



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I507409 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：099136177

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07D487/08 (2006.01)

A61K31/407 (2006.01)

A61K31/47 (2006.01)

(30)優先權：2009/10/23 美國

61/254,614

(71)申請人：維泰克斯製藥公司 (美國) VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(US)

美國

(72)發明人：章 貝里 ZHANG, BEILI (US)；卡威克 馬利亞茲 KRAWIEC, MARIUSZ (PL)；
路西 布萊恩 LUISI, BRIAN (US)；麥迪克 亞歷斯 MEDEK, ALES (CZ)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2006/002421A2

審查人員：廖彥昱

申請專利範圍項數：37 項 圖式數：23 共 122 頁

(54)名稱

N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺之固體形式

SOLID FORMS OF N-(4-(7-AZABICYCLO[2.2.1]HEPTAN-7-YL)-2-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL)-4-OXO-5-(TRIFLUOROMETHYL)-1,4-DIHYDROQUINOLINE-3-CARBOXAMIDE

(57)摘要

本發明係關於實質性結晶及固態形式之 N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl、或該等形式之任一組合)、其醫藥組合物、及使用其進行治療之方法。

The present invention relates to substantially crystalline and solid state forms of N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluoromethyl)phenyl)-4-oxo-5-(trifluoromethyl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide (Form A-HCl, Form B, Form B-HCl, or any combination of these forms), pharmaceutical compositions thereof, and methods of treatment therewith.

(無元件符號說明)

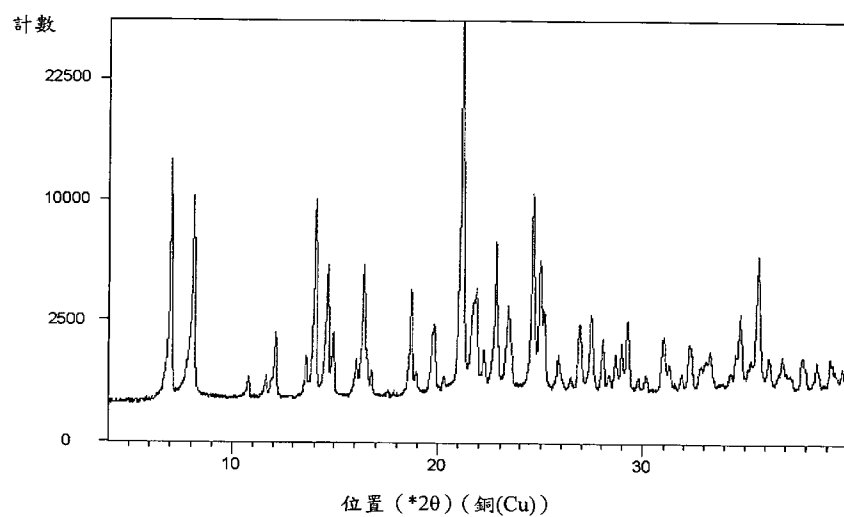
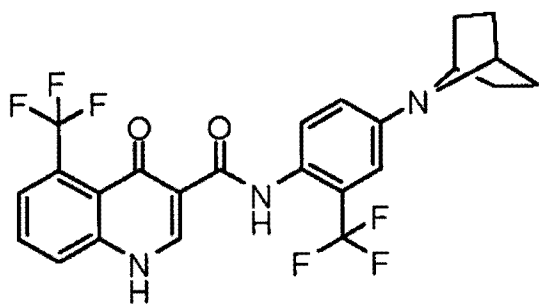


圖 1



(化合物I)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99136177

※ 申請日：99.10.22

※IPC 分類：C07D 487/08 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺之固體形式

SOLID FORMS OF N-(4-(7-AZABICYCLO[2.2.1]HEPTAN-7-YL)-2-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL)-4-OXO-5-(TRIFLUOROMETHYL)-1,4-DIHYDROQUINOLINE-3-CARBOXAMIDE

二、中文發明摘要：

本發明係關於實質性結晶及固態形式之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合)、其醫藥組合物、及使用其進行治療之方法。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to substantially crystalline and solid state forms of N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-yl)-2-(trifluoromethyl)phenyl)-4-oxo-5-(trifluoromethyl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide (Form A-HCl, Form B, Form B-HCl, or any combination of these forms), pharmaceutical compositions thereof, and methods of treatment therewith.

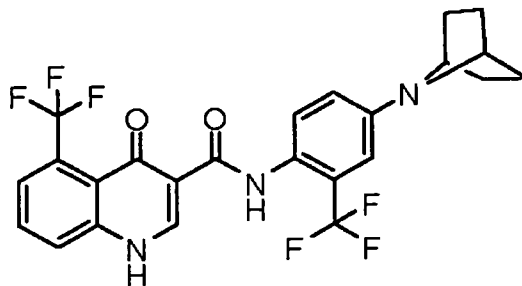
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(化合物I)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於固態形式(例如結晶形式)之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其係囊性纖維化跨膜傳導調節因子(「CFTR」)之調節劑。本發明亦係關於包含結晶形式之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺之醫藥組合物、及使用其之方法。

本申請案主張2009年10月23日提出申請之美國臨時申請案第61/254,614號之權利。

【先前技術】

ATP匣式轉運蛋白係調節各種藥理學藥劑、潛在毒性藥物、及異生物質、以及陰離子之運輸的膜轉運蛋白家族。其係針對其特異性活性結合並使用細胞三磷酸腺苷(ATP)之同源膜蛋白。人們發現，一些該等轉運蛋白可用作多藥抵抗蛋白(例如MDR1-P糖蛋白、或多藥抵抗蛋白MRP1)，從而使得惡性癌細胞可抵抗化學治療劑。迄今為止，已鑒定出48種該轉運蛋白並根據其序列一致性及功能分為7個家族。

ATP匣式轉運蛋白家族中通常與疾病有關之一個成員係cAMP/ATP-調介之陰離子通道CFTR。CFTR表現於各種細胞類型(包含吸收性及分泌性上皮細胞)中，其中CFTR調節陰離子跨膜流動、以及其他離子通道及蛋白質之活性。在

上皮細胞中，CFTR之正常功能對於維持全身各處(包含呼吸及消化組織)之電解質運輸甚為重要。CFTR係由約1480個胺基酸組成，該等胺基酸編碼由串聯重複之跨膜結構域(每個結構域含有六個跨膜螺旋)及一個核苷酸結合結構域構成之蛋白質。兩個跨膜結構域藉由較大之極性調節(R)-結構域連接，其具有多個可調節通道活性及細胞輸送之磷酸化位點。

已確定編碼CFTR之基因並對其實施測序(參見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)。此基因中之缺陷可引發CFTR突變，從而導致囊性纖維化(「CF」)，囊性纖維化係人類中最常見之致死遺傳病。在美國，每2,500個嬰兒中即有大約一個患有囊性纖維化。在一般美國群體內，高達一千萬人攜帶有缺陷型基因之單拷貝而無明顯疾病效應。與之相比，具有CF相關基因雙拷貝之個體經受CF之虛弱及致死效應，包含慢性肺疾病。

在患有囊性纖維化之患者中，呼吸上皮中內源表現之CFTR突變會導致頂膜陰離子分泌減少，從而導致離子及流體運輸失調。所致陰離子運輸之降低促使肺中黏液積累增強且伴隨有微生物感染，從而最終導致CF患者死亡。除呼吸疾病外，CF患者通常發生胃腸道問題及胰腺功能不全，若不予以治療，則可導致死亡。此外，大多數患有囊性纖維化之雄性不育且患有囊性纖維化之雌性之生育力降

低。與CF相關基因之雙拷貝的嚴重效應相反，具有CF相關基因單拷貝之個體顯示對霍亂及腹瀉所致脫水之抗性增強-或許此可闡釋CF基因在群體中之相對高頻率。

CF染色體中CFTR基因之序列分析已揭示多種致病突變 (Cutting, G. R.等人(1990) *Nature* 346:366-369; Dean, M.等人(1990) *Cell* 61:863:870; 及Kerem, B-S.等人(1989) *Science* 245:1073-1080; Kerem, B-S等人(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8447-8451)。迄今為止，在CF基因中已確定1000種以上致病突變 (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>)。最常見突變係CFTR胺基酸序列中508位之苯丙胺酸缺失，且通常稱作 $\Delta F508$ -CFTR。此突變發生在約70%之囊性纖維化病例中且與嚴重疾病有關。

$\Delta F508$ -CFTR中殘基508之缺失會阻止初生蛋白正確摺疊。此導致突變蛋白不能離開ER並輸送至質膜。因此，存於膜中之通道數遠低於在表現野生型CFTR之細胞中所觀察到者。除輸送受損外，突變亦導致通道門控缺陷。膜中通道數減少與門控缺陷共同導致跨越上皮之陰離子運輸降低，從而導致離子及流體運輸缺陷。(Quinton, P. M.(1990), *FASEB J.* 4: 2709-2727)。然而，研究已顯示，膜中減少數量之 $\Delta F508$ -CFTR仍具有一定功能，儘管其小於野生型CFTR。(Dolmans等人(1991), *Nature Lond.* 354: 526-528; Denning等人，參見上文; Pasyk及Foskett (1995), *J. Cell. Biochem.* 270: 12347-50)。除 $\Delta F508$ -CFTR、R117H-CFTR及G551D-CFTR外，可上調或下調CFTR中其他導致

輸送、合成及/或通道門控缺陷之致病突變以改變陰離子分泌並改變疾病進展及/或嚴重程度。

儘管CFTR運輸除陰離子外之多種分子，但顯而易見，此作用(運輸陰離子-氯離子及碳酸氫根離子)代表運輸離子及水跨越上皮之重要機制中的一個要素。其他要素包含上皮 Na^+ 通道ENaC、 $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ 共同轉運蛋白 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶幫浦、及負責將氯離子吸收至細胞中之基底外側膜 K^+ 通道。

該等要素經由其在細胞內之選擇性表現及定位一起發揮作用以達成跨越上皮之定向運輸。藉由協調存於頂膜上之ENaC及CFTR活性與在細胞基底外側表面上表現之 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶幫浦及 Cl^- 通道之活性來吸收氯離子。自腔側繼發性主動運輸氯離子會導致細胞內氯離子發生積累，該等氯離子然後可經由 Cl^- 離子通道以被動方式離開細胞，從而導致向量運輸。位於基底外側表面上之 $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ 共同轉運蛋白、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶幫浦及基底外側膜 K^+ 通道與腔側上之CFTR之排列可協調經由腔側上之CFTR分泌氯離子。由於水可能從不主動自身運輸，故其跨越上皮之流動取決於由鈉離子及氯離子之整體流動生成之微小跨上皮滲透梯度。

由CFTR突變引起之碳酸氫根離子運輸缺陷預計會引起某些分泌功能缺陷。參見(例如)「Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis,」Paul M. Quinton, Lancet 2008; 372: 415-417。

與調節CFTR功能障礙有關之CFTR突變亦在患有與CF具

有某些相同疾病表現但並不符合CF診斷標準之病狀的患者中顯而易見。該等病狀包含輸精管先天性雙側缺失、特發性慢性胰腺炎、慢性支氣管炎、及慢性鼻竇炎。將CFTR突變體以及修飾基因或環境因素視為風險因素之其他疾病包含原發性硬化性膽管炎、過敏性支氣管肺麴菌病、及哮喘。

吸煙、缺氧、及誘導缺氧信號傳導之環境因素亦顯示會破壞CFTR功能且可引起某些形式之呼吸疾病，例如慢性支氣管炎。可由CFTR功能缺陷引起但並不符合CF診斷標準之疾病可描述為CFTR相關性疾病。

除囊性纖維化外，調節CFTR活性可有利於並非直接由CFTR突變引起之其他疾病，例如分泌性疾病及由CFTR介導之其他蛋白摺疊疾病。CFTR調節許多細胞中氯離子及碳酸氫根離子之跨上皮流動以控制流體移動、蛋白溶解、黏液黏度、及酶活性。CFTR缺陷可阻斷許多器官(包含肝及胰)中之氣道或管道。增效劑係可增強細胞膜中所存在CFTR之門控活性之化合物。涉及黏液增稠、流體調節受損、黏液清除受損、或引起炎症及組織破壞之管道阻斷之任一疾病可為用於增效劑的候選者。

該等疾病包含但不限於慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、煙霧誘導性COPD、慢性支氣管炎、鼻竇炎、便秘、乾眼病、及薛格連氏症候群(Sjögren's Syndrome)、胃食道逆流疾病、膽結石、直腸脫垂、及炎症性腸病。COPD之特徵在於係進行性且並非完全可逆之氣流受限。氣流受限係

由黏液分泌過多、肺氣腫、及毛細支氣管炎引起。突變型或野生型CFTR活化劑可有效治療COPD中常見之黏液分泌過多及黏膜纖毛清除受損。特定而言，增加跨越CFTR之陰離子分泌可促進流體運輸至氣道表面液體上以使黏液水合並優化纖毛周流體黏度。此將增強黏膜纖毛清除並減少與COPD有關之症狀。此外，藉由改進氣道清除以預防感染及炎症發生，CFTR調節劑可預防或減緩肺氣腫特徵之氣道實質性破壞，並減少或逆轉引起氣道疾病中黏液分泌過多之黏液分泌細胞數量及尺寸增加。乾眼病之特徵在於水性淚液產量減少及異常淚膜脂質、蛋白質及黏蛋白特徵。乾眼病具有許多起因，一些起因包含年齡、Lasik眼外科手術、關節炎、藥劑、化學/熱損傷、過敏、及諸如囊性纖維化及薛格連氏症候群等疾病。經由CFTR增加陰離子分泌可增強眼睛周圍之角膜內皮細胞及分泌腺之流體運輸以增加角膜水合。此將有助於減輕與乾眼病有關之症狀。薛格連氏症候群係自身免疫性疾病，其中免疫系統侵蝕整個機體內產生水分之腺，包含眼睛、口腔、皮膚、呼吸組織、肝、陰道、及腸。症狀包含乾眼、口腔疾病、及陰道疾病、以及肺疾病。該疾病亦與類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、全身性硬化病、及多肌炎/皮肌炎有關。據信，蛋白輸送缺陷可引起疾病，其治療選擇有限。CFTR活性調節劑可使受疾病影響之各個器官水合且可有助於減輕相關症狀。患有囊性纖維化之個體具有腸梗阻復發及較高發病率之直腸脫垂、膽結石、胃食道逆流疾病、GI惡性

腫瘤、及炎性腸病，此表明CFTR功能可在預防該等疾病中發揮重要作用。

如上所述，據信， $\Delta F508$ -CFTR中殘基508之缺失會阻止初生蛋白正確摺疊，從而導致此突變蛋白不能離開ER並輸送至質膜。因此，質膜處所存在之成熟蛋白量不足且上皮組織內之氯離子運輸顯著降低。事實上，已顯示，此藉由ER機構對CFTR實施ER處理出現缺陷之細胞現象不僅係CF疾病之潛在基礎，且亦係眾多種其他孤立疾病及遺傳病之潛在基礎。ER機構功能失常之兩種可能方式係喪失與蛋白質中ER出口之偶合從而導致發生降解，或該等缺陷/錯誤摺疊蛋白在ER中積累[Aridor M, 等人，Nature Med., 5(7)，第 745- 751 頁 (1999)；Shastry, B.S., 等人，Neurochem. International, 43，第 1-7 頁 (2003)；Rutishauser, J., 等人，Swiss Med Wkly, 132，第 211-222 頁 (2002)；Morello, JP 等人，TIPS, 21，第 466-469 頁 (2000)；Bross P., 等人，Human Mut., 14，第 186-198 頁 (1999)]。與第一類ER功能失常有關之疾病係囊性纖維化(由如上所述之錯誤摺疊之 $\Delta F508$ -CFTR引起)、遺傳肺氣腫(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、非Piz變體引起)、遺傳性血色病、凝結-纖維蛋白溶解缺陷(例如蛋白質C缺陷)、I型遺傳性血管性水腫、脂質處理缺陷(例如家族性高膽固醇血症)、I型乳糜微粒血症、無 β 脂蛋白血症、溶酶體貯積病(例如I細胞疾病/假何勒氏病(pseudo-Hurler))、黏多糖累積病(由溶酶體處理酶引起)、桑德霍夫/泰-薩克斯病(Sandhof/Tay-Sachs)(由 β -己糖胺酶引起)、II

型克裏格勒-納賈爾病(Crigler-Najjar type II)(由UDP-葡萄糖苷酸基-唾液酸-轉移酶引起)、多重內分泌腺病/高胰島素血症、糖尿病(由胰島素受體引起)、拉倫侏儒症(Laron dwarfism)(由生長激素受體引起)、髓過氧化物酶缺陷、原發性甲狀旁腺功能減退(由前甲狀旁腺激素原引起)、黑素瘤(由絡胺酸酶引起)。與後一類ER功能失常有關之疾病係1型心包積液CDG、遺傳肺氣腫(由 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(PiZ變體)引起)、先天性甲狀腺機能亢進、成骨不全(由I、II、IV型前膠原引起)、遺傳性低纖維蛋白原血症(由纖維蛋白原引起)、ACT缺陷(由 $\alpha 1$ -抗胰凝乳蛋白酶引起)、尿崩症(DI)、神經生長板DI(由加壓素激素/V2-受體引起)、腎源性尿崩症(由水通道蛋白II引起)、夏-馬-圖三氏症候群(Charcot-Marie Tooth syndrome)(由周邊髓磷脂蛋白22引起)、佩-梅二氏病(Perlizaesus-Merzbacher disease)、神經變性疾病(例如阿爾茨海默病(Alzheimer's disease)(由 β APP及衰老蛋白引起)、帕金森病(Parkinson's disease))、肌萎縮側索硬化、進行性核上性麻痺、皮克病(Pick's disease)、諸多多麩胺醯胺神經性病(例如亨廷頓氏病(Huntington's)、I型脊髓小腦性共濟失調、脊髓延髓肌肉萎縮症、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症、及營養不良性肌強直)、以及海綿樣腦病(例如遺傳性克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)(由朊病毒蛋白處理缺陷引起))、法布裏病(Fabry disease)(由溶酶體 α -半乳糖苷酶A引起)、格斯特曼-施特勞斯納症候群(Straussler-Scheinker syndrome)(由Prp

處理缺陷引起)、不育、胰腺炎、胰腺功能不全、骨質疏鬆症、骨質減少、戈漢症候群(Gorham's Syndrome)、氯離子通道病變、先天性肌強直(Thomson及Becker型)、III型巴特氏症候群(Bartter's syndrome type III)、登特氏病(Dent's disease)、過度驚嚇症、癲癇症、過度驚嚇症、溶酶體貯存病、安琪曼氏症候群(Angelman syndrome)、原發性纖毛運動障礙(PCD)、具有左右轉位之PCD(亦稱作卡特金納氏症候群(Kartagener syndrome))、不具有左右轉位及纖毛不發育之PCD、及肝病。

其他與CFTR突變有關之疾病包含由輸精管先天性雙側缺失(CBAVD)引起之男性不育、輕度肺疾病、特發性胰腺炎、及過敏性支氣管肺麴菌病(ABPA)。參見「CFTR-opathies: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations,」Peader G. Noone及Michael R. Knowles, *Respir. Res.* 2001, 2: 328-332(以引用方式併入本文中)。

除上調CFTR活性外，藉由CFTR調節劑來減小陰離子分泌可有利於治療分泌性腹瀉，其中上皮水運輸因促分泌活化氯離子運輸而顯著增加。該機制涉及增加cAMP及刺激CFTR。

儘管腹瀉具有諸多起因，但由過量氯離子運輸引起之腹瀉病之主要後果係眾所周知，且包含脫水、酸中毒、生長受損及死亡。急性及慢性腹瀉代表了世界上許多地區之主要醫學問題。腹瀉係5歲以下兒童中營養不良之重要因素

及死亡之主要原因(每年死亡5,000,000人)。

分泌性腹瀉亦係患有獲得性免疫缺陷症候群(AIDS)及慢性炎症腸病(IBD)之患者之危險病狀。每年有1600萬自工業化國家至發展中國家旅行者會發生腹瀉，其中腹瀉病例之嚴重程度及數量端視所旅行之國家及地區而有所變化。

因此，業內需要人類CFTR之野生型及突變體形式的有效及選擇性CFTR增效劑。該等突變體CFTR形式包含但不限於 $\Delta F508del$ 、G551D、R117H、2789+5G->A。

業內亦需要CFTR活性調節劑、及其組合物，該等物質可用於調節哺乳動物之細胞膜中之CFTR活性。

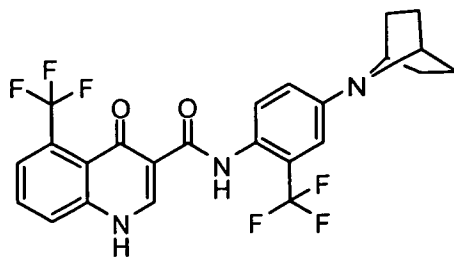
業內需要使用該等CFTR活性調節劑來治療由CFTR突變引起之疾病之方法。

業內需要調節哺乳動物之離體細胞膜中之CFTR活性的方法。

此外，業內需要可容易地用於適於用作治療劑之醫藥組合物中之該化合物的穩定固體形式。

【發明內容】

本發明係關於固體形式之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(在下文中係「化合物I」)，其具有下列結構：



化合物I.

化合物I及其醫藥上可接受之組合物可用於治療諸多疾病、病症、或病狀或減輕該等疾病、病症、或病狀之嚴重程度，該等疾病、病症、或病狀包含但不限於囊性纖維化、哮喘、煙霧誘導性COPD、慢性支氣管炎、鼻竇炎、便秘、胰腺炎、胰腺功能不全、由輸精管先天性雙側缺失(CBAVD)引起之男性不育、輕度肺疾病、特發性胰腺炎、過敏性支氣管肺麴菌病(ABPA)、肝病、遺傳肺氣腫、遺傳血色素沉著症、凝結-纖維蛋白溶解缺陷(例如蛋白質C缺陷)、1型遺傳性血管性水腫、脂質處理缺陷(例如家族性高膽固醇血症)、1型乳糜微粒血症、無 β 脂蛋白血症、溶酶體貯積病(例如I細胞疾病/假何勒氏病)、黏多糖累積病、桑德霍夫/泰-薩克斯病、II型克裏格勒-納賈爾病、多重內分泌腺病/高胰島素血症、糖尿病、拉倫侏儒症、髓過氧化物酶缺陷、原發性甲狀旁腺功能減退、黑素瘤、1型心包積液CDG、先天性甲狀腺機能亢進、成骨不全、遺傳性低纖維蛋白原血症、ACT缺陷、尿崩症(DI)、神經生長板DI、腎源性尿崩症、夏-馬-圖三氏症候群、佩-梅二氏病、神經變性疾病(例如阿爾茨海默病、帕金森病)、肌萎縮側索硬化、進行性核上性麻痺、皮克病、諸多多麩胺醯胺神經性病(例如亨廷頓氏病、I型脊髓小腦性共濟失調、脊髓延髓肌肉萎縮症、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症、及營養不良性肌強直)、以及海綿樣腦病(例如遺傳性克雅氏病(由朊病毒蛋白處理缺陷引起))、法布裏病、格斯特曼-施特勞斯納症候群、COPD、乾眼病、或薛格連氏病、骨質疏鬆

症、骨質減少、骨癒合及骨生長(包含骨修復、骨再生、骨吸收減少及骨沈積增加)、戈漢症候群、氯離子通道病變(例如先天性肌強直(Thomson及Becker型))、III型巴特氏症候群、登特氏病、過度驚嚇症、癲癇症、過度驚嚇症、溶酶體貯存病、安琪曼氏症候群、及原發性纖毛運動障礙(PCD)(關於纖毛結構及/或功能之遺傳病症的術語，包含具有左右轉位之PCD(亦稱作卡特金納氏症候群)、不具有左右轉位及纖毛不發育之PCD)。

在一態樣中，化合物I呈稱作形式B、形式A-HCl、或形式B-HCl之實質性結晶形式，如本文所闡述及表徵。

在另一態樣中，化合物I呈稱作形式A-HCl或形式B-HCl之鹽酸鹽形式，如本文所闡述及表徵。

在另一態樣中，化合物I呈稱作形式B-HCl之鹽酸鹽形式，如本文所闡述及表徵。

可使用本文所述之方法來製備本發明組合物，其包括形式B、形式A-HCl、形式B-HCl、或該等形式之任一組合。

【實施方式】

定義

除非另有說明，否則本文所用之下列定義應適用。

本文所用之術語「ABC-轉運蛋白」意指包括至少一個結合結構域之ABC-轉運蛋白或其片段，其中該蛋白質或其片段存在於活體內或活體外。本文所用之術語「結合結構域」意指ABC-轉運蛋白上可結合調節劑之結構域。參見(例如)Hwang, T. C.等人，J. Gen. Physiol. (1998):

111(3), 477-90。

本文所用之術語「CFTR」意指囊性纖維化跨膜傳導調節因子或其具有調節因子活性之突變，包含但不限於 $\Delta F508$ CFTR、R117H CFTR、及G551D CFTR(例如，關於CFTR突變可參見<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>)。

本文所用之術語「調節」意指增加或降低可量測量。

本文所用之術語「正常CFTR」或「正常CFTR功能」意指不具有由諸如以下環境因素引起之任何損傷的野生型類CFTR：吸煙、污染、或產生肺炎之任何因素。

本文所用之術語「減小之CFTR」或「減小之CFTR功能」意指小於正常CFTR或小於正常CFTR功能。術語「結晶」係指結構單元以固定幾何圖案或晶格排列從而使結晶固體具有穩固長程有序之化合物或組合物。組成晶體結構之結構單元可為原子、分子、或離子。結晶固體顯示確定之熔點。

術語「實質性結晶」係指固體材料主要以具有穩固長程有序之固定幾何圖案或晶格進行排列。舉例而言，實質性結晶材料具有大於約85%之結晶度(例如，大於約90%之結晶度、大於約95%之結晶度、或大於約99%之結晶度)。亦應注意，術語'實質性結晶'包含前文段落中所定義之描述語'結晶'。

出於本發明目的，根據元素週期表，CAS版，Handbook of Chemistry and Physics，第75版來鑒定化學元素。此外，有機化學之一般原則闡述於「Organic Chemistry」，

Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999、及「March's Advanced Organic Chemistry」，第5版，Smith, M. B. 及 March, J.編輯，John Wiley & Sons, New York: 2001中，其全部內容皆以引用方式併入本文中。

除非另有所述，否則本發明化合物之所有互變異構體形式皆屬於本發明範圍內。

此外，除非另有說明，否則本文所繪示之結構亦意欲包含不同之處僅在於存在一或多個富含同位素原子之化合物。舉例而言，具有本發明結構但氫由氘或氚代替、或碳由 ^{13}C -或 ^{14}C 富集碳代替之化合物均屬於本發明範圍內。該等化合物可(例如)在生物分析中用作分析工具或探針。該等化合物、尤其含有氘原子之化合物可呈現改良之代謝性質。

形式 A-HCl

在一態樣中，本發明闡述描述為形式 A-HCl 之 N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺形式。

在一些實施例中，形式 A-HCl 之特徵在於 X-射線粉末繞射圖案中以度量測之下列峰中之一或多者：約 6.9 至約 7.3 度(例如，約 7.1 度)之峰；約 8.0 至約 8.4 度(例如，約 8.2 度)之峰；約 13.9 至約 14.2 度(例如，約 14.1 度)之峰；及約 21.0 至約 21.4 度(例如，約 21.2 度)之峰；該 X-射線粉末繞射係使用 Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式 A-HCl 之特徵在於 X-射線粉末繞

射圖案中以度量測之下列峰中之一或多者：約6.9至約7.3度(例如，約7.1度)之峰；約8.0至約8.4度(例如，約8.2度)之峰；約11.9至約12.3度(例如，約12.1度)之峰；約13.5至約13.9度(例如，約13.7度)之峰；約16.2至約16.6度(例如，約16.4度)之峰；約18.5至約18.9度(例如，約18.7度)之峰；及約21.0至約21.4度(例如，約21.2度)之峰，該X-射線粉末繞射係使用Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式A-HCl之特徵在於X-射線粉末繞射圖案中以度量測之下列峰中之一或多者：約6.9至約7.2度(例如，約7.1度)之峰；約8.0至約8.4度(例如，約8.2度)之峰；約13.9至約14.3度(例如，約14.1度)之峰；約14.5至約14.9度(例如，約14.7度)之峰；約16.2至約16.6度(例如，約16.4度)之峰；約18.5至約18.9度(例如，約18.7度)之峰；約21.0至約22.2度之三個峰(例如，約21.2度、約21.7度、及約21.9度之峰)；約22.6至約23.0度(例如，約22.8度)之峰；約24至約25度(例如，約24.6度及約25.0度)之2個峰；及約35.3至約36.0度(例如，約35.6度)之2個峰；該X-射線粉末繞射係使用Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式A-HCl之特徵在於圖1中所提供之X-射線粉末繞射圖案。

在一些實施例中，形式A-HCl之特徵在於固態 ^{13}C NMR光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約163.5至約163.9 ppm(例如，約163.7 ppm)之峰、約137.0至約137.4 ppm(例如，約137.2 ppm)之峰、及約121.3至約

121.7 ppm(例如，約121.5 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式A-HCl之特徵在於固態 ^{13}C NMR光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約175.5至約175.9 ppm(例如，約175.7 ppm)之峰、約163.5至約163.9 ppm(例如，約163.7 ppm)之峰、約142.4至約142.8 ppm(例如，約142.6 ppm)之峰、約140.6至約141.0 ppm(例如，約140.8 ppm)之峰、約137.0至約137.4 ppm(例如，約137.2 ppm)之峰、約131.3至約131.7 ppm(例如，約131.5 ppm)之峰、及約121.3至約121.7 ppm(例如，約121.5 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式A-HCl之特徵在於圖5中所示之固態 ^{13}C NMR光譜。

在一些實施例中，形式A-HCl之特徵在於固態 ^{19}F NMR光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約-56.8至約-57.2 ppm(例如，約-57.0 ppm)之峰、及約-60.3至約-60.7 ppm(例如，約-60.5 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式A-HCl之特徵在於圖6中所示之固態 ^{19}F NMR光譜。

在其他實施例中，形式A-HCl之特徵在於圖4中所提供之FTIR光譜。

形式B

在一態樣中，本發明闡述描述為形式B之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺形式。

在一些實施例中，形式B之特徵在於X-射線粉末繞射圖案中以度量測之下列峰中之一或多者：約6.5至約6.9度(例如，約6.7度)之峰；約9.8至約10.2度(例如，約10.0度)之峰；約11.0至約11.4度(例如，約11.2度)之峰；約13.2至約13.6度(例如，約13.4度)之峰；及約23.8至約24.2度(例如，約24.2度)之峰，該X-射線粉末繞射係使用Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式B之特徵在於一或多個下列峰：約6.5至約6.9度(例如，約6.7度)之峰、約9.2至約9.6度(例如，約9.4)之峰、約11.0至約11.4度(例如，約11.2度)之峰、約13.2至約13.6度(例如，約13.4度)之峰、約15.0至約15.4度(例如，約15.2度)之峰、約17.0至約17.4度(例如，約17.2度)之峰、約17.6至約18.0度(例如，約17.8度)之峰、約17.9至約18.3度(例如，約18.1度)之峰、約19.0至約19.4度(例如，約19.2度)之峰、約19.9至約20.3度(例如，約20.1度)之峰、約21.0至約21.5度(例如，約21.2度)之峰、約21.8至22.2度(例如，約22.0度)之峰、約23.8至約24.2度(例如，約24.0度)之峰、約26.0至約26.4度(例如，約26.2度)之峰、約27.0至約27.4度(例如，約27.2度)之峰、約27.5至約27.9度(例如，約27.7度)之峰、及約28.7至約29.1度(例如，約28.9度)之峰；該X-射線粉末繞射係使用Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式B之特徵在於圖7中所提供之X-射線粉末繞射圖案。

在一些實施例中，形式B之特徵在於固態 ^{13}C NMR光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約165.1至約165.5 ppm(例如，約165.3 ppm)之峰、約145.7至約146.1 ppm(約145.9 ppm)之峰、約132.7至約133.1 ppm(例如，約132.9 ppm)之峰、及約113.2至約113.6 ppm(例如，約113.4 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式B之特徵在於固態 ^{13}C NMR光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約175.1至約175.5 ppm(例如，約175.3 ppm)之峰、約165.1至約165.5 ppm(例如，約165.3 ppm)之峰、約141.2至約141.6 ppm(例如，約141.4 ppm)之峰、約145.7至約146.1 ppm(例如，約145.9 ppm)之峰、約132.7至約133.1 ppm(例如，約132.9 ppm)之峰、約123.3至約123.7 ppm(例如，約123.5 ppm)之峰、約126.6至約127.0 ppm(例如，約126.8 ppm)之峰、約113.2至約113.6 ppm(例如，約113.4 ppm)之峰、約117.2至約117.6 ppm(例如，約117.4 ppm)之峰、約58.1至約58.5 ppm(例如，約58.3 ppm)之峰、約26.7至約27.1 ppm(例如，約26.9 ppm)之峰及約29.0至約29.4 ppm(例如，約29.2 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式B之特徵在於圖11中所示之固態 ^{13}C NMR光譜。

在一些實施例中，形式B之特徵在於固態 ^{19}F NMR光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約-55.9至約-56.3 ppm(例如，約-56.1 ppm)之峰、及約-61.9至約-62.3

ppm(例如，約-62.1 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式B之特徵在於圖12中所示之固態 ^{19}F NMR光譜。

在另一實施例中，本發明闡述N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氮喹啉-3-甲醯胺之形式B之晶體，其具有單斜晶系、P21/c空間群、及下列晶胞尺寸： $a=13.5429(4)$ Å， $b=13.4557(4)$ Å， $c=12.0592(4)$ Å， $\alpha=90^\circ$ ， $\beta=101.193^\circ$ ，且 $\gamma=90^\circ$ 。

在一實施例中，本發明提供N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氮喹啉-3-甲醯胺之形式B之晶體，其具有單斜晶系、P21/c空間群、及下列晶胞尺寸： $a=13.5429(4)$ Å， $b=13.4557(4)$ Å， $c=12.0592(4)$ Å。

在其他實施例中，形式B之特徵在於圖10中所提供之FTIR光譜。

形式B-HCl

在一態樣中，本發明闡述描述為形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氮喹啉-3-甲醯胺形式。

在一些實施例中，形式B-HCl之特徵在於X-射線粉末繞射圖案中以度量測之下列峰中之一或多者：約8.1至約8.5度(例如，約8.3度)之峰；約8.8至約9.2度(例如，約9.0度)之峰；約12.8至約13.2度(例如，約13.0度)之峰；約17.8至約18.2度(例如，約18.0度)之峰；及約22.8至約23.2度(例

如，約23.0度)之峰；該X-射線粉末繞射係使用Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式B-HCl之特徵在於X-射線粉末繞射圖案中以度量測之下列峰中之一或多者：約8.1至約8.5度(例如，約8.3度)之峰；約14.6至約15.1度(例如，約14.8度)之峰；約16.5至約16.9度(例如，約16.7度)之峰；約17.6至約18.4度(例如，約17.8度、約18.0度、及約18.2度)之3個峰；約21.4至約22.1度(例如，約21.7度及約22.0度)之2個峰；約22.8至約23.8度之2個峰(例如，約23.0度及約23.6度之峰)；約24.7至約25.4度(例如，約24.9度及約25.2度)之2個峰；約26.9至約27.3度(例如，約27.1度)之峰；約30.9至約31.3度(例如，約31.1度)之峰；及約38.2至約38.7度(例如，約38.5度)之峰；該X-射線粉末繞射係使用Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式B-HCl之特徵在於X-射線粉末繞射圖案中以度量測之下列峰中之一或多者：約8.1至約8.5度(例如，約8.3度)之峰；約13.8至約14.3度(例如，約14.1度)之峰；約14.6至約15.5度(例如，約14.8度及約15.2度)之2個峰；約16.5至約16.9度(例如，約16.7度)之峰；約17.6至約18.4度(例如，約17.8度、約18.0度、及約18.2度)之3個峰；約19.1至約19.7度(例如，約19.3度及約19.5度)之2個峰；約21.4至約22.1度(例如，約21.7度及約22.0度)之2個峰；約22.8至約23.8度之2個峰(例如，約23.0度及約23.6度之峰)；約24.5至約25.9度(例如，約24.7度、約24.9

度、約 25.2 度、及約 25.7 度)之 4 個峰；約 26.9 至約 27.3 度(例如，約 27.1 度)之峰；約 27.7 至約 28.3 度(例如，約 27.9 度及約 28.1 度)之 2 個峰；約 29.5 至約 30.0 度(例如，約 29.7 度及約 29.8 度)之 2 個峰；約 29.5 至約 30.0 度(例如，約 29.7 度及約 29.8 度)之 2 個峰；約 30.9 至約 31.3 度(例如，約 31.1 度)之峰；約 32.1 至約 32.5 度(例如，約 32.3 度)之峰；約 33.2 至約 34.1 度(例如，約 33.4 度、約 33.8 度、及約 33.9 度)之 3 個峰；約 35.0 至約 35.4 度(例如，約 35.2 度)之峰；約 36.0 至約 36.4 度(例如，約 36.2 度)之峰；及約 38.3 至約 40.1 度(例如，約 38.5 度、約 38.6 度、及約 39.9 度)之 3 個峰；該 X-射線粉末繞射係使用 Cu K α 輻射獲得。

在一些實施例中，形式 B-HCl 之特徵在於圖 13 中所提供之 X-射線粉末繞射圖案。

在一些實施例中，形式 B-HCl 之特徵在於固態 ^{13}C NMR 光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約 168.0 至約 168.4 ppm(例如，約 168.2 ppm)之峰、約 148.5 至約 148.9 ppm(例如，約 148.7 ppm)之峰、約 138.6 至約 139.0 ppm(例如，約 138.8 ppm)之峰、約 119.6 至約 120.0 ppm(例如，約 119.8 ppm)之峰、及約 23.7 至約 24.1 ppm(例如，約 23.9 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式 B-HCl 之特徵在於固態 ^{13}C NMR 光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約 176.1 至約 176.5 ppm(例如，約 176.3 ppm)之峰、約 168.0 至約 168.4 ppm(例如，約 168.2 ppm)之峰、約 148.5 至約 148.9

ppm(例如，約148.7 ppm)之峰、約143.0至約143.4 ppm(例如，約143.2 ppm)之峰、約138.6至約139.0 ppm(例如，約138.8 ppm)之峰、約119至約134 ppm(例如，約131.6 ppm、約129.6 ppm、約129.1 ppm、約126.7 ppm、約125.8 ppm、約122.7 ppm、及約119.8 ppm)之7個峰、約112.1至約112.5 ppm(例如，約112.3 ppm)之峰、約68.8至約69.2 ppm(例如，約69.0 ppm)之峰、約66.7至約67.1 ppm(例如，約66.9 ppm)之峰、約28.1至約28.5 ppm(例如，約28.3 ppm)之峰及約23.7至約24.1 ppm(例如，約23.9 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式B-HCl之特徵在於圖17中所示之固態¹³C NMR光譜。

在一些實施例中，形式B-HCl之特徵在於固態¹⁹F NMR光譜中以百萬份數(ppm)量測之下列峰中之一或多者：約-55.4至約-55.8 ppm(例如，約-55.6 ppm)之峰、及約-61.8至約-62.2 ppm(例如，約-62.0 ppm)之峰。

在一些實施例中，形式B-HCl之特徵在於圖18中所示之固態¹⁹F NMR光譜。

在其他實施例中，形式B-HCl之特徵在於圖16中所提供之FTIR光譜。

在一態樣中，本發明闡述醫藥組合物，其包括形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合、及醫藥上可接受之佐劑或載劑。

在一態樣中，本發明闡述治療人類中CFTR介導之疾病

之方法，其包括向該人類投與有效量之形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合。

在一些實施例中，該方法包括投與額外治療劑。

在一些實施例中，該疾病選自囊性纖維化、胰腺炎、竇炎、遺傳肺氣腫、遺傳血色素沉著症、凝結-纖維蛋白溶解缺陷(例如蛋白質C缺陷)、I型遺傳性血管性水腫、脂質處理缺陷(例如家族性高膽固醇血症)、I型乳糜微粒血症、無 β 脂蛋白血症、溶酶體貯積病(例如I細胞疾病/假何勒氏病)、黏多糖累積病、桑德霍夫/泰-薩克斯病、II型克裏格勒-納賈爾病、多重內分泌腺病/高胰島素血症、糖尿病、拉倫侏儒症、髓過氧化物酶缺陷、原發性甲狀旁腺功能減退、黑素瘤、I型心包積液CDG、遺傳肺氣腫、先天性甲狀腺機能亢進、成骨不全、遺傳性低纖維蛋白原血症、ACT缺陷、尿崩症(DI)、神經生長板DI、腎源性尿崩症、夏-馬-圖三氏症候群、佩-梅二氏病、神經變性疾病(例如阿爾茨海默病、帕金森病)、肌萎縮側索硬化、進行性核上性麻痺、皮克病、若干多羥胺醯胺神經性病(例如亨廷頓氏病、I型脊髓小腦性共濟失調、脊髓延髓肌肉萎縮症、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症、及營養不良性肌強直)、以及海綿樣腦病(例如遺傳性克雅氏病)、法布裏病、格斯特曼-施特勞斯納症候群、COPD、乾眼病、胰腺功能不全、骨質疏鬆症、骨質減少、戈漢症候群、氯離子通道病變、先天性肌強直(Thomson及Becker型)、III型巴特氏症候群、登特氏病、過度驚嚇症、癲癇症、過度驚嚇症、溶

酶體貯存病、安琪曼氏症候群、原發性纖毛運動障礙(PCD)、具有左右轉位之PCD(亦稱作卡特金納氏症候群)、不具有左右轉位及纖毛不發育之PCD、或薛格連氏病。

在一實施例中，本發明提供治療人類之囊性纖維化之方法，其包括向該人類投與有效量之形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合。

在一態樣中，本發明闡述醫藥包或套組，其包括形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合、及醫藥上可接受之載劑。

本發明之其他態樣

用途、調配及投與

醫藥上可接受之組合物

在本發明一態樣中，提供醫藥上可接受之組合物，其中該等組合物包括如本文所述之形式A-HCl、形式B、或形式B-HCl，且視需要包括醫藥上可接受之載劑、佐劑或媒劑。在某些實施例中，該等組合物視需要進一步包括一或多種額外治療劑。

如上所述，本發明醫藥上可接受之組合物另外包括醫藥上可接受之載劑、佐劑或媒劑，其在本文中使用時包含適於所期望特定劑型之任一及所有溶劑、稀釋劑、或其他液體媒劑、分散或懸浮助劑、表面活性劑、等滲劑、增稠或乳化劑、防腐劑、固體黏合劑、潤滑劑及諸如此類。

Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，E. W. Martin (Mack Publishing公司，Easton, Pa., 1980)揭示用於調配醫

藥上可接受之組合物之各種載劑及製備其之已知技術。任一習用載劑介質之使用皆涵蓋於本發明範圍內，但若該習用載劑介質與本發明化合物不相容則屬例外，例如產生任何不期望之生物效應或以有害方式與醫藥上可接受之組合物中的任一其他組份相互作用。一些可用作醫藥上可接受之載劑的材料之實例包含但不限於離子交換劑、氧化鋁、硬脂酸鋁、卵磷脂、血清蛋白(例如，人類血清白蛋白)、緩衝物質(例如，磷酸鹽、甘胺酸、山梨酸或山梨酸鉀)、飽和植物脂肪酸之部分甘油酯混合物、水、鹽或電解質(例如硫酸魚精蛋白、磷酸氫二鈉、磷酸氫鉀、氯化鈉、鋅鹽、膠體二氧化矽、三矽酸鎂)、聚乙烯吡咯啶酮、聚丙烯酸酯、蠟、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、羊毛脂、糖(例如，乳糖、葡萄糖及蔗糖)；澱粉，例如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，例如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及乙酸纖維素；粉末狀磺基膠；麥芽；明膠；滑石粉；賦形劑，例如可可油及栓劑蠟；油，例如花生油、棉籽油；紅花油；芝麻油；橄欖油；玉米油及大豆油；二醇；例如丙二醇或聚乙二醇；酯，例如油酸乙酯及月桂酸乙酯；瓊脂；緩衝劑，例如氫氧化鎂及氫氧化鋁；海藻酸；無致熱源之水；等滲鹽水；林格氏溶液(Ringer's solution)；乙醇、及磷酸鹽緩衝溶液、以及其他無毒相容潤滑劑(例如，月桂基硫酸鈉及硬脂酸鎂)，且根據配方設計師之判斷，該組合物中亦可存在著色劑、釋放劑、塗覆劑、甜味劑、矯味劑及芳香劑、防腐劑及抗氧化劑。

化合物及醫藥上可接受之組合物之用途

在又一態樣中，本發明提供治療涉及CFTR突變之病狀、疾病或病症或減輕其嚴重程度之方法。在某些實施例中，本發明提供治療與CFTR活性缺陷有關之病狀、疾病、或病症之方法，該方法包括向有需要之受試者(較佳係哺乳動物)投與包括如本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合的組合物。

在某些實施例中，本發明提供治療與CFTR功能減小有關之疾病之方法，該CFTR功能減小係由編碼CFTR之基因突變或環境因素(例如，煙霧)所致。該等疾病包含囊性纖維化、哮喘、煙霧誘導性COPD、慢性支氣管炎、鼻竇炎、便秘、胰腺炎、胰腺功能不全、由輸精管先天性雙側缺失(CBAVD)引起之男性不育、輕度肺疾病、特發性胰腺炎、過敏性支氣管肺麴菌病(ABPA)、肝病、遺傳肺氣腫、遺傳血色素沉著症、凝結-纖維蛋白溶解缺陷(例如蛋白質C缺陷)、1型遺傳性血管性水腫、脂質處理缺陷(例如家族性高膽固醇血症)、1型乳糜微粒血症、無 β 脂蛋白血症、溶酶體貯積病(例如I細胞疾病/假何勒氏病)、黏多糖累積病、桑德霍夫/泰-薩克斯病、II型克裏格勒-納賈爾病、多重內分泌腺病/高胰島素血症、糖尿病、拉倫侏儒症、髓過氧化物酶缺陷、原發性甲狀旁腺功能減退、黑素瘤、1型心包積液CDG、先天性甲狀腺機能亢進、成骨不全、遺傳性低纖維蛋白原血症、ACT缺陷、尿崩症(DI)、神經生長板DI、腎源性尿崩症、夏-馬-圖三氏症候群、佩-梅二氏

病、神經變性疾病(例如阿爾茨海默病、帕金森病)、肌萎縮側索硬化、進行性核上性麻痺、皮克病、諸多多麩胺醯胺神經性病(例如亨廷頓氏病、I型脊髓小腦性共濟失調、脊髓延髓肌肉萎縮症、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症、及營養不良性肌強直)、以及海綿樣腦病(例如遺傳性克雅氏病(由朊病毒蛋白處理缺陷引起))、法布裏病、格斯特曼-施特勞斯納症候群、COPD、乾眼病、或薛格連氏病、骨質疏鬆症、骨質減少、骨癒合及骨生長(包含骨修復、骨再生、骨吸收減少及骨沈積增加)、戈漢症候群、氯離子通道病變(例如先天性肌強直(Thomson及Becker型))、III型巴特氏症候群、登特氏病、過度驚嚇症、癲癇症、過度驚嚇症、溶酶體貯存病、安琪曼氏症候群、及原發性纖毛運動障礙(PCD)(關於纖毛結構及/或功能之遺傳病症的術語，包含具有左右轉位之PCD(亦稱作卡特金納氏症候群)、不具有左右轉位及纖毛不發育之PCD)。

在一些實施例中，該方法包含治療患者之囊性纖維化或減輕其嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在某些實施例中，患者具有人類CFTR之突變體形式。在其他實施例中，患者具有人類CFTR之下列突變中之一或多個： $\Delta F508$ 、R117H、及G551D。在一實施例中，該方法包含治療具有人類CFTR之 $\Delta F508$ 突變之患者中之囊性纖維化或減輕其嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在一實施例中，該方法包含治療具有人類CFTR之G551D突變之患者中之囊性纖

維化或減輕其嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在一實施例中，該方法包含治療在至少一個等位基因上具有人類CFTR之 $\Delta F508$ 突變之患者中之囊性纖維化或減輕其嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在一實施例中，該方法包含治療在兩個等位基因上皆具有人類CFTR之 $\Delta F508$ 突變之患者中之囊性纖維化或減輕其嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在一實施例中，該方法包含治療在至少一個等位基因上具有人類CFTR之G551D突變之患者中之囊性纖維化或減輕其嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在一實施例中，該方法包含治療在兩個等位基因上皆具有人類CFTR之G551D突變之患者中之囊性纖維化或減輕其嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。

在一些實施例中，該方法包含減輕患者之囊性纖維化嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在某些實施例中，患者具有人類CFTR之突變體形式。在其他實施例中，患者具有人類CFTR之下列突變中之一或多個： $\Delta F508$ 、R117H、及G551D。在一實施例中，該方法包含減輕具有人類CFTR之 $\Delta F508$ 突變之患者中囊性纖維化之嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。在一實施例中，該方法包含減輕具有人類CFTR之G551D突變之患者中囊性纖維化之嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。

在一實施例中，該方法包含減輕在至少一個等位基因上具有人類 CFTR 之 $\Delta F508$ 突變之患者中囊性纖維化之嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。

在一實施例中，該方法包含減輕在兩個等位基因上皆具有人類 CFTR 之 $\Delta F508$ 突變之患者中囊性纖維化之嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。

在一實施例中，該方法包含減輕在至少一個等位基因上具有人類 CFTR 之 G551D 突變之患者中囊性纖維化之嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。

在一實施例中，該方法包含減輕在兩個等位基因上皆具有人類 CFTR 之 G551D 突變之患者中囊性纖維化之嚴重程度，其包括向該患者投與如本文所定義組合物中之一者。

在一些態樣中，本發明提供治療患者中骨質疏鬆症或減輕其嚴重程度之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物 I。

在某些實施例中，治療患者中骨質疏鬆症或減輕其嚴重程度之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在一些態樣中，本發明提供治療患者中骨質減少或減輕其嚴重程度之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物 I。

在某些實施例中，治療患者中骨質減少或減輕其嚴重程度之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在一些態樣中，本發明提供對患者進行骨癒合及/或骨修復之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物 I。

在某些實施例中，對患者進行骨癒合及/或骨修復之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在一些態樣中，本發明提供減少患者中骨吸收之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物I。

在某些實施例中，減少患者中骨吸收之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在一些態樣中，本發明提供增加患者中骨沈積之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物I。

在某些實施例中，增加患者中骨沈積之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在一些態樣中，本發明提供治療患者中COPD或減輕其嚴重程度之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物I。

在某些實施例中，治療患者中COPD或減輕其嚴重程度之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在一些態樣中，本發明提供治療患者中煙霧誘導性COPD或減輕其嚴重程度之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物I。

在某些實施例中，治療患者中煙霧誘導性COPD或減輕其嚴重程度之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在一些態樣中，本發明提供治療患者中慢性支氣管炎或減輕其嚴重程度之方法，其包括向該患者投與如本文所述之化合物I。

在某些實施例中，治療患者中慢性支氣管炎或減輕其嚴重程度之方法包括向該患者投與如本文所述之醫藥組合物。

在某些實施例中，本發明提供治療與正常CFTR功能有關之疾病之方法。該等疾病包含慢性阻塞性肺疾病(COPD)、慢性支氣管炎、復發性支氣管炎、急性支氣管炎、鼻竇炎、便秘、胰腺炎(包含慢性胰腺炎、復發性胰腺炎、及急性胰腺炎)、胰腺功能不全、由輸精管先天性雙側缺失(CBAVD)引起之男性不育、輕度肺疾病、特發性胰腺炎、肝病、遺傳肺氣腫、膽結石、胃食道逆流疾病、胃腸道惡性腫瘤、炎症腸病、便秘、糖尿病、關節炎、骨質疏鬆症、及骨質減少。

在某些實施例中，本發明提供治療與正常CFTR功能有關之疾病之方法，該等疾病包含遺傳血色素沉著症、凝結-纖維蛋白溶解缺陷(例如蛋白質C缺陷)、I型遺傳性血管性水腫、脂質處理缺陷(例如家族性高膽固醇血症)、I型乳糜微粒血症、無 β 脂蛋白血症、溶酶體貯積病(例如I細胞疾病/假何勒氏病)、黏多糖累積病、桑德霍夫/泰-薩克斯病、II型克裏格勒-納賈爾病、多重內分泌腺病/高胰島素血症、糖尿病、拉倫侏儒症、髓過氧化物酶缺陷、原發性甲狀旁腺功能減退、黑素瘤、I型心包積液CDG、先天性甲狀腺機能亢進、成骨不全、遺傳性低纖維蛋白原血症、ACT缺陷、尿崩症(DI)、神經生長板DI、腎源性尿崩症、夏-馬-圖三氏症候群、佩-梅二氏病、神經變性疾病(例如

阿爾茨海默病、帕金森病)、肌萎縮側索硬化、進行性核上性麻痺、皮克病、諸多多甡胺醯胺神經性病徵(例如亨廷頓氏病、I型脊髓小腦性共濟失調、脊髓延髓肌肉萎縮症、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症、及營養不良性肌強直)、以及海綿樣腦病(例如遺傳性克雅氏病(由朊病毒蛋白處理缺陷引起))、法布裏病、格斯特曼-施特勞斯納症候群、戈漢症候群、氯離子通道病變、先天性肌強直(Thomson及Becker型)、III型巴特氏症候群、登特氏病、過度驚嚇症、癲癇症、過度驚嚇症、溶酶體貯存病、安琪曼氏症候群、原發性纖毛運動障礙(PCD)、具有左右轉位之PCD(亦稱作卡特金納氏症候群)、不具有左右轉位及纖毛不發育之PCD、或薛格連氏病，該方法包括以下步驟：向該哺乳動物投與有效量之本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合。

根據一替代性較佳實施例，本發明提供治療囊性纖維化之方法，其包括以下步驟：向該哺乳動物投與有效量之本文所述包括形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合的組合物。

根據本發明，「有效量」之形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、該等形式之任一組合、或其醫藥上可接受之組合物係可有效治療如上所述一或多種疾病、病症或病狀或減輕其嚴重程度的量。

可使用可有效治療如上所述一或多種疾病、病症或病狀或減輕其嚴重程度之任一量及任一投與途徑來投與形式A-

HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合、或其醫藥上可接受之組合物。

在某些實施例中，形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、該等形式之任一組合、或其醫藥上可接受之組合物可用於治療如下患者中之囊性纖維化或減輕其嚴重程度：其在呼吸及非呼吸上皮之頂膜中呈現殘餘CFTR活性。可使用業內已知之方法容易地檢測殘餘CFTR活性在上皮表面之存在，例如標準電生理技術、生化技術或組織化學技術。該等方法使用活體內或離體電生理技術、對汗液或唾液Cl⁻濃度之量測、或監測細胞表面密度之離體生化或組織化學技術來鑒定CFTR活性。使用該等方法，可在各種不同突變之異型合子或同型合子患者中容易地檢測殘餘CFTR活性，包含最常見突變 Δ F508之同型合子或異型合子患者。

在另一實施例中，本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合、或其醫藥上可接受之組合物可用於治療如下患者中的囊性纖維化或減輕其嚴重程度：其具有藉由使用藥理學方法或基因療法誘導或增加之殘餘CFTR活性。該等方法會增加細胞表面上存在之CFTR量，由此在患者中誘導迄今不存在之CFTR活性或增加患者中殘餘CFTR活性之現有程度。

在一實施例中，本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合、或其醫藥上可接受之組合物可用於治療具有某些表現殘餘CFTR活性之基因型(例如III類突變(調節或門控受損)、IV類突變(傳導性改變)、或

V類突變(合成減小))之患者的囊性纖維化或減輕其嚴重程度(Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521-529, 2000)。其他表現殘餘CFTR活性之患者基因型包含該等種類中一者之同型合子患者或與任何其他突變種類(包含I類突變、II類突變、或尚未分類之突變)異型合子之患者。

在一實施例中，本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或該等形式之任一組合或其醫藥上可接受之組合物可用於治療屬於某些臨床表型(例如，通常與上皮頂膜中之殘餘CFTR活性量有關之中度至輕度臨床表型)內之患者的囊性纖維化或減輕其嚴重程度。該等表型包含表現胰腺功能不全之患者或經診斷患有特發性胰腺炎及輸精管先天性雙側缺失或輕度肺疾病之患者。

端視個體之物種、年齡及一般狀況、感染嚴重程度、特定藥劑、其投與模式及諸如此類，所需確切量可隨個體而變化。本發明化合物較佳調配成劑量單位形式以便於投與及統一劑量。本文所用之措辭「劑量單位形式」係指適於擬治療患者之藥劑之物理離散單位。然而，應理解，本發明化合物及組合物之總日用量應由主治醫師在合理之醫學判斷範圍內確定。任一特定患者或有機體之具體有效劑量可端視各種因素而定，包含所治療病症及病症嚴重程度；所用具體化合物之活性；所用具體組合物；患者之年

齡、體重、一般健康狀況、性別及飲食；所用具體化合物之投與時間、投與途徑及排泄速率；治療持續時間；與所用具體化合物組合或同時使用之藥物；及醫療技術中熟知之類似因素。本文所用之術語「患者」意指動物，較佳為哺乳動物，且最佳為人類。

端視所治療感染之嚴重程度，本發明之醫藥上可接受之組合物可以下列方式投與人類及其他動物：經口、經直腸、非經腸、腦池內、陰道內、腹膜腔內、局部(以粉劑、軟膏、滴劑或貼片形式)、經口腔(以經口或鼻噴霧形式)或類似投與方式。在某些實施例中，本發明化合物可以約 0.01 mg/kg 至約 50 mg/kg 個體體重/天、且較佳約 0.5 mg/kg 至約 25 mg/kg 個體體重/天之劑量量每天一或多次經口或非經腸投與以獲得期望治療效應。

用於經口投與之液體劑型包含但不限於醫藥上可接受之乳液、微乳液、溶液、懸浮液、漿液及酏劑。除活性化合物外，該等液體劑型可含有業內常用之情性稀釋劑(例如水或其他溶劑)、增溶劑及乳化劑，例如，乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油(尤其棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇及山梨糖醇酐之脂肪酸酯、及其混合物。除情性稀釋劑外，該等口服組合物亦可包含佐劑，例如，潤濕劑、乳化及懸浮劑、甜味劑、矯味劑、及芳香劑。

可根據已知技術使用適宜分散劑或潤濕劑及懸浮劑來調配可注射製劑，例如，無菌可注射水性或油性懸浮液。該無菌可注射製劑亦可為存於無毒非腸道可接受之稀釋劑或溶劑中的無菌可注射溶液、懸浮液或乳液，例如存於1,3-丁二醇中之溶液。可用之可接受媒劑及溶劑尤其係水、林格氏溶液、U.S.P.及等滲氯化鈉溶液。此外，通常採用無菌不揮發性油作為溶劑或懸浮介質。出於此目的，可採用包含合成甘油單酸酯或甘油二酸酯在內的任何溫和不揮發性油。此外，在可注射製劑中可使用諸如油酸等脂肪酸。

可注射調配物可(例如)藉由經由細菌截留過濾器過濾或藉由納入滅菌劑來滅菌，該等滅菌劑呈可在使用前溶解或分散於無菌水或其他無菌可注射介質中之無菌固體組合物形式。

為延長本發明化合物之作用，通常期望自皮下或肌內注射來減緩該化合物之吸收。此可藉由使用具有較差水溶性之結晶或非晶型材料之液體懸浮液來達成。因此，化合物之吸收速率取決於其溶解速率，且此溶解速率繼而可取決於晶體尺寸及結晶形式。另一選擇為，可藉由將化合物溶解或懸浮於油性媒劑中來達成非經腸投與化合物之延遲吸收。藉由在生物可降解聚合物(例如，聚交酯-聚乙醇酸交酯)中形成化合物之微囊基質來製備可注射儲積形式。端視化合物與聚合物之比例及所用特定聚合物之性質，可控制化合物之釋放速率。其他生物可降解聚合物之實例包含聚(原酸酯)及聚(酐)。儲積可注射調配物亦可藉由將化合

物俘獲入與身體組織相容之脂質體或微乳液中來製得。

用於直腸或陰道投與之組合物較佳為栓劑，其可藉由將本發明化合物與適宜無刺激性賦形劑或載劑(例如可可油、聚乙二醇或栓劑蠟)進行混合來製得，該等賦形劑或載劑在環境溫度下為固體但在體溫下為液體且因此其可在直腸或陰道腔內融化並釋放活性化合物。

經口投與之固體劑型包含膠囊、錠劑、丸劑、粉劑及顆粒。在該等固體劑型中，將活性化合物與至少一種醫藥上可接受之惰性賦形劑或載劑(例如，檸檬酸鈉或磷酸二鈣)及/或以下物質混合：a) 填充劑或擴充劑，例如，澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及矽酸，b) 黏合劑，例如羧甲基纖維素、藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖及阿拉伯膠，c) 保濕劑，例如甘油，d) 崩解劑，例如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些矽酸鹽、及碳酸鈉，e) 溶液阻滯劑，例如石蠟，f) 吸收促進劑，例如四級銨化合物，g) 潤濕劑，例如鯨蠟醇及甘油單硬脂酸酯，h) 吸收劑，例如高嶺土及膨潤土、及i) 潤滑劑，例如滑石粉、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉、及其混合物。在膠囊、錠劑及丸劑之情形下，劑型亦可包括緩衝劑。

在使用諸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及諸如此類等賦形劑之軟質及硬質填充明膠膠囊中，亦可使用相似類型之固體組合物作為填充劑。固體劑型之錠劑、糖衣藥丸、膠囊、丸劑及顆粒可使用包膜及包殼製

備，例如腸溶包膜及醫藥調配技術中熟知之其他包膜。其可視需要含有遮光劑且亦可為視需要以延遲方式僅(或優先)在腸道之某一部分中釋放活性成份的組合物。可使用之包埋用組合物的實例包含聚合物質及蠟。在使用諸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇及諸如此類等賦形劑的軟質及硬質填充明膠膠囊中，亦可採用相似類型之固體組合物作為填充劑。

活性化合物亦可呈具有一或多種上述賦形劑之微囊封化形式。可使用諸如腸溶包膜、釋放控制包膜及醫藥調配技術中熟知之其他包膜等包膜及包殼來製備錠劑、糖衣藥丸、膠囊、丸劑及顆粒之固體劑型。在該等固體劑型中，可將活性化合物與至少一種惰性稀釋劑(例如，蔗糖、乳糖或澱粉)混合。該等劑型除惰性稀釋劑外亦可包括如同通常實踐一般之其他物質，例如壓片潤滑劑及其他壓片助劑(例如硬脂酸鎂及微晶纖維素)。在膠囊、錠劑及丸劑之情形下，該等劑型亦可包括緩衝劑。其可視需要含有遮光劑且亦可為視需要以延遲方式僅(或優先)在腸道之某一部分中釋放活性成份的組合物。可使用之包埋用組合物的實例包含聚合物質及蠟。

用於局部或經皮投與本發明化合物之劑型包含軟膏、膏糊、乳膏、洗劑、凝膠、粉劑、溶液、噴霧劑、吸入劑或貼片。若需要，可在無菌條件下將活性組份與醫藥上可接受之載劑及任一所需防腐劑或緩衝劑混合。眼用調配物、滴耳劑及滴眼劑亦涵蓋於本發明範圍內。此外，本發明涵

蓋使用經皮貼片，其具有提供化合物至身體之控制遞送的額外優點。藉由將化合物溶解或分散於適當介質中來製備該等劑型。亦可使用吸收促進劑來增加化合物經過皮膚之通量。可藉由提供速率控制膜或藉由將化合物分散於聚合物基質或凝膠中來控制速率。

亦應瞭解，本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合或其醫藥上可接受之組合物可用於組合療法中，亦即，本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合或其醫藥上可接受之組合物可與一或多種其他期望治療劑或醫學程序同時、在之前、或在之後投與。在組合方案中使用之特定療法(治療劑或程序)組合需考慮期望治療劑及/或程序之相容性及欲達到之期望治療效應。亦應瞭解，所用各療法可對相同病症達成期望效應(例如，本發明化合物可與用於治療相同病症之另一藥劑同時投與)，或其可達成不同效應(例如，控制任何不良效應)。本文所用通常投與以治療或預防特定疾病、或病狀之額外治療劑稱作「適用於所治療之疾病、或病狀」。

在一實施例中，額外藥劑選自溶黏蛋白劑、支氣管擴張藥、抗生素、抗感染藥、消炎藥、除本發明化合物外之CFTR調節劑、或營養劑。

在一實施例中，額外藥劑係抗生素。用於本文之實例性抗生素包含妥布黴素(tobramycin)(包含妥布黴素吸入性粉劑(TIP))、阿奇黴素(azithromycin)、胺曲南(aztreonam)(包含胺曲南之氣溶膠化形式)、阿米卡星(amikacin)(包含其脂

質體調配物)、環丙沙星(ciprofloxacin)(包含其適於藉由吸入投與之調配物)、左氧氟沙星(levofloxacin)(包含其氣溶膠化調配物)、及兩種抗生素之組合(例如,磷黴素(fosfomycin)與妥布黴素)。

在另一實施例中,額外藥劑係溶黏蛋白劑。用於本文之實例性溶黏蛋白劑包含Pulmozyme®。

在另一實施例中,額外藥劑係支氣管擴張藥。實例性支氣管擴張藥包含沙丁胺醇(albuterol)、硫酸異丙喘寧(metaprotenerol sulfate)、乙酸吡布特羅(pirbuterol acetate)、沙美特羅(salmeterol)、或硫酸特他布林(tetrabuline sulfate)。

在另一實施例中,額外藥劑可有效地用於恢復肺氣道表面液體。該等藥劑改進了細胞內外鹽之移動,從而提高肺氣道中之黏液之水合程度並由此更易於清除。該等實例性藥劑包含高張生理鹽水、德努伏索四鈉(denufosol tetrasodium)($(((3S, 5R)-5-(4-氨基-2-酮基嘓啶-1-基)-3-羥基四氫呋喃-2-基]甲氧基-羥基磷醯基)[((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-二酮基嘓啶-1-基)-3,4-二羥基四氫呋喃-2-基]甲氧基-羥基磷醯基]氧基-羥基磷醯基]磷酸氫酯)$ 、或布若尼妥(bronchitol)(甘露醇之吸入調配物)。

在另一實施例中,額外藥劑係消炎藥,亦即,可減小肺中炎症之藥劑。用於本文之該等實例性藥劑包含布洛芬(ibuprofen)、二十二碳六烯酸(DHA)、西地那非(sildenafil)、吸入式麩胱甘肽、吡格列酮(pioglitazone)、

羥氣嗒、或斯伐他汀(simavastatin)。

在另一實施例中，額外藥劑直接藉由阻斷通道或間接藉由調節引起ENaC活性增加之蛋白酶(例如，絲胺酸蛋白酶、通道活化蛋白酶)來減小上皮鈉通道阻斷劑(ENaC)之活性。該等實例性藥劑包含卡莫司他(camostat)(胰島素樣蛋白酶抑制劑)、QAU145、552-02、GS-9411、INO-4995、阿若替克(Aerolytic)、及阿米洛利(amiloride)。減小上皮鈉通道阻斷劑(ENaC)活性之額外藥劑可參見(例如)PCT公開案第WO2009/074575號，其全部內容皆併入本文中。

CFTR調節劑(例如形式B、形式B-HCl、及形式A-HCl)與減小ENaC活性之藥劑之組合尤其用於治療本文所述之利德爾症候群(Liddle's syndrome)、包含囊性纖維化之炎性或過敏性病狀、原發性纖毛運動障礙、慢性支氣管炎、慢性阻塞肺疾病、哮喘、呼吸道感染、肺癌、口乾症及乾燥性角結膜炎、呼吸道感染(急性及慢性；病毒性及細菌性)及肺癌等疾病。

CFTR調節劑(例如形式B、形式B-HCl、及形式A-HCl)與減小ENaC活性之藥劑之組合亦用於治療藉由阻斷上皮鈉通道介導的疾病，亦包含除呼吸性疾病外之與跨越上皮之異常流體調節有關、或許涉及其表面上保護性表面液體之異常生理學的疾病，例如，口乾症(口腔乾燥)或乾燥性角結膜炎(乾眼)。另外，阻斷腎中之上皮鈉通道可用於促進利尿並由此誘導降血壓效應。

哮喘包含內因性(非過敏性)哮喘及外因性(過敏性)哮喘、輕度哮喘、中度哮喘、嚴重哮喘、支氣管炎性哮喘、運動誘發哮喘、職業性哮喘及在細菌感染後誘導之哮喘。哮喘之治療亦可理解為涵蓋治療(例如)呈現喘息症狀且診斷或可診斷為「喘息幼兒」(一種確定的在醫學界引起重大關注之患者分類且現在通常稱作初期或早期哮喘)的小於4或5歲之個體。(出於方便之目的，該特定哮喘病狀稱作「喘息幼兒症候群」。)可藉由降低症狀性發作(例如急性哮喘或支氣管收縮發作)之頻率或嚴重程度、改善肺功能或改善氣道超敏反應性來證明在哮喘治療中之預防功效。此預防功效可由對其他症狀性療法(亦即用於或欲限制或終止出現之症狀性發作之療法，例如消炎藥(例如，皮質類固醇)或支氣管擴張藥)之需求減少來進一步證明。對哮喘之預防益處可在易於「晨間肺功能下降(morning dipping)」之個體中尤為顯現。「晨間肺功能下降」係公認之哮喘症候群，其為實質百分比之哮喘所常見且其特徵在於(例如)於上午約4點至6點之間(亦即，通常實質上距任何先前所施用症狀性哮喘療法較遠之時間)的哮喘發作。

慢性阻塞性肺疾病包含慢性支氣管炎或與其有關之呼吸困難、肺氣腫、以及隨其他藥物療法(特定而言，其他吸入藥物療法)發生之氣道超敏反應加劇。在一些實施例中，CFTR調節劑(例如形式B、形式B-HCl、及形式A-HCl)與減小ENaC活性之藥劑之組合可用於治療任何類型或起源之支氣管炎，包含(例如)急性、花生仁吸入性、卡他

性、格魯布性(croupus)、慢性或結核性支氣管炎。

在另一實施例中，額外藥劑係除形式B、形式B-HCl、及形式A-HCl外之CFTR調節劑，亦即，具有調節CFTR活性之效應之藥劑。該等實例性藥劑包含阿塔魯仁(ataluren)(「PTC124®」；3-[5-(2-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-3-基]苯甲酸)、西那普肽(sinapultide)、蘭考韋泰(lancovutide)、地來司他(depelestat)(人類重組中性白細胞彈性蛋白酶抑制劑)、考柔斯同(cobiprostone)(7-{(2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-二氟-3-甲基戊基]-2-羥基-6-酮基八氫環戊[b]吡喃-5-基}庚酸)、或(3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]間二氧環戊烯-5-基)環丙烷甲醯胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸。在另一實施例中，額外藥劑係3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧雜環戊烯-5-基)環丙烷甲醯胺基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸。

在另一實施例中，該額外藥劑係營養劑。該等實例性藥劑包含胰脂肪酶(代替胰腺酵素)，包括Pancrease®、Pancreacarb®、Ultrase®、或Creon®、Liprotomase®(先前之Trizyte®)、Aquadeks®、或吸入式麩胱甘肽。在一實施例中，該額外營養劑係胰脂肪酶。

在一實施例中，該額外藥劑係除本發明化合物外之CFTR調節劑。

存在於本發明組合物中之該額外治療劑之量不超過僅包含該治療劑作為唯一活性劑之組合物中之正常投與量。較佳地，本文所揭示組合物中該額外治療劑之量通常包括該

藥劑作為唯一治療活性劑之組合物中時所存在量的約50%至100%。

本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合或其醫藥上可接受之組合物亦可納入組合物中，以塗覆可植入醫學裝置，例如假體、人工瓣膜、人造血管、支架及導管。因此，在另一態樣中，本發明包括用於塗覆可植入裝置之組合物，該組合物包括如上概述且屬於本文中各種類及子類之本發明化合物、及適用於塗覆該可植入裝置的載劑。在再一態樣中，本發明包括經組合物塗覆之可植入裝置，該組合物包括如上概述且屬於本文中各種類及子類之本發明化合物、及適用於塗覆該可植入裝置的載劑。適宜塗層及經塗覆可植入裝置之一般製法闡述於美國專利第6,099,562號、第5,886,026號、及第5,304,121號。塗層通常係生物相容性聚合材料，如：水凝膠聚合物、聚甲基二矽氧烷、聚己內酯、聚乙二醇、聚乳酸、乙烯乙酸乙烯基酯、及其混合物。組合物中之塗層可視需要進一步藉由氟聚矽氧、多醣、聚乙二醇、磷脂或其組合之適宜頂部塗層覆蓋，以賦予控制釋放特性。

本發明之另一態樣係關於調節生物試樣或患者中之CFTR活性(例如，活體外或活體內)，該方法包括向該患者投與本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合或其醫藥上可接受之組合物、或使該生物試樣與該等物質接觸。本文所用之術語「生物試樣」包含但不限於細胞培養物或其提取物；自哺乳動物獲得之活組織檢查材料

或其提取物；及血液、唾液、尿、糞便、精液、眼淚、或其他體液或其提取物。

生物試樣中CFTR之調節可用於熟習此項技術者已知之各種目的。該等目的之實例包含但不限於在生物及病理學現象中研究CFTR、及對新穎CFTR調節劑進行對比性評估。

在另一實施例中，提供在活體外或活體內調節陰離子通道活性之方法，其包括以下步驟：使該通道與本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合或其醫藥上可接受之組合物接觸。在較佳實施例中，陰離子通道係氯離子通道或碳酸氫根離子通道。在其他較佳實施例中，陰離子通道係氯離子通道。

根據一替代性實施例，本發明提供增加細胞膜中之功能CFTR數量之方法，其包括以下步驟：使該細胞與本文所述形式A-HCl、形式B、形式B-HCl、或其任一組合或其醫藥上可接受之組合物接觸。

根據另一較佳實施例，藉由量測跨膜電壓電位來量測CFTR活性。用於量測生物試樣中跨膜電壓電位之方式可採用業內已知之任一方法，例如光學膜電位分析或其他電生理方法。

光學膜電位分析利用Gonzalez及Tsien所述之電壓敏感性FRET感測器(參見Gonzalez, J. E.及R. Y. Tsien (1995)「Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells.」 Biophys J 69(4): 1272-80、及Gonzalez, J. E.及R. Y.

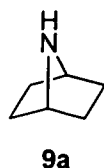
Tsien (1997); 「Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer」 Chem Biol 4(4): 269-77)與用於量測螢光變化之儀器(例如電壓/離子探針讀取器(VIPR))(參見 Gonzalez, J. E., K. Oades 等人, (1999) 「Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets」 Drug Discov Today 4(9): 431-439)之組合。

該等電壓敏感性分析係基於膜溶性電壓敏感性染料 DiSBAC₂(3)與螢光磷脂 CC2-DMPE(其附接至質膜外葉且用作 FRET 供體)之間螢光共振能量轉移(FRET)之變化。膜電位(V_m)之變化會導致帶負電之 DiSBAC₂(3)在質膜兩側重新分配, 且導致來自 CC2-DMPE 之能量轉移量發生相應變化。使用 VIPRTM II 來監測螢光發射之變化, 該儀器係經設計在 96-或 384 孔微量滴定板中實施細胞篩選之整合液體處理器及螢光檢測器。

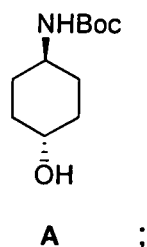
在另一態樣中, 本發明提供用於在活體外或活體內量測生物試樣中 CFTR 或其片段之活性的套組, 其包括 (i) 組合物, 包括形式 A-HCl、形式 B、形式 B-HCl、或其任一組合或任一上述實施例; 及 (ii) 用於 a) 使組合物與生物試樣接觸及 b) 量測該 CFTR 或其片段之活性的說明書。在一實施例中, 該套組進一步包括用於以下各項之說明書: a) 使額外組合物與生物試樣接觸; b) 量測在該額外化合物存在下該 CFTR 或其片段之活性; 及 c) 比較在該額外化合物存在下 CFTR 之活性與在本文所述形式 A-HCl、形式 B、

形式B-HCl、或其任一組合存在下CFTR之活性。在一實施例中，比較該CFTR或其片段活性之步驟提供該CFTR或其片段之密度的量度。在較佳實施例中，使用該套組來量測CFTR之密度。

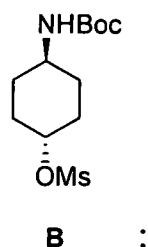
在一態樣中，本發明包含製備式9a化合物



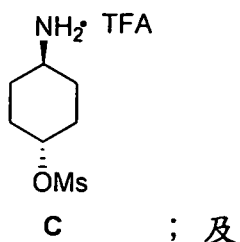
或其醫藥上可接受之鹽之方法，其包括使反-4-胺基環己醇與Boc酐接觸以製備式A化合物



使式A化合物與甲磺酸接觸以製備式B化合物

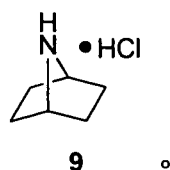


使式B化合物與三氟乙酸接觸以製備式C化合物



使式C化合物與氫氧化物接觸以製備式9a化合物。

在另一實施例中，該方法進一步包括使式9a化合物與鹽酸接觸以製備式9化合物。



為使得可更全面地理解本文所述之本發明，闡述下列實例。應理解，該等實例僅出於闡釋目的，而不應視為以任何方式限制本發明。

實例

方法及材料

XRPD(X-射線粉末繞射)

儀器1

在室溫下使用 Rigaku/MSD MiniFlex Desktop 粉末 X-射線繞射儀 (Rigaku, The Woodlands, TX) 記錄 X-射線粉末繞射 (XRPD) 數據。使用具有 $K\beta$ 抑制濾波器且在 30 kV 及 15 mA 下作業之 Cu 管來產生 X-射線。發散狹縫可隨分別設置於 4.2 度及 0.3 mm 狹縫之散射及接收狹縫而變。掃描模式係具有 0.02 度步寬及 2.0 秒計數時間之固定時間 (FT)。使用以下參比標準來校準粉末 X-射線繞射儀：75% 方鈉石 ($\text{Na}_3\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{12}\text{Cl}$) 及 25% 矽 (Rigaku, 目錄編號為 2100/ALS)。使用具有零背景試樣支架 SH-LBSI511-RNDB) 之六試樣台。將粉末試樣置於凹入區域中並使用載玻片弄平。

儀器2

另一選擇為，使用 PANalytical's X-pert Pro 繞射儀在室

溫及銅輻射($1.54060\text{ \AA}$)下實施粉末x-射線繞射量測。入射光束包括可變之發散狹縫以確保試樣上及繞射光束側之照射長度恆定。使用有效長度為 $2.12^\circ 2\theta$ (以掃描模式量測)之快速線性固態檢測器。將粉末試樣填充於零背景矽支架之凹入區域中，且實施旋轉以達成較佳統計學。自 $4\text{--}40^\circ 2\theta$ 量測對稱掃描，其中步長為 0.017° 且掃描步驟時間為 15.5 s 。

儀器 3

另一選擇為，在室溫下在光束線 ID31 (European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, France)處收集高解析度數據。藉由三個 11-mm 間隙ex-真空波蕩器產生X-射線。藉由低溫冷卻之雙晶體單色儀(Si(111)晶體)對光束實施單色化。水冷卻狹縫將入射至單色儀上之光束、及傳輸至試樣之單色光束的尺寸界定於 $0.5\text{--}2.5\text{ mm}$ (水平) $\times$ $0.1\text{--}1.5\text{ mm}$ (垂直)範圍內。實驗所用波長為 $1.29984\text{ (3) \AA}$ 。繞射儀係由一組9個檢測器組成，對其實施垂直掃描以量測隨 2θ 變化之繞射強度。每一檢測器位於Si(111)分析儀晶體之後且檢測器通道相隔約 2° 。此繞射儀能夠產生極精確之高解析度繞射圖案，其中峰寬可低至 0.003° 且峰位置之精確度為 0.0001° 數量級。使用Materials Studio(Reflex模組)處理粉末繞射數據並編入索引。使用Materials Studio之PowderSolve模組來解析結構。評價所得溶液之結構可行性且隨後使用Rietveld精製程序進行精製。

使用儀器 1(圖 7A)或儀器 2(圖 7B)在上述設置下記錄關於

形式B之實例中所述之XPRD光譜。使用儀器2在上述設置下記錄關於關於形式B-HCl、及形式A-HCl之實例中所述之XPRD光譜。使用儀器3測定形式A-HCl及形式B-HCl之晶系、空間群及晶胞尺寸。

示差掃描熱量測定(DSC)

使用TA DSC Q2000示差掃描熱量測定儀(TA Instruments, New Castle, DE)來實施示差掃描熱量測定(DSC)。使用鈦校準該儀器。將約2-3 mg試樣稱量至密封盤中，使用具有1個針孔之蓋扣住(crimp)該等密封盤。自25°C至315°C在10°C/min之加熱速率下掃描DSC試樣。藉由Thermal Advantage Q Series™軟體收集數據並藉由Universal Analysis軟體(TA Instruments, New Castle, DE)進行分析。

熱重分析(TGA)

在TA Q500熱重分析儀(TA Instruments, New Castle, DE)上收集熱重分析(TGA)數據。自25°C至350°C在10°C/min之加熱速率下掃描約3-5 mg重之試樣。藉由Thermal Advantage Q Series™軟體收集數據並藉由Universal Analysis軟體(TA Instruments, New Castle, DE)進行分析。

FTIR光譜

自具有智能軌道取樣室(多點式衰減全反射附件)、45度金剛石窗之Thermo Scientific, Nicolet 6700 FT-IR光譜儀收集FTIR光譜。用於數據收集及分析之軟體係Omnic7.4版。收集設置如下：

檢測器：DTGS KBr；

分光鏡：Ge on KBr；

光源：EverGlo IR；

掃描範圍：4000-400 cm^{-1} ；

增益：8.0；

光學速率：0.6329 cm/sec ；

孔徑：100；

掃描次數：32；及

解析度：4 cm^{-1}

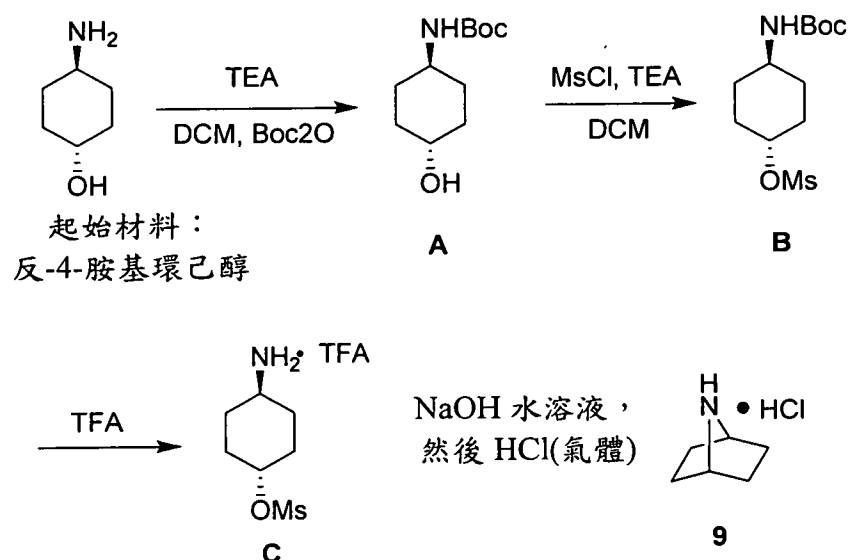
將粉末試樣直接置於金剛石晶體上，且施加壓力以使試樣表面貼合於金剛石晶體表面上。收集背景光譜且然後收集試樣光譜。

固態核磁共振分析

在Bruker 400 MHz質子頻率寬孔光譜儀上獲得固態核磁共振分析(SSNMR)光譜。藉由將質子檢測之質子飽和恢復數據擬合成指數函數來獲得質子弛豫縱向弛豫時間(^1H T_1)。使用該等值來設置碳交叉極化魔角旋轉實驗(^{13}C CPMAS)之最佳循環延遲，其通常設置為介於 $1.2 \times ^1\text{H}$ T_1 與 $1.5 \times ^1\text{H}$ T_1 之間。使用質子通道上之線性振幅斜坡(自50%至100%)及100 kHz TPPM去耦合在2 ms接觸時間下獲得碳光譜。典型魔角旋轉(MAS)速度為15.0 kHz。使用質子去耦合之直接偏振MAS實驗獲得氟光譜。使用100 kHz TPPM去耦合。循環延遲設置為 $\geq 5 \times ^{19}\text{F}$ T_1 。藉由將氟檢測之質子去耦合飽和恢復數據擬合成指數函數來獲得氟縱向弛豫時間(^{19}F T_1)。使用固相金剛烷之設置為29.5 ppm之高磁場

共振作為碳以及氟光譜之外部參照。使用此程序，在 0 ppm 下間接以四甲基矽烷作為碳光譜之參照且在 0 ppm 下間接以硝基甲烷作為氟光譜之參照。

製備實例：7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)。



反-4-(第三-丁氧基羰基氨基)環己醇(A)之製備，方法1。
將碳酸鈉(920.2 g, 8.682 mol, 2當量)添加至反應容器中，隨後添加水(3.000 L, 6體積)並攪拌。添加二氯甲烷(DCM, 4.000 L, 4體積)，隨後添加反-4-氨基環己醇(500.0 g, 4.341 mol)以產生兩相反應混合物，在室溫下劇烈攪拌該兩相反應混合物。然後迅速向容器中逐滴添加存於DCM(2體積)中之Boc₂O(947.4 g, 997.3 mL, 4.341 mol, 1當量)溶液，且將所得反應混合物在室溫下攪拌過夜。然後過濾反應混合物且使用水(2×8體積)洗滌濾餅。抽乾產物直至其變成緊湊濾餅為止。然後將濾餅在35℃下於真空烘箱中乾燥24 h，得到830 g結晶固體形式之反-4-(第三-丁氧基羰基氨基)環己醇(A)。

反-4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己醇(A)之製備，方法2。使兩個50 L三頸圓底燒瓶各自配備有機械攪拌器及熱電偶。將燒瓶置於冷卻管中，且然後向每一燒瓶中裝填水(8.87 L)及反-4-胺基環己醇(1479 g)。約10至30分鐘後，反-4-胺基環己醇已溶解，且向每一燒瓶中添加碳酸鉀(1774.6 g)。約10至20分鐘後，碳酸鉀已溶解，且向每一燒瓶中裝填DCM (2.96 L)。然後以將溫度維持於20-30°C之速率向每一燒瓶中添加存於DCM (1479 mL)中之Boc酐(3082.6 g)。使用冰/水浴來控制放熱並加快添加，此需要約1至2小時。在添加期間形成懸浮液，且將反應混合物升溫至室溫並攪拌過夜，直至根據Boc酐消失判斷反應完成為止。然後向每一燒瓶中裝填庚烷(6 L)，且將混合物冷卻至約0-5°C。使用相同過濾器藉由過濾自每一燒瓶收集固體。使用庚烷(6 L)隨後使用水(8 L)洗滌合併之固體。將固體裝填至配備有機械攪拌器之具有適當大小之罐中。添加水(12 L)及庚烷(6 L)，且將所得懸浮液以機械方式攪拌30-60分鐘。藉由過濾收集固體且然後使用水(8 L)及庚烷(8 L)在過濾器上洗滌，在過濾器上風乾3天，且然後在真空及30-35°C下乾燥至恒重以提供白色固體產物。

反-甲烷磺酸4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己基酯(B)之製備，方法1。使12 L燒瓶配備有氮氣流及機械攪拌器。引入反-4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己醇(750 g, 3.484 mol)，隨後引入四氫呋喃(THF, 6.000 L, 8體積)，且攪拌混合物。添加三乙胺(370.2 g, 509.9 mL, 3.658 mol, 1.05當

量)且將混合物冷卻至0°C。仔細逐滴添加甲磺醯氯(419.0 g, 283.1 mL, 3.658 mol, 1.05當量), 同時使混合物之溫度保持低於5°C。添加後, 將混合物在0°C下攪拌3 h, 且然後逐漸升溫至室溫(17°C)並攪拌過夜(約15 h)。使用水(6體積)將混合物驟冷並攪拌15 min。添加乙酸乙酯(EtOAc, 9.000 L, 12體積)且繼續攪拌15 min。停止攪拌且將混合物靜置10 min, 並去除水相。添加1 N HCl(6體積, 4.5 L)且繼續攪拌15 min。停止攪拌且去除水相。添加10% w/v NaHCO₃(4.5 L, 6體積)並將混合物攪拌10 min。停止攪拌且去除水相。添加水(6體積, 4.5 L)且將混合物攪拌10 min。去除水層, 且對有機層實施精緻過濾並濃縮至4體積。添加庚烷(5.5體積, 4 L)且將混合物再次濃縮至乾燥, 從而得到988 g反-甲烷磺酸4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己基酯。

反-甲烷磺酸4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己基酯(B)之製備, 方法2。將配備有機械攪拌器、加料漏斗、氮氣入口、熱電偶及乾燥管之三頸圓底燒瓶置於冷卻管中。向燒瓶中添加反-4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己醇(2599 g, 12.07 mol, 1.0當量)、四氫呋(THF) (20.8 L)、及三乙胺(1466 g, 14.49 mol, 1.2當量)。使用冰水浴冷卻混合物並攪拌。藉由加料漏斗經1小時逐滴添加甲磺醯氯(1466 g, 12.80 mol, 1.06當量)。完成添加後, 去除冷卻浴, 且攪拌反應混合物直至TLC表明起始材料耗盡為止(約30分鐘)。然後使用鹽酸水溶液(223 mL HCl, 存於6.7 L水中)

及EtOAc (10.4 L)將反應混合物驟冷。將混合物在環境溫度下攪拌約10-20分鐘且然後轉移至分液漏斗中。分離各層，且去除水層。使用水(2×4.5 L)、飽和碳酸氫鈉水溶液(1×4.5 L)洗滌有機層，並在攪拌下藉由無水硫酸鎂乾燥5-10分鐘。過濾混合物，且使用EtOAc (2×600 mL)洗滌濾餅。在減壓及40°C下濃縮合併之洗滌液及濾液，從而留下白色固體。將固體吸收於庚烷(3 L)中並在冰/甲醇冷卻管中冷卻。再次添加庚烷(5 L)，且將混合物在0-5°C下攪拌不小於1小時。然後藉由過濾收集固體，使用冷庚烷(0-5°C, 2×1.3 L)洗滌，並在真空及40°C下乾燥至恒重以提供標題化合物。

注意：可使用夾套反應器來代替帶有冷卻管及冰浴之圓底燒瓶。

反-甲烷磺酸4-胺基環己基酯(C)之製備，方法1。在氮氣及開放通風下將反-甲烷磺酸4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己基酯(985 g, 3.357 mol)引入配備有攪拌器之3-頸12 L燒瓶中。在室溫下添加DCM(1.970 L, 2體積)，且開始攪拌。向混合物中分兩批(每批1 L)緩慢添加三氟乙酸(TFA)(2.844 kg, 1.922 L, 24.94 mol, 2體積)。第一次添加後，將混合物攪拌30 min隨後進行第二次添加。將混合物在室溫下攪拌過夜(15 h)，從而得到澄清溶液。然後向反應混合物中添加2-甲基四氫呋喃(4體積)，攪拌1 h。然後將混合物在通風櫥中仔細過濾並抽乾以產生1100 g反-甲烷磺酸4-胺基環己基酯之TFA過量的TFA鹽。

反-甲烷磺酸4-胺基環己基酯(C)之製備，方法2。使50 L 三頸圓底燒瓶配備有機械攪拌器、加料漏斗及熱電偶且置於冷卻管中。向燒瓶中添加反-甲烷磺酸4-(第三-丁氧基羰基胺基)環己基酯(3474 g, 1.0當量)及DCM (5.9 L)。將所得懸浮液在環境溫度下攪拌5-10分鐘，且然後經2.5小時經由加料漏斗緩慢添加三氟乙酸(TFA, 5.9 L)以控制所得放熱曲線及氣體逸出速率。將反應混合物在室溫下攪拌過夜且然後使用冰水浴冷卻至15°C-20°C。然後以將內部溫度維持於低於25°C之速率經由加料漏斗添加2-甲基四氫呋喃(2-MeTHF, 11.8 L)(約1.5小時)。添加前4-5 L 2-MeTHF時，反應放熱。將所得懸浮液攪拌1小時。藉由過濾收集固體且然後使用2-MeTHF (2×2.2 L)洗滌，且然後在真空及環境溫度下乾燥至恒重以提供白色固體形式之標題化合物。

7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)之製備，方法1。將反-甲烷磺酸4-胺基環己基酯之TFA鹽(200 g, 650.9 mmol)引入3 L 3-頸燒瓶中，隨後添加水(2.200 L, 11體積)。緩慢添加NaOH(78.11 g, 1.953 mol, 3當量)，同時將反應混合物之溫度保持於低於25°C且將混合物攪拌過夜。然後添加DCM(1.4 L, 7體積)並攪拌混合物，且分離有機層。然後使用DCM(1.4 L, 7體積)再次萃取水層，且合併DCM層。然後添加HCl(108.5 mL, 12 M, 1.3020 mol, 2當量)，將混合物攪拌30 min且然後在旋轉蒸發儀上濃縮至乾燥。添加乙腈(10體積)並濃縮混合物。重複此過程3次直至共沸去

除所有痕量水為止以提供 7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)。自乙腈(10體積)將粗產物重結晶以提供無色結晶固體形式之 7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)。 ^1H NMR (DMSO- d^6) 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)。

應注意，在並不添加 DCM 用於萃取時，粗產物亦可在約 95°C -97°C 下蒸餾並進一步重結晶。

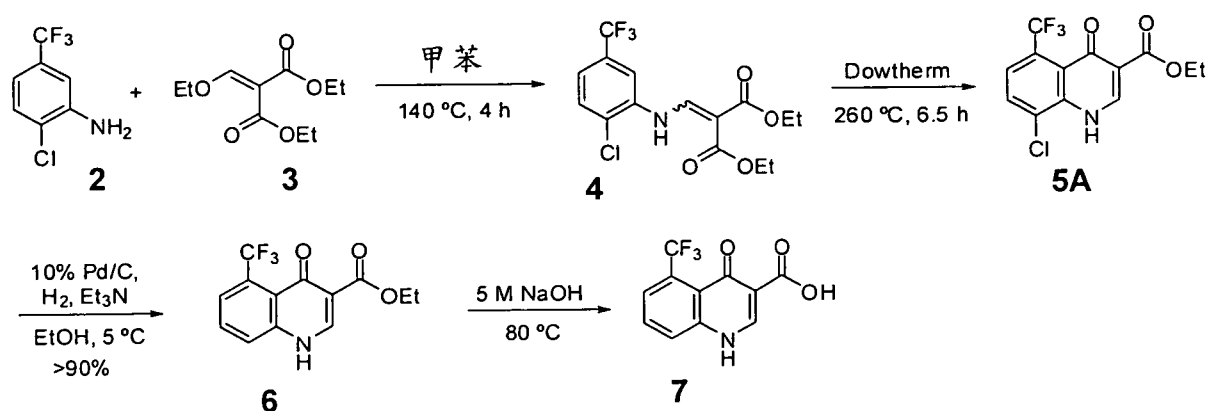
7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)之製備，方法 2。使 50 L 三頸圓底燒瓶配備有機械攪拌器、加料漏斗及熱電偶且置於加熱套中。向燒瓶中添加反-甲烷磺酸 4-胺基環己基酯三氟乙酸鹽(3000 g, 1 當量)及水(30 L)。攪拌混合物，以將溫度維持於低於 25°C 之速率(此乃因在添加時輕度放熱)藉由加料漏斗添加 50% NaOH(2343 g, 29.29 mol, 3 當量)。NaOH 添加完成後，將反應混合物在室溫下攪拌過夜。藉由分餾在頭部溫度為 95°C -98°C 之回流溫度(約 100°C)下回收產物。藉由添加 HCl 將每一餾份之 pH 調節至 2，並在減壓及 55°C 下濃縮以留下稠膏。添加乙腈(ACN 1.5 L)且將所得懸浮液攪拌 30 分鐘，且然後冷卻至 0°C -5°C 保持 1 小時。藉由過濾收集固體，使用冷(0-5°C) ACN (2×600 mL)洗滌，並在真空及 50°C 下乾燥至恒重。

使 22 L 三頸圓底燒瓶配備有機械攪拌器、熱電偶、及冷凝器並置於加熱套中。向燒瓶中添加收集之固體(2382 g)、甲醇(4.7 L)及 2-MeTHF (4.7 L)。攪拌所得懸浮液並加熱至回流(約 65°C)。將反應燒瓶轉移至冷卻管中，且攪拌

混合物。然後經30分鐘經由加料漏斗添加2-MeTHF (4.7 L)。將所得懸浮液冷卻至0-5°C並在此溫度下攪拌30分鐘。藉由過濾收集固體，使用冷(0-5°C) 2-MeTHF (2×600 mL)洗滌，且然後在真空及55°C下乾燥至恒重。

將配備有機械攪拌器、熱電偶、氮氣入口及冷凝器之12 L三頸圓底燒瓶置於加熱套中。向燒瓶中添加粗產物(2079 g)及ACN (6.2 L)。攪拌所得懸浮液並加熱至回流(約82°C)保持30分鐘。將燒瓶轉移至冷卻管中且將懸浮液緩慢冷卻至0-5°C，並在此溫度下維持1小時。藉由過濾收集固體，使用冷(0-5°C) ACN (3×600 mL)洗滌，並在真空及55°C下乾燥至恒重以提供標題產物。

實例 1A：4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(7)之製備。



2-((2-氯-5-(三氟甲基)苯基胺基)亞甲基)丙二酸二乙酯(4)之製備。在氮氣氛下於配備有Dean-Stark冷凝器之3-頸1-L圓底燒瓶中合併2-氯-5-(三氟甲基)苯胺(2) (200 g, 1.023 mol)、2-(乙氧基亞甲基)丙二酸二乙酯(3) (276 g, 1.3

mol)及甲苯(100 mL)。將溶液在攪拌下加熱至140℃且維持此溫度4小時(h)。將反應混合物冷卻至70℃且緩慢添加己烷(600 mL)。攪拌所得漿液並升溫至室溫。藉由過濾收集固體，使用存於己烷中之10%乙酸乙酯(2×400 mL)洗滌且然後在真空下乾燥以提供白色固體產物2-((2-氯-5-(三氟甲基)苯基氨基)亞甲基)丙二酸二乙酯(4)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.28 (d, J=13.0 Hz, 1H), 8.63 (d, J=13.0 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.80 (d, J=8.3 Hz, 1H), 7.50 (dd, J=1.5, 8.4 Hz, 1H), 4.24 (q, J=7.1 Hz, 2H), 4.17 (q, J=7.1 Hz, 2H), 1.27 (m, 6H)。

8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸乙酯(5A)之製備 方法1。向3-頸1 L燒瓶中裝填Dowtherm® (200 mL, 8 mL/g)，且在200℃下脫氣1 h。將溶劑加熱至260℃並經10分鐘(min)逐份裝填2-((2-氯-5-(三氟甲基)苯基氨基)亞甲基)丙二酸二乙酯(4)(25 g, 0.07 mol)。將所得混合物在260℃下攪拌6.5 h並藉由蒸餾去除所得乙醇副產物。將混合物緩慢冷卻至80℃。經30 min緩慢添加己烷(150 mL)，隨後一次性添加額外之200 mL己烷。攪拌漿液直至其達到室溫為止。過濾固體，使用己烷(3×150 mL)洗滌，且然後在真空下乾燥以提供黃褐色固體形式之8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸乙酯(5A)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.91 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.06 (d, J=8.3 Hz, 1H), 7.81 (d, J=8.4 Hz, 1H), 4.24 (q, J=7.1 Hz, 2H), 1.29 (t, J=7.1 Hz, 3H)。

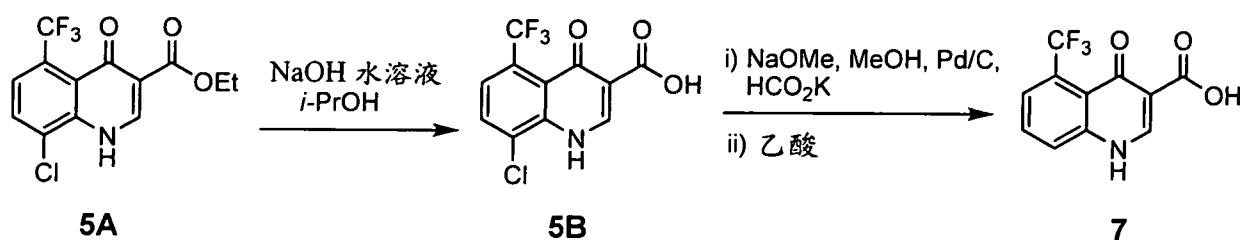
8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸乙酯 (5A)之製備 方法2。將化合物4 (2000 g, 5.468 mol)引入反應器中。將Dowtherm(4.000 L)裝填至反應器中並在室溫下於氮氣吹掃下過夜脫氣。然後攪拌並升溫至260°C。蒸餾出所產生之EtOH。監測反應且反應在5.5 h後完成，此時反應已實質上完成。去除熱源且將反應混合物冷卻至80°C並裝填庚烷(2.000 L)。將混合物攪拌30 min。將庚烷(6.000 L)裝填至經攪拌混合物中並繼續攪拌過夜。過濾出固體並使用庚烷(4.000 L)洗滌，且在50°C下於真空烘箱中乾燥以提供化合物6A。

4-酮基-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸乙酯(6)之製備。向3-頸5 L燒瓶中裝填8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸乙酯(5A) (100 g, 0.3 mol)、乙醇(1250 mL, 12.5 mL/g)及三乙胺(220 mL, 1.6 mol)。然後在5°C下向容器中裝填10 g 10% Pd/C(50%濕)。將反應液在氮氣及5°C下劇烈攪拌20 h，然後將反應混合物濃縮至體積為約150 mL。將產物4-酮基-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸乙酯(6)以含有Pd/C之漿液形式直接用於下一步驟。

4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(7)之製備。將4-酮基-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸乙酯(6)(58 g, 0.2 mol，含有Pd/C之粗製反應漿液)懸浮於具有回流冷凝器之1 L燒瓶中之NaOH (814 mL, 5 M, 4.1 mol)中並在80°C下加熱18 h，隨後在100°C下進一步加熱5 h。經由填充矽藻土將反應液熱過濾以去除Pd/C且使用1 N NaOH沖洗矽藻

土。將濾液酸化至pH約為1以獲得稠白色沉澱物。過濾沉澱物，然後使用水及冷乙腈沖洗。然後在真空下乾燥固體以提供白色固體形式之4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(7)。¹H NMR (400.0 MHz, DMSO-d₆) δ 15.26 (s, 1H), 13.66 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.13 (dd, J=1.6, 7.8 Hz, 1H), 8.06-7.99 (m, 2H)。

實例1B：4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(7)之替代性製備。



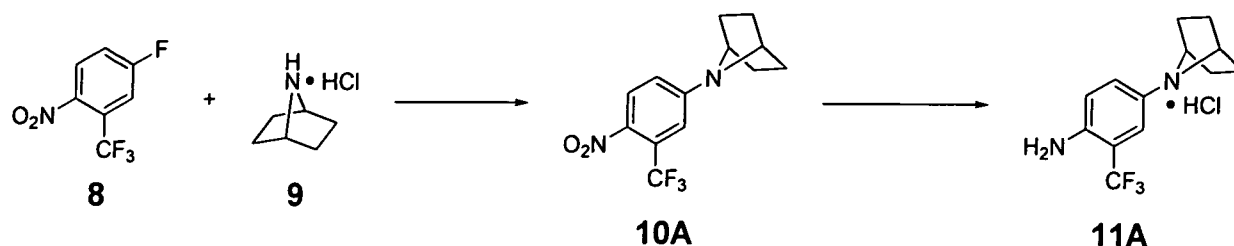
8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(5B)之製備。向反應容器中裝填8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸乙酯(5A) (1200 g, 3.754 mol)，隨後添加2-丙醇(1.200 L)及水(7.200 L)並攪拌。混合氫氧化鈉(600.6 g, 7.508 mol)及水(1.200 L)並冷卻至室溫。將所得混合物裝填至反應容器中，且然後在攪拌下加熱至80°C保持3.5 h以產生深色均勻混合物。再經1小時後，經45 min經由滴液漏斗添加乙酸(9.599 L, 20% w/v, 31.97 mol)。在攪拌下以6°C/h之速率將反應混合物冷卻至22°C。過濾所得固體並使用水(3 L)洗滌以產生濕濾餅(1436 g)。在氮氣吹掃下於真空烘箱中藉由Drierite®乾燥濾液以產生褐色固體形

式之 8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(5B)(1069 g)。藉由在攪拌下於 1.5 L 甲醇中製成漿液來將 8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(5B)純化 6 h。然後過濾並乾燥以提供 968.8 g 經純化之 8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(5B)。

4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(7)之製備。
將 8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(5B)(18.5 g, 1.00 當量, 限制試劑)裝填至反應容器中, 且在惰性氣氛及攪動下添加 MeOH(118 mL, 6.4 體積)。經 10 min 向反應器中逐份添加甲醇鈉(3.53 g, 1.00 當量)。攪拌混合物直至所有固體皆溶於溶液中為止(5-10 分鐘)。然後向反應混合物中添加鈮/碳(2.7 g, 0.03 當量)。經 30 min 向反應混合物中添加溶於 MeOH(67 mL, 3.6 體積)中之甲酸鉀(10.78 g, 2 當量), 並在環境溫度下攪拌約 4.5 h。在 8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸相對於 4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(7)不超過 1.0% 時, 可斷定反應已完成。在反應完成時, 經由矽藻土墊(所用矽藻土重量約為最初裝填至容器中之 8-氯-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(5B)重量的 2 倍)過濾混合物以去除固體。使用 MeOH(37 mL, 2 體積)洗滌矽藻土濾餅。將濾液裝填至清潔反應容器中並攪拌。經至少 45 分鐘繼續向經攪拌溶液中裝填乙酸(7.22 mL, 2 當量)並將所得漿液攪拌 5-16 h。過濾固體並使用 MeOH(56 mL, 3 體積)洗滌濾餅, 抽乾且然後真空乾燥以提供白色/灰白色固體產物。

另一選擇為，可使用氫氣代替甲酸鉀試劑。

實例 2A：4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺(11A)之製備。



7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷(10A)之製備，方法1。在氮氣氛下向含有7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)(4.6 g, 34.43 mmol)之燒瓶中添加存於乙腈(50 ml)中之4-氟-1-硝基-2-(三氟甲基)苯(8) (6.0 g, 28.69 mmol)及三乙胺(8.7 g, 12.00 ml, 86.07 mmol)的溶液。將反應燒瓶在80°C及氮氣氛下加熱16 h。然後將反應混合物冷卻並分配於水與二氯甲烷之間。使用1 M HCl洗滌有機層，藉由Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮至乾燥。藉由矽膠層析(存於己烷中之0-10%乙酸乙酯)純化以得到黃色固體形式之7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷。¹H NMR (400.0 MHz, DMSO-d₆) δ 8.03 (d, J=9.1 Hz, 1H), 7.31 (d, J=2.4 Hz, 1H), 7.25 (dd, J=2.6, 9.1 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 1.69-1.67 (m, 4H), 1.50 (d, J=7.0 Hz, 4H)。

7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷(10A)之製備，方法2。在氮氣氛及攪拌下向30 L夾套容器中引入4-氟-1-硝基-2-(三氟甲基)苯(8) (901 g, 4.309 mol)

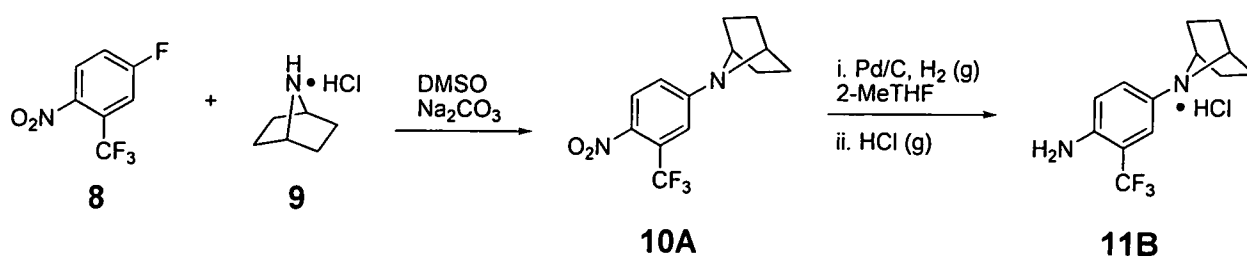
以及碳酸鈉(959.1 g, 9.049 mol)及DMSO(5 L, 5.5體積)。然後向容器中逐份添加7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)(633.4 g, 4.740 mol)，且溫度逐漸升至55°C。藉由HPLC監測反應，且在受質<1% AUC時，認為反應已完成。然後使用10體積EtOAc稀釋混合物並使用水(5.5體積)洗滌三次。然後將有機層濃縮至4體積且添加環己烷並濃縮至4體積。重複添加環己烷及濃縮所得溶液至4體積之過程直至去除所有EtOAc為止，且燒瓶中之總體積為約4體積(含有環己烷)。將反應混合物在旋轉蒸發儀上加熱至60°C保持30 min。然後將溶液在攪拌或旋轉下冷卻至室溫保持3 h。然後使所有固體結晶，且濃縮至乾燥以提供7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷(10A)。

7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷(10A)之製備，方法3。向溶於3體積DCM中之4-氟-1-硝基-2-(三氟甲基)苯(8)中添加四丁基溴化銨(0.05當量)及50 wt% KOH(3.6當量)。然後在0-5°C下添加7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(9)。將反應升溫至環境溫度。藉由HPLC監測反應，且在受質<1% AUC時，認為反應已完成，且分離各層。使用1 M HCl洗滌有機層，且去除水層。然後使用水洗滌有機層一次，使用鹽水洗滌一次，並蒸發。自環己烷在回流下將所得材料重結晶。過濾固體，使用環己烷洗滌，並在45°C及氮氣氛下於真空烘箱中乾燥以提供7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷。

4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺(11A)

之製備。將裝填有 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷(10A) (7.07 g, 24.70 mmol)及 10% Pd/C (0.71 g, 6.64 mmol)之燒瓶抽真空且然後使用氮氣沖洗。添加乙醇(22 mL)，且將氮氣球配備在反應燒瓶上。劇烈攪拌 12 h 後，使用氮氣吹掃反應混合物且藉由過濾去除 Pd/C。在減壓下將濾液濃縮成深色油狀物，藉由矽膠層析(存於己烷中之 0-15% 乙酸乙酯)純化以提供紫色固體形式之 4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺(11A)。¹H NMR (400.0 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.95 (dd, *J*=2.3, 8.8 Hz, 1H), 6.79 (d, *J*= 2.6 Hz, 1H), 6.72 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 1.61-1.59 (m, 4H)及 1.35 (d, *J*=6.8 Hz, 4H)。

實例 2B： 4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺鹽酸鹽(11B)之製備。



4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺鹽酸鹽(11B)之製備，方法 1。在氮氣氛下將鈀/碳(150 g, 5 % w/w)裝填至 Büchi 氫化器(20 L 容量)中，隨後添加 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(10A, 1500 g)(如上文實例 2A(方法 2)中所製備)、及 2-甲基四氫呋喃(10.5 L, 7 體積)。然後使用氮氣吹掃氫化器且然後在高

於大氣壓 0.5 巴之壓力下繼續向混合物中裝填。然後藉由冷卻容器夾套將混合物在介於 18°C 與 23°C 之間之溫度下攪拌。在不再消耗氫氣且並不進一步放熱時，向容器施加真空。然後在 0.5 巴下向容器中裝填氫氣且再次施加真空，隨後再次裝填 0.5 巴氫氣。在經過濾等份試樣之 HPLC 顯示沒有 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷 (10A) 剩餘(例如， $\leq 0.5\%$)時，在氫氣氛下經由過濾漏斗使用矽藻土過濾器將反應混合物轉移至接收燒瓶中。使用 2-甲基四氫呋喃 (3 L，2 體積) 洗滌矽藻土濾餅。將洗滌液及濾液裝填至配備有攪拌、溫度控制、及氫氣氛之容器中。在 20°C 下經 1 h 向容器中連續添加存於 1,4-二噁烷 (1 體積) 中之 4 M HCl。將混合物再攪拌至少 10 h，過濾，並使用 2-甲基四氫呋喃 (2 體積) 洗滌並乾燥以產生 1519 g 白色結晶固體形式之 4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺之鹽酸鹽 (11B)。

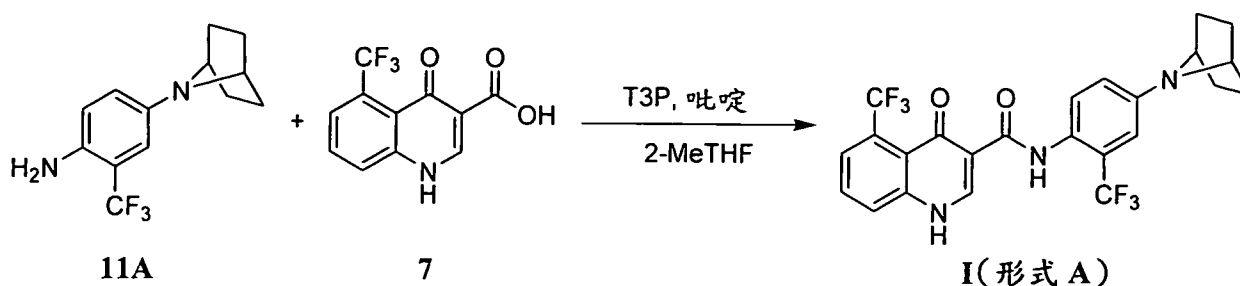
在此實例中亦可代替使用替代性溶劑。舉例而言，可使用 MeOH 及 / 或 EtOH 代替 2-MeTHF。

4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺鹽酸鹽 (11B) 之製備，方法 2。在氫氣下將鈀 / 碳 (150 g, 5 % w/w) 引入 Büchi 氫化器 (20 L 容量) 中，隨後添加 7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷 (1500 g) 及 2-甲基四氫呋喃 (10.5 L，7 體積)。然後使用氫氣吹掃氫化器且然後在高於大氣壓 0.5 巴之壓力下繼續向攪拌混合物中裝填。然後藉由冷卻容器夾套將反應混合物之溫度維持於

18°C -23°C。在不再消耗氫氣且並不進一步放熱時，向容器施加真空。然後向容器中裝填氫氣，且再次施加真空，隨後在0.5巴下裝填氫氣。在經過濾等份試樣之HPLC顯示檢測不到7-[4-硝基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷($\leq 0.5\%$)時，認為反應已完成。然後經由矽藻土過濾反應混合物。在氫氣下經由含有矽藻土過濾器之過濾漏斗將剩餘漿液轉移至接收燒瓶中。使用2-甲基四氫呋喃(3 L，2體積)洗滌矽藻土濾餅。將濾液及洗滌液轉移至配備有攪拌機構、溫度控制、及氫氣氣之容器中。在20°C下經1 h向容器中連續添加存於1,4-二噁烷(1體積)中之4 M HCl。將所得混合物再攪拌10 h，過濾並使用2-甲基四氫呋喃(2體積)洗滌並乾燥以產生1519 g白色結晶固體形式之7-[4-胺基-3-(三氟甲基)苯基]-7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷鹽酸鹽(11B)。

在此實例中亦可代替使用替代性溶劑。舉例而言，可使用MeOH及/或EtOH代替2-MeTHF。

實例3A：N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(形式A)之製備。



在室溫下向存於2-甲基四氫呋喃(91.00 mL)中之4-酮基-5-(三氟甲基)-1H-喹啉-3-甲酸(7) (9.1 g, 35.39 mmol)及4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺(11A) (9.2 g, 35.74 mmol)的溶液中添加丙基膦酸環狀酐(T3P(存於乙酸乙酯中之50 %溶液), 52.68 mL, 88.48 mmol)及吡啶(5.6 g, 5.73 mL, 70.78 mmol)。將反應燒瓶在65°C及氮氣氛下加熱10 h。冷卻至室溫後，然後使用乙酸乙酯稀釋反應混合物且使用飽和Na₂CO₃溶液(50 mL)將其驟冷。分離各層，且使用乙酸乙酯將水層萃取兩次以上。使用水洗滌合併之有機層，藉由Na₂SO₄乾燥，過濾並濃縮成黃褐色固體。將粗製固體在乙酸乙酯與二乙醚之2:1混合物中製成漿液，藉由真空過濾收集，並使用乙酸乙酯/二乙醚混合物洗滌兩次以上以提供淺黃色結晶粉末形式之粗產物。將粉末溶解於溫熱乙酸乙酯中並吸收於矽藻土上。藉由矽膠層析(存於二氯甲烷中之0-50 %乙酸乙酯)純化以提供白色結晶固體形式之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(化合物I)(固體形式A)。LC/MS m/z 496.0 [M+H]⁺，保留時間1.48 min(RP-C₁₈，10-99 % CH₃CN/0.05 % TFA，經3 min)。¹H NMR(400.0 MHz, DMSO-d₆) δ 13.08 (s, 1H), 12.16 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.04 (dd, J=2.1, 7.4 Hz, 1H), 7.95-7.88 (m, 3H), 7.22 (dd, 2.5, 8.9 Hz, 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)。

- 71 -

(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺鹽酸鹽(形式 A-HCl)之晶種(3.281 g, 5.570 mmol)。使 HCl (g)(10當量)鼓泡通過 2 h 且將混合物攪拌過夜。過濾所得懸浮液，使用 2-甲基四氫呋喃(4體積)洗滌，抽乾並在 60°C 下烘箱乾燥以提供化合物 I 形式 A-HCl。

形式 A-HCl 之粉末繞射圖示於圖 1 中。

下表 1 提供形式 A-HCl 之代表性 XRPD 峰。

表 1. 形式 A-HCl XPRD 峰。

2-θ(度)	相對強度(%)
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

2- θ (度)	相對強度(%)
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
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

經測定，化合物1形式A-HCl之單一晶體具有單斜晶系、 $P2_1/c$ 空間群、及下列晶胞尺寸： $a=13.6175(4)$ Å， $b=21.614(3)$ Å， $c=8.3941(4)$ Å， $\alpha=90^\circ$ ， $\beta=112.303^\circ$ ，且 $\gamma=90^\circ$ 。

亦使用顯微術來評估形式A-HCl之代表性試樣。

形式A-HCl之代表性試樣的DSC曲線提供於圖2中。

形式A之代表性試樣的TGA曲線提供於圖3中。

形式A-HCl之代表性試樣給出提供於圖4中之FTIR光譜。

表2提供形式A-HCl之FTIR特徵吸收。

表 2. 形式 A HCl 之 FTIR 吸收。

位置(cm^{-1})	強度(反射率%)
407.6	51.1
422.7	69.7
445.7	62.6
479.1	51.8
508.4	55.7
538.1	58.6
568.4	56.7
586.3	65.7
614.9	66.8
640.5	55.8
663.2	44.2
669.3	53.2
687.2	58.2
752.1	34.4
796.2	32.5
821.7	40.0
836.8	62.0
868.2	60.8
884.7	60.5
900.2	56.1
940.0	59.0
965.4	56.3
1052.4	35.1
1065.7	40.0
1109.5	23.9
1122.8	27.3
1147.7	38.8
1159.3	42.1
1212.8	37.9
1237.0	65.1
1255.3	51.4
1270.6	46.6
1300.8	47.0
1328.6	45.1
1434.1	41.6
1452.0	61.6
1521.8	40.2
1568.2	64.0
1608.8	55.2
1688.5	54.5
2256.5	68.0
2880.9	73.2
3676.3	90.5

亦使用固態(SS) ^{13}C 及 ^{19}F NMR 分析形式 A-HCl 之代表性

試樣。相應NMR光譜提供於圖5及6中。在¹³C SSNMR及¹⁹F SSNMR光譜中發現之若干峰闡述於下表3及4中。

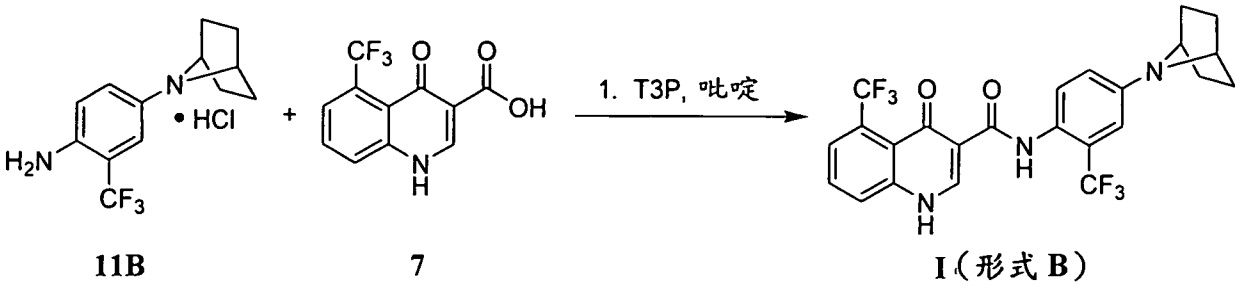
表 3.形式 A-HCl之 ¹³C SSNMR峰。

峰編號	化學位移(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
14	65.7
15	29.2
16	28.3
17	26.1

表 4：形式 A-HCl之 ¹⁹F SSNMR峰。

峰編號	化學位移(ppm)
1	-57.0
2	-60.5

實例 4A：N-(4-(7-氮雜雙環 [2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(形式 B)之製備。



將 2-甲基四氫呋喃(1體積)裝填至 30 L 夾套反應器容器

中，隨後添加 4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯胺之鹽酸鹽(11B)(1.2當量)及 4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲酸(7) (573 g, 2.228 mol)。將額外 2-甲基四氫呋喃(9體積)裝填至容器中並開始攪拌。經 15 min 時間將存於 2-甲基四氫呋喃中之 T3P(2當量)添加至反應混合物中。使用加料漏斗以逐滴方式迅速添加吡啶(3當量)。在攪拌下，然後經約 30 min 時間將混合物加熱至 45°C 且維持此溫度約 5 h。將混合物冷卻至室溫。添加 2-甲基四氫呋喃(4體積)，隨後緩慢添加水(6.9體積)，且將反應溫度保持於低於 30°C。去除水層且使用 NaHCO₃ 飽和水溶液將有機層洗滌兩次。然後使用 10% w/w 檸檬酸(5體積)及水(7體積)仔細洗滌有機層，實施精緻過濾，且然後轉移至另一乾燥容器中。添加 2-甲基四氫呋喃(10體積)並開始攪拌。在攪拌下以逐滴方式迅速添加庚烷(10體積)。將混合物攪拌約 12 h 時間，且然後真空過濾。將固體濾餅引入另一容器中。向容器中裝填水(15體積)且將懸浮液劇烈攪拌 48 h，且然後過濾。使用水(5體積)洗滌固體濾餅並在 45°C 下乾燥至恒重以得到化合物 I 形式 B。

化合物 I 形式 B 之粉末繞射圖示於圖 7A 及 7B 中。

表 5. 形式 B 之代表性 XRPD 峰

表 5. 形式 B 之 XPRD 峰

2θ(度)	相對強度(%)
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
26.2	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
34.2	8.9
34.7	12.4
35.1	8.0
36.7	6.5
38.1	4.7
39.3	5.3

形式B之代表性試樣的DSC曲線提供於圖8中。

形式B之代表性試樣的TGA曲線提供於圖9中。

形式B之代表性試樣給出提供於圖10中之FTIR光譜。

表6提供形式B之FTIR特徵吸收。

表6.形式B之FTIR吸收。

位置(cm-1)	強度(反射率%)
406.1	78.6
435.2	93.3
450.0	91.0
464.3	87.9

位置(cm-1)	強度(反射率%)
473.7	84.0
490.7	81.3
505.1	81.2
531.7	81.5
565.2	79.3
586.1	80.5
603.0	75.9
642.5	77.3
661.9	74.3
682.5	78.0
726.9	80.7
749.6	68.8
766.4	81.9
798.7	81.3
823.2	63.4
842.9	93.6
876.8	83.5
902.3	92.2
919.5	85.7
976.3	72.4
1045.8	71.0
1073.6	76.6
1109.0	65.5
1119.4	65.2
1139.6	58.8
1167.6	71.4
1197.9	92.0
1206.6	90.3
1227.8	81.9
1253.9	79.2
1272.8	77.9
1285.0	78.6
1301.1	74.6
1329.6	83.8
1349.7	76.6
1435.1	75.5
1466.6	78.2
1501.3	75.0
1534.8	68.4
1577.4	82.6
1620.4	83.5
1657.4	79.7
2952.5	92.2
2988.6	92.1

亦使用固態 ^{13}C 及 ^{19}F NMR分析形式B之代表性試樣。相應 NMR 光譜提供於圖 11 及 12 中。在 ^{13}C SSNMR 及 ^{19}F

SSNMR光譜中發現之若干峰闡述於下表7及8中。

表 7. 形式 B 之 ^{13}C SSNMR 峰。

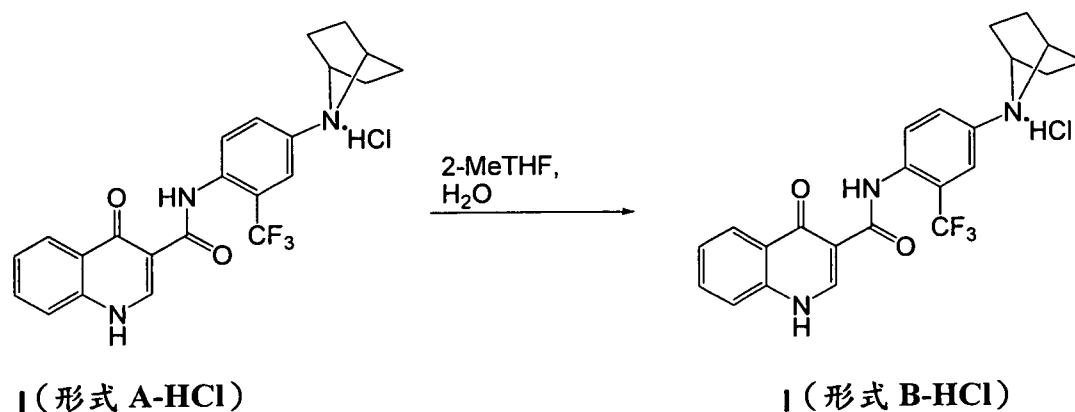
峰編號	化學位移(ppm)
1	175.3
2	165.3
3	145.9
4	141.4
5	132.9
6	126.8
7	123.5
8	117.4
9	113.4
10	58.3
11	29.2
12	26.9

表 8. 形式 B 之 ^{19}F SSNMR 峰。

峰編號	化學位移(ppm)
1	-56.1
2	-62.1

經測定，呈形式 B 之 N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺之單一晶體具有單斜晶系、P21/c 空間群、及下列晶胞尺寸： $a=13.5429(4) \text{ \AA}$ ， $b=13.4557(4) \text{ \AA}$ ， $c=12.0592(4) \text{ \AA}$ ， $\alpha=90^\circ$ ， $\beta=101.193^\circ$ ，且 $\gamma=90^\circ$ 。

實例 4B：N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(形式 B-HCl)之製備。



將 100 mL 2-甲基四氫呋喃裝填至具有氮氣氛且配備有攪拌器之 3-頸燒瓶中。向燒瓶中添加化合物 I 形式 A-HCl (55 g, 0.103 mol)，隨後添加 349 mL 2-甲基四氫呋喃，並開始攪拌。向燒瓶中添加 28 mL 水且將燒瓶升溫至內部溫度為 60°C 並攪拌 48 h。將燒瓶冷卻至室溫並攪拌 1 h。將反應混合物真空過濾直至濾餅乾燥為止。使用 2-甲基四氫呋喃 (4 體積) 將固體濾餅洗滌兩次。將固體濾餅在真空抽吸下保持約 30 分鐘時間並轉移至乾燥盤中。在真空及 60°C 下乾燥濾餅以得到形式 B-HCl 之白色結晶固體。

形式 B-HCl 之粉末繞射圖示於圖 13 中。

下表 9 提供形式 B-HCl 之代表性 XRPD 峰。

表 9. 形式 B-HCl 之 XRPD 峰。

2-θ(度)	相對強度(%)
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

2- θ (度)	相對強度(%)
19.3	19.0
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

2- θ (度)	相對強度(%)
39.9	10.7

經測定，化合物1形式B-HCl之單一晶體具有單斜晶系、 $P2_1/a$ 空間群、及下列晶胞尺寸： $a=12.57334(5)$ Å， $b=19.68634(5)$ Å， $c=8.39399(5)$ Å， $\alpha=90^\circ$ ， $\beta=90.0554^\circ$ ，且 $\gamma=90^\circ$ 。

亦使用顯微術來評估形式B-HCl之代表性試樣。

形式B-HCl之代表性試樣的DSC曲線提供於圖14中。

形式B-HCl之代表性試樣的TGA曲線提供於圖15中。

形式B-HCl之代表性試樣給出提供於圖16中之FTIR光譜。

表10提供形式B-HCl之FTIR特徵吸收。

表10.形式B-HCl之FTIR吸收。

位置(cm^{-1})	強度(反射率%)
406.3	48.8
428.2	70.9
453.1	66.8
478.2	52.3
507.5	59.5
537.8	58.9
563.8	51.8
585.3	63.9
610.1	56.4
641.1	50.5
664.7	44.8
694.5	60.2
740.0	52.2
763.5	40.3
797.8	49.9
809.9	47.5
833.6	34.0
874.2	48.7
888.5	47.7
907.6	56.1
936.0	62.1
969.6	57.1
1051.0	39.2
1070.2	44.3

位置(cm-1)	強度(反射率%)
1113.2	30.4
1126.7	26.9
1142.4	39.3
1166.0	53.4
1208.0	56.3
1233.6	49.7
1254.4	50.8
1270.7	47.3
1291.5	47.6
1328.3	50.5
1355.8	58.6
1372.4	67.3
1434.1	43.3
1463.9	48.0
1520.9	33.0
1574.4	56.8
1612.6	60.1
1653.8	61.0
2709.5	63.0
2994.4	68.3

亦使用固態 ^{13}C 及 ^{19}F NMR 分析形式 B-HCl。相應 NMR 光譜提供於圖 17 及 18 中。在 ^{13}C SSNMR 及 ^{19}F SSNMR 光譜中發現之若干峰列示於表 11 及 12 中。

表 11. 形式 B-HCl 之 ^{13}C SSNMR 峰。

峰編號	化學位移(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

表 12. 形式 B-HCl 之 ¹⁹F SSNMR 峰。

峰編號	F1(ppm)
1	-55.6
2	-62.0

實例 4C：N-(4-(7-氮雜雙環 [2.2.1] 庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺(形式 B-HCl)之替代性製備。

將形式 A-HCl (14.638 g, 27.52 mmol)裝填至 100 mL 圓底燒瓶中。添加 EtOH (248.9 mL)及水(27.82 mL)。將白色漿液加熱至回流。在 77°C 下獲得澄清溶液。將反應液冷卻至 45°C，且攪拌 30 min，且然後冷卻至 20°C。在 20°C 下將混合物再攪拌 3 h。過濾產物並使用 EtOH 洗滌濾餅。在 45°C 及氮氣吹掃下於真空烘箱中乾燥固體以提供白色固體形式之化合物 I 形式 B-HCl。XRPD 分析證實了固體形式 B-HCl 之身份。

應注意，可使用其他溶劑組合(例如 MeOH/H₂O 及 IPA/H₂O 或諸如此類)來代替此實例中所述之 EtOH/H₂O。替代性溶劑組合之實例提供於表 13 中。

表 13. 可用於製備形式 B-HCl 之其他溶劑。

溶劑	溶劑體積	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

另外應注意，在實例 3A、3B、及 4A-4C 中，可使用 EtOAc 代替 2-MeTHF 作為溶劑。

用於檢測及量測化合物之 $\Delta F508$ -CFTR 增效性質之分析

用於分析化合物之 $\Delta F508$ -CFTR 調節性質之膜電位光學方法

該分析使用螢光板讀取器(例如，FLIPR III，Molecular Devices 公司)並利用螢光電壓感測染料來量測膜電位變化以作為 NIH 3T3 細胞中功能 $\Delta F508$ -CFTR 增加的讀出值。反應驅動力係結合通道活化產生氯離子梯度，此係藉由在預先使用化合物處理細胞且隨後載入電壓感測染料之後實施單一液體添加步驟來達成。

增效劑化合物之鑒定

為鑒定 $\Delta F508$ -CFTR 之增效劑，研發雙重添加 HTS 分析模式。此 HTS 分析利用螢光電壓感測染料在溫度校正 $\Delta F508$ CFTR NIH 3T3 細胞中量測 FLIPR III 上之膜電位隨 $\Delta F508$ CFTR 之門控(傳導性)量測值增加而產生之變化。該反應之驅動力係 Cl⁻ 離子梯度以及使用毛喉素(forskolin)達成之通道活化，此係使用諸如 FLIPR III 等螢光板讀取器在預先使用增效劑化合物(或 DMSO 媒劑對照)處理細胞且隨後載入再分佈染料之後在單一液體添加步驟中達成。

溶液

1號浴液：(以 mM 表示) NaCl 160，KCl 4.5，CaCl₂ 2，MgCl₂ 1，HEPES 10，使用 NaOH 調節至 pH 7.4。

1號浴液之替代者包含氯離子鹽由葡糖酸鹽代替之浴液。

細胞培養物

使用穩定表現 $\Delta F508$ -CFTR 之 NIH3T3 小鼠成纖維細胞來實施膜電位之光學量測。在存於 175 cm² 培養瓶中之補充有 2 mM 麩胺醯胺、10% 胎牛血清、1 X NEAA、 β -ME、1 X 青黴素/鏈黴素、及 25 mM HEPES 之達爾伯克改良伊戈爾培養基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中，將細胞維持在 37°C 及 5% CO₂ 及 90% 濕度下。對於所有光學分析而言，在 384 孔基質膠塗覆板中以約 20,000/孔接種細胞且在 37°C 下將其培養 2 h，然後在 27°C 下培養 24 h 以實施增效劑分析。對於校正分析而言，將細胞在存在及不存在化合物之情形下在 27°C 或 37°C 下培養 16-24h。

分析化合物之 $\Delta F508$ -CFTR 調節性質之電生理分析

1. 尤斯室分析 (Using Chamber Assaying)

對表現 $\Delta F508$ -CFTR 之極化氣道上皮細胞實施尤斯室實驗以進一步描述光學分析中鑒定之 $\Delta F508$ -CFTR 調節劑。自支氣管組織分離非 CF 及 CF 氣道上皮，如前文所述進行培養 (Galiotta, L.J.V.、Lantero, S.、Gazzolo, A.、Sacco, O.、Romano, L.、Rossi, G.A. 及 Zegarra-Moran, O. (1998) In Vitro Cell. Dev. Biol. 34, 478-481)，並平鋪於預先塗覆有 NIH3T3 條件化培養基之 Costar® Snapwell™ 濾膜上。4 天後，去除

頂側培養基，且在使用前使細胞在氣液介面處生長14天以上。從而產生具纖毛且具有氣道上皮特徵之完全分化柱狀細胞單層。自不具有任何已知肺疾病之不吸煙者分離非CF HBE。自 $\Delta F508$ -CFTR同型合子患者分離CF-HBE。

將在Costar® Snapwell™細胞培養插件上生長之HBE安裝於尤斯室(Physiologic Instruments公司，San Diego, CA)中，且使用電壓鉗系統(Department of Bioengineering, University of Iowa, IA)量測在基底外側至頂側 Cl^- 梯度(I_{sc})存在下之跨上皮電阻及短路電流。簡言之，在37°C下在電壓鉗記錄條件($V_{保持}=0$ mV)下檢驗HBE。基底外側溶液含有(以mM表示)145 NaCl、0.83 K_2HPO_4 、3.3 KH_2PO_4 、1.2 $MgCl_2$ 、1.2 $CaCl_2$ 、10葡萄糖、10 HEPES(使用NaOH將pH調節至7.35)，且頂側溶液含有(以mM表示)145葡萄糖酸鈉、1.2 $MgCl_2$ 、1.2 $CaCl_2$ 、10葡萄糖、10 HEPES(使用NaOH將pH調節至7.35)。

增效劑化合物之鑒定

典型方案利用基底外側至頂膜之 Cl^- 濃度梯度。為設置此梯度，在基底外側膜上使用正常林格氏溶液，而使用等莫耳葡萄糖酸鈉(使用NaOH滴定至pH 7.4)來代替頂側NaCl，從而獲得較大跨上皮 Cl^- 濃度梯度。將毛喉素(10 μM)及所有測試化合物添加至細胞培養插件之頂側。比較假定 $\Delta F508$ -CFTR增效劑與已知增效劑染料木黃酮之功效。

2. 膜片鉗記錄

使用如前文所述之穿孔膜片記錄設置來監測 $\Delta F508$ -NIH3T3細胞中之總 Cl^- 電流(Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) J. Neurosci. Methods 37, 15-26)。在 $22^\circ C$ 下使用Axopatch 200B膜片鉗放大器(Axon Instruments公司, Foster City, CA)實施電壓鉗記錄。移液管溶液含有(以mM表示)150 N-甲基-D-葡萄糖胺(NMDG)-Cl、2 $MgCl_2$ 、2 $CaCl_2$ 、10 EGTA、10 HEPES、及240 $\mu g/ml$ 兩性黴素-B(使用HCl將pH調節至7.35)。細胞外培養基含有(以mM表示)150 NMDG-Cl、2 $MgCl_2$ 、2 $CaCl_2$ 、10 HEPES(使用HCl將pH調節至7.35)。使用配備有Digidata 1320 A/D介面之PC並組合使用Clampex 8(Axon Instruments公司)來產生脈衝、採集數據、及分析。為活化 $\Delta F508$ -CFTR, 向浴液中添加10 μM 毛喉素及20 μM 染料木黃酮, 且每隔30 sec監測一次電流-電壓關係。

增效劑化合物之鑒定

亦使用穿孔膜片記錄技術來研究 $\Delta F508$ -CFTR增效劑增加穩定表現 $\Delta F508$ -CFTR之NIH3T3細胞中之宏觀 $\Delta F508$ -CFTR Cl^- 電流($I_{\Delta F508}$)的能力。自光學分析鑒定之增效劑可引起 $I_{\Delta F508}$ 隨劑量變化而增加, 此效能及功效與在光學分析中所觀察到者相似。在所有所檢驗細胞中, 在施加增效劑之前及期間之逆轉電位為-30 mV左右, 其為計算之 E_{Cl} (-28 mV)。

細胞培養物

使用穩定表現 $\Delta F508$ -CFTR之NIH3T3小鼠成纖維細胞來

實施全細胞記錄。在存於175 cm²培養瓶中之補充有2 mM 麩胺醯胺、10%胎牛血清、1 X NEAA、 β -ME、1 X青黴素/鏈黴素、及25 mM HEPES之達爾伯克改良伊戈爾培養基中，將細胞維持在37°C及5% CO₂及90%濕度下。對於全細胞記錄而言，將2,500-5,000個細胞接種於塗覆有聚L-離胺酸之玻璃蓋玻片上且在27°C下培養24-48 hr，然後使用其來測試增效劑活性；且在37°C及存在或不存在校正化合物之情形下培育，以量測校正劑之活性。

3. 單通道記錄

使用如前文所述之切除翻轉膜片記錄(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)且使用Axopatch 200B膜片鉗放大器(Axon Instruments公司)來觀察NIH3T3細胞中所表現之wt-CFTR及溫度經校正 Δ F508-CFTR的門控活性。移液管含有(以mM表示)：150 NMDG、150天冬胺酸、5 CaCl₂、2 MgCl₂、及10 HEPES(使用Tris鹼將pH調節至7.35)。浴液含有(以mM表示)：150 NMDG-Cl、2 MgCl₂、5 EGTA、10 TES、及14 Tris鹼(使用HCl將pH調節至7.35)。切除後，藉由添加1 mM Mg-ATP、75 nM催化亞單位之cAMP依賴性蛋白激酶(PKA；Promega公司，Madison, WI)、及10 mM NaF來活化wt-及 Δ F508-CFTR以抑制蛋白質磷酸酶，從而防止電流衰減。將移液管電位維持於80 mV。自含有 ≤ 2 個活性通道之膜片分析通道活性。由實驗

過程期間同時開放之最大數量決定活性通道數。為確定單通道電流幅值，由120秒之 $\Delta F508$ -CFTR活性記錄之數據過濾100 Hz下之「離線」值後，用於構建全點幅值組織圖，使用多高斯函數(multigaussian functions)利用Bio-Patch Analysis軟體(Bio-Logic公司，France)對該等全點幅值組織圖進行擬合。根據120秒之通道活性決定總微觀電流及開放概率(P_o)。使用Bio-Patch軟體或根據方程式 $P_o = I/i(N)$ 來測定 P_o ，其中 I =平均電流， i =單通道電流幅值，且 N =膜片中之活性通道數。

細胞培養物

使用穩定表現 $\Delta F508$ -CFTR之NIH3T3小鼠成纖維細胞來實施切除膜之膜片鉗記錄。在存於175 cm²培養瓶中之補充有2 mM麩胺鹽胺、10%胎牛血清、1 X NEAA、 β -ME、1 X青黴素/鏈黴素、及25 mM HEPES之達爾伯克改良伊戈爾培養基中，將細胞維持在37°C及5% CO₂及90%濕度下。對於單通道記錄而言，在塗覆有聚L-離胺酸之玻璃蓋玻片上接種2,500-5,000個細胞且在使用前於27°C下培養24-48 hr。

化合物I形式A可用作ATP結合匣式轉運蛋白之調節劑。化合物I形式A之EC₅₀ (μ m)經量測小於2.0 μ M。化合物I形式A之功效經計算為100%至25%。應注意，100%功效係使用4-甲基-2-(5-苯基-1H-吡唑-3-基)酚獲得之最大反應。

【圖式簡單說明】

圖1係形式A-HCl之實例性試樣的X-射線粉末繞射圖

案；

圖 2 係形式 A-HCl 之代表性試樣的 DSC 曲線；

圖 3 係藉由對形式 A-HCl 之代表性試樣實施熱重分析產生的曲線，其顯示試樣重量隨溫度而變化；

圖 4 係形式 A-HCl 之代表性試樣的 FTIR 光譜；

圖 5 係形式 A-HCl 之代表性試樣的固相 ^{13}C NMR 光譜；

圖 6 係形式 A-HCl 之代表性試樣的固相 ^{19}F NMR 光譜；

圖 7A 係使用儀器 1 記錄之形式 B 之代表性試樣的 X-射線粉末繞射圖案；

圖 7B 係使用儀器 2 記錄之形式 B 之代表性試樣的 X-射線粉末繞射圖案；

圖 8 係形式 B 之代表性試樣的 DSC 曲線；

圖 9 係藉由對形式 B 之代表性試樣實施熱重分析產生的曲線，其顯示試樣重量隨溫度而變化；

圖 10 係形式 B 之代表性試樣的 FTIR 光譜；

圖 11 係形式 B 之代表性試樣的固相 ^{13}C NMR 光譜；

圖 12 係形式 B 之代表性試樣的固相 ^{19}F NMR 光譜；

圖 13 係形式 B-HCl 之代表性試樣的 X-射線粉末繞射圖案；

圖 14 係形式 B-HCl 之代表性試樣的 DSC 曲線；

圖 15 係藉由對形式 B-HCl 之代表性試樣實施熱重分析產生的曲線，其顯示試樣重量隨溫度而變化；

圖 16 係形式 B-HCl 之代表性試樣的 FTIR 光譜；

圖 17 係形式 B-HCl 之代表性試樣的固相 ^{13}C NMR 光譜；

圖 18 係形式 B-HCl 之代表性試樣的固相 ^{19}F NMR 光譜；

圖 19 係基於單一 X-射線分析之形式 B 之構象結構的圖式；

圖 20 係基於單一 X-射線分析之形式 A-HCl 之構象結構的圖式；

圖 21 係基於單一 X-射線分析之形式 A-HCl 之分子堆積圖；

圖 22 係基於單一 X-射線分析之形式 B-HCl 之構象結構的圖式；及

圖 23 係基於單一 X-射線分析之形式 B-HCl 之分子堆積圖。

七、申請專利範圍：

1. 一種稱為形式 A-HCl 之 N-(4-(7-氮雜雙環 [2.2.1] 庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式 A-HCl 之特徵在於在使用 Cu K α 輻射獲得的 X-射線粉末繞射圖案中具有：約 7.1 度之峰、約 8.2 度之峰、約 14.1 度之峰、約 14.7 度之峰、約 16.4 度之峰、約 18.7 度之峰、約 21.2 度之峰、約 21.9 度之峰、約 22.8 度之峰、約 24.6 度之峰、約 25.0 度之峰及約 35.6 度之峰。
2. 如請求項 1 之稱為形式 A-HCl 之 N-(4-(7-氮雜雙環 [2.2.1] 庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式 A-HCl 之特徵在於在 ^{13}C NMR 光譜中具有一或多個選自由下列所組成之群之峰：約 163.7 ppm 處之峰、約 137.2 ppm 處之峰、及約 121.5 ppm 處之峰。
3. 如請求項 2 之稱為形式 A-HCl 之 N-(4-(7-氮雜雙環 [2.2.1] 庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式 A-HCl 之特徵在於在 ^{13}C NMR 光譜中具有以下峰：約 163.7 ppm 處之峰、約 137.2 ppm 處之峰、及約 121.5 ppm 處之峰。
4. 如請求項 1 之稱為形式 A-HCl 之 N-(4-(7-氮雜雙環 [2.2.1] 庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式 A-HCl 之特徵在於在 ^{19}F NMR 光譜中具有一或多個選自由下列所組成之群之峰：

約 -57.0 ppm 處之峰及約 -60.5 ppm 處之峰。

5. 一種醫藥組合物，其包括如請求項 1 之稱為形式 A-HCl 之 N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，及醫藥上可接受之佐劑或載劑。

6. 一種稱為形式 B 之 N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式 B 之特徵在於在使用 Cu K α 輻射獲得的 X-射線粉末繞射中具有：約 6.7 度之峰、約 9.4 度之峰、約 11.2 度之峰、約 13.4 度之峰、約 15.2 度之峰、約 17.2 度之峰、約 17.8 度之峰、約 18.1 度之峰、約 19.2 度之峰、約 20.1 度之峰、約 21.2 度之峰、約 22.0 度之峰、約 24.0 度之峰、約 26.2 度之峰、約 27.2 度之峰、約 27.7 度之峰、及約 28.9 度之峰；或

其中該形式 B 之特徵在於其係單一晶體，具有單斜晶系、P2₁/c 空間群、及下列晶胞尺寸：

$$a = 13.5429(4) \text{ \AA},$$

$$b = 13.4557(4) \text{ \AA},$$

$$c = 12.0592(4) \text{ \AA},$$

$$\alpha = 90^\circ,$$

$$\beta = 101.193^\circ, \text{ 且}$$

$$\gamma = 90^\circ.$$

7. 如請求項 6 之稱為形式 B 之 N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫

喹啉-3-甲醯胺，其中該形式B之特徵在於在 ^{13}C NMR光譜中具有一或多個選自由下列所組成之群之峰：約165.3 ppm處之峰、約145.9 ppm處之峰、約132.9 ppm處之峰、及約113.4 ppm處之峰。

8. 如請求項7之稱為形式B之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式B之特徵在於在 ^{13}C NMR光譜中具有以下峰：約165.3 ppm處之峰、約145.9 ppm處之峰、約132.9 ppm處之峰、及約113.4 ppm處之峰。
9. 如請求項6之稱為形式B之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式B之特徵在於在 ^{19}F NMR光譜中具有一或多個選自由下列所組成之群之峰：約-56.1 ppm處之峰及約-62.1 ppm處之峰。
10. 一種醫藥組合物，其包括如請求項6之稱為形式B之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺、及醫藥上可接受之佐劑或載劑。
11. 一種稱為形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式B-HCl之特徵在於在使用Cu K α 輻射獲得的X-射線粉末繞射中具有：約8.3度之峰、約14.8度之峰、約16.7度之峰、約17.8度之峰、約18.0度之峰、約18.2度之峰、約21.7度之峰、約22.0度之峰、約

23.0度之峰、約23.6度之峰、約24.9度之峰、約25.2度之峰、約27.1度之峰、約31.1度之峰、及約38.5度之峰。

12. 如請求項11之稱為形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式B-HCl之特徵在於在¹³C NMR光譜中具有一或多個選自由下列所組成之群之峰：約168.2 ppm處之峰、約148.7 ppm處之峰、約138.8 ppm處之峰、約119.8 ppm處之峰、及約23.9 ppm處之峰。

13. 如請求項12之稱為形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式B-HCl之特徵在於在¹³C NMR光譜中具有以下峰：約168.2 ppm處之峰、約148.7 ppm處之峰、約138.8 ppm處之峰、約119.8 ppm處之峰、及約23.9 ppm處之峰。

14. 如請求項11之稱為形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺，其中該形式B-HCl之特徵在於在¹⁹F NMR光譜中具有一或多個選自由下列所組成之群之峰：約-55.6 ppm處之峰及約-62.0 ppm處之峰。

15. 一種醫藥組合物，其包括如請求項11之稱為形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺、及醫藥上可接受之佐劑或載劑。

16. 一種如請求項1至4、6至9或11至14中任一項之稱為形式

A-HCl、形式B或形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺或任何此等形式之組合於製造藥物之用途，該藥物係用於治療患者之疾病或減輕該疾病之嚴重程度，其中該疾病選自囊性纖維化、哮喘、慢性支氣管炎、鼻竇炎、便秘、胰腺炎、胰腺功能不全、由輸精管先天性雙側缺失(CBAVD)引起之男性不育、輕度肺疾病、過敏性支氣管肺麴菌病(ABPA)、肝病、遺傳肺氣腫、遺傳血色素沉著症、凝結-纖維蛋白溶解缺陷、I型遺傳性血管性水腫、脂質處理缺陷、溶酶體貯積病、II型克裏格勒-納賈爾病(Crigler-Najjar type II)、多重內分泌腺病、高胰島素血症、糖尿病、拉倫侏儒症(Laron dwarfism)、髓過氧化物酶缺陷、原發性甲狀旁腺功能減退、黑素瘤、I型心包積液CDG、先天性甲狀腺機能亢進、成骨不全、遺傳性低纖維蛋白原血症、ACT缺陷、尿崩症、夏-馬-圖三氏症候群(Charcot-Marie Tooth syndrome)、佩-梅二氏病(Perlizaesus-Merzbacher disease)、神經變性疾病多麩胺醯胺神經性病、法布裏病(Fabry disease)、格斯特曼-施特勞斯納症候群(Straussler-Scheinker syndrome)、COPD、乾眼病、薛格連氏病(Sjogren's disease)、骨質疏鬆症、骨質減少、骨癒合、骨生長、戈漢症候群(Gorham's Syndrome)、氯離子通道病變、III型巴特氏症候群(Bartter's syndrome type III)、登特氏病(Dent's disease)、過度驚嚇症、癲癇症、

安琪曼氏症候群(Angelman syndrome)、及具有左右轉位之原發性纖毛運動障礙、不具有左右轉位之原發性纖毛運動障礙、及纖毛不發育。

17. 如請求項16之用途，其中該疾病係囊性纖維化。
18. 一種如請求項1至4、6至9或11至14中任一項之稱為形式A-HCl、形式B或形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺或任何此等形式之組合於製造藥物之用途，該藥物係用於治療患者之疾病或減輕該疾病之嚴重程度，其中該疾病與由編碼CFTR之基因突變或環境因素引起之CFTR功能減小有關，及其中該疾病係囊性纖維化、慢性支氣管炎、復發性支氣管炎、急性支氣管炎、由輸精管先天性雙側缺失(CBAVD)引起之男性不育、由子宮及陰道先天性缺失(CAUV)引起之女性不育、特發性慢性胰腺炎(ICP)、特發性復發性胰腺炎、特發性急性胰腺炎、慢性鼻竇炎、原發性硬化性膽管炎、糖尿病、乾眼、便秘、過敏性支氣管肺麴菌病(ABPA)、骨疾病、及哮喘。
19. 一種如請求項1至4、6至9或11至14中任一項之稱為形式A-HCl、形式B或形式B-HCl之N-(4-(7-氮雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺或任何此等形式之組合於製造藥物之用途，該藥物係用於治療患者之疾病或減輕該疾病之嚴重程度，其中該疾病與正常CFTR功能有關。

20. 如請求項19之用途，其中該疾病係慢性阻塞性肺疾病(COPD)、慢性支氣管炎、復發性支氣管炎、急性支氣管炎、鼻竇炎、慢性胰腺炎、復發性胰腺炎、及急性胰腺炎、胰腺功能不全、由輸精管先天性雙側缺失(CBAVD)引起之男性不育、輕度肺疾病、特發性胰腺炎、肝病、遺傳肺氣腫、膽結石、胃食道逆流疾病、胃腸道惡性腫瘤、炎性腸病、便秘、糖尿病、關節炎、骨質疏鬆症、及骨質減少。
21. 如請求項19之用途，其中該疾病係遺傳血色素沉著症、凝結-纖維蛋白溶解缺陷、I型遺傳性血管性水腫、脂質處理缺陷溶酶體貯積病、II型克裏格勒-納賈爾病、多重內分泌腺病、高胰島素血症、糖尿病、拉倫侏儒症、髓過氧化物酶缺陷、原發性甲狀旁腺功能減退、黑素瘤、I型心包積液CDG、先天性甲狀腺機能亢進、成骨不全、遺傳性低纖維蛋白原血症、ACT缺陷、尿崩症、夏-馬-圖三氏症候群、佩-梅二氏病、神經變性疾病、多麩胺醯胺神經性病、海綿樣腦病、法布裏病、格斯特曼-施特勞斯納症候群、戈漢症候群、氯離子通道病變、III型巴特氏症候群、登特氏病、過度驚嚇症、癲癇症、安琪曼氏症候群、具有左右轉位之原發性纖毛運動障礙、不具有左右轉位之原發性纖毛運動障礙、纖毛不發育、或薛格連氏病。
22. 一種調節生物試樣中之CFTR活性之活體外方法，其包括以下步驟：使該CFTR與如請求項1至4、6至9或11至14中

任一項之稱為形式 A-HCl、形式 B 或形式 B-HCl 之 N-(4-(7-氯雜雙環[2.2.1]庚烷-7-基)-2-(三氟甲基)苯基)-4-酮基-5-(三氟甲基)-1,4-二氫喹啉-3-甲醯胺、或該等形式之任一組合接觸。

23. 如請求項 17 之用途，其中該患者擁有具有同型合子 $\Delta F508$ 突變之囊性纖維化跨膜受體(CFTR)。

24. 如請求項 17 之用途，其中該患者擁有具有同型合子 G551D 突變之囊性纖維化跨膜受體(CFTR)。

25. 如請求項 17 之用途，其中該患者擁有具有異型合子 $\Delta F508$ 突變之囊性纖維化跨膜受體(CFTR)。

26. 如請求項 17 之用途，其中該患者擁有具有異型合子 G551D 突變之囊性纖維化跨膜受體(CFTR)。

27. 如請求項 16 或 21 之用途，其中該凝結-纖維蛋白溶解缺陷係蛋白質 C 缺陷。

28. 如請求項 16 或 21 之用途，其中該脂質處理缺陷係家族性高膽固醇血症、1 型乳糜微粒血症、或無 β 脂蛋白血症。

29. 如請求項 16 或 21 之用途，其中該溶酶體貯積病係 I 細胞疾病、假何勒氏病(pseudo-Hurler)、黏多糖累積病、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、或泰-薩克斯病(Tay-Sachs disease)。

30. 如請求項 16 或 21 之用途，其中該尿崩症係神經生長板尿崩症或腎源性尿崩症。

31. 如請求項 16 或 21 之用途，其中該神經變性疾病係阿爾茨海默病(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's

disease)、肌萎縮側索硬化、進行性核上性麻痺、或皮克病(Pick's disease)。

32. 如請求項16或21之用途，其中該多麩胺醯胺神經性病係亨廷頓氏病(Huntington's)、I型脊髓小腦性共濟失調、脊髓延髓肌肉萎縮症、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症、或營養不良性肌強直。

33. 如請求項16或21之用途，其中該海綿樣腦病係遺傳性克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)。

34. 如請求項16或21之用途，其中該氯離子通道病變係Thomson型先天性肌強直或Becker型先天性肌強直。

35. 如請求項16之用途，其中該骨癒合及/或骨生長係選自骨修復、骨再生、減少骨吸收及增加骨沈積。

36. 如請求項16之用途，其中該COPD係煙霧誘導性COPD。

37. 如請求項16之用途，其中該胰腺炎係特發性胰腺炎。

八、圖式：

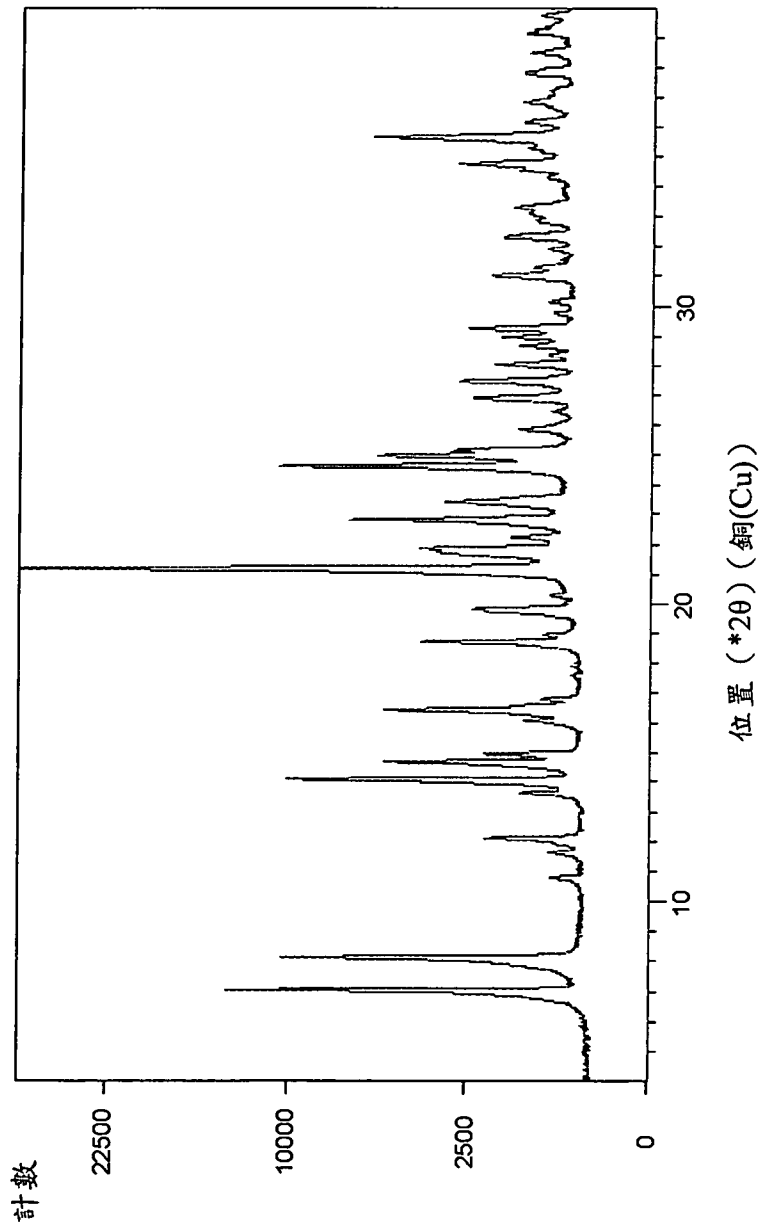


圖 1

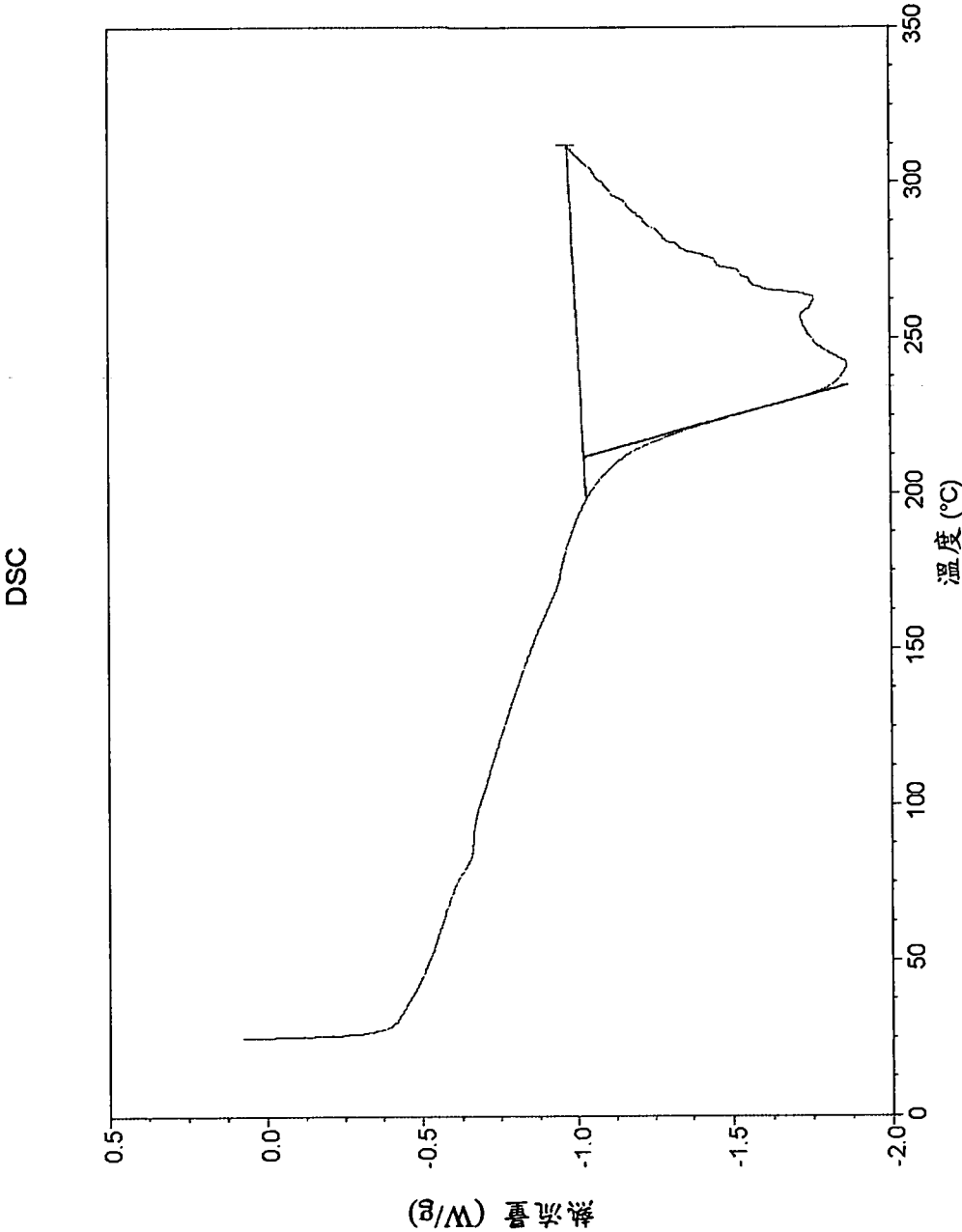


圖2

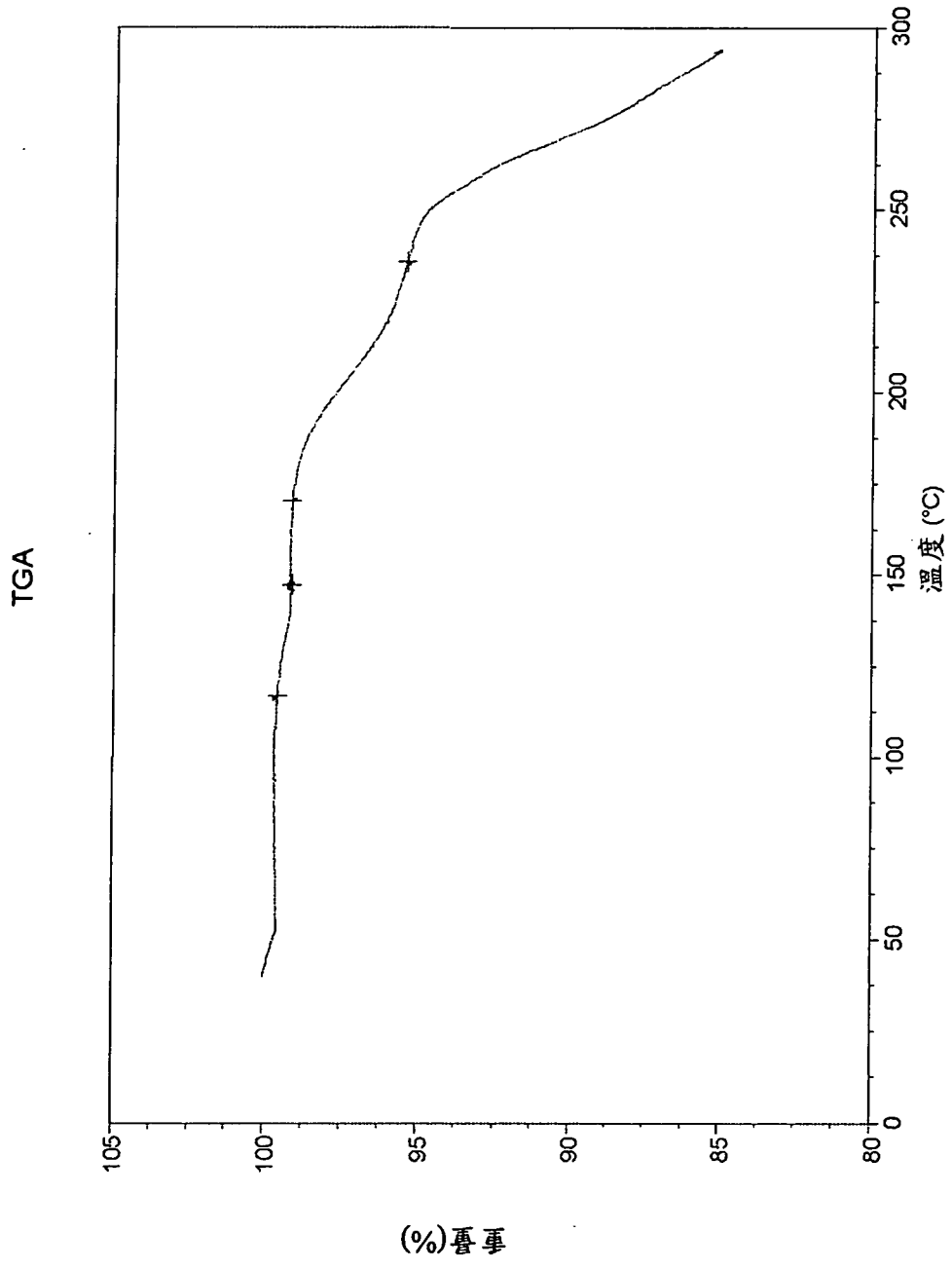


圖3

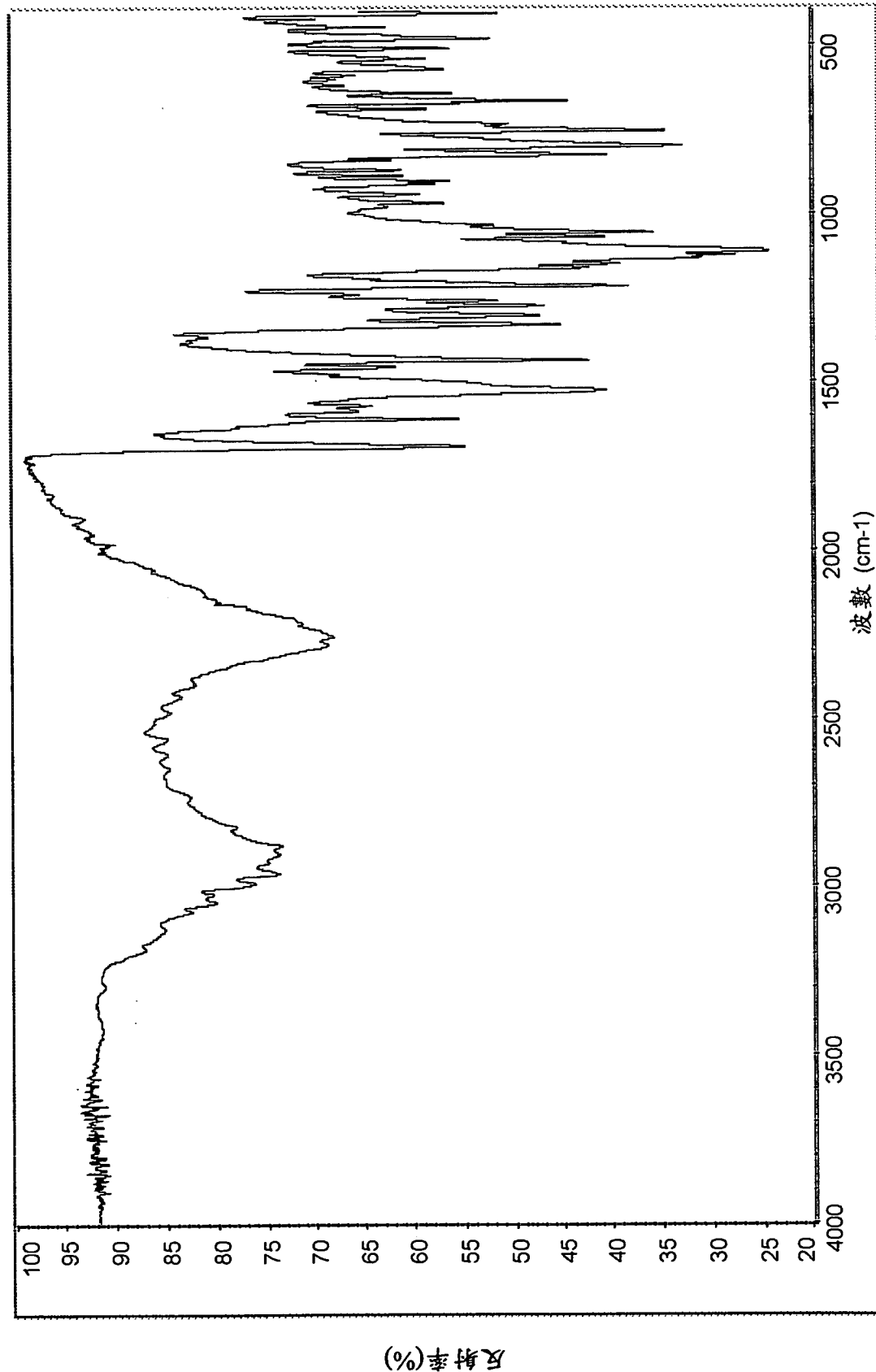


圖4

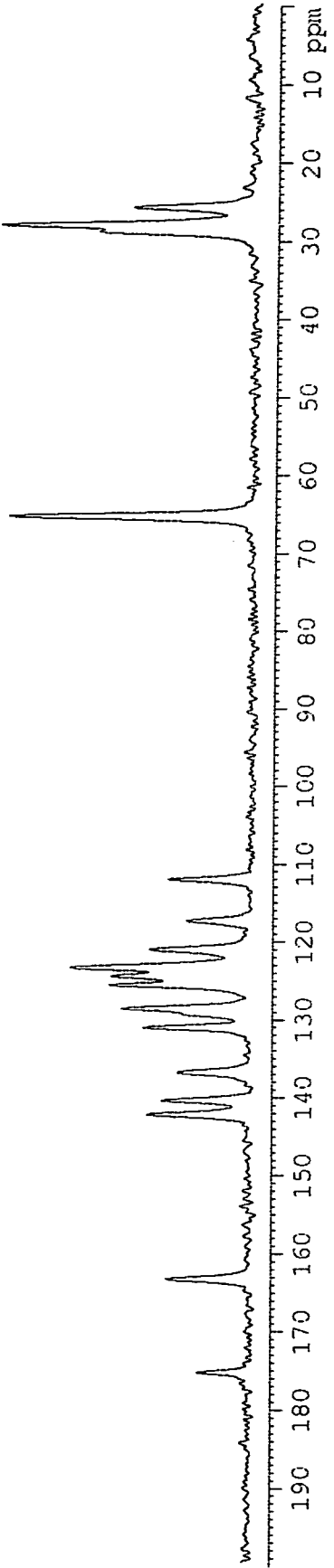


圖 5

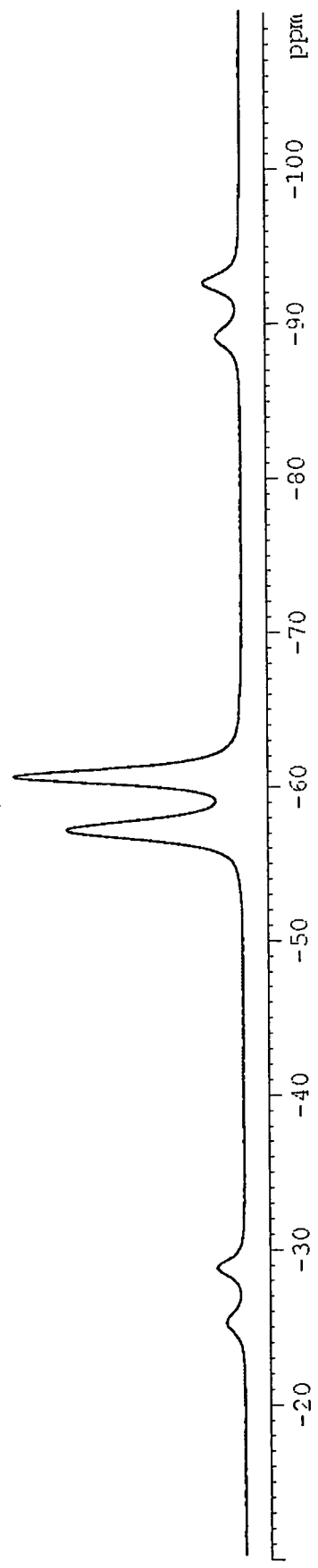


圖6

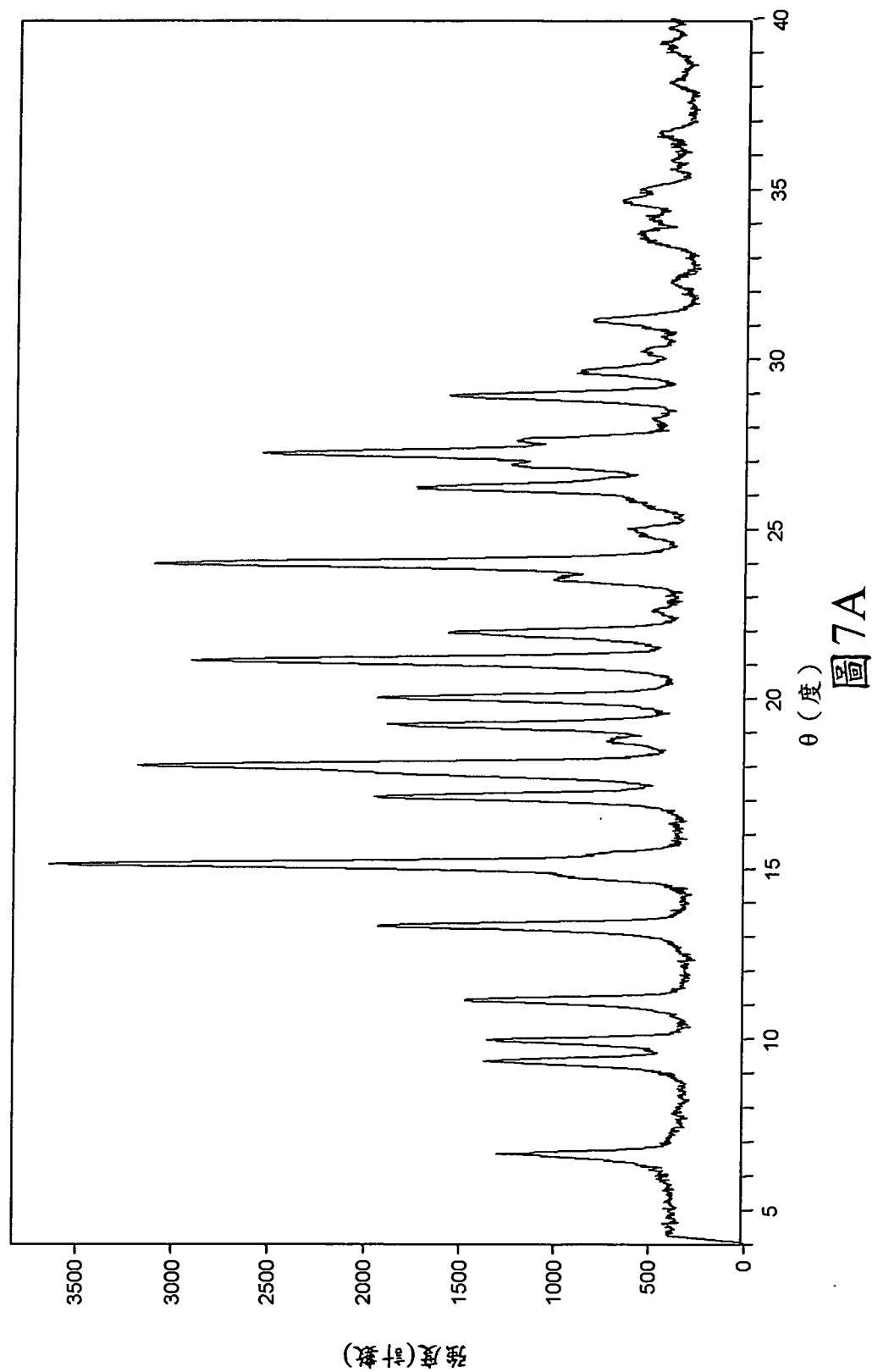


圖7A

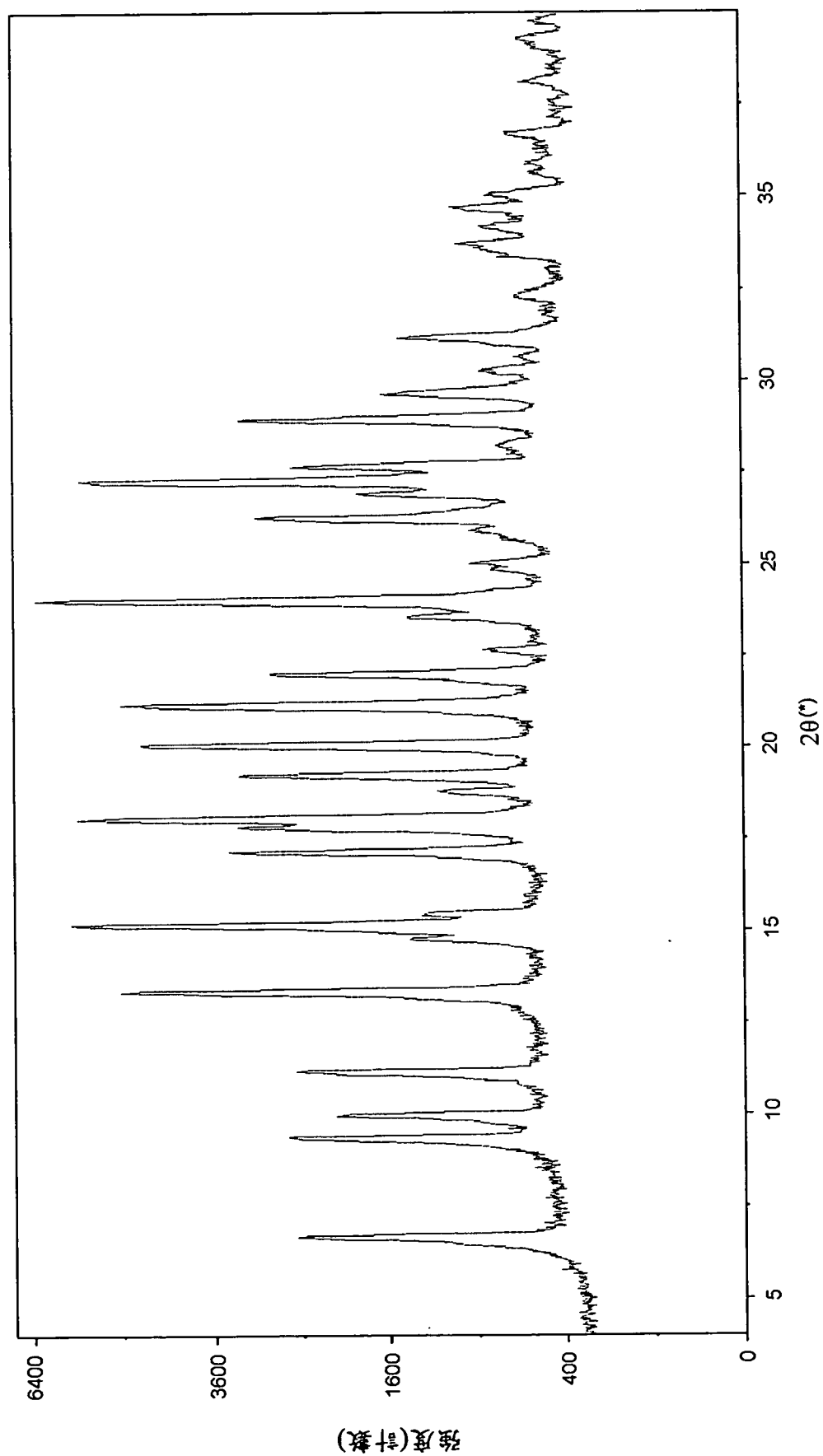


圖7B

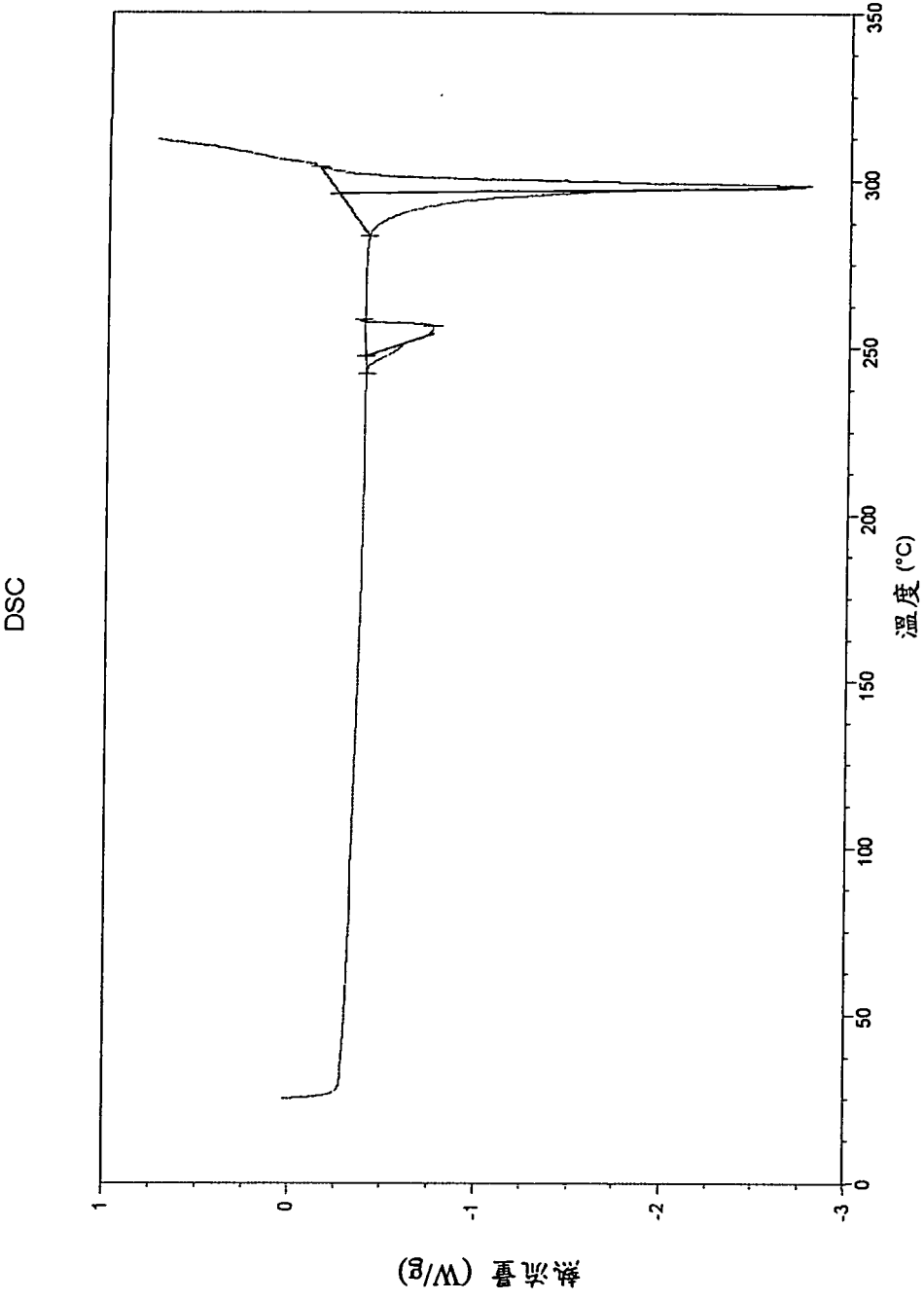


圖8

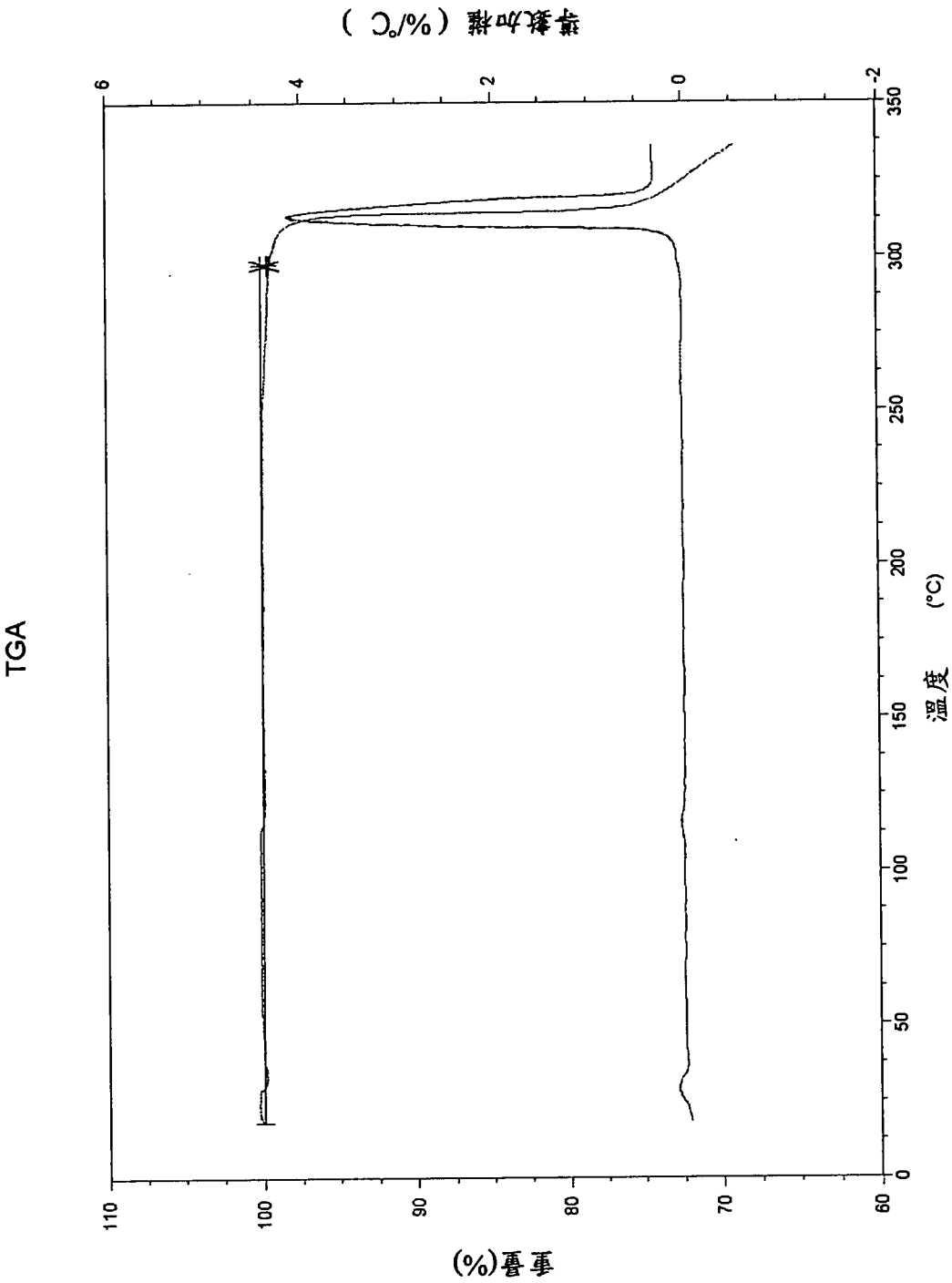


圖9

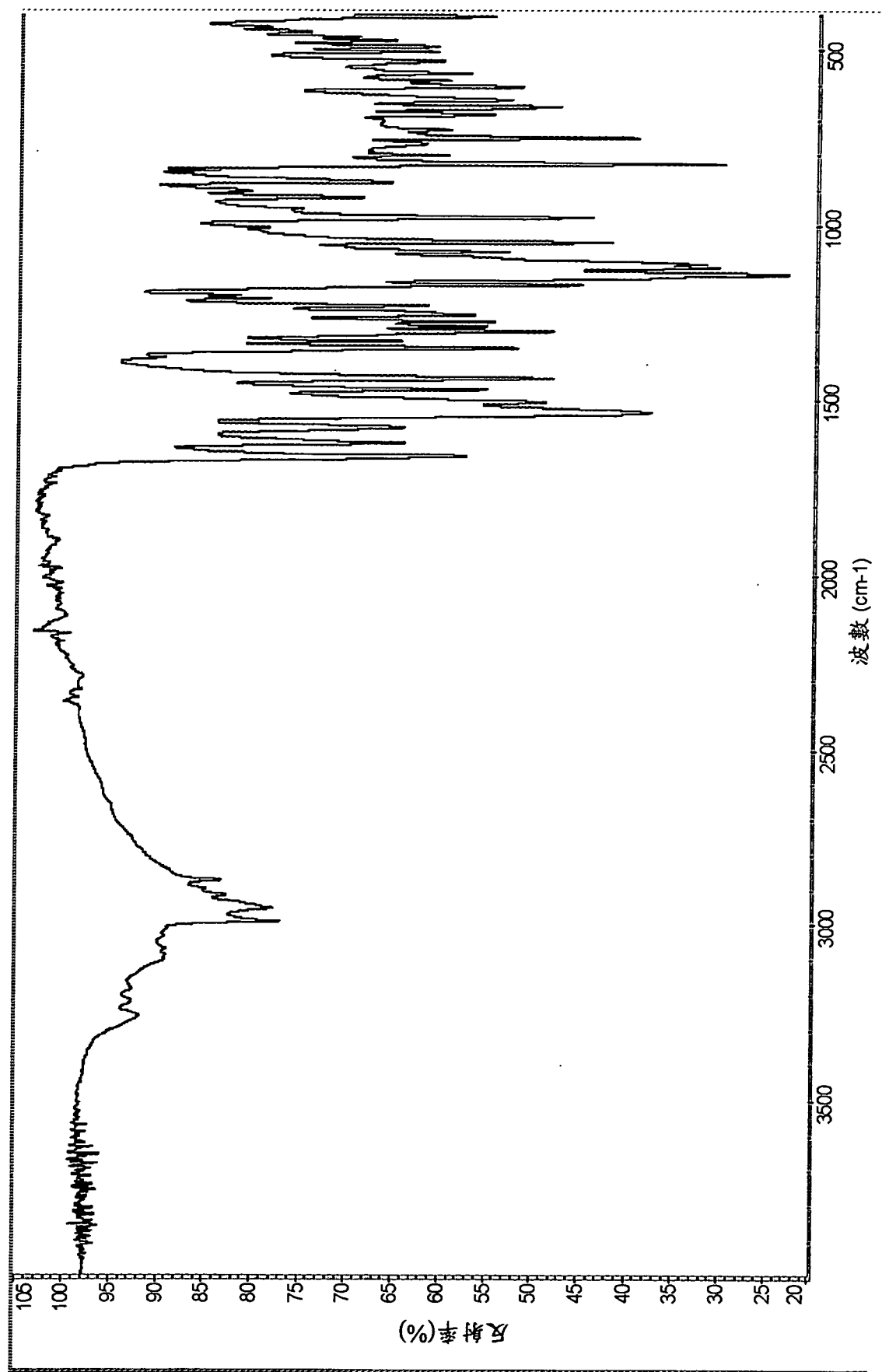


圖 10

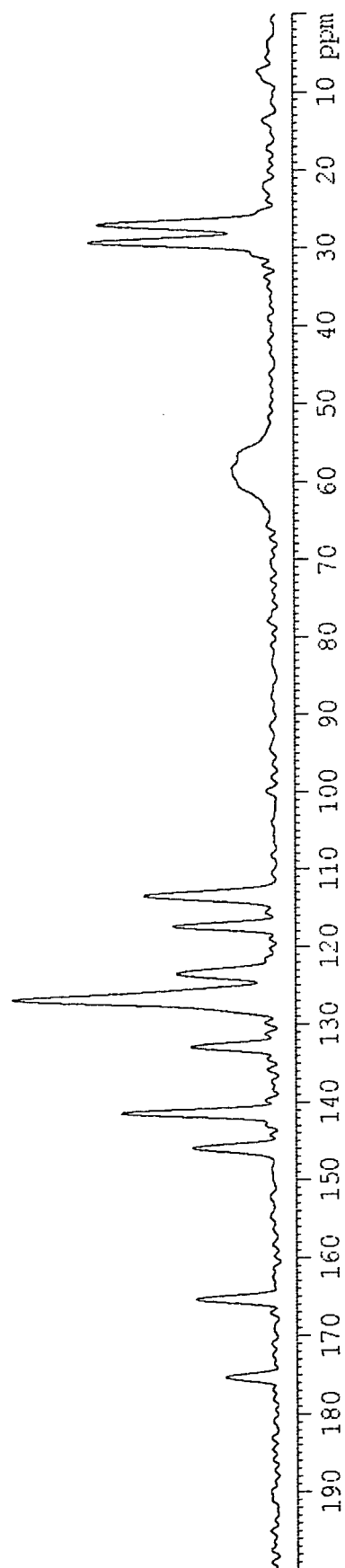


圖 11

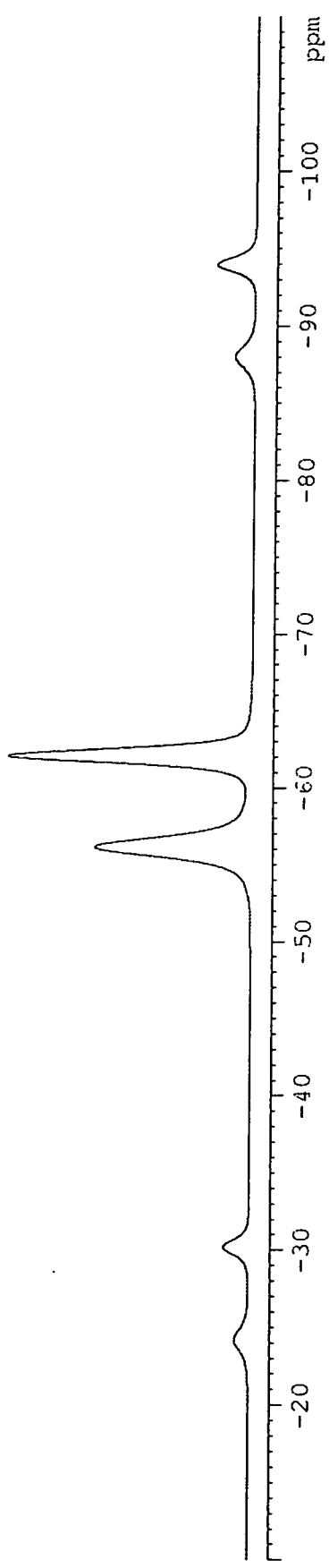


圖12

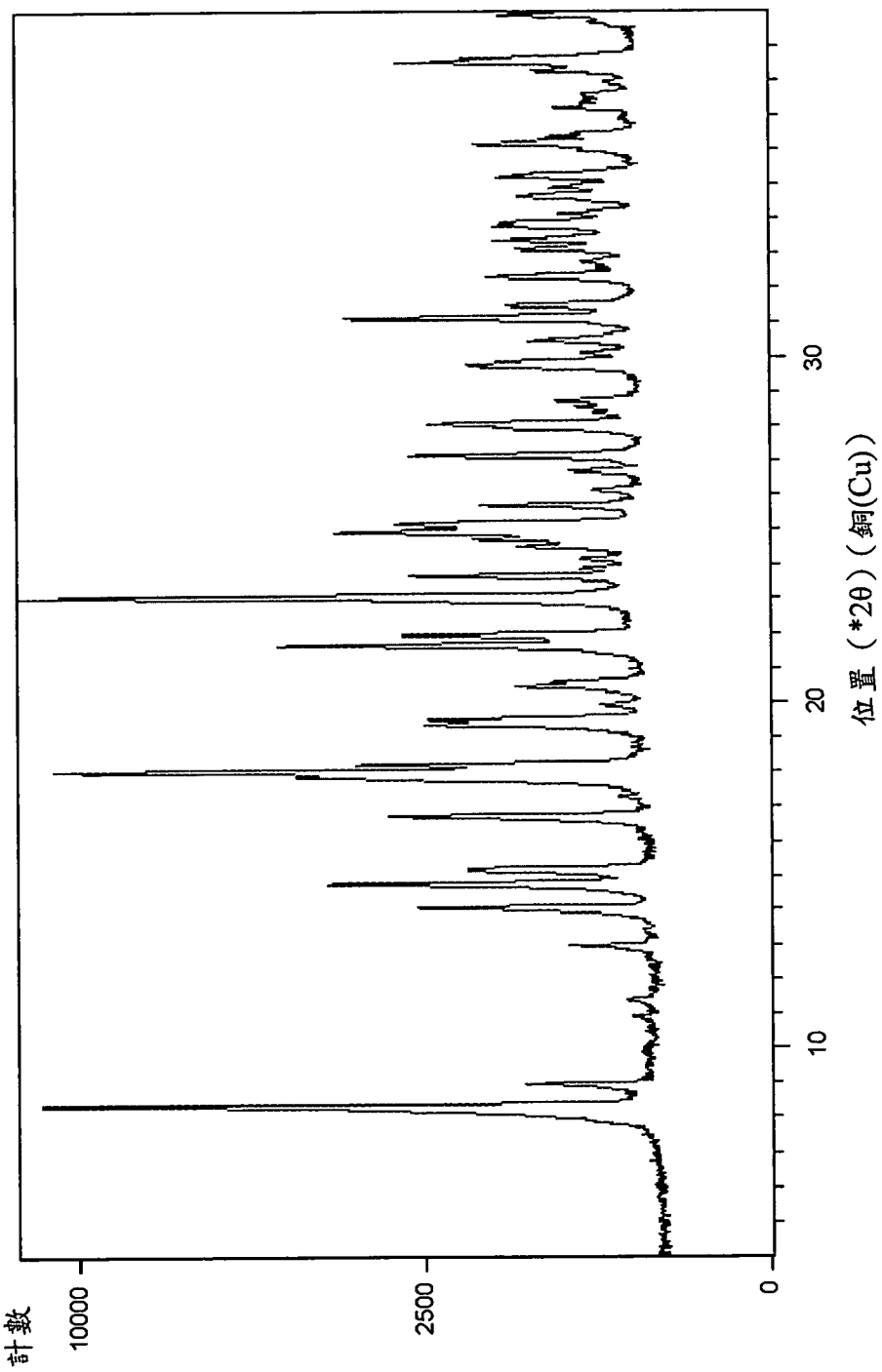


圖13

DSC

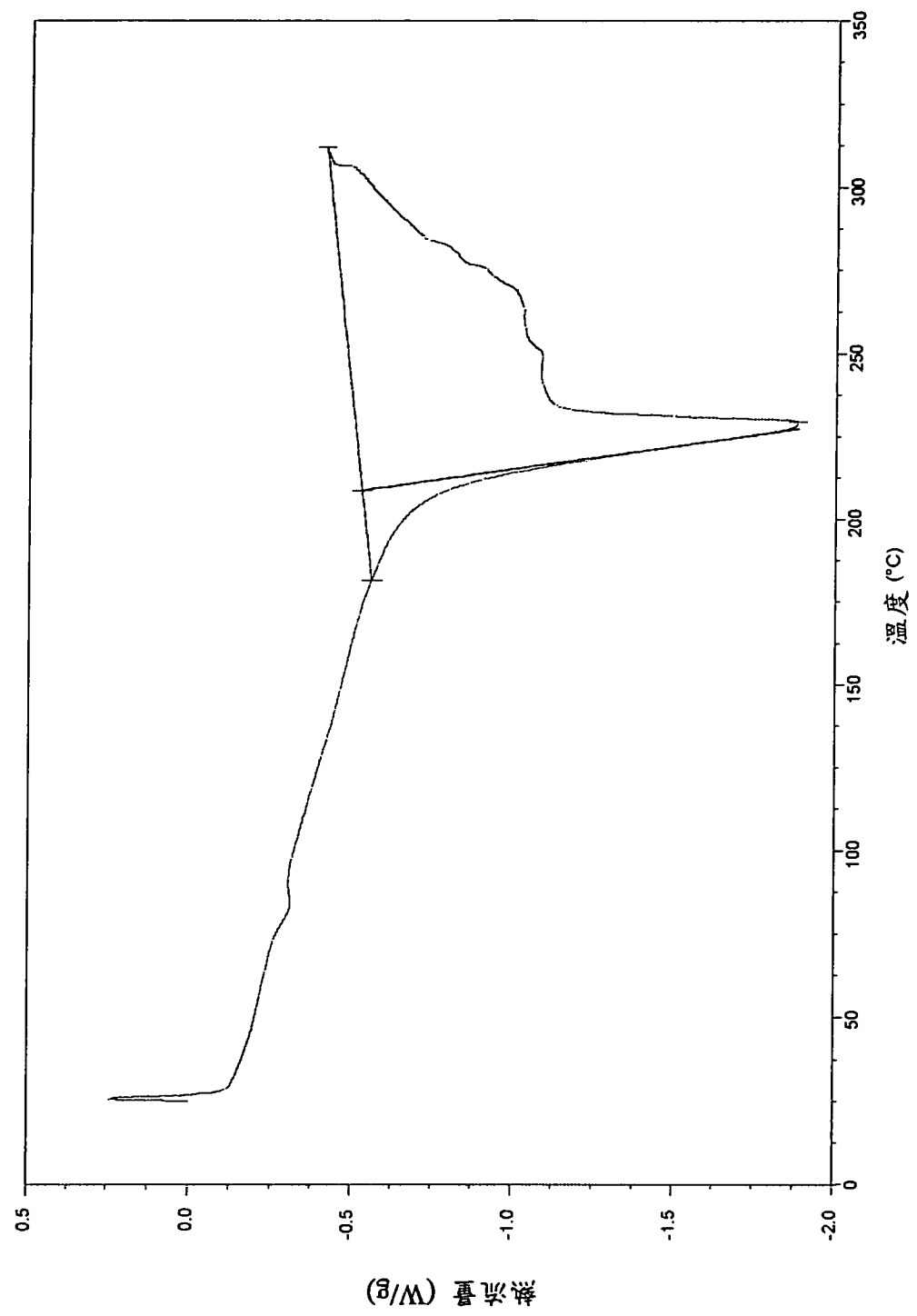


圖14

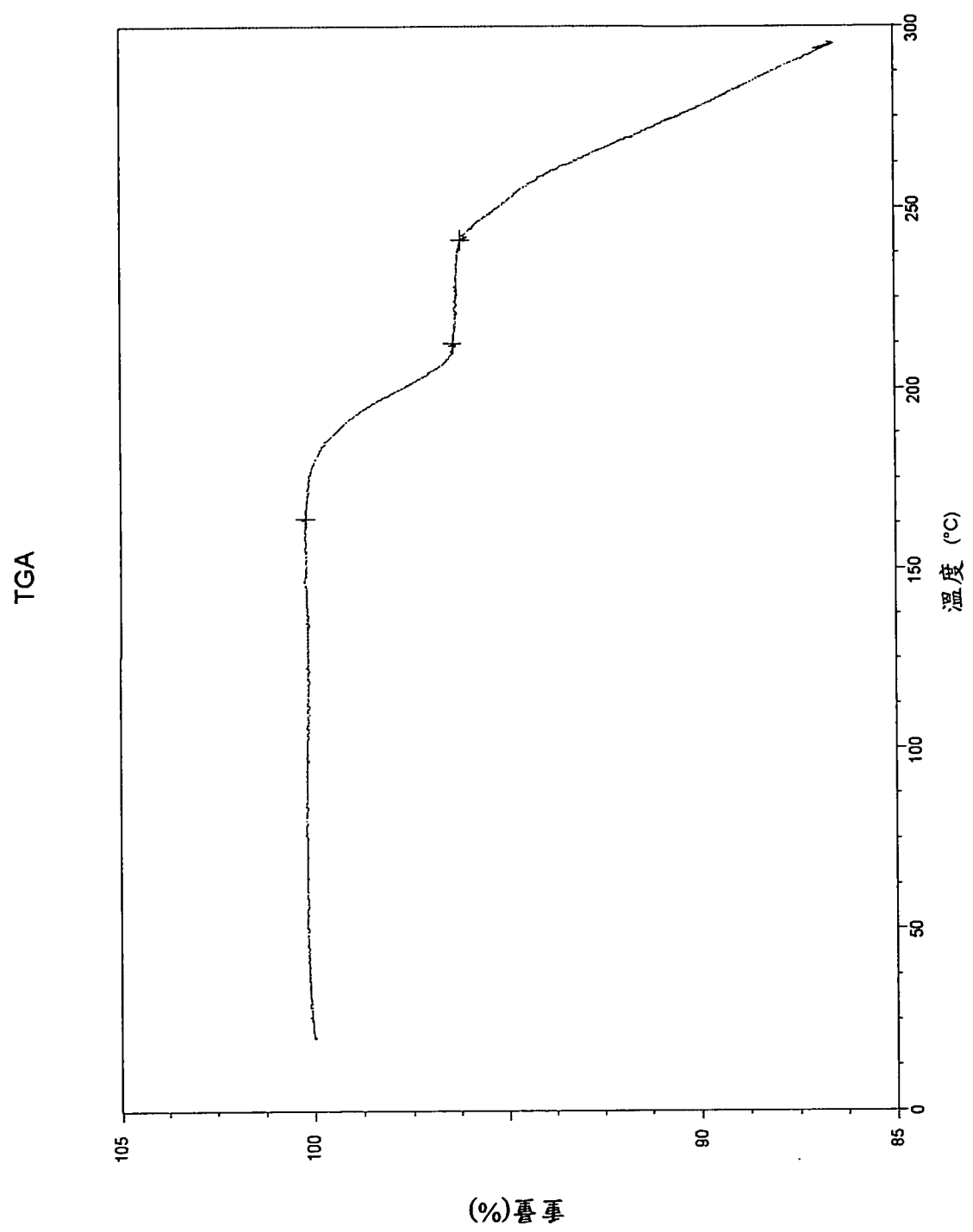


圖15

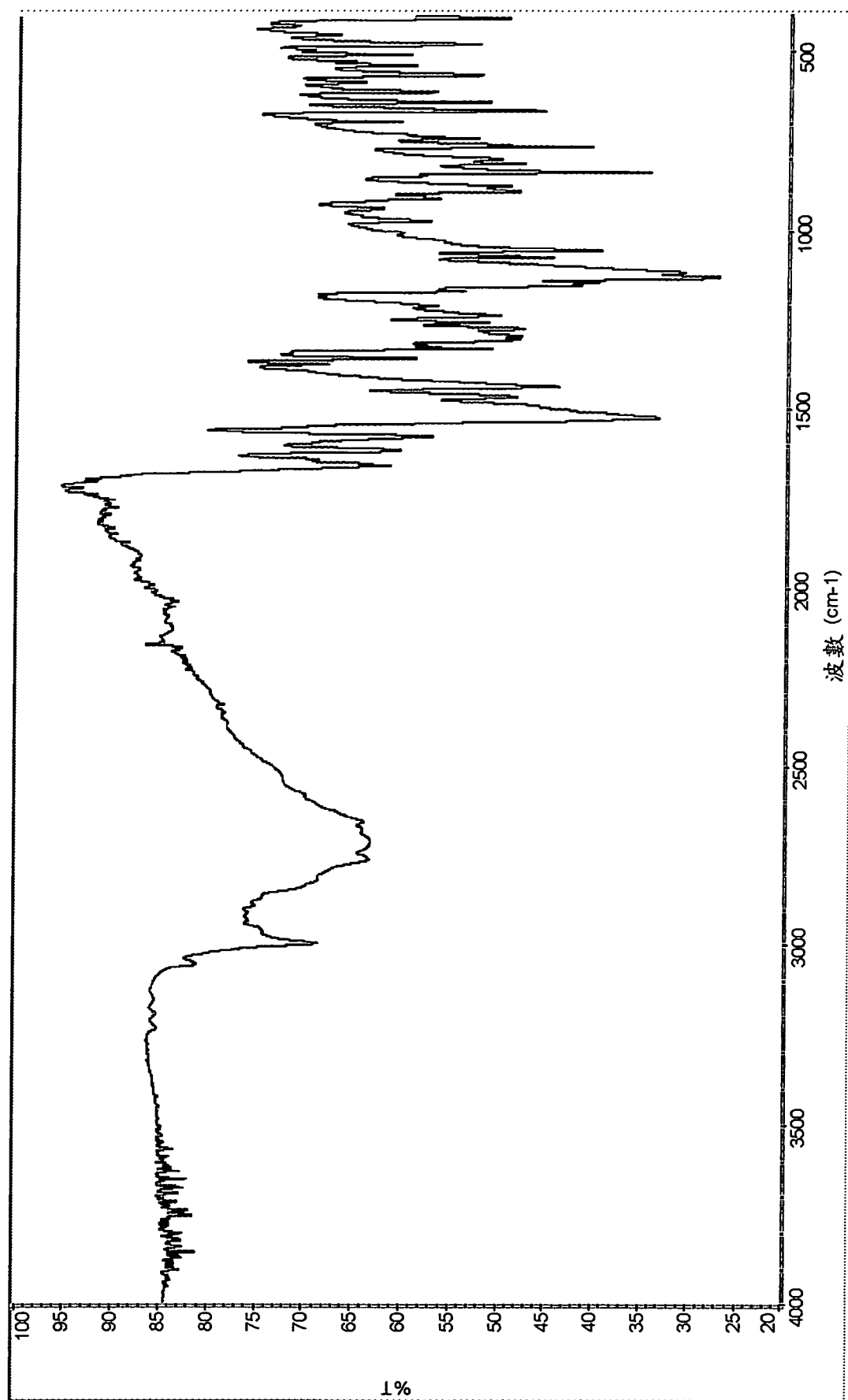


圖16

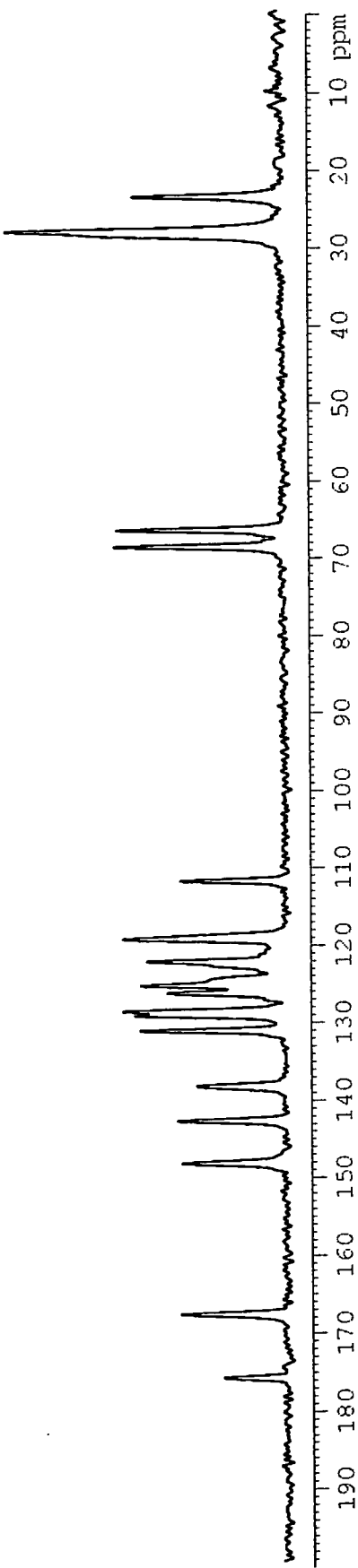


圖17

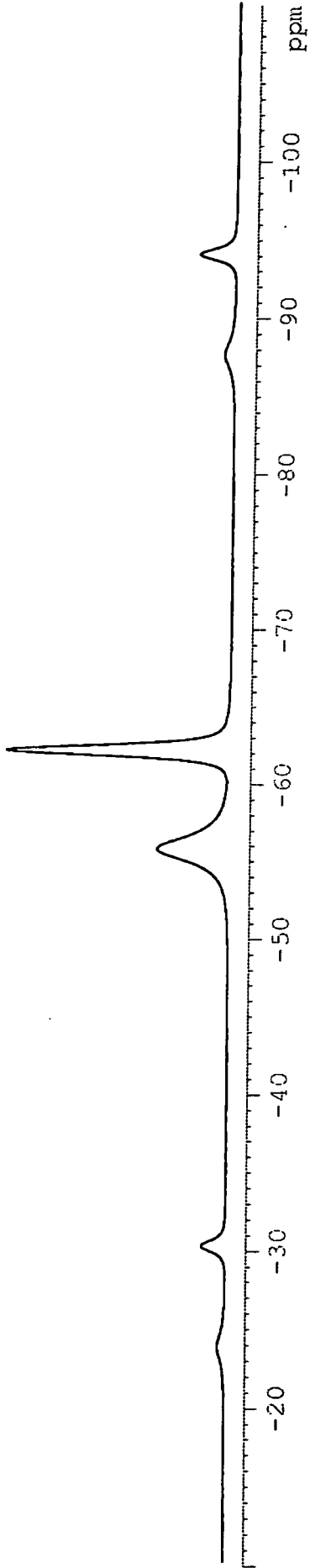


圖18

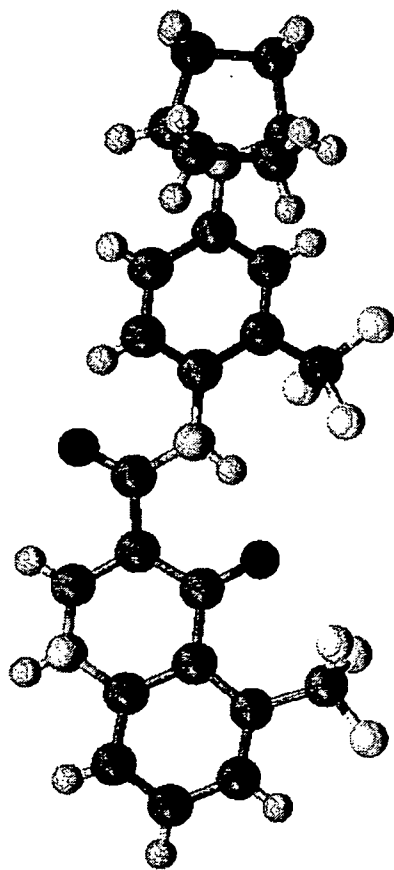


圖19

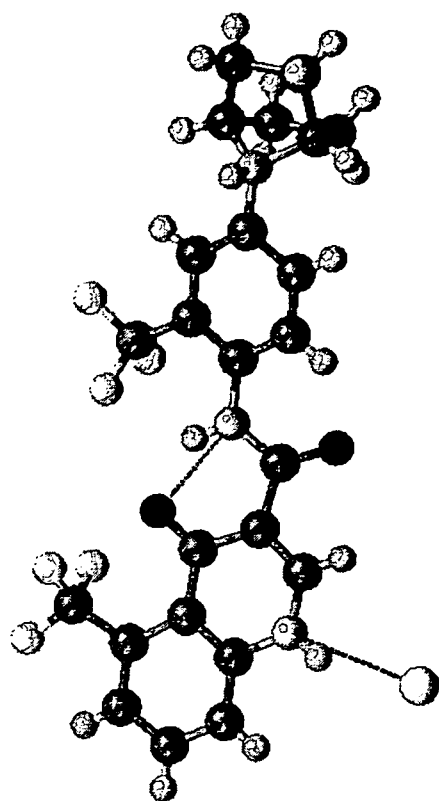


圖20

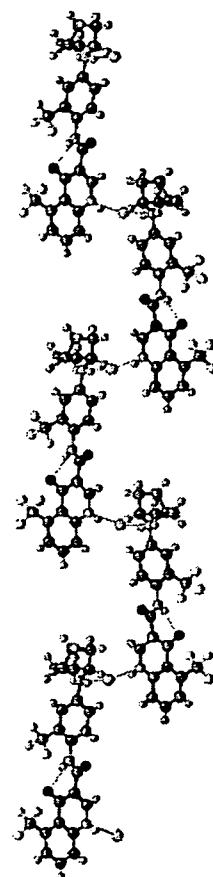


圖21

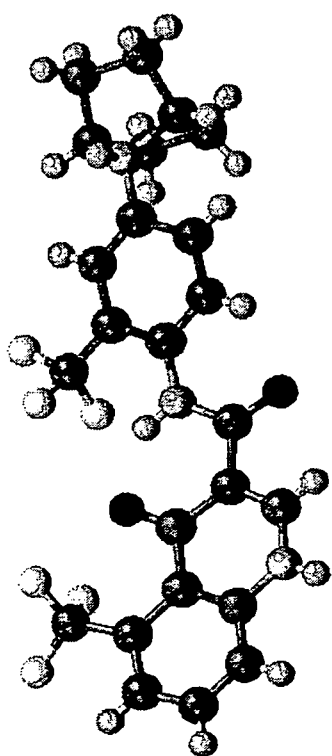


圖22

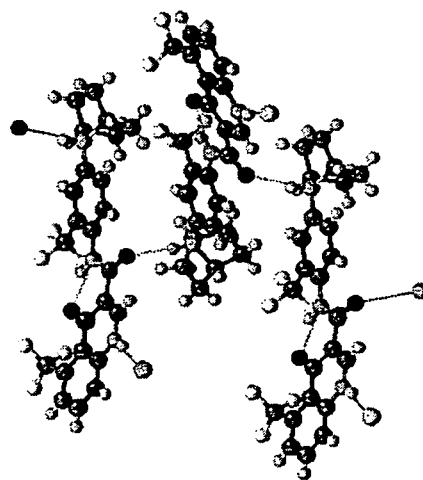


圖23