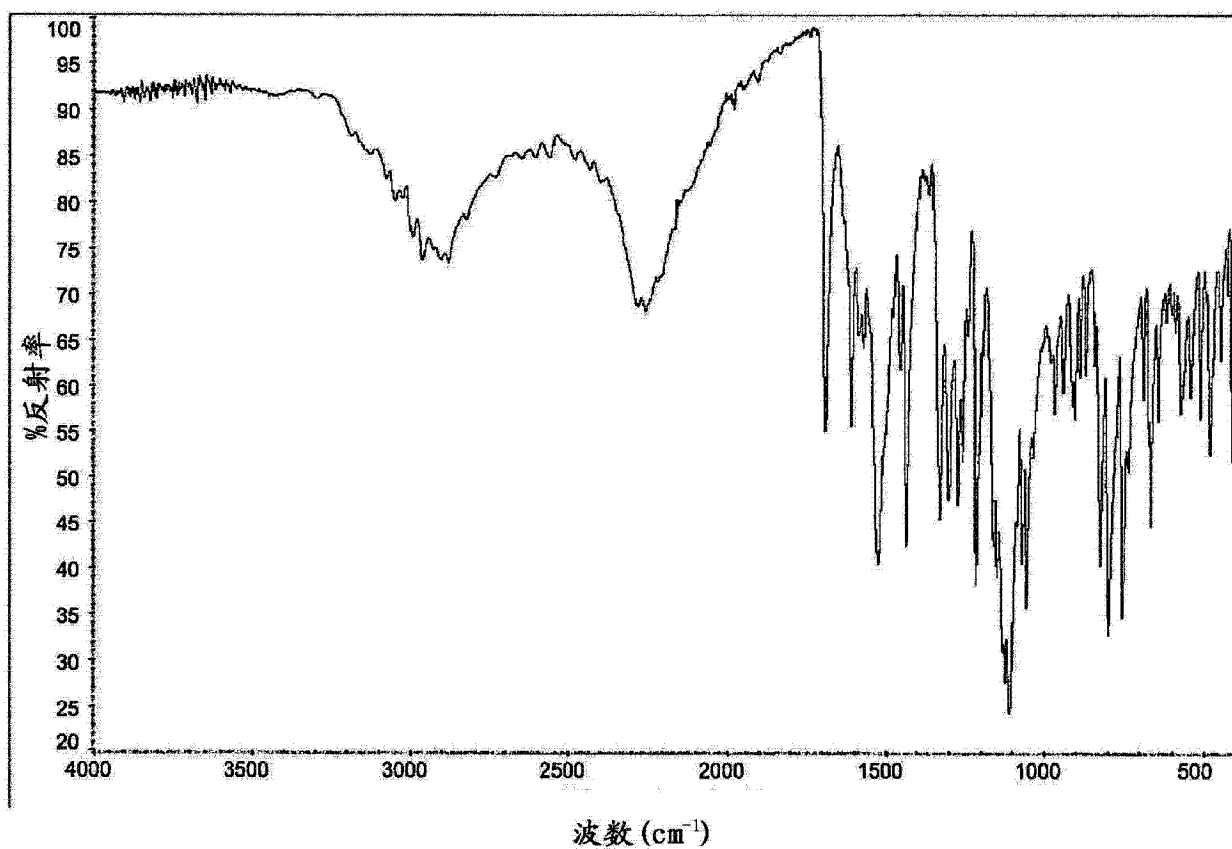


图 7

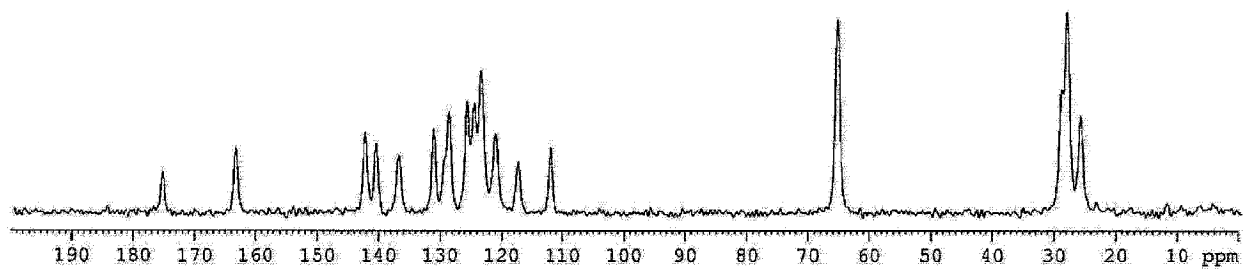


图 8

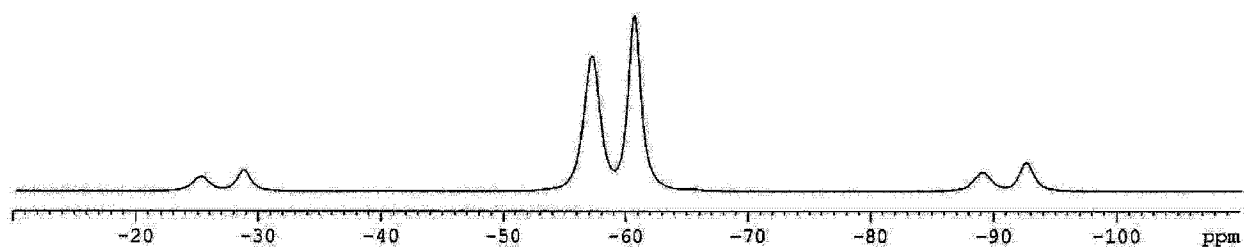


图 9

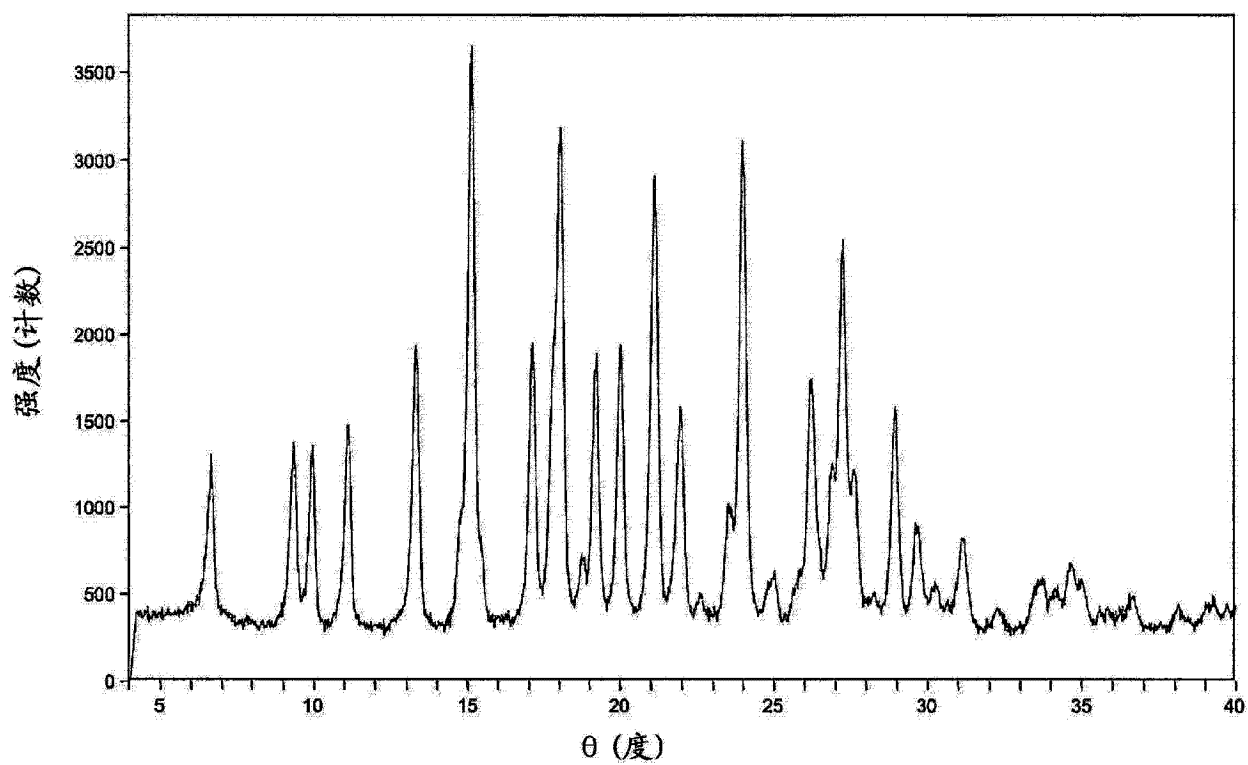


图 10A

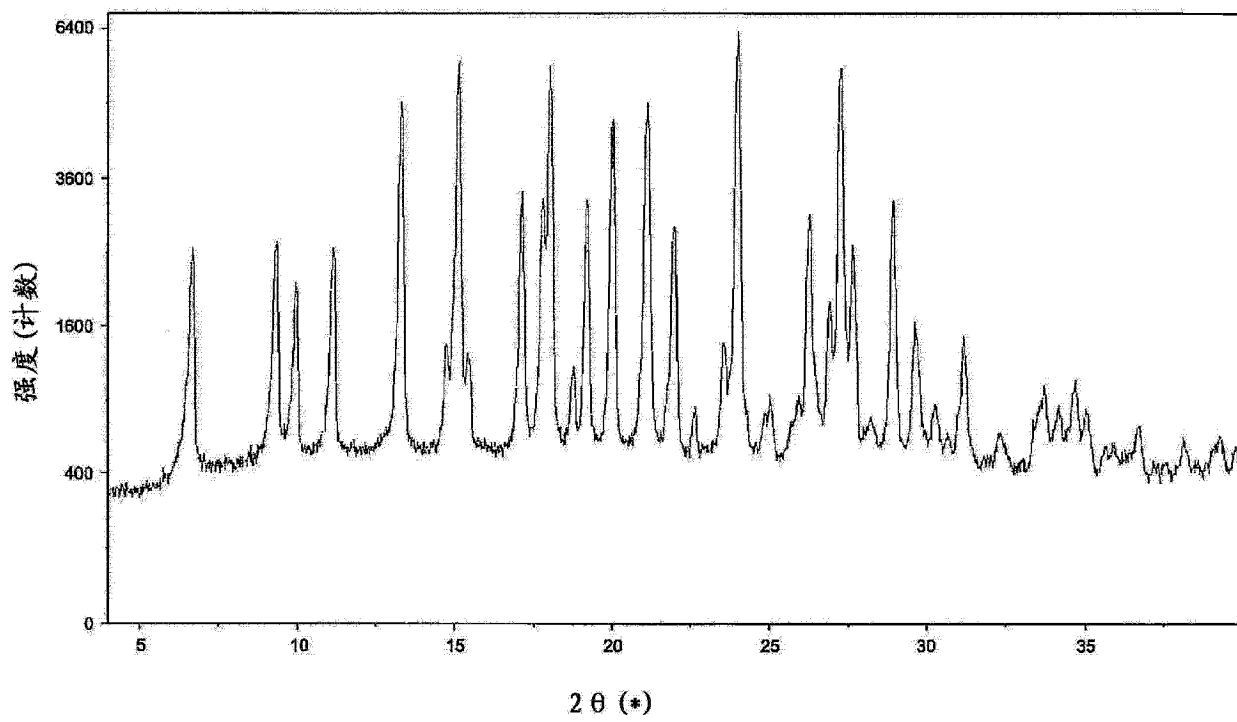


图 10B

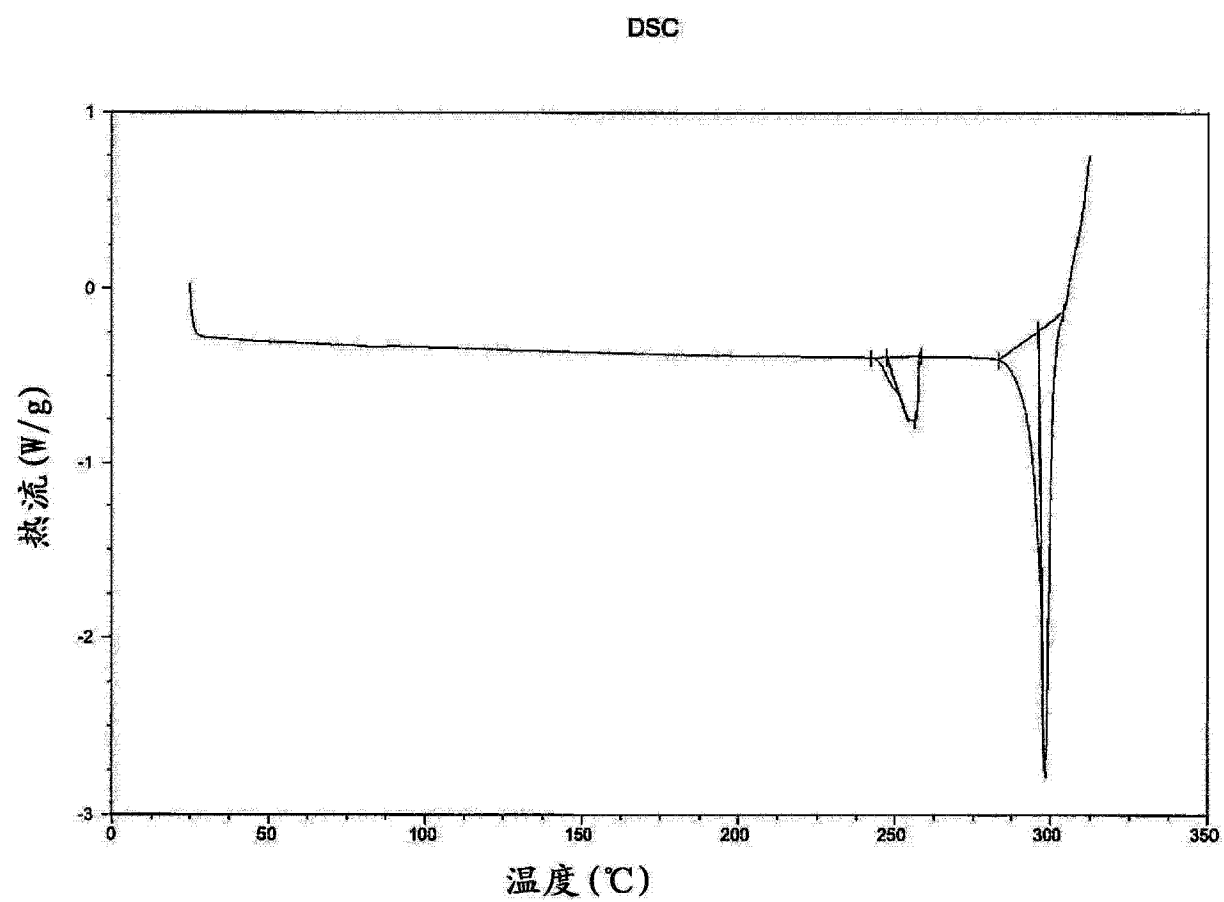


图 11

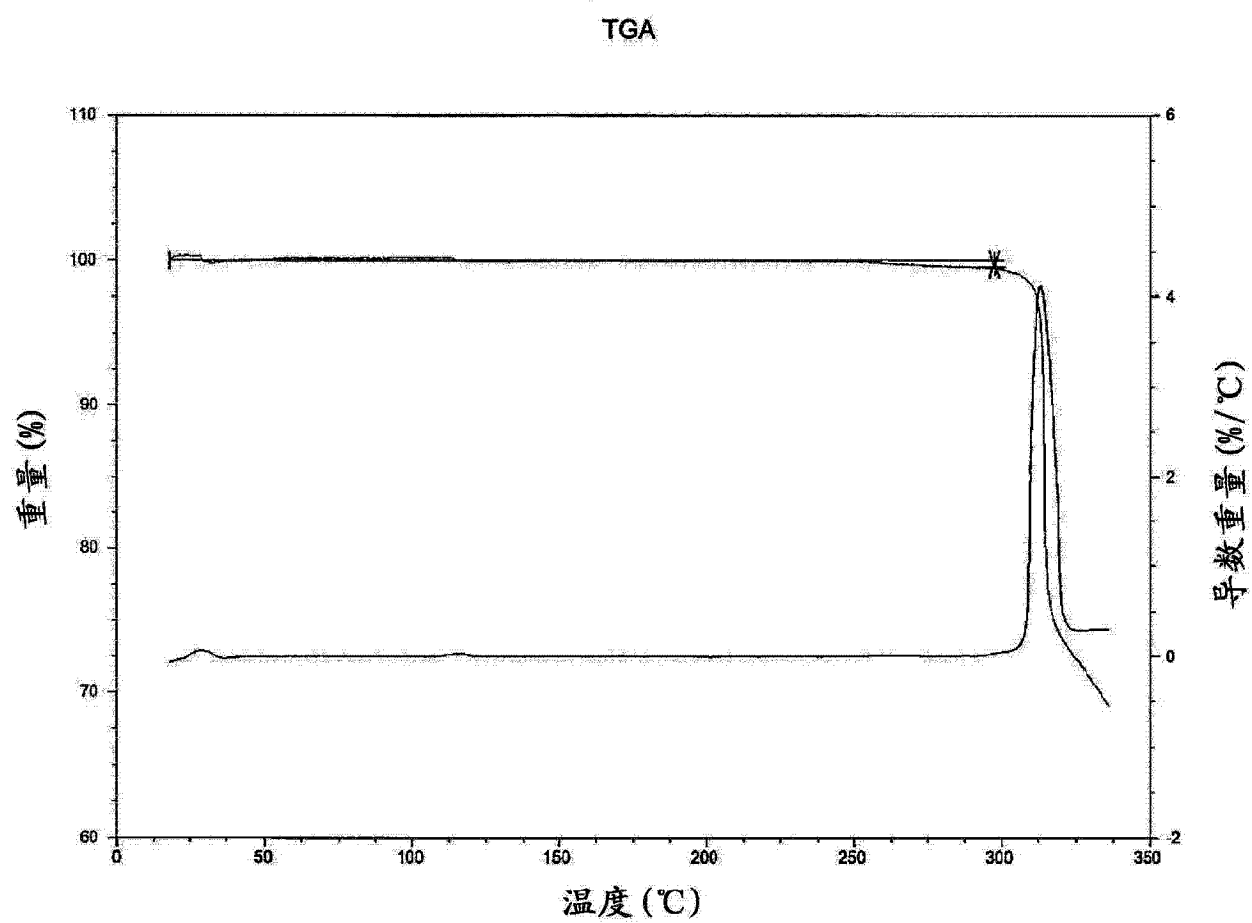


图 12

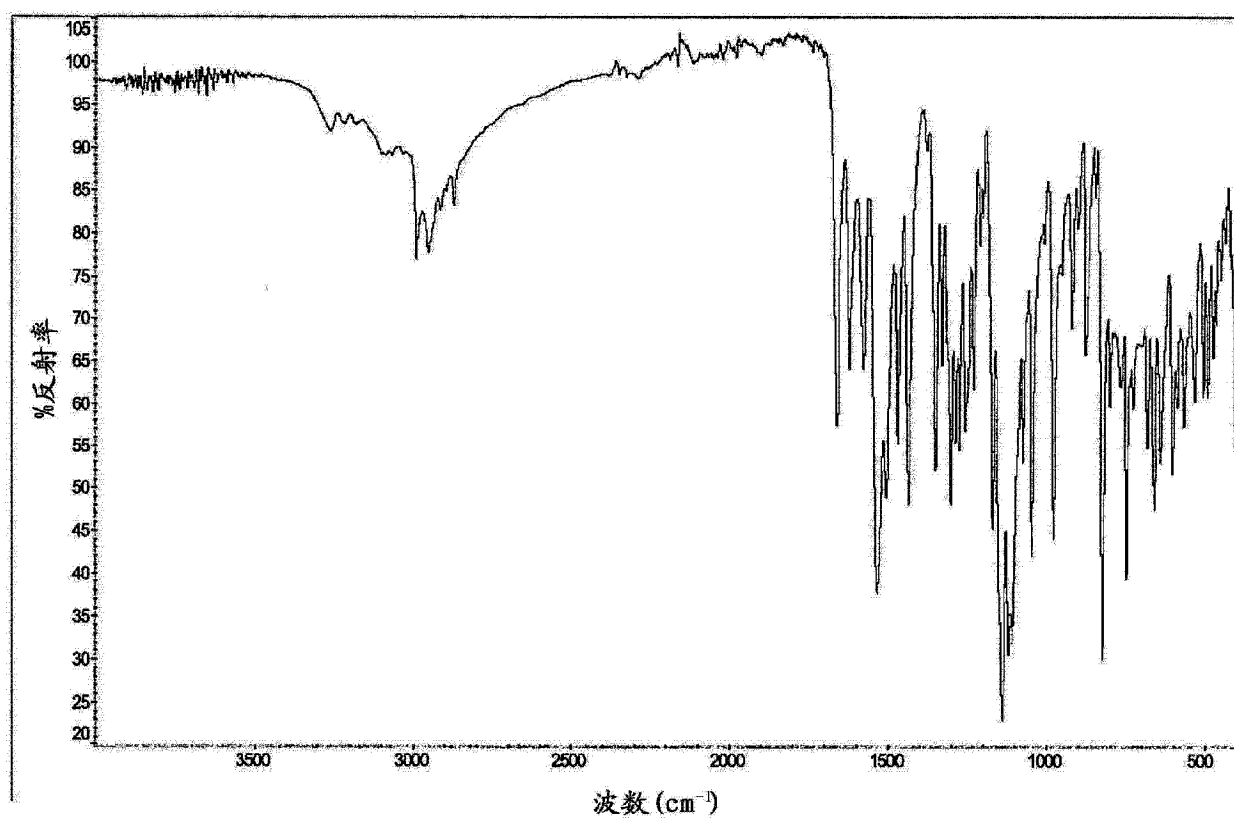


图 13

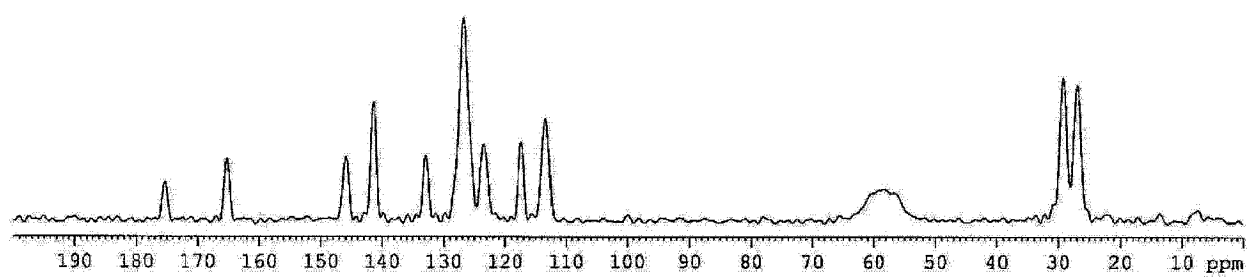


图 14

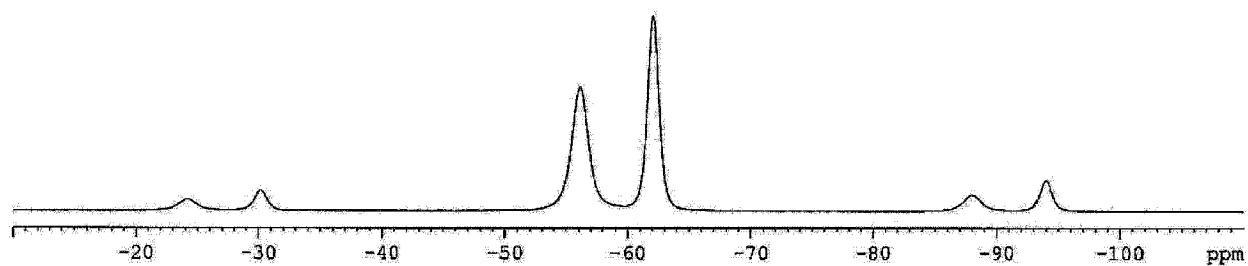


图 15

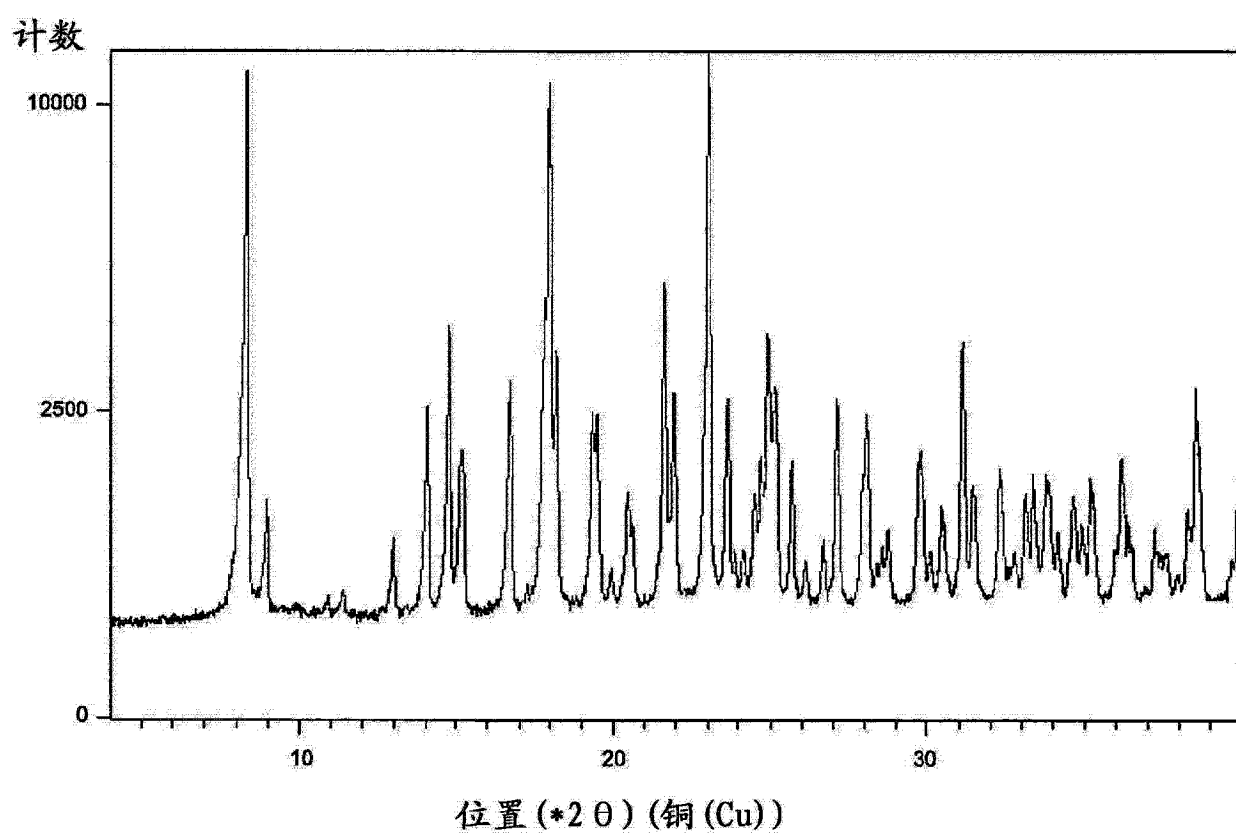


图 16

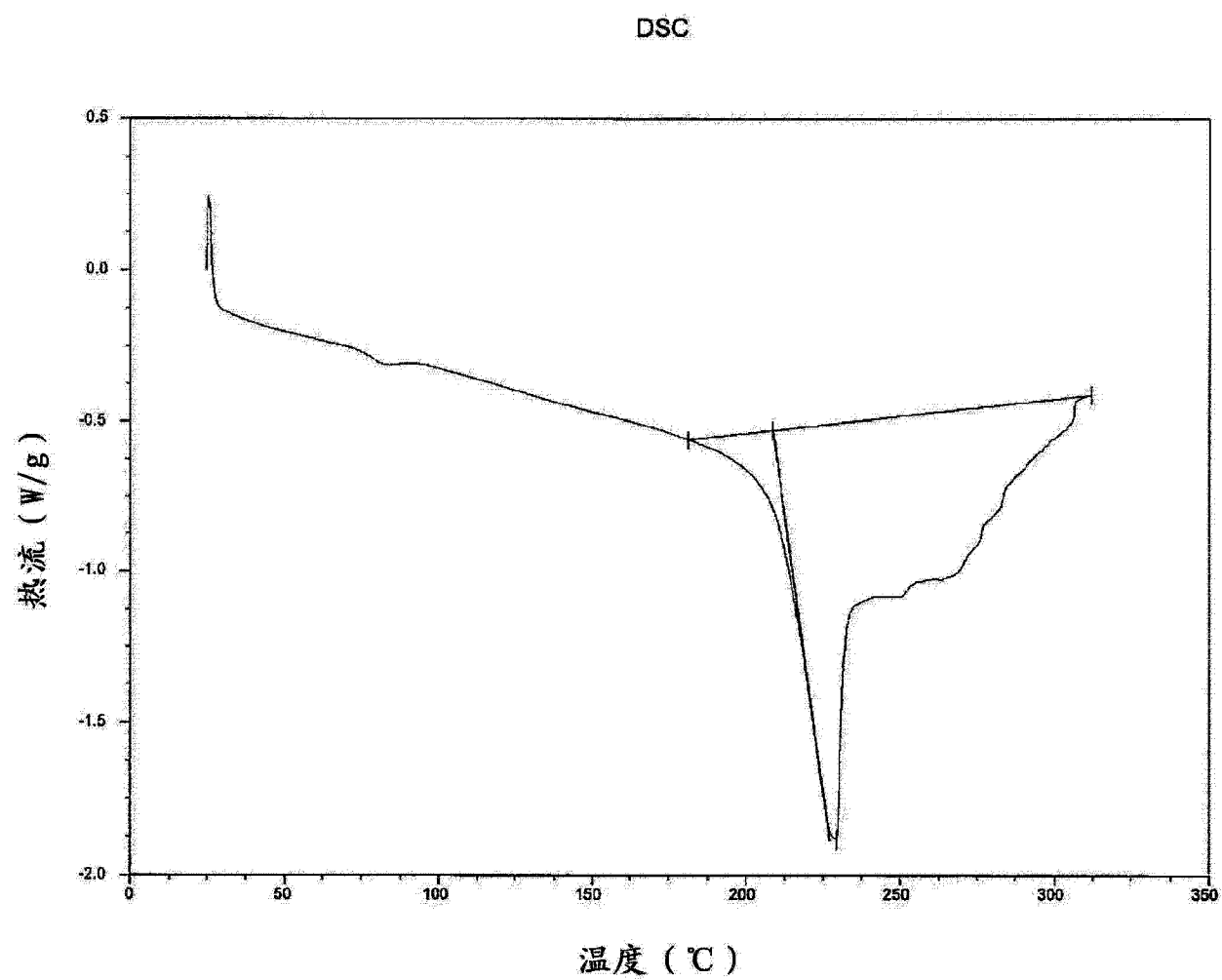


图 17

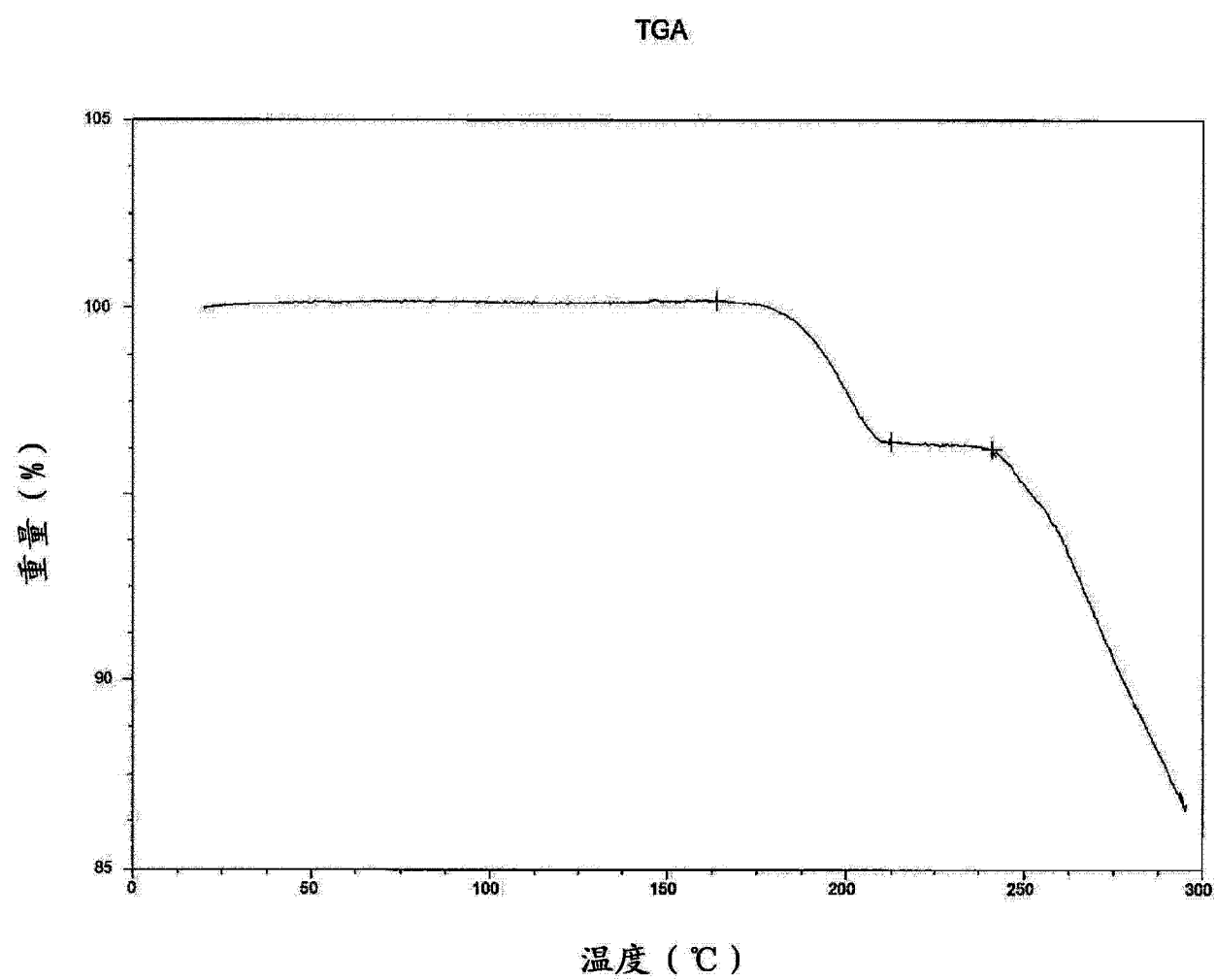


图 18

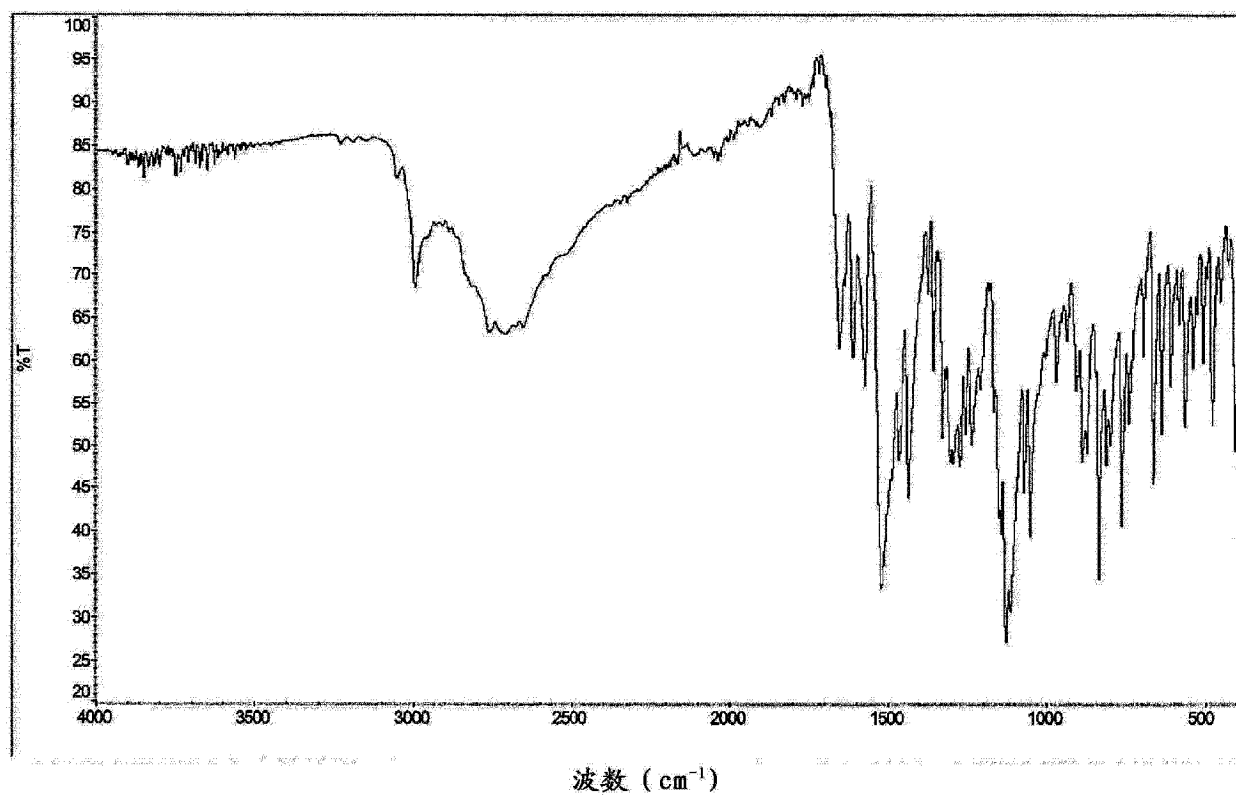


图 19

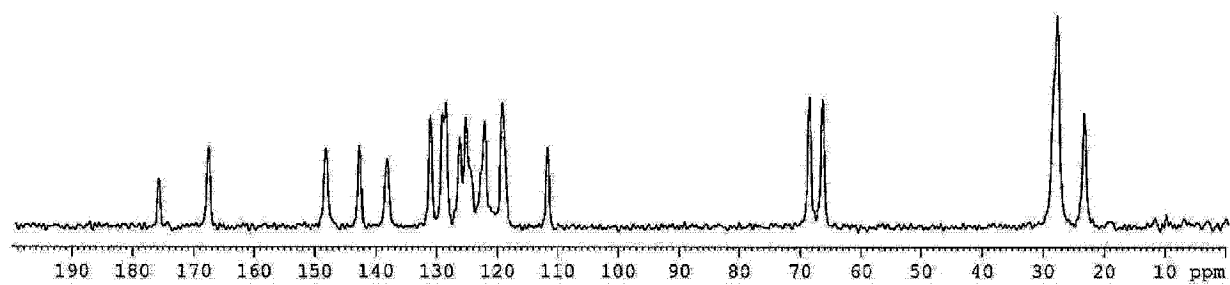


图 20

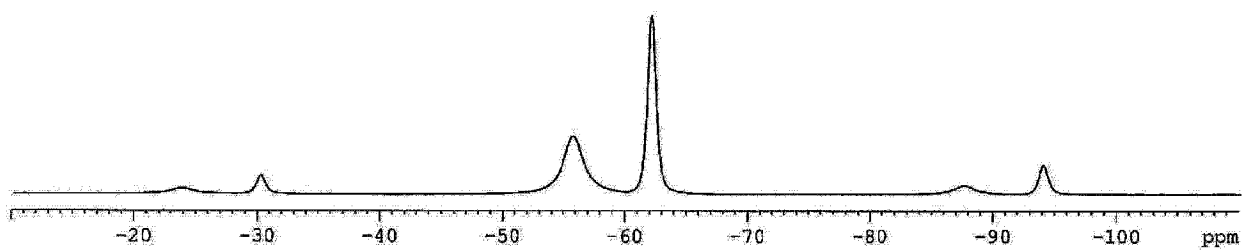


图 21