



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111671751 A

(43)申请公布日 2020.09.18

(21)申请号 202010527346.2

(22)申请日 2013.11.01

(30)优先权数据

61/721,622 2012.11.02 US

61/728,328 2012.11.20 US

61/770,668 2013.02.28 US

61/824,005 2013.05.16 US

61/840,668 2013.06.28 US

(62)分案原申请数据

201380066317.9 2013.11.01

(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 M·J·沃维耶斯 R·卡尔卡里

M·D·摩尔

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 李华英

(51)Int.Cl.

A61K 31/47(2006.01)

A61K 9/20(2006.01)

A61K 9/16(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

A61K 31/443(2006.01)

权利要求书2页 说明书80页 附图8页

(54)发明名称

用于治疗CFTR介导的疾病的药物组合物

(57)摘要

公开了包含3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(化合物1)形式I和包含基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的固体分散体的药物组合物;治疗CFTR介导的疾病例如囊性纤维化、减轻其严重性或对症治疗它们的方法;其施用方法和药盒。

1. 药物组合物, 包含: 200mg 的 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(化合物1)的形式I和包含基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的固体分散体;

其中所述药物组合物包含125mg 的基本上无定形的化合物2。

2. 片剂, 包含: 固定剂量的 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(化合物1)的形式I和包含基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的固体分散体;

其中所述片剂包含25-50%重量的化合物1形式I和15-35%重量的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体。

3. 药物组合物, 包含:

(a) 约100mg 的 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(化合物1)的形式I和约125mg 的基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2);

(b) 约150mg 的化合物1的形式I和约200mg 的基本上无定形的化合物2; 或

(c) 约75mg 的化合物1的形式I和约100mg 的基本上无定形的化合物2。

4. 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(化合物1)的形式I和基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)在制备用于治疗患者囊性纤维化的药物中的用途, 其中所述药物以每天800mg 的化合物1的形式I和500mg 的基本上无定形的化合物2的量向患者给药。

5. 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(化合物1)的形式I和基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)在制备用于治疗患者囊性纤维化的药物中的用途, 其中所述药物以每天400mg 的化合物1的形式I和500mg 的基本上无定形的化合物2的量向患者给药。

6. 制备药物组合物的方法, 包括对如下成分进行湿法制粒:

a. 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(化合物1)的形式I;

b. 包含基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的固体分散体;

c. 填充剂;

d. 崩解剂;

e. 表面活性剂; 和

f. 粘合剂。

7. 制备片剂的方法, 包括对如下成分进行压制:

i) 包含如下成分的多颗粒药物组合物:

a. 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(化合物1)的形式I;

b. 包含基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺

(化合物2)的固体分散体;

- c. 填充剂;
- d. 崩解剂;
- e. 表面活性剂;和
- f. 粘合剂;
- ii) 崩解剂;
- iii) 填充剂;和
- iv) 润滑剂。

8. 制备片剂的连续方法,包括:

a) 在共混机中混合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(化合物1)的形式I、包含基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的固体分散体、填充剂和崩解剂以形成共混物;

b) 用水、粘合剂和表面活性剂制备制粒液;

c) 在添加得自步骤b)的所述制粒液的同时将得自步骤a)的所述共混物进料入连续双螺杆制粒机以产生颗粒;

d) 对得自步骤c)的所述颗粒进行干燥并研磨它们;

e) 将得自步骤d)的研磨后的颗粒与填充剂、崩解剂和润滑剂共混以形成共混物;和

f) 将得自步骤e)的所述共混物压成片剂。

## 用于治疗CFTR介导的疾病的药物组合物

[0001] 本申请是申请号为201380066317.9 (PCT/US2013/067952)、申请日为2013年11月1日、发明名称为“用于治疗CFTR介导的疾病的药物组合物”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求如下美国临时专利申请顺序号的优先权：2012年11月2日提交的61/721,622；2012年11月20日提交的61/728,328；2013年2月28日提交的61/770,668；2013年5月16日提交的61/824,005；和2013年6月28日提交的61/840,668，将所有这些申请的内容完整地引入本文参考。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及包含3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸(化合物1)的形式I和包含基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的固体分散体的药物组合物、治疗方法、制备方法、施用方法及其药盒。

### 背景技术

[0005] 囊性纤维化(CF)是一种隐性遗传疾病,其在美国影响大约30,000儿童和成年人,并在欧洲影响大约30,000儿童和成年人。尽管CF的治疗取得了进展,仍然不可治愈。

[0006] 在患有CF的患者中,在呼吸上皮细胞中内源性表达的CFTR突变引起顶端阴离子分泌减少,引起离子和流体转运失衡。所引起的阴离子转运减少促进肺中的粘液蓄积增加,以及伴随的微生物感染,其最终导致CF患者死亡。除了呼吸疾病以外,CF患者典型地还遭受胃肠问题和胰腺功能不全的痛苦,其如果不经治疗,会导致死亡。另外,大多数患有囊性纤维化的男性不能生育,而患有囊性纤维化的女性生育力下降。与两个拷贝CF相关基因的严重效应相反,带有单拷贝CF相关基因的个体表现出对霍乱和因腹泻所致脱水的抗性的增加—也许这解释了人群中相对高频率的CF基因的原因。

[0007] CF染色体的CFTR基因的序列分析已经揭示多种致病性突变(Cutting,G.R.等人(1990)Nature346;366-369;Dean,M.等人(1990)Cell161;863;870;和Kerem,B-S.等人(1989)Science245;1073-1080;Kerem,B-S等人(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA87;8447-8451)。迄今为止,已鉴定了CF基因中超过1000个致病性突变(<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>)。最普遍的突变是CFTR氨基酸序列的508位苯丙氨酸的缺失,通常将其称为 $\Delta F508$ -CFTR。这种突变发生在大约70%的囊性纤维化病例中,并与严重的疾病相关联。

[0008]  $\Delta F508$ -CFTR中508位残基的缺失阻止了新生蛋白的正确折叠。这导致该突变蛋白不能退出ER和转运至质膜。其结果是,膜中存在的通道数量远少于在表达野生型CFTR的细胞中所观察到的数量。除了转运受损外,这种突变导致缺陷性通道门控。合起来,膜中通道数量的减少和缺陷性门控导致通过上皮的阴离子转运减少,导致缺陷性离子和流体转运。

(Quinton, P.M. (1990), FASEB J. 4; 2709-2727)。然而, 研究表明, 膜中  $\Delta$ F508-CFTR 数量的减少是功能性的, 尽管其比野生型 CFTR 少。(Dalemans 等人 (1991), Nature Lond. 354; 526-528; Denning 等人, 同上; Pasyk 和 Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270; 12347-50)。除  $\Delta$ F508-CFTR 之外, CFTR 中导致缺陷性转运、合成和/或通道门控的其它引起疾病的突变可被上调或下调以改变阴离子分泌, 并且改变疾病进程和/或严重性。

[0009] 盐的形式的化合物 1 在国际 PCT 公开号 W02007056341 和美国专利号 US7, 741, 321 中被公开为 CFTR 活性的诱导剂, 且由此作为用于 CFTR-介导的疾病例如囊性纤维化的有用的治疗手段。化合物 1 形式 I 基本上是结晶和不含盐的形式, 其公开在国际 PCT 公开号 W02009073757 和美国专利号 US8, 507, 534 中。化合物 2 在国际 PCT 公开号 W02006002421 和美国专利号 US7, 495, 103 中被公开作为 CFTR 活性的诱导剂, 且作为用于 CFTR-介导的疾病例如囊性纤维化的有用的治疗手段。包含基本上无定形的化合物 2 的固体分散体公开在国际 PCT 公开号 W02010019239 和美国公布的专利申请号 US20100074949 中。将所有上述申请和专利作为参考的形式完整地并入本文。

[0010] 已经证实为 CFTR 增效剂 (例如化合物 2) 的化合物和为 CFTR 纠正剂 (例如化合物 1) 的化合物独立地具有在治疗 CFTR 相关疾病 (例如囊性纤维化) 中的用途。

[0011] 因此, 对于涉及 CFTR 纠正剂和增效剂化合物的 CFTR 介导的疾病的新治疗方法存在需求。

[0012] 具体地, 对于包括 CFTR 增效剂和纠正剂化合物的治疗 CFTR 介导的疾病 (例如囊性纤维化) 的联合疗法存在需求。

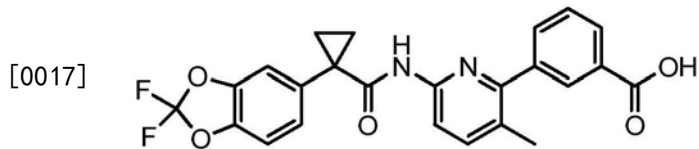
[0013] 更具体地, 对于治疗 CFTR 介导的疾病 (例如囊性纤维化) 的联合疗法存在需求, 所述联合疗法包括 CFTR 增效剂化合物 (例如基本上无定形的化合物 2) 与 CFTR 纠正剂化合物 (例如化合物 1 形式 I) 的组合。

[0014] 作为与化合物 2 的组合的一部分的化合物 1 已被美国食品和药物监督管理局 (FDA) 授予用于治疗囊性纤维化的突破性疗法认定, 它是在提交本申请时仅有的两个此类授予中的一个 (另一个为化合物 2)。这表明对于通过对症治疗而对囊性纤维化的原因进行有效治疗存在显著的尚未满足的需求。另外, 经 FDA 批准的药物的共同挑战是对于有需要的患者而言有时无药可用。因此, 对于目前公开的化合物 1 和化合物 2 制剂以及以连续和受控的方式制备它们的工艺存在明显尚未满足的需求。

[0015] 另外, 对治疗方案和剂量具有依从性的患者主要依赖于药物易于施用。包含固定剂量的 CFTR 纠正剂和 CFTR 增效剂的药物组合物对于治疗 CFTR 介导的疾病、例如囊性纤维化而言是显著的突破, 其中所述纠正剂和增效剂的固体形式是稳定的。

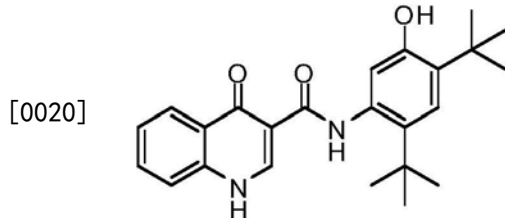
## 发明内容

[0016] 本发明的特征在于: 药物组合物, 其包含: 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸, 即化合物 1 形式 I, 其具有如下结构:



[0018] 化合物1;和

[0019] 固体分散体的基本上无定形的N-(5-羟基-2,4-二叔丁基-苯基)-4-氧代-1H-喹啉-3-甲酰胺,即化合物2,其具有如下结构:



[0021] 化合物2;

[0022] 所述药物组合物的治疗方法;制备方法;施用方法;及其药盒。

[0023] 在一个方面,本发明的特征在于药物组合物,其包含:

[0024] a. 化合物1形式I;

[0025] b. 包含基本上无定形的化合物2的固体分散体;

[0026] c. 填充剂;

[0027] d. 崩解剂;

[0028] e. 表面活性剂;和

[0029] f. 粘合剂;

[0030] 称作PC-I。

[0031] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物包含30—55重量百分比的化合物1形式I和10—45重量百分比的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体。

[0032] 在一个实施方案中,所述填充剂选自纤维素、改性纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、羟甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、醋酸纤维素、微晶纤维素、磷酸氢钙、蔗糖、乳糖、玉米淀粉、马铃薯淀粉或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述填充剂是微晶纤维素且存在量为10—20重量百分比。

[0033] 在一个实施方案中,所述崩解剂选自琼脂、藻类、碳酸钙、羧甲基纤维素、纤维素、羟丙基纤维素、低取代的羟丙基纤维素、粘土、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、树胶、硅酸镁铝、甲基纤维素、聚克立林钾、藻酸钠、淀粉羟乙酸钠、玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述崩解剂是交联羧甲基纤维素钠且存在量为1—3重量百分比。

[0034] 在一个实施方案中,所述表面活性剂选自月桂基硫酸钠、硬脂酰醇富马酸钠、聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述表面活性剂是月桂基硫酸钠且存在量为0.5—2重量百分比。

[0035] 在一个实施方案中,所述粘合剂选自聚乙烯吡咯烷酮、磷酸氢钙、蔗糖、玉米淀粉、改性纤维素或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述粘合剂是聚乙烯吡咯烷酮且存在量为0—5重量百分比。

[0036] 在一个实施方案中,本发明的特征在于如下配方的药物组合物:

	%重量
化合物 1 形式 I	35-50
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	25-40
[0037] 微晶纤维素	10-20
交联羧甲基纤维素钠	1-3
月桂基硫酸钠	0.5-2
聚乙烯吡咯烷酮	0-5

[0038] 称作PC-II。

[0039] 在另一个方面,本发明的特征在于药物组合物,其包含:

[0040] a. 化合物1形式I;

[0041] b. 包含基本上无定形的化合物2的固体分散体;

[0042] c. 填充剂;

[0043] d. 崩解剂;

[0044] e. 表面活性剂;

[0045] f. 粘合剂;和

[0046] g. 润滑剂;

[0047] 称作PC-III。

[0048] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物包含约100—250mg的化合物1形式I和约100—150mg的基本上无定形的化合物2。在另一个实施方案中,本发明的药物组合物包含约200mg的化合物1形式I和约125mg的基本上无定形的化合物2。在另一个实施方案中,本发明的药物组合物包含约150mg的化合物1形式I和约125mg的基本上无定形的化合物2。

[0049] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物包含25—50重量百分比的化合物1形式I和15—35重量百分比的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体。

[0050] 在一个实施方案中,所述填充剂选自纤维素、改性纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素羟甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、醋酸纤维素、微晶纤维素、磷酸氢钙、蔗糖、乳糖、玉米淀粉、马铃薯淀粉或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述填充剂是微晶纤维素且存在量为20—30重量百分比。

[0051] 在一个实施方案中,所述崩解剂选自琼脂,藻类,碳酸钙、羧甲基纤维素、纤维素、羟丙基纤维素、低取代的羟丙基纤维素、粘土、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、树胶、硅酸镁铝、甲基纤维素、聚克立林钾、藻酸钠、淀粉羟乙酸钠、玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述崩解剂是交联羧甲基纤维素钠且存在量为3—10重量百分比。

[0052] 在一个实施方案中,所述表面活性剂选自月桂基硫酸钠、硬脂酰醇富马酸钠、聚氧

乙烯山梨糖醇酐单油酸酯或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述表面活性剂是月桂基硫酸钠且存在量为0.5-2重量百分比。

[0053] 在一个实施方案中,所述粘合剂选自聚乙烯吡咯烷酮、磷酸氢钙、蔗糖、玉米淀粉,改性纤维素或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述粘合剂是聚乙烯吡咯烷酮且存在量为0-5重量百分比。

[0054] 在一个实施方案中,所述润滑剂选自硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸钠、硬脂酸铝、亮氨酸、山嵛酸甘油酯、氢化植物油或其任意的组合。在另一个实施方案中,所述润滑剂是硬脂酸镁且存在量为0.5-2重量百分比。

[0055] 在一个实施方案中,本发明的特征在于如下配方的药物组合物:

	%重量
化合物 1 形式 I	25-50
包含基本上无定形的 化合物 2 固体分散体	15-35
[0056] 微晶纤维素	20-30
交联羧甲基纤维素钠	3-10
月桂基硫酸钠	0.5-2
聚乙烯吡咯烷酮	0-5
硬脂酸镁	0.5-2

[0057] 称作PC-IV。

[0058] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物还包含着色剂和任选的蜡。在另一个实施方案中,本发明的着色剂的存在量为2-4重量百分比。在另一个实施方案中,所述蜡是巴西棕榈蜡,其存在量为0-0.020重量百分比。

[0059] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物是固体口服药物组合物。在另一个实施方案中,所述固体口服药物组合物是颗粒药物组合物或片剂。

[0060] 在一个实施方案中,本发明的颗粒组合物具有如下配方:

	%重量
化合物 1 形式 I	43
[0061] 包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	34
微晶纤维素	17
交联羧甲基纤维素钠	2

[0062]	月桂基硫酸钠	1
	聚乙烯吡咯烷酮	3

[0063] 称作PC-V。

[0064] 在一个实施方案中,本发明的颗粒组合物具有如下配方:

	%重量	
[0065]	化合物 1 形式 I	38
	包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	40
	微晶纤维素	16
	交联羧甲基纤维素钠	2
	月桂基硫酸钠	1
	聚乙烯吡咯烷酮	3

[0066] 称作PC-VI。

[0067] 在一个实施方案中,本发明的颗粒组合物具有如下配方:

	%重量	
[0068]	化合物 1 形式 I	51
	包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	27
	微晶纤维素	16
	交联羧甲基纤维素钠	2
	月桂基硫酸钠	1
	聚乙烯吡咯烷酮	3

[0069] 称作PC-VII。

[0070] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	%重量	
[0071]	化合物 1 形式 I	35

[0072]	包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	28
	微晶纤维素	26
	交联羧甲基纤维素钠	6
	月桂基硫酸钠	1
	聚乙烯吡咯烷酮	3
	硬脂酸镁	1

[0073] 称作PC-VIII。

[0074] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	%重量
化合物 1 形式 I	31
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	32
[0075] 微晶纤维素	26
交联羧甲基纤维素钠	6
月桂基硫酸钠	1
聚乙烯吡咯烷酮	3
硬脂酸镁	1

[0076] 称作PC-IX。

[0077] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	%重量
化合物 1 形式 I	41
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	22
[0078] 微晶纤维素	26
交联羧甲基纤维素钠	6
月桂基硫酸钠	1

[0079]	聚乙烯吡咯烷酮	3
	硬脂酸镁	1

[0080] 称作PC-X。

[0081] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

		mg
	化合物 1 形式 I	200
	包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	156
[0082]	微晶纤维素	150
	交联羧甲基纤维素钠	34
	月桂基硫酸钠	4
	聚乙烯吡咯烷酮	15
	硬脂酸镁	6

[0083] 称作PC-XI。

[0084] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

		mg
	化合物 1 形式 I	150
	包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	156
[0085]	微晶纤维素	129
	交联羧甲基纤维素钠	30
	月桂基硫酸钠	4
	聚乙烯吡咯烷酮	13
	硬脂酸镁	5

[0086] 称作PC-XII。

[0087] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	mg
化合物 1 形式 I	200
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	104
[0088] 微晶纤维素	128
交联羧甲基纤维素钠	29
月桂基硫酸钠	4
聚乙烯吡咯烷酮	13
硬脂酸镁	5

[0089] 称作PC-XIII。

[0090] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	%重量
化合物 1 形式 I	34
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	27
[0091] 微晶纤维素	25
交联羧甲基纤维素钠	6
月桂基硫酸钠	1
聚乙烯吡咯烷酮	3
硬脂酸镁	1
着色剂	3

[0092] 称作PC-XIV。

[0093] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	%重量
化合物 1 形式 I	30
[0094] 包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	31

[0095]	微晶纤维素	25
	交联羧甲基纤维素钠	6
	月桂基硫酸钠	1
	聚乙烯吡咯烷酮	3
	硬脂酸镁	1
	着色剂	3

[0096] 称作PC-XV。

[0097] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	%重量
化合物 1 形式 I	40
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	21
[0098] 微晶纤维素	25
交联羧甲基纤维素钠	6
月桂基硫酸钠	1
聚乙烯吡咯烷酮	3
硬脂酸镁	1
着色剂	3

[0099] 称作PC-XVI。

[0100] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	mg
化合物 1 形式 I	200
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	156
[0101] 微晶纤维素	150
交联羧甲基纤维素钠	34
月桂基硫酸钠	4

[0102]	聚乙烯吡咯烷酮	15
	硬脂酸镁	6
	着色剂	17

[0103] 称作PC-XVII。

[0104] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

[0105]		mg
	化合物 1 形式 I	200
	基本上无定形的 化合物 2	125
	微晶纤维素	150
	交联羧甲基纤维素钠	34
	月桂基硫酸钠	4
	聚乙烯吡咯烷酮	15
	硬脂酸镁	6
	着色剂	17

[0106] 称作PC-XVIII。

[0107] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

[0108]		mg
	化合物 1 形式 I	150
	包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	156
	微晶纤维素	129
	交联羧甲基纤维素钠	29
	月桂基硫酸钠	4
	聚乙烯吡咯烷酮	13
	硬脂酸镁	5
	着色剂	15

[0109] 称作PC-XIX。

[0110] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	mg
化合物 1 形式 I	200
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	104
[0111] 微晶纤维素	128
交联羧甲基纤维素钠	29
月桂基硫酸钠	4
聚乙烯吡咯烷酮	13
硬脂酸镁	5
着色剂	14

[0112] 称作PC-XX。

[0113] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

	mg
化合物 1 形式 I	200
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	83
[0114] 微晶纤维素	128
交联羧甲基纤维素钠	29
月桂基硫酸钠	4
聚乙烯吡咯烷酮	13
硬脂酸镁	5
着色剂	14

[0115] 称作PC-XXI。

[0116] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

成分	%重量
化合物 1 形式 I	20-40
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	30-40
[0117] 微晶纤维素	20-30
交联羧甲基纤维素钠	1-10
聚乙烯吡咯烷酮	1-5
月桂基硫酸钠	0.1-1
硬脂酸镁	0.5-1.5

[0118] 称作PC-XXII。

[0119] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

化合物 1/化合物 2 100 mg/125 mg			
成分	在颗粒中的%	在片剂中的%	mg/片
化合物 1 形式 I	30	25	100
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	47	38	156
微晶纤维素	17	13	55
[0120] 交联羧甲基纤维素钠	2	2	7
聚乙烯吡咯烷酮	3	3	11
月桂基硫酸钠	1	1	3
总颗粒	100	82	332
交联羧甲基纤维素钠		4	18
微晶纤维素		13	53
硬脂酸镁		1	4
总片剂		100	407

[0121] 称作PC-XXIII。

[0122] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

化合物 1/化合物 2 150 mg/125 mg			
成分	在颗粒中的%	在片剂中的%	mg/片
化合物 1 形式 I	38	31	150
[0123] 包含基本上无定形的	40	32	156

[0124]	化合物 2 的固体分散体			
	微晶纤维素	16	13	65
	交联羧甲基纤维素钠	2	2	8
	聚乙烯吡咯烷酮	3	3	13
	月桂基硫酸钠	1	1	4
	总颗粒	100	82	396
	交联羧甲基纤维素钠		4	22
	微晶纤维素		13	64
	硬脂酸镁		1	5
	总片剂		100	487

[0125] 称作PC-XXIV。

[0126] 在一个实施方案中,本发明的片剂具有如下配方:

化合物 1/化合物 2 75 mg/125 mg			
成分	在颗粒中的%	在片剂中的%	mg/片
化合物 1 形式 I	25	20	75
包含基本上无定形的 化合物 2 的固体分散体	52	43	156
微晶纤维素	17	13	49
交联羧甲基纤维素钠	2	2	6
聚乙烯吡咯烷酮	3	3	10
月桂基硫酸钠	1	1	3
总颗粒	100	82	299
交联羧甲基纤维素钠		4	17
微晶纤维素		13	48
硬脂酸镁		1	4
片芯片剂		100	368
粉红色欧巴代		3	11
薄膜包衣片			379

[0127] 称作PC-XXV。

[0128] 在一个方面,本发明的特征在于治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括对该患者施用有效量的本发明的药物组合物、颗粒药物组合物或片剂。

[0129] 在实施方案中,本发明的特征在于治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括对该患者施用有效量的制剂PC-I—PC-XXV的任意一种的药物组合物、颗粒药物组合物或片剂。

[0130] 在一个实施方案中,所述患者具有  $\Delta$ F508 CFTR突变。在另一个实施方案中,所述患者为纯合型的  $\Delta$ F508。在另一个实施方案中,所述患者为杂合型的  $\Delta$ F508。在另一个实施方案中,每天将两种片剂施用于患者。

[0131] 在一个方面,本发明的特征在于制备颗粒药物组合物的方法,所述颗粒药物组合物包含湿法制粒的如下成分:

- [0133] a. 化合物1形式I;
- [0134] b. 包含基本上无定形的化合物2的固体分散体;
- [0135] c. 填充剂;
- [0136] d. 崩解剂;
- [0137] e. 表面活性剂;和
- [0138] f. 粘合剂。
- [0139] 在一个方面,本发明的特征在于制备片剂的方法,包括压制:
- [0140] i) 包含如下成分的多颗粒药物组合物:
- [0141] a. 化合物1形式I;
- [0142] b. 包含基本上无定形的化合物2的固体分散体;
- [0143] c. 填充剂;
- [0144] d. 崩解剂;
- [0145] e. 表面活性剂;和
- [0146] f. 粘合剂;
- [0147] ii) 崩解剂;
- [0148] iii) 填充剂;和
- [0149] iv) 润滑剂。
- [0150] 在一个方面,本发明的特征在于药盒,其包含本发明的药物组合物、颗粒药物组合物或片剂和单独治疗剂或其药物组合物。
- [0151] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物、颗粒药物组合物或片剂和单独治疗剂或其药物组合物在公开的容器中。在另一个实施方案中,所述公开的容器是瓶子。在另一个实施方案中,所述公开的容器是小瓶。在另一个实施方案中,所述公开的容器是泡罩包装。
- [0152] 在另一个方面,本发明提供通过双螺杆湿法制粒工艺制备本文所述的药物组合物的连续或半连续工艺,包括以下步骤:筛选并称取化合物1、化合物2和赋形剂;将化合物1、化合物2和赋形剂在共混机中混合,并且在添加含有表面活性剂和粘合剂的制粒流体的同时以适合的速率使共混物进料至连续制粒机中持续适当量的时间,并将混合物切碎成颗粒;干燥颗粒;将颗粒与颗粒外的赋形剂共混适当量的时间;将共混物压成片剂;对片剂进行包衣;以及任选地在一个或两个片剂表面上印刷字母图案。

#### 附图说明

- [0153] 图1是由化合物1形式I的单个晶体结构计算的X射线衍射图。
- [0154] 图2是化合物1形式I的实际X射线粉末衍射图。
- [0155] 图3是示意图,其描述对于通过高剪切制粒(HSG)工艺和双螺杆湿法制粒(TSWG)工艺制备的片剂的化合物1pH梯度溶出曲线(LOD表示干燥失重,即定义粉末/颗粒中水量的测量值)。
- [0156] 图4是示意图,其描述通过随时间仅显示少量结晶度在60%相对湿度下预平衡后在50℃的片剂PC-XVII中基本上无定形形式的化合物2的稳定性。
- [0157] 图5是示意图,其描述通过随时间仅显示少量结晶度在60%相对湿度下预平衡后在60℃的片剂PC-XVII中基本上无定形形式的化合物2的稳定性。

[0158] 图6是示意图,其描述通过随时间仅显示少量结晶度在60%相对湿度下预平衡后在60°C的片剂PC-XX中基本上无定形形式的化合物2的稳定性。

[0159] 图7是示意图,其描述通过随时间仅显示少量结晶度在60%相对湿度下预平衡后在50°C的片剂PC-XX中基本上无定形形式的化合物2的稳定性。

[0160] 图8是化合物1的<sup>1</sup>HNMR光谱。

[0161] 图9是化合物1HCl盐的<sup>1</sup>HNMR光谱。

[0162] 图10是痕量的化合物1形式I的差示扫描量热图(DSC)。

[0163] 图11是基于单晶X射线分析的化合物1形式I的构象图。

[0164] 详细描述

[0165] 定义

[0166] 本文所用的“CFTR”表示囊性纤维化跨膜传导调节因子。

[0167] 本文所用的“ $\Delta$ F508突变”或“F508-de1突变”是CFTR蛋白质内的具体突变。该突变是包含氨基酸苯丙氨酸的密码子的三个核苷酸在位置508处的缺失,从而产生不含该特定苯丙氨酸残基的CFTR蛋白质。

[0168] 本文所用的对于特定突变(例如 $\Delta$ F508)是“纯合的”患者在每个等位基因上具有相同的突变。

[0169] 本文所用的对于特定突变(例如 $\Delta$ F508)是“杂合的”患者在一个等位基因上具有该突变,而在另一个等位基因上具有不同的突变。

[0170] 本文所用的术语“CFTR纠正剂”是指增加细胞表面功能性CFTR蛋白质的量从而导致离子转运增强的化合物。

[0171] 本文所用的术语“CFTR增效剂”是指增加位于细胞表面的CFTR蛋白质的通道活性从而导致离子转运增强的化合物。

[0172] 本文所用的术语“活性药物成分”或“API”是指生物活性化合物。

[0173] 术语“固体形式”和相关术语在本文中用于指代化合物1或化合物2时是指特定的固体形式,例如晶体、无定形态等。

[0174] 本文所用的术语“基本上无定形的”是指在其分子位置中具有很少或不具有长距秩序排列的固体材料。例如,基本上无定形的材料具有低于约15%的结晶度(例如低于约10%的结晶度或低于约5%的结晶度)。还应注意,术语“基本上无定形的”包括描述语“无定形的”,其是指不具有(0%)结晶度的材料。

[0175] 本文所用的术语“基本上结晶的”(如在短语基本上结晶的化合物1形式I中)是指在其分子位置中主要具有长距秩序排列的固体材料。例如,基本上结晶的材料具有大于约85%的结晶度(例如大于约90%的结晶度或大于约95%的结晶度)。还应注意,术语‘基本上结晶的’包括描述语‘结晶的’,其是指具有100%结晶度的材料。

[0176] 本文所用的术语“结晶的”和相关术语当用于描述物质、成分、产物或形式时是指该物质、成分或产物通过X射线衍射测定为基本上结晶的。(参见例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (2003) (《雷明顿: 药剂学科学与实践》, 第21版, 利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司, 马里兰州巴尔的摩, 2003年); The United States Pharmacopeia, 23<sup>rd</sup> ed., 1843-1844 (1995) (《美国药典》, 第23版, 第1843-1844页, 1995年))。

[0177] 本文所用的“赋形剂”包括药物组合物中的功能性和非功能性成分。

[0178] 本文所用的“崩解剂”是水合药物组合物并有助于片剂分散的赋形剂。如本文所用，“稀释剂”或“填充剂”是为药物组合物增添膨松度的赋形剂。

[0179] 本文所用的“表面活性剂”是赋予药物组合物增强的溶解性和/或润湿性的赋形剂。

[0180] 本文所用的“粘合剂”是赋予药物组合物增强的内聚力或拉伸强度(例如硬度)的赋形剂。

[0181] 本文所用的“助流剂”是赋予药物组合物增强的流动性的赋形剂。

[0182] 本文所用的“着色剂”是赋予药物组合物例如片剂所需的颜色的赋形剂。着色剂的实例包括可商购获得的色素,例如FD&C Blue#1铝色淀、FD&C Blue#2、其它FD&C Blue颜色、二氧化钛、氧化铁和/或其组合。在一个实施方案中,本发明提供的药物组合物为粉红色的。

[0183] 本文所用的“润滑剂”是加入到压成片剂的药物组合物中的赋形剂。润滑剂有助于将颗粒压成片剂并使药物组合物的片剂从模压机中射出。

[0184] 本文所用的“立方厘米”和“cc”可互换地用于表示体积的单位。注意,1cc=1mL。

[0185] 本文所用的“千磅”和“kP”可互换使用并表示力的度量,其中1kP=约9.8牛顿。

[0186] 本文所用的“脆度”是指片剂不管外部压力而保持完整并维持其形式的性质。脆度可使用公式1所示的数学表达式来定量:

$$[0187] \quad \% \text{脆度} = 100 \times \frac{(W_o - W_f)}{W_o}$$

[0188] 其中 $W_o$ 是片剂的初始重量,而 $W_f$ 是片剂在放入通过脆度仪后的最终重量。脆度采用使实验片剂翻滚100或400转的标准USP测试设备进行测量。本发明的一些片剂的脆度小于5.0%。在另一个实施方案中,脆度小于2.0%。在另一个实施方案中,400转之后的目标脆度小于1.0%。

[0189] 本文所用的“平均粒径”是使用例如激光散射、图像分析或筛分分析的技术测得的平均粒径。在一个实施方案中,用于制备本发明提供的药物组合物的颗粒具有小于1.0mm的平均粒径。

[0190] 本文所用的“堆积密度”是材料的粒子的质量除以粒子占据的总体积。总体积包括粒子体积、粒间空隙体积和内部孔体积。堆积密度不是材料的固有性质;它可以根据材料的加工方式而有所变化。在一个实施方案中,用于制备本发明提供的药物组合物的颗粒的堆积密度为约0.5至0.7g/cc。

[0191] 本发明的药物化合物的“有效”量或“治疗有效量”可根据例如如下因素而变化:疾病状态、受试者的年龄和体重以及本发明的化合物在受试者中引起所需响应的能力。可调整剂量方案以提供最佳的治疗响应。有效量还是治疗有益效果超过本发明的化合物的任何毒性或有害作用(例如副作用)的量。

[0192] 如本文所用,并且除非另外指明,否则术语化合物的“治疗有效量”和“有效量”是指在疾病或病症的治疗或管理中足以提供治疗有益效果或足以延缓或使与疾病或病症相关的一种或多种症状最小化的量。化合物的“治疗有效量”和“有效量”是指单独的或与一种或多种其它药剂结合的治疗剂的量,其在疾病或病症的治疗或管理中提供治疗有益效果。术语“治疗有效量”和“有效量”可涵盖改善总体治疗、减少或避免疾病或病症的症状或成因

或增强另一种治疗剂的治疗效能的量。

[0193] 如在短语“基本上纯的化合物1形式I”中所用的“基本上纯的”是指大于约90%的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的是指大于约95%的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的是指大于约98%的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的是指大于约99%的纯度。

[0194] 对于化合物1形式I或包含基本上无定形的化合物2的固体分散体,术语“约”和“大约”在结合组合物或剂型的成分的剂量、量或重量百分比使用时是指由本领域中的普通技术人员认为提供相当于指定的剂量、量或重量百分比获得的药理作用的剂量、量或重量百分比。具体地讲,术语“约”或“大约”是指由本领域中的普通技术人员确定的可接受的特定值的误差,其部分取决于该值的测量或测定方式。在一些实施方案中,术语“约”或“大约”是指在1、2、3或4个标准偏差内。在一些实施方案中,术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.05%内。

[0195] 药物组合物

[0196] 本发明提供包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的药物组合物。在该方面的一些实施方案中,存在于药物组合物中的化合物1形式I的量为100mg、125mg、150mg、200mg、250mg、300mg或400mg。在该方面的一些实施方案中,存在于药物组合物中的化合物1形式I的重量百分比为10%至75%。在这些和其它实施方案中,化合物1形式I作为基本上纯的化合物1形式I存在。在该方面的一些实施方案中,存在于药物组合物中的基本上无定形的化合物2的量为100mg、125mg、150mg、200mg或250mg。在该方面的一些实施方案中,存在于药物组合物中的基本上无定形的化合物2的重量百分比为10%至75%。在这些和其它实施方案中,基本上无定形的化合物2作为基本上纯的和无定形的化合物2存在。“基本上纯的”是指大于90%的纯度;优选地大于95%的纯度;更优选地大于99.5%的纯度。

[0197] 因此,在一个方面,本发明提供药物组合物,其包含:

[0198] a. 化合物1形式I;

[0199] b. 基本上无定形的化合物2的固体分散体;

[0200] c. 填充剂;

[0201] d. 崩解剂;

[0202] e. 表面活性剂;和

[0203] f. 粘合剂。

[0204] 在该方面的一个实施方案中,所述药物组合物包含25mg的化合物1形式I。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含50mg的化合物1形式I。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含100mg的化合物1形式I。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含125mg的化合物1形式I。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含150mg的化合物1形式I。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含200mg的化合物1形式I。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含250mg的化合物1形式I。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含400mg的化合物1形式I。

[0205] 在该方面的一个实施方案中,所述药物组合物包含25mg的基本上无定形的化合物

2.在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含50mg的基本上无定形的化合物2。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含100mg的基本上无定形的化合物2。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含125mg的基本上无定形的化合物2。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含150mg的基本上无定形的化合物2。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含200mg的基本上无定形的化合物2。在该方面的另一个实施方案中,所述药物组合物包含250mg的基本上无定形的化合物2。

[0206] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含化合物1形式I,其中化合物1形式I的存在量按组合物重量计至少为15wt% (例如,至少20wt%、至少30wt%、至少40wt%、至少50wt%或至少60wt%)。

[0207] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含基本上无定形的化合物2,其中基本上无定形的化合物2的存在量按组合物重量计至少为15wt% (例如,至少20wt%、至少30wt%、至少40wt%、至少50wt%或至少60wt%)。

[0208] 在一些实施方案中,所述药物组合物包含化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体、填充剂、崩解剂、表面活性剂和粘合剂。在该实施方案中,所述组合物包含按组合物重量计约25wt%—约55wt% (例如,约30—50wt%)的化合物1形式I,且更典型地按组合物重量计40wt%—约45wt%的化合物1形式I。在该实施方案中,所述组合物包含按组合物重量计约15wt%—约40wt% (例如,约20—35wt%)的基本上无定形的化合物2,且更典型地按组合物重量计25wt%—约30wt%的基本上无定形的化合物2。

[0209] 化合物1形式I和基本上无定形的化合物2在组合物中的浓度取决于若干因素,例如提供所需量的化合物1形式I和基本上无定形的化合物2所需要的药物组合物的量以及所需的药物组合物的溶出曲线。

[0210] 在另一个实施方案中,所述药物组合物包含化合物1形式I,其中为其固体形式的化合物1形式I具有通过光散射法 (例如,使用可得自英国马尔文仪器有限公司 (Malvern Instruments, England) 的Malvern Mastersizer) 测得的0.1微米至10微米的平均粒径。在另一个实施方案中,化合物1形式I的粒度为1微米至5微米。在另一个实施方案中,化合物1形式I具有2.0微米的粒度D50。

[0211] 如所指出的那样,除了化合物1形式I和基本上无定形的化合物2的固体分散体以外,在本发明的一些实施方案中,作为口服制剂的药物组合物还包含一种或多种赋形剂,例如填充剂、崩解剂、表面活性剂、稀释剂、粘合剂、助流剂、润滑剂、着色剂或芳香剂以及它们的任何组合。

[0212] 适用于本发明的填充剂与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不会降低药物组合物的溶解性、硬度、化学稳定性、物理稳定性或生物活性。示例性的填充剂包括:纤维素、改性纤维素 (例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素)、醋酸纤维素、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙、淀粉 (例如玉米淀粉、马铃薯淀粉)、糖 (例如山梨醇、乳糖、蔗糖等) 或它们的任何组合。

[0213] 因此,在一个实施方案中,所述药物组合物包含至少一种填充剂,其用量按组合物重量计为至少5wt% (例如,至少约20wt%、至少约30wt%或至少约40wt%)。例如,所述药物组合物包含按组合物重量计约10wt%—约60wt% (例如,约20wt%—约55wt%、约25wt%—约50wt%或约27wt%—约45wt%)的填充剂。在另一个实例中,所述药物组合物包含至少按

组合物重量计约20wt% (例如,至少30wt%或至少40wt%) 的微晶纤维素,例如MCC Avicel PH102。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约10wt%—约60wt% (例如,约20wt%—约55wt%或约25wt%—约45wt%) 的微晶纤维素。

[0214] 适用于本发明的崩解剂提高了药物组合物的分散性并与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不会降低药物组合物的化学稳定性、物理稳定性、硬度或生物活性。示例性的崩解剂包括交联羧甲基纤维素钠、羟基乙酸淀粉钠或其组合。

[0215] 因此,在一个实施方案中,所述药物组合物包含崩解剂,其用量按组合物重量计约为10wt%或以下(例如,约7wt%或以下、约6wt%或以下或约5wt%或以下)。例如,所述药物组合物包含按组合物重量计约1wt%—约10wt% (例如,约1.5wt%—约7.5wt%或约2.5wt%—约6wt%) 的崩解剂。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约10wt%或以下(例如,7wt%或以下、6wt%或以下或5wt%或以下) 的交联羧甲基纤维素钠。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约1wt%—约10wt% (例如,约1.5wt%—约7.5wt%或约2.5wt%—约6wt%) 的交联羧甲基纤维素钠。在一些实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约0.1%—约10wt% (例如,约0.5wt%—约7.5wt%或约1.5wt%—约6wt%) 的崩解剂。在其它实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约0.5%—约10wt% (例如,约1.5wt%—约7.5wt%或约2.5wt%—约6wt%) 的崩解剂。

[0216] 适用于本发明的表面活性剂提高了药物组合物的润湿性并与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不会降低药物组合物的化学稳定性、物理稳定性、硬度或生物活性。示例性的表面活性剂包括月桂基硫酸钠(SLS)、硬脂富马酸钠(SSF)、聚氧乙烯20脱水山梨糖醇单油酸酯(例如Tween™)、它们的任何组合等。

[0217] 因此,在一个实施方案中,所述药物组合物包含表面活性剂按组合物重量计,其用量约为10wt%或以下(例如,约5wt%或以下,约2wt%或以下,约1wt%或以下,约0.8wt%或以下或约0.6wt%或以下)。例如,所述药物组合物包含按组合物重量计约10wt%—约0.1wt% (例如,约5wt%—约0.2wt%或约2wt%—约0.3wt%) 的表面活性剂。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计10wt%或以下(例如,约5wt%或以下、约2wt%或以下、约1wt%或以下、约0.8wt%或以下或约0.6wt%或以下) 的月桂基硫酸钠。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约10wt%—约0.1wt% (例如,约5wt%—约0.2wt%或约2wt%—约0.3wt%) 的月桂基硫酸钠。

[0218] 适用于本发明的粘合剂提高了药物组合物的片剂强度并与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不会降低药物组合物的化学稳定性、物理稳定性或生物活性。示例性的粘合剂包括聚乙烯吡咯烷酮、磷酸氢钙、蔗糖、玉米(玉蜀黍)淀粉、改性纤维素(例如羟甲基纤维素)或它们的任何组合。

[0219] 因此,在一个实施方案中,所述药物组合物包含粘合剂,其用量按组合物重量计至少约为0.1wt% (例如,至少约1wt%、至少约3wt%、至少约4wt%或至少约5wt%)。例如,所述药物组合物包含按组合物重量计约0.1wt%—约10wt% (例如,约1wt%—约10wt%或约2wt%—约7wt%) 的粘合剂。在另一个实例中,所述药物组合物包含至少按组合物重量计约0.1wt% (例如,至少约1wt%、至少约2wt%、至少约3wt%或至少约4wt%) 的聚乙烯吡咯烷酮。在另一个实例中,所述药物组合物包含助流剂聚乙烯吡咯烷酮,其用量按组合物重量计约为0.1wt%—约10wt% (例如,约1wt%—约8wt%或约2wt%—约5wt%)。

[0220] 适用于本发明的稀释剂可为制剂增添必要的体积以制备所需大小的片剂并通常与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不会降低药物组合物的溶解性、硬度、化学稳定性、物理稳定性或生物活性。示例性的稀释剂包括:糖,例如糖粉(confectioner's sugar)、可压缩糖(compressible sugar)、葡聚糖、糊精、右旋糖、乳糖、甘露糖醇、山梨醇、纤维素和改性纤维素,例如粉末状纤维素,滑石粉、磷酸钙、淀粉或它们的任何组合。

[0221] 因此,在一个实施方案中,所述药物组合物包含稀释剂,其用量按组合物重量计为40wt%或以下(例如,35wt%或以下、30wt%或以下或25wt%或以下或20wt%或以下或15wt%或以下或10wt%或以下)。例如,所述药物组合物包含按组合物重量计约40wt%—约1wt%(例如,约35wt%—约5wt%或约30wt%—约7wt%、约25wt%—约10wt%、约20wt%—约15wt%)的稀释剂。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计40wt%或以下(例如,35wt%或以下、25wt%或以下或15wt%或以下)的甘露糖醇。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约35wt%—约1wt%(例如,约30wt%—约5wt%或约25wt%—约10wt%)的甘露糖醇。

[0222] 适用于本发明的助流剂提高了药物组合物的流动性并与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不会降低药物组合物的溶解性、硬度、化学稳定性、物理稳定性或生物活性。示例性的助流剂包括胶态二氧化硅、滑石粉或它们的组合。

[0223] 因此,在一个实施方案中,所述药物组合物包含助流剂,其用量按组合物重量计为2wt%或以下(例如,1.75wt%、1.25wt%或以下或1.00wt%或以下)。例如,所述药物组合物包含按组合物重量计约2wt%—约0.05wt%(例如,约1.5wt%—约0.07wt%或约1.0wt%—约0.09wt%)的助流剂。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计2wt%或以下(例如,1.75wt%、1.25wt%或以下或1.00wt%或以下)的胶态二氧化硅。在另一个实例中,所述药物组合物包含按组合物重量计约2wt%—约0.05wt%(例如,约1.5wt%—约0.07wt%或约1.0wt%—约0.09wt%)的胶态二氧化硅。

[0224] 在一些实施方案中,药物组合物可包括口服固体药物剂型,其可以包含可防止微粒微珠掺合剂粘附到表面(例如,混料罐、压模和/或冲床的表面)的润滑剂。润滑剂还可降低颗粒内的粒间摩擦,并改善药物组合物的压缩以及使压缩后的药物组合物从模压机中脱模。润滑剂也与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不会降低药物组合物的溶解性、硬度或生物活性。示例性的润滑剂包括硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酸钠、硬脂酸、硬脂酸铝、亮氨酸、山嵛酸甘油酯、氢化植物油或它们的任何组合。在一个实施方案中,按组合物的重量计,药物组合物含量为5重量%或以下(例如4.75重量%、4.0重量%或以下、或3.00重量%或以下、或2.0重量%或以下)的润滑剂。例如,按组合物的重量计,药物组合物包含约5重量%至约0.10重量%(例如约4.5重量%至约0.5重量%或约3重量%至约1重量%)的润滑剂。在另一个实例中,按组合物的重量计,药物组合物包含5重量%或以下(例如4.0重量%或以下、3.0重量%或以下或2.0重量%或以下或1.0重量%或以下)的硬脂酸镁。在另一个实例中,按组合物的重量计,药物组合物包含约5重量%至约0.10重量%(例如约4.5重量%至约0.15重量%或约3.0重量%至约0.50重量%)的硬脂酸镁。

[0225] 本发明的药物组合物可任选地包含一种或多种着色剂、矫味剂和/或芳香剂以增强组合物的视觉吸引力、口感和/或香味。适合的着色剂、矫味剂或芳香剂与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不降低药物组合物的溶解性、化学稳定性、物理稳定性、硬度或

生物活性。在一个实施方案中,药物组合物包含着色剂、矫味剂和/或芳香。在一个实施方案中,本发明提供的药物组合物为紫色。

[0226] 在一些实施方案中,药物组合物包括片剂或可制成片剂,而片剂可用着色剂包衣并任选地使用适合的油墨标上徽标、其它图像和/或文字。在另外其它实施方案中,药物组合物包括片剂或可制成片剂,而片剂可用着色剂包衣、打蜡并任选地使用适合的油墨标上徽标、其它图像和/或文字。适合的着色剂和油墨与药物组合物的成分相匹配,即,它们基本上不降低药物组合物的溶解性、化学稳定性、物理稳定性、硬度或生物活性。适合的着色剂和油墨可以为任何颜色并为基于水的或基于溶剂的。在一个实施方案中,将由药物组合物制备的片剂用着色剂包衣然后使用适合的油墨标上徽标、其它图像和/或文字。例如,包含如本文所述的药物组合物的片剂可用约3重量% (例如低于约6重量%或低于约4重量%)的包含着色剂的薄膜衣包衣。着色后的片剂可用适合的油墨标上徽标和文字,从而指明活性成分在片剂中的强度。在另一个实例中,包含如本文所述的药物组合物的片剂可用约3重量% (例如低于约6重量%或低于约4重量%)的包含着色剂的薄膜衣包衣。

[0227] 在另一个实施方案中,将由药物组合物制备的片剂用着色剂包衣、打蜡然后使用适合的油墨标上徽标、其它图像和/或文字。例如,包含如本文所述的药物组合物的片剂可用约3重量% (例如低于约6重量%或低于约4重量%)的包含着色剂的薄膜衣包衣。着色的片剂可用按起始片芯重量的约0.01%w/w的量称出的巴西棕榈蜡粉末打蜡。打蜡的片剂可用适合的油墨标上徽标和文字,从而指明活性成分在片剂中的强度。在另一个实例中,可将包含如本文所述的药物组合物的片剂用约3重量% (例如低于约6重量%或低于约4重量%)的包含着色剂的薄膜衣包衣。着色的片剂可用按起始片芯重量的约0.01%w/w的量称出的巴西棕榈蜡粉末打蜡。打蜡的片剂可用例如黑色油墨的药学级油墨(例如**Opacode®** S-1-17823,一种基于溶剂的油墨,可从宾夕法尼亚州西点卡乐康公司(Colorcon, Inc., West Point, PA.) 商购获得)标上徽标和文字,从而指明活性成分在片剂中的强度。

[0228] 一种示例性药物组合物按组合物的重量计包含约15wt%—约70wt% (例如,约15wt%—约60wt%、约15wt%—约50wt%或约20wt%—约70wt%或约30wt%—约70wt%)的化合物1形式I;和按组合物重量计约15wt%—约40wt% (例如,约20—35wt%)的基本上无定形的化合物2和更典型地按组合物重量计25wt%—约30wt%的基本上无定形的化合物2。上述举出的组合物还可以包括一种或多种药学上可接受的赋形剂,例如约20wt%—约50wt%的填充剂;约1wt%—约5wt%的崩解剂;约2wt%—约0.3wt%的表面活性剂;和约0.1wt%—约5wt%的粘合剂。

[0229] 另一种示例性药物组合物包含按组合物重量计约15wt%—约70wt% (例如,约15wt%—约60wt%、约15wt%—约50wt%或约15wt%—约40wt%或约20wt%—约70wt%或约30wt%—约70wt%或约40wt%—约70wt%或约50wt%—约70wt%)的化合物1形式I;按组合物重量计约15wt%—约40wt% (例如,约20—35wt%)的基本上无定形的化合物2和更能典型地按组合物重量计25wt%—约30wt%的基本上无定形的化合物2和一种或多种赋形剂,例如约20wt%—约50wt%的填充剂;约1wt%—约5wt%的崩解剂;约2wt%—约0.3wt%的表面活性剂;约0.1wt%—约5wt%的粘合剂;和约2wt%—约0.1wt%的润滑剂。

[0230] 另一种示例性药物组合物包含按组合物重量计约15wt%—约70wt% (例如,约15wt%—约60wt%、约15wt%—约50wt%或约15wt%—约40wt%或约20wt%—约70wt%或

约30wt%—约70wt%或约40wt%—约70wt%或约50wt%—约70wt%)的化合物1形式I;按组合物重量计约15wt%—约40wt%(例如,约20—35wt%)的基本上无定形的化合物2和更典型地按组合物重量计25wt%—约30wt%的基本上无定形的化合物2和一种或多种赋形剂,例如约20wt%—约50wt%的填充剂;约1wt%—约5wt%的崩解剂;约2wt%—约0.3wt%的表面活性剂;约0.1wt%—约5wt%的粘合剂;约2wt%—约0.1wt%的润滑剂;约2wt%—约4wt%着色剂;和约0.005wt%—约0.015wt%的蜡。

[0231] 在一个实施方案中,本发明是颗粒药物组合物,其包含:

- [0232] a. 按组合物重量计约43wt%的化合物1形式I;
- [0233] b. 按组合物重量计约34wt%的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体;
- [0234] c. 按组合物重量计约17wt%的微晶纤维素;
- [0235] d. 按组合物重量计约2wt%的交联羧甲基纤维素钠;
- [0236] e. 按组合物重量计约1wt%的月桂基硫酸钠;和
- [0237] f. 按组合物重量计约3wt%的聚乙烯吡咯烷酮。

[0238] 在一个实施方案中,本发明是片剂,其包含:

- [0239] a. 按组合物重量计约35wt%的化合物1形式I;
- [0240] b. 按组合物重量计约28wt%的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体;
- [0241] c. 按组合物重量计约26wt%的微晶纤维素;
- [0242] d. 按组合物重量计约6wt%的交联羧甲基纤维素钠;
- [0243] e. 按组合物重量计约3wt%的聚乙烯吡咯烷酮;
- [0244] f. 按组合物重量计约1wt%的月桂基硫酸钠;和
- [0245] g. 按组合物重量计约1wt%的硬脂酸镁。

[0246] 在一个实施方案中,本发明是片剂,其包含:

- [0247] a. 按组合物重量计约34wt%的化合物1形式I;
- [0248] b. 按组合物重量计约27wt%的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体;
- [0249] c. 按组合物重量计约26wt%的微晶纤维素;
- [0250] d. 按组合物重量计约6wt%的交联羧甲基纤维素钠;
- [0251] e. 按组合物重量计约2wt%的聚乙烯吡咯烷酮;
- [0252] f. 按组合物重量计约1wt%的月桂基硫酸钠;
- [0253] g. 按组合物重量计约1wt%的硬脂酸镁;
- [0254] h. 按组合物重量计约3wt%的着色剂;和
- [0255] i. 按组合物重量计约0.010wt%的蜡。

[0256] 本发明的另一种片剂包含:

- [0257] a. 约150—250mg的化合物1形式I;
- [0258] b. 约100—150mg的基本上无定形的化合物2;
- [0259] c. 约125—175mg的微晶纤维素;
- [0260] d. 约20—40mg的交联羧甲基纤维素钠;
- [0261] e. 约10—20mg的聚乙烯吡咯烷酮;
- [0262] f. 约2—6mg的月桂基硫酸钠;和
- [0263] g. 约3—7mg的硬脂酸镁。

- [0264] 本发明的另一种片剂包含：
- [0265] a. 约200mg的化合物1形式I；
- [0266] b. 约125mg的基本上无定形的化合物2；
- [0267] c. 约150mg的微晶纤维素；
- [0268] d. 约34mg的交联羧甲基纤维素钠；
- [0269] e. 约15mg的聚乙烯吡咯烷酮；
- [0270] f. 约4mg的月桂基硫酸钠；和
- [0271] g. 约6mg的硬脂酸镁。
- [0272] 本发明的另一种片剂包含：
- [0273] a. 约200mg的化合物1形式I；
- [0274] b. 约125mg的基本上无定形的化合物2；
- [0275] c. 约150mg的微晶纤维素；
- [0276] d. 约34mg的交联羧甲基纤维素钠；
- [0277] e. 约15mg的聚乙烯吡咯烷酮；
- [0278] f. 约4mg的月桂基硫酸钠；
- [0279] g. 约6mg的硬脂酸镁；
- [0280] h. 约17mg的着色剂；和
- [0281] i. 约0.06mg的蜡。
- [0282] 在一个实施方案中，本发明是颗粒药物组合物，其包含：
- [0283] a. 按组合物重量计约38wt%的化合物1形式I；
- [0284] b. 按组合物重量计约40wt%的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体；
- [0285] c. 按组合物重量计约16wt%的微晶纤维素；
- [0286] d. 按组合物重量计约2wt%的交联羧甲基纤维素钠；
- [0287] e. 按组合物重量计约1wt%的月桂基硫酸钠；和
- [0288] f. 按组合物重量计约3wt%的聚乙烯吡咯烷酮。
- [0289] 在一个实施方案中，本发明是片剂，其包含：
- [0290] a. 按组合物重量计约31wt%的化合物1形式I；
- [0291] b. 按组合物重量计约32wt%的包含基本上无定形的化合物2的固体分散体；
- [0292] c. 按组合物重量计约26wt%的微晶纤维素；
- [0293] d. 按组合物重量计约6wt%的交联羧甲基纤维素钠；
- [0294] e. 按组合物重量计约3wt%的聚乙烯吡咯烷酮；
- [0295] f. 按组合物重量计约1wt%的月桂基硫酸钠；
- [0296] g. 按组合物重量计约1wt%的硬脂酸镁；和
- [0297] h. 按组合物重量计约3wt%的着色剂。
- [0298] 本发明的另一种片剂包含：
- [0299] a. 约100—200mg的化合物1形式I；
- [0300] b. 约100—150mg的基本上无定形的化合物2；
- [0301] c. 约100—150mg的微晶纤维素；
- [0302] d. 约20—40mg的交联羧甲基纤维素钠；

[0303] e. 约10—20mg的聚乙烯吡咯烷酮;

[0304] f. 约2—6mg的月桂基硫酸钠;和

[0305] g. 约3—7mg的硬脂酸镁。

[0306] 本发明的另一种片剂包含:

[0307] a. 约150mg的化合物1形式I;

[0308] b. 约125mg的基本上无定形的化合物2;

[0309] c. 约129mg的微晶纤维素;

[0310] d. 约29mg的交联羧甲基纤维素钠;

[0311] e. 约13mg的聚乙烯吡咯烷酮;

[0312] f. 约4mg的月桂基硫酸钠;

[0313] g. 约5mg的硬脂酸镁;和

[0314] h. 约15mg的着色剂。

[0315] 本发明的药物组合物可加工成片剂形式、胶囊形式、小袋形式、锭剂形式或适于口服的其它固体形式。因此,在一些实施方案中,药物组合物为片剂形式。

[0316] 本发明的另一个方面提供由片剂组成的药物制剂,所述片剂包括化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和赋形剂(例如,填充剂、崩解剂、表面活性剂、粘合剂、着色剂、润滑剂或其任意的组合),它们各自如上述和如下实施例中所述,其中所述片剂具有在约30分钟内至少约50%(例如,至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约99%)的溶出度。

[0317] 在一个实例中,所述药物组合物由片剂组成,该片剂包括:化合物1形式I,其用量为25mg—400mg,例如25mg或50mg或75mg或100mg或150mg、200mg、250mg、300mg或400mg;基本上无定形的化合物2,其用量为25mg—250mg,例如25mg或50mg或75mg或100mg或150mg、200mg、250mg;和一种或多种赋形剂(例如,填充剂、崩解剂、表面活性剂、粘合剂、着色剂、润滑剂或其任意的组合),它们各自如上述和如下实施例中所述,其中所述片剂具有在约30分钟内约50%—约100%(例如,约55%—约95%或约60%—约90%)的溶出度。

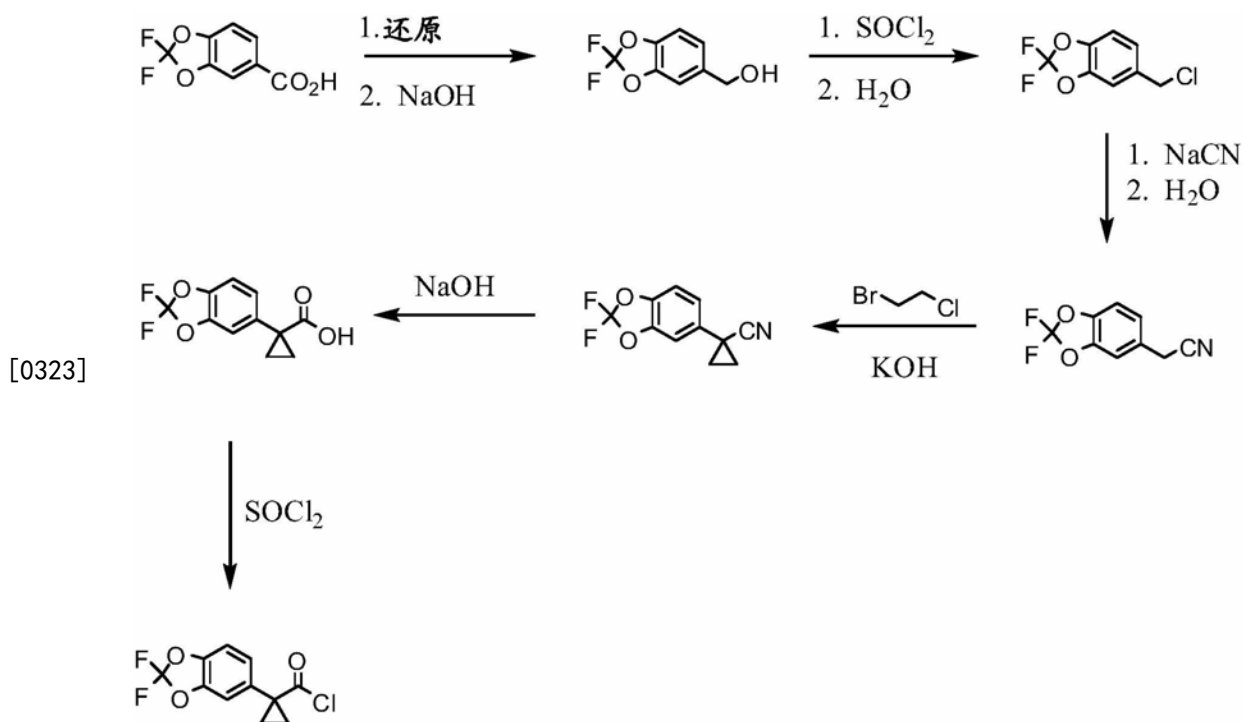
[0318] 可通过采用以下条件的标准美国药典II型仪器来测量溶出度:溶解在900mL去离子水(用50mM磷酸二氢钾缓冲到pH 6.8)中的0.1%CTAB作为溶出介质,在约37°C的温度下以约50—75rpm搅拌。在仪器的每个测试容器中测试单个实验片剂。还可以通过采用以下条件的标准美国药典II型仪器来测量溶出度:溶解在900mL 50mM磷酸钠缓冲液(pH 6.8)中的0.7%月桂基硫酸钠作为溶出介质,在约37°C的温度下以约65rpm搅拌。在仪器的每个测试容器中测试单个实验片剂。还可以通过采用以下条件的标准美国药典II型仪器来测量溶出度:溶解在900mL 50mM磷酸钠缓冲液(pH 6.8)中的0.5%月桂基硫酸钠作为溶出介质,在约37°C的温度下以约65rpm搅拌。在仪器的每个测试容器中测试单个实验片剂。

[0319] 制备化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的方法

[0320] 化合物1

[0321] 化合物1用作化合物1形式I的起点且可以通过使酰氯部分与胺部分根据方案1-4偶联制备。

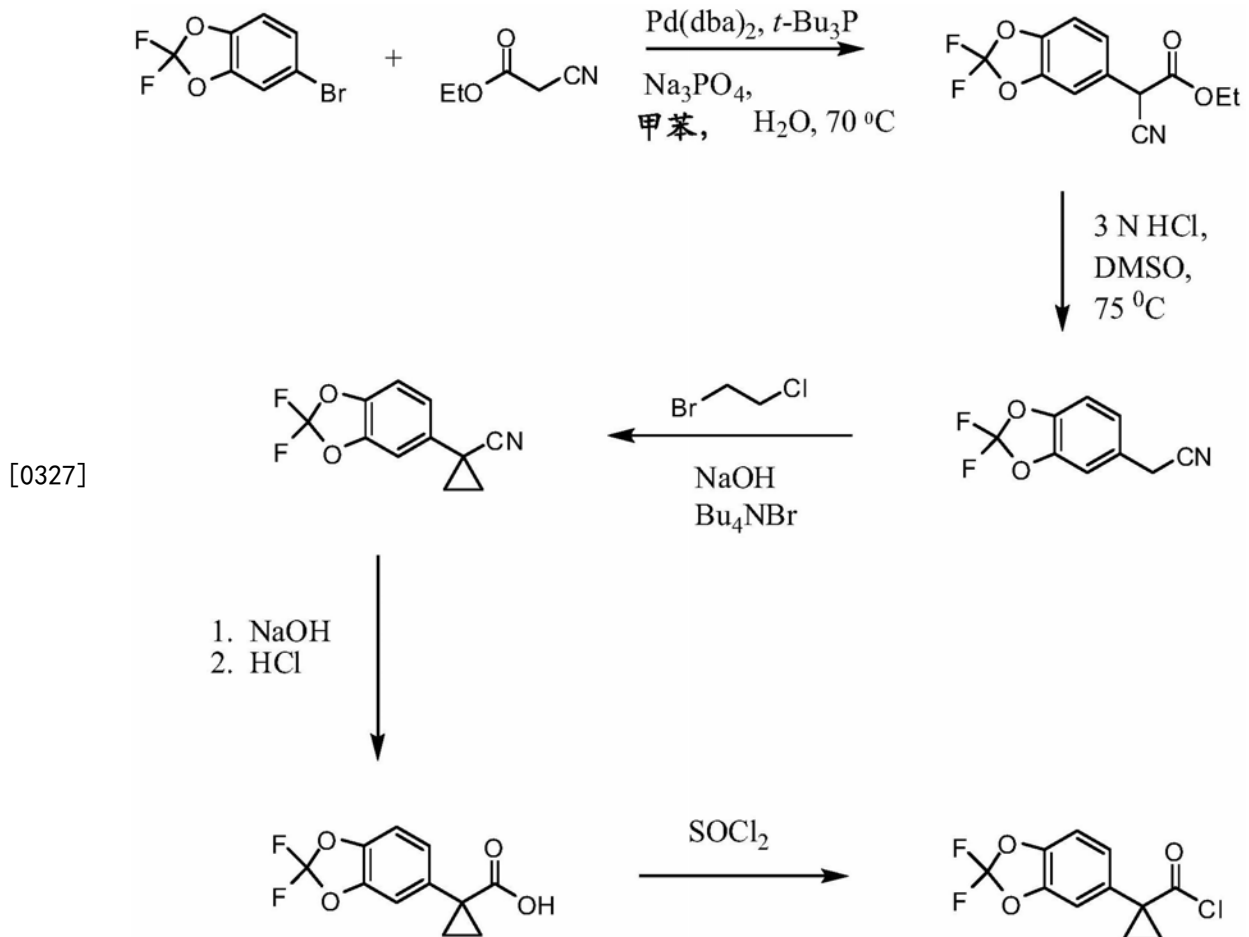
[0322] 方案1. 酰氯部分的合成。



[0324] 方案1示出了1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷羰基氯的制备,其用于方案3中以形成化合物1的酰胺键。

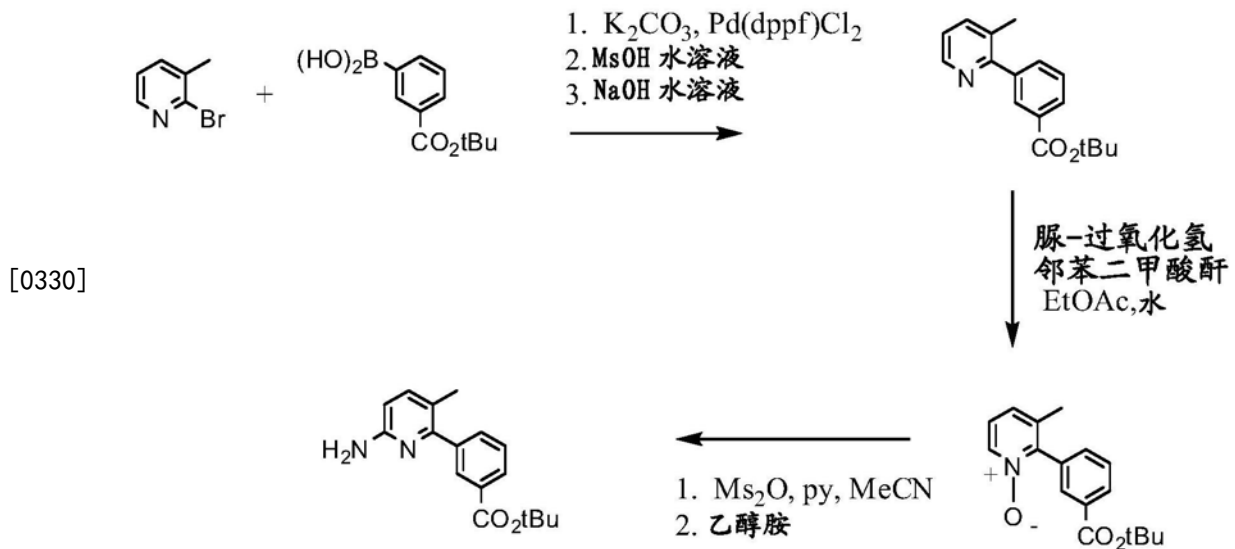
[0325] 原料2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-甲酸从赛拓(Saltigo)(朗盛(Lanxess Corporation)子公司)商购获得。将2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-甲酸中的羧酸部分还原成伯醇然后使用亚硫酰氯(SOCl<sub>2</sub>)转化成相应的氯化物,提供5-(氯甲基)-2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯,随后使用氰化钠将其转化成2-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)乙腈。将2-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)乙腈用碱和1-溴-2-氯乙烷处理提供1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲腈。将1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲腈中的腈部分用碱转化成羧酸得到1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酸,将其用亚硫酰氯转化成所需的酰氯。

[0326] 方案2.酰氯部分的另一种合成.



[0328] 方案2示出了必需的酰氯的替代合成。将5-溴甲基-2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯在存在钯催化剂的情况下与氰基乙酸乙酯偶联以形成相应的 $\alpha$ 氰基乙酯。将酯部分皂化成羧酸得到氰基乙基化合物。将氰基乙基化合物用1-溴-2-氯乙烷在存在碱的情况下烷基化得到氰基环丙基化合物。将氰基环丙基化合物用碱处理得到羧酸盐,将其通过用酸处理而转化成羧酸。然后使用例如亚硫酰氯等氯化剂实现羧酸向酰氯的转化。

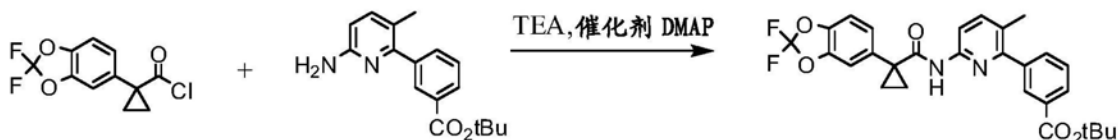
[0329] 方案3.胺部分的合成.



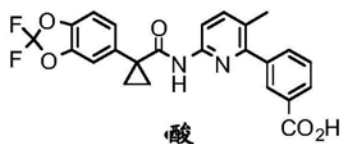
[0331] 方案3示出了必需的3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯的制备,其在方

案3中与1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷羰基氯偶联得到化合物1。2-溴-3-甲基吡啶与3-(叔丁氧羰基)苯基硼酸的钯催化偶联得到3-(3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯,其随后转化成所需的化合物。

[0332] 方案4. 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的酸式盐的形成。



[0333]



[0334] 方案4示出了使用三乙胺和4-二甲基氨基吡啶进行1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氯与3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯的偶联最初提供化合物1的叔丁酯。

[0335] 化合物1形式I

[0336] 化合物1形式I通过将化合物1的盐形式(例如HCl盐)在适合的溶剂中分散或溶解有效的时长而制备。将叔丁酯用例如HCl的酸处理得到化合物1的HCl盐,其典型地为结晶固体。化合物1形式I还可以通过用适合的酸(例如甲酸)处理而直接由叔丁酯前体制备。

[0337] 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的HCl盐可用于通过将3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的HCl盐在适合的溶剂中分散或溶解有效的时长而制备形式I。可以使用3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的其它盐,例如衍生自其它矿物酸或有机酸的盐。其它盐由叔丁酯部分的酸介导的水解而得到。衍生自其它酸的盐可包括例如硝酸、硫酸、磷酸、硼酸、乙酸、苯甲酸和丙二酸。3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的这些盐形式可根据所用的溶剂为可溶的或不溶的,但溶解性不足不会阻碍化合物1形式I的形成。例如,在一个实施方案中,适合的溶剂可以为水或醇/水混合物,例如50%甲醇/水混合物,即使3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的HCl盐形式仅微溶于水。在一个实施方案中,适合的溶剂为水。

[0338] 由3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的盐形成化合物1形式I的有效时长可以为2至24小时的任何时间或更长。已经认识到,所需的时长与温度成反比。也就是说,温度越高,实现酸解离形成化合物1形式I所需的时间越短。当溶剂为水时,在室温下将分散体搅拌约24小时以大约98%的收率提供化合物1形式I。如果出于工艺目的需要3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸的盐的溶液,则可以使用升高的

温度。在升高的温度下将溶液搅拌有效的时长后,在冷却时的重结晶提供基本上纯的化合物1形式I。在一个实施方案中,基本上纯的是指大于约90%的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的是指大于约95%的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的是指大于约98%的纯度。在另一个实施方案中,基本上纯的是指大于约99%的纯度。所选的温度部分地取决于所用的溶剂,并完全在本领域普通技术人员的能力范围内。在一个实施方案中,该温度在室温与约80°C之间。在另一个实施方案中,该温度在室温与约40°C之间。在另一个实施方案中,该温度在约40°C与约60°C之间。在另一个实施方案中,该温度在约60°C与约80°C之间。

[0339] 化合物1形式I也可直接由作为化合物1的盐的前体的3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯(参阅方案3)形成。因此,使3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯在适合的反应条件下与适合的酸(例如甲酸)发生反应以得到化合物1形式I。

[0340] 化合物1形式I可通过从有机溶剂中重结晶而进一步纯化。有机溶剂的实例包括但不限于甲苯、异丙基苯、茴香醚、1-丁醇、醋酸异丙酯、醋酸丁酯、醋酸异丁酯、甲基叔丁基醚、甲基异丁基酮和1-丙醇-水混合物。温度可以为如上所述的温度。例如,将化合物1形式I在75°C下溶于1-丁醇直至其完全溶解。将溶液以0.2°C/min的速率冷却到10°C得到化合物1形式I的晶体,其可以通过过滤而分离。

[0341] 在一个实施方案中,化合物1形式I的特征在于在使用Cu K $\alpha$ 辐射得到的X射线粉末衍射图中在15.2–15.6度、16.1–16.5度和14.3–14.7度的一个或多个峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征在于在15.4、16.3和14.5度的一个或多个峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在14.6–15.0度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在14.8度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在17.6–18.0度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在17.8度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在16.4–16.8度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在16.4–16.8度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在16.6度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在7.6–8.0度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在7.8度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在25.8–26.2度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在26.0度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在21.4–21.8度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在21.6度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在23.1–23.5度的峰。在另一个实施方案中,化合物1形式I的特征还在于在23.3度的峰。在一些实施方案中,化合物1形式I的特征在于与图1基本上类似的衍射图。在一些实施方案中,化合物1形式I的特征在于与图2基本上类似的衍射图。

[0342] 在一些实施方案中,对于化合物1形式I,D90粒度分布为约82 $\mu\text{m}$ 或以下。在一些实施方案中,对于化合物1形式I,D50粒度分布为约30 $\mu\text{m}$ 或以下。

[0343] 化合物2

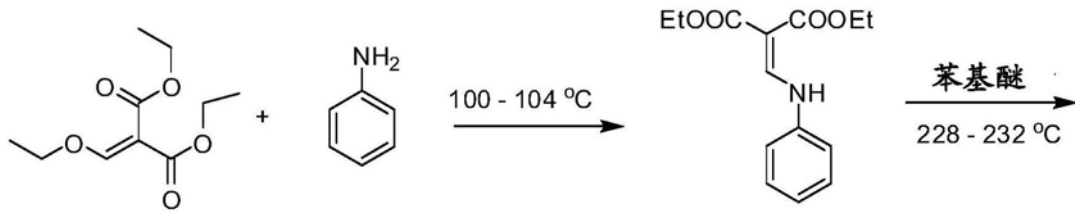
[0344] 化合物2是包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的起点,且可以通过使4-氧

代-二氢喹啉甲酸部分与胺部分根据方案5-7偶联制备。

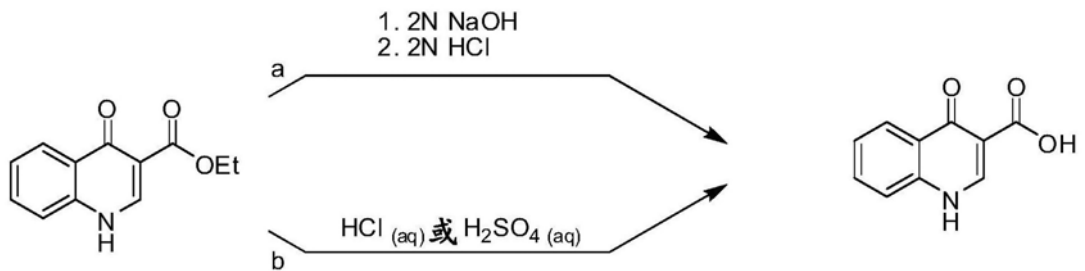
[0345] 方案5:4-氧代-二氢喹啉甲酸部分的合成.

[0346] 苯基醚

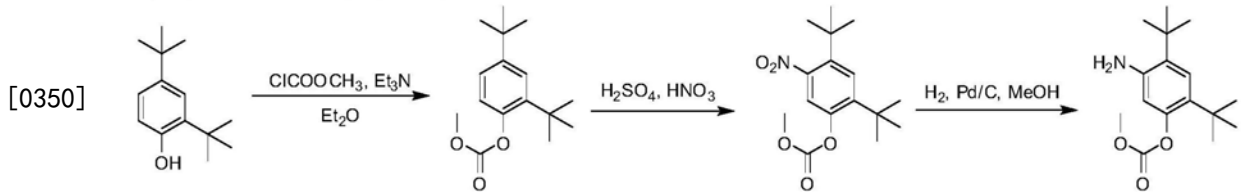
[0347] HCl (水溶液) 或 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (水溶液)



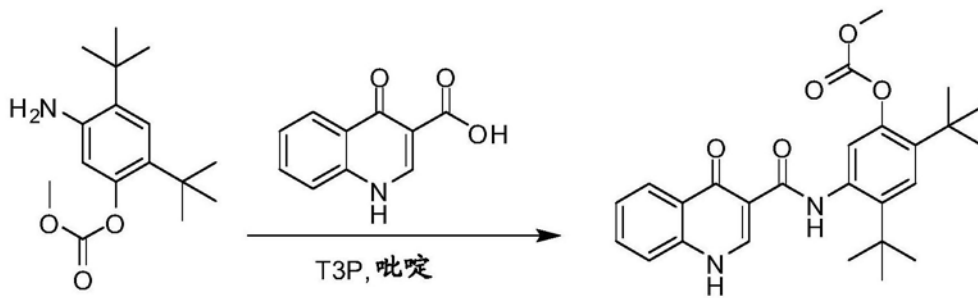
[0348]



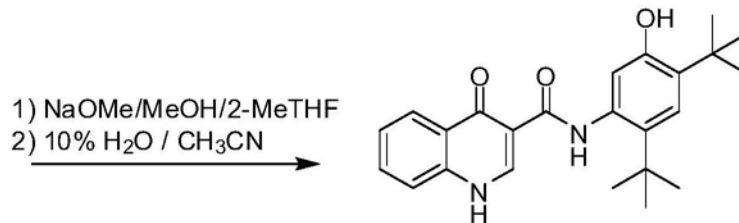
[0349] 方案6:胺部分的合成.



[0351] 方案7:4-氧代-二氢喹啉甲酸与胺部分的偶联.



[0352]



化合物 2

[0353] 包含基本上无定形的化合物2的固体分散体

[0354] 可以通过喷雾干燥法以化合物2为原料制备化合物2的无定形形式。喷雾干燥是将

液体进料转化成干燥颗粒形式的工艺。任选地,干燥工艺例如流化床干燥或真空干燥可以用于将残留溶剂减少至药学上可接受的水平。典型地,喷雾干燥包括使高度分散的液体混悬液或溶液和足够体积的热空气接触,以便对液滴产生蒸发和干燥作用。喷雾干燥的制备物可以是任意的溶液、粗混悬液、浆液、胶态分散体或糊剂,可以使用选择的喷雾干燥设备使它们雾化。在一种标准的方法中,将制备物喷入温热过滤的空气流,它可以蒸发溶剂并且将干燥产物传送至收集器(例如旋风分离器)。然后用溶剂耗尽消耗的空气,或者将消耗的空气传送至冷凝器以俘获溶剂并且能够使其再循环。商购类型的设备可以用于进行喷雾干燥。例如,商购喷雾干燥器由Buchi Ltd.和Niro制造(例如,由Niro制造的喷雾干燥PSD管线)(参见US 2004/0105820;US 2003/0144257)。

[0355] 喷雾干燥典型地使用约3%—约30%重量的固体材料(即药物和赋形剂)载量,例如约4%—约20%重量,优选至少约10%。一般而言,固体载量的上限由得到的溶液的粘度(例如,泵送能力)和成分在溶液中的溶解度决定。一般而言,溶液的浓度可以决定得到的粉末产物中颗粒的大小。

[0356] 用于喷雾干燥的技术和方法可以在Perry's Chemical Engineering Handbook,第6版,R.H.Perry,D.W.Green&J.O.Maloney,eds.),McGraw-Hill book co.(1984);和Marshall“Atomization and Spray-Drying”50,Chem.Eng.Prog.Monogr.Series 2(1954)中找到。一般而言,喷雾干燥使用约60°C—约200°C例如约95°C—约185°C、约110°C—约182°C、约96°C—约180°C例如约145°C的入口温度进行。喷雾干燥一般使用约30°C—约90°C例如约40°C—约80°C、约45°C—约80°C例如约75°C的出口温度进行。雾化流速一般约为4kg/h—约12kg/h,例如约4.3kg/h—约10.5kg/h,例如约6kg/h或约10.5kg/h。进料速率一般约为3kg/h—约10kg/h,例如约3.5kg/h—约9.0kg/h,例如约8kg/h或约7.1kg/h。雾化速率一般约为0.3—1.7,例如约0.5—1.5,例如约0.8或约1.5。

[0357] 除去溶剂可能需要随后的干燥步骤,例如塔板干燥、流化床干燥(例如,约室温—约100°C)、真空干燥、微波干燥、转鼓干燥或双圆锥体真空干燥(biconical vacuum drying)(例如,约室温—约200°C)。

[0358] 在一个实施方案中,喷雾干燥的分散体是流化床干燥的。

[0359] 在一种工艺中,溶剂包括挥发性溶剂,例如具有低于约100°C的沸点的溶剂。在一些实施方案中,溶剂包括溶剂混合物,例如挥发性溶剂的混合物或挥发性和非挥发性溶剂的混合物。如果使用溶剂混合物,则该混合物可以包括一种或多种挥发性溶剂,例如其中非挥发性溶剂以低于约15%例如低于约12%、低于约10%、低于约8%、低于约5%、低于约3%或低于约2%存在于混合物中。

[0360] 优选的溶剂是这样的溶剂,其中化合物2具有至少约10mg/ml(例如,至少约15mg/ml、20mg/ml、25mg/ml、30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml、50mg/ml或以上)的溶解度。更优选的溶剂包括这样的溶剂,其中化合物2具有至少约20mg/ml的溶解度。

[0361] 可以测试的示例性溶剂包括丙酮、环己烷、二氯甲烷、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1,3-二甲基-2-咪唑烷酮(DMI)、二甲亚砜(DMSO)、二噁烷、乙酸乙酯、乙醚、冰醋酸(HAc)、甲基乙基酮(MEK)、N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、甲基叔丁基醚(MTBE)、四氢呋喃(THF)、戊烷、乙腈、甲醇、乙醇、异丙醇、乙酸异丙酯和甲苯。示例性共溶剂包括丙酮/DMSO、丙酮/DMF、丙酮/水、MEK/水、THF/水、二噁烷/水。在两种溶剂系统中,溶剂

可以以约0.1%—约99.9%存在。在一些优选的实施方案中,水是丙酮的共溶剂,其中水以约0.1%—约15%、例如约9%—约11%、例如约10%存在。在一些优选的实施方案中,水是MEK的共溶剂,其中水以约0.1%—约15%、例如约9%—约11%、例如约10%存在。在一些实施方案中,溶剂溶液包括三种溶剂。例如丙酮和水可以与第三种溶剂例如DMA、DMF、DMI、DMSO或HAc混合。在基本上无定形的化合物2是固体分散体的成分的情况下,优选的溶剂溶解化合物2和所述聚合物。适合的溶剂包括上述那些溶剂,例如MEK、丙酮、水、甲醇及其混合物。

[0362] 粒度和温度干燥范围可以改变以制备最佳的喷雾干燥分散体。正如本领域技术人员可以理解的,小粒度会导致溶剂除去的改善。然而,申请人已经发现,小颗粒可以产生松散的颗粒,在一些情况中,无法提供用于下游加工例如压片的最佳喷雾干燥分散体。在较高温度下,基本上无定形的化合物2可能发生结晶或化学降解。在较低温度下,无法除去足量的溶剂。本文的方法提供了最佳的粒度和最佳的干燥温度。

[0363] 一般而言,粒度使得D10 ( $\mu\text{m}$ ) 是低于约5,例如低于约4.5、低于约4.0或低于约3.5, D50 ( $\mu\text{m}$ ) 一般低于约17,例如低于约16、低于约15、低于约14、低于约13;且D90 ( $\mu\text{m}$ ) 一般低于约175,例如低于约170、低于约170、低于约150、低于约125、低于约100、低于约90、低于约80、低于约70、低于约60或低于约低于约50。一般而言,喷雾干燥颗粒的堆积密度约为0.08g/cc—约0.20g/cc,例如约0.10—约0.15g/cc,例如约0.11g/cc或约0.14g/cc。对于10次轻振,喷雾干燥颗粒的振实密度一般约为0.08g/cc—约0.20g/cc,例如约0.10—约0.15g/cc,例如约0.11g/cc或约0.14g/cc;对于500次轻振,一般约为0.10g/cc—约0.25g/cc,例如约0.11—约0.21g/cc,例如约0.15g/cc、约0.19g/cc或约0.21g/cc;对于1250次轻振,一般约为0.15g/cc—约0.27g/cc,例如约0.18—约0.24g/cc,例如约0.18g/cc、约0.19g/cc、约0.20g/cc或约0.24g/cc;且对于2500次轻振,一般约为0.15g/cc—约0.27g/cc,例如约0.18—约0.24g/cc,例如约0.18g/cc,约0.21g/cc,约0.23g/cc或约0.24g/cc。

#### [0364] 聚合物

[0365] 本文还包括喷雾干燥分散体,其包括无定形化合物2和聚合物(或固态载体)。例如,化合物2作为固体无定形分散体的成分的无定形化合物存在。固体无定形分散体一般包括基本上无定形的化合物2和聚合物。示例性聚合物包括纤维质聚合物,例如HPMC或HPMCAS;和包含吡咯烷酮的聚合物,例如PVP/VA。在一些实施方案中,固体无定形分散体包括一种或多种另外的赋形剂,例如表面活性剂。

[0366] 在一个实施方案中,聚合物能够溶于水性介质中。所述聚合物的溶解度可以是不依赖于pH的或pH-依赖性的。后者包括一种或多种肠溶聚合物。术语“肠溶”是指相对于胃的酸性较强环境优先在酸性较弱的肠环境中溶解的聚合物,例如,不溶于酸性水介质、而在pH高于5-6时可溶的聚合物。适合的聚合物应是化学和生物学惰性的。为了改善喷雾干燥分散体的物理稳定性,所述聚合物的玻璃转化温度( $T_g$ ) 应尽可能高。例如,优选的聚合物具有至少等于或大于药物(即化合物2)的玻璃转化温度的玻璃转化温度。其它优选的聚合物具有在药物(即化合物2)的约10—约15°C范围内的玻璃转化温度。所述聚合物的适合的玻璃转化温度的实例包括至少约90°C、至少约95°C、至少约100°C、至少约105°C、至少约110°C、至少约115°C、至少约120°C、至少约125°C、至少约130°C、至少约135°C、至少约140°C、至少约145°C、至少约150°C、至少约155°C、至少约160°C、至少约165°C、至少约170°C或至少约175

℃(正如在干燥条件下测定的)。不希望受到理论约束,认为潜在的机理是具有较高 $T_g$ 的聚合物在室温下一般具有较低的分子流动性,这可能是使无定形喷雾干燥分散体的物理稳定性稳定的决定性因素。

[0367] 另外,所述聚合物的吸湿性低至例如低于约10%。为了本申请中比较的目的,聚合物或组合物的吸湿性的特征在于约60%的相对湿度。在一些优选的实施方案中,所述聚合物具有低于约10%吸水率,例如低于约9%、低于约8%、低于约7%、低于约6%、低于约5%、低于约4%、低于约3%或低于约2%吸水率。吸湿性还可以影响喷雾干燥分散体的物理稳定性。一般而言,吸附在所述聚合物中的湿气可以显著地降低所述聚合物和得到的喷雾干燥分散体的 $T_g$ ,这可能进一步降低如上所述的喷雾干燥分散体的物理稳定性。

[0368] 在一个实施方案中,所述聚合物是一种或多种水溶性聚合物或部分水溶性聚合物。水溶性或部分水溶性聚合物包括、但不限于纤维素衍生物(例如,羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)或乙基纤维素;聚乙烯吡咯烷酮(PVP);聚乙二醇(PEG);聚乙烯醇(PVA);丙烯酸酯,例如聚甲基丙烯酸酯(例如,**Eudragit®E**);环糊精(例如, $\beta$ -环糊精)及其共聚物和衍生物,包括例如PVP-VA(聚乙烯吡咯烷酮-醋酸乙烯酯)。

[0369] 在一些实施方案中,所述聚合物是羟丙基甲基纤维素(HPMC),例如HPMCAS、HPMC E50、HPMCE15或HPMC60SH50)。

[0370] 正如本文所讨论的,所述聚合物可以是pH-依赖性肠溶聚合物。这样的pH-依赖性肠溶聚合物包括、但不限于纤维素衍生物(例如,醋酸邻苯二甲酸纤维素(CAP))、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCP)、醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS)、羧甲基纤维素(CMC)或其盐(例如,钠盐,例如(CMC-Na));醋酸偏苯三酸纤维素(CAT)、醋酸邻苯二甲酸羟丙基纤维素(HPCAP)、醋酸邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAP)和醋酸邻苯二甲酸甲基纤维素(MCAP)或聚甲基丙烯酸酯(例如,**Eudragit®S**)。在一些实施方案中,所述聚合物是醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS)。在一些实施方案中,所述聚合物是HG级醋酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS-HG)。

[0371] 在另一个实施方案中,所述聚合物是聚乙烯吡咯烷酮共聚物,例如乙基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物(PVP/VA)。

[0372] 在实施方案中,其中化合物2与聚合物例如与HPMC、HPMCAS或PVP/VA聚合物形成喷雾干燥分散体,聚合物相对于喷雾干燥分散体总重的量约为0.1%—99%重量。除非另有指定,否则如分散体中所述的药物、聚合物和其它赋形剂的百分比均按重量百分比给出。聚合物的量典型地至少约20%且优选至少约30%,例如至少约35%、至少约40%、至少约45%或约50%(例如,49.5%)。该量典型地约为99%或以下且优选约80%或以下,例如约75%或以下,约70%或以下,约65%或以下,约60%或以下或约55%或以下。在一个实施方案中,所述聚合物的量占分散体总重的至多约50%(且甚至更具体地为约40%—50%,例如约49%、约49.5%或约50%)。HPMC和HPMCAS以不同等级购自ShinEtsu,例如HPMCAS以不同种类得到,包括AS-LF、AS-MF、AS-HF、AS-LG、AS-MG、AS-HG。这些等级各自在醋酸酯和琥珀酸酯的取代百分比方面可变。

[0373] 在一些实施方案中,基本上无定形的化合物2和聚合物以基本上等量存在,例如所述聚合物和药物各自约占分散体总百分比的一半。例如,所述聚合物以约49.5%存在且所述药物以约50%存在。

[0374] 在一些实施方案中,合并的基本上无定形的化合物2和所述聚合物占喷雾干燥前非喷雾干燥分散体的总固体含量的1%—20%w/w。在一些实施方案中,合并的基本上无定形的化合物2和所述聚合物占喷雾干燥前非喷雾干燥分散体的总固体含量的5%—15%w/w。在一些实施方案中,合并的基本上无定形的化合物2和所述聚合物占喷雾干燥前非喷雾干燥分散体的总固体含量的约11%w/w。

[0375] 在一些实施方案中,所述分散体还包括另外的少量成分,例如表面活性剂(例如,SLS)。在一些实施方案中,所述表面活性剂在分散体中的存在量低于约10%,例如低于约9%、低于约8%、低于约7%、低于约6%、低于约5%、低于约4%、低于约3%、低于约2%、约1%或约0.5%。

[0376] 在包括聚合物的实施方案中,所述聚合物应以有效稳定喷雾干燥分散体的量存在。稳定包括抑制或防止基本上无定形的化合物2结晶。这样的稳定可以抑制化合物2从无定形转化成晶型。例如,所述聚合物可以防止至少部分(例如,约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%或以上)的化合物2从无定形转化成晶型。例如,可以通过测定喷雾干燥分散体的玻璃转化温度、测定无定形材料的松散比例或通过测定化合物2的溶解度或生物利用度确定稳定。

[0377] 用于与化合物2组合例如形成喷雾干燥分散体(例如无定形喷雾干燥分散体)的适合的聚合物应具有如下特性的一种或多种:

[0378] 所述聚合物的玻璃转化温度具有不低于基本上无定形的化合物2的玻璃转化温度约10-15°C的温度。优选地,所述聚合物的玻璃转化温度高于基本上无定形的化合物2的玻璃转化温度,且一般高于药物产品的期望的储存温度至少50°C。例如,至少约100°C、至少约105°C、至少约110°C、至少约120°C、至少约130°C、至少约140°C、至少约150°C、至少约160°C、至少约160°C或以上。

[0379] 所述聚合物应是相对不吸湿的。例如,当储存在标准条件下时,所述聚合物应吸收低于约10%水,例如低于约9%、低于约8%、低于约7%、低于约6%或低于约5%、低于约4%或低于约3%的水。优选地,所述聚合物在储存在标准条件下时应基本上不吸水。

[0380] 所述聚合物在适合于喷雾干燥工艺的溶剂中应具有与化合物2类似或更好的溶解度。在优选的实施方案中,所述聚合物可以溶于与化合物2相同的溶剂的一种或多种溶剂系统。优选所述聚合物溶于至少一种不含羟基的溶剂中,例如二氯甲烷、丙酮或其组合。

[0381] 在与基本上无定形的化合物2合并例如合并喷雾干燥分散体或液体混悬液中时,相对于无所述聚合物存在下化合物2的溶解度,或相对于与参比聚合物合并时化合物2的溶解度,所述聚合物应增加化合物2在水和生理相关介质中的溶解度。例如,所述聚合物可以通过减少从固体无定形分散体或液体混悬液转化成结晶化合物2的无定形化合物2的量而增加无定形化合物2的溶解度。

[0382] 所述聚合物应减少无定形物质的松散比例。

[0383] 所述聚合物应增加基本上无定形的化合物2的物理和/化学稳定性。

[0384] 所述聚合物应改善基本上无定形的化合物2的可制造性。

[0385] 所述聚合物应改善基本上无定形的化合物2的处理、施用或储存特性的一种或多种。

[0386] 所述聚合物不应与其它药物成分例如赋形剂发生不利的相互作用。

[0387] 可以使用本文所述的喷雾干燥法(或其它方法)测试候选聚合物(或其它成分)在形成无定形组合物中的适合性。可以比较候选组合物的稳定性、对形成晶体的抗性或其它特性,并且与参比制品比较,例如纯净无定形化合物2或结晶化合物2的制备。例如,可以测试候选组合物以确定它是否抑制溶剂为介体的结晶启动的时间,或者是在受控条件下在指定时间的转化百分比为至少50%、75%、100%或110%,且可以测试参比制品或候选组合物以确定相对于结晶化合物2其生物利用度或溶解度是否改善。

[0388] 表面活性剂

[0389] 喷雾干燥分散体可以包括表面活性剂。表面活性剂或表面活性剂混合物一般可以减小喷雾干燥分散体与水性介质之间的界面张力。适合的表面活性剂或表面活性剂混合物也可以增强来自喷雾干燥分散体的化合物2的水溶解度和生物利用度。用于本发明所涉及的用途的表面活性剂包括、但不限于脂肪酸酯类(例如,**Spans®**)、聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯类(例如,**Tweens®**)、月桂基硫酸钠(SLS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、丁二酸二辛基磺酸钠(多库酯钠)、二氧胆酸钠盐(dioxycholic acid sodium salt)(DOSS)、硬脂山梨坦、三硬脂山梨坦、溴化十六烷基三甲基铵(HTAB)、N-月桂酰肌氨酸钠、油酸钠、肉豆蔻酸钠、硬脂酸钠、棕榈酸钠、Gelucire 44/14、乙二胺四乙酸(EDTA)、维生素E d- $\alpha$ 生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS)、卵磷脂、MW 677-692、谷氨酸一钠一水合物(Glutamic acid monosodium monohydrate)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol)、PEG 8辛酸/癸酸甘油酯类、二乙二醇单乙基醚(Transcutol)、二甘醇单乙醚、Solutol HS-15、聚乙二醇/羟基硬脂酸酯、牛磺胆酸、普卢兰尼克F68、普卢兰尼克F108和普卢兰尼克F127(或任意其它聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(**Pluronic®**)或饱和聚乙二醇化甘油酯类(polyglycolized glycerides)(**Gelucirs®**))。可以用于本发明的这样的表面活性剂的具体实例包括、但不限于司盘65、司盘25、吐温20、Capryol 90、普卢兰尼克F108、月桂基硫酸钠(SLS)、维生素E TPGS、普流罗尼类和共聚物。一般优选SLS。

[0390] 所述表面活性剂(例如,SLS)相对于喷雾干燥分散体总重的量可以在0.1-15%。优选地,其约为0.5%—约10%、更优选约0.5—约5%,例如约0.5—4%、约0.5—3%、约0.5—2%、约0.5—1%或约0.5%。

[0391] 在一些实施方案中,所述表面活性剂相对于喷雾干燥分散体总重的量至少约为0.1%、优选约0.5%。在这些实施方案中,所述表面活性剂可以以不超过约15%且优选不超过约12%、约11%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%、约2%或约1%的量存在。优选一种实施方案,其中所述表面活性剂的量约为0.5%重量。

[0392] 可以按照与用于测试聚合物所述类似的方式测试候选表面活性剂(或其它成分)在用于本发明中的适合性。

[0393] 制备药物组合物的方法

[0394] 本发明的剂量单位形式可以通过在压力下压缩或压制配混物或组合物(例如粉末或颗粒)以形成稳定的三维形状(例如片剂)来制备。如本文所用,“片剂”包括所有形状和大小的压制的药物剂量单位形式,不论是包衣的还是未包衣的。

[0395] 本文所用的术语“片剂”是指适合于所治疗患者的活性剂的物理分散单元。一般而

言,压缩的混合物的密度大于压缩之前的该混合物的密度。本发明的剂量片剂可以具有几乎任何形状,包括凹状和/或凸状表面、圆形或楔形角和圆形至直线形状。在一些实施方案中,本发明的压制片剂包括具有平表面的圆形片剂。本发明的片剂可以通过本领域普通技术人员已知的形成压制固体药物剂型的任何压缩和压制方法来制备。在特定的实施方案中,本文提供的制剂可以使用药物制剂领域技术人员已知的常规方法来制备,如例如在相关教科书中所述。参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st Ed.,Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore,Md.(2003)(《雷明顿:药剂学科学与实践》,第21版,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司,马里兰州巴尔的摩,2003年);Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms And Drug Delivery Systems,7th Edition,Lippincott Williams&Wilkins,(1999)(Ansel等人,《药物剂型和药物递送系统》,第7版,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司,1999年);The Handbook of Pharmaceutical Excipients,4<sup>th</sup> edition,Rowe等人,Eds.,American Pharmaceuticals Association(2003)(《药物赋形剂手册》,第4版,Rowe等人编辑,美国医药协会,2003年);Gibson,Pharmaceutical Preformulation And Formulation,CRC Press(2001)(Gibson,《药物预制剂和制剂》,CRC出版社,2001年),将这些参考文献作为参考完整地并入本文。

#### [0396] 制粒和压制

[0397] 在一些实施方案中,按照本文所示的配方称取各成分。接下来,将所有颗粒内成分过筛,并充分混合。可以用适合的润滑剂(例如硬脂酸镁)润滑这些成分。下一步可以包括压缩/击压粉末配混物和过筛后的成分。接下来,将压缩或击压后的共混物碾磨成颗粒,并过筛,以得到所需的大小。接下来,进一步用例如硬脂酸镁润滑颗粒。接下来,可以在适合的冲头上压制本发明的颗粒组合物以形成根据本发明的各种药物制剂。任选地,可以用薄膜衣、着色剂或其它包衣对片剂包衣。

[0398] 发明的另一个方面提供了制备药物组合物的方法,该方法包括:提供组合物的配混物,其中该组合物包含化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和一种或多种选自以下的赋形剂:填充剂、稀释剂、粘合剂、表面活性剂、润滑剂、崩解剂;以及将该组合物压制成片剂,这种片剂在约30分钟内的溶出度为至少约50%。

[0399] 在另一个实施方案中,进行湿法制粒工艺,以由粉末成分和液体成分的配混物得到本发明的药物制剂。例如,按照本文所示的配方称取包含组合物(该组合物包含化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和一种或多种选自以下的赋形剂:填充剂、粘合剂、表面活性剂或崩解剂)的配混物的药物组合物。接下来,将所有颗粒内成分过筛,并在高剪切或低剪切制粒机中使用水或含表面活性剂的水或含粘合剂的水或含表面活性剂和粘合剂的水混合,以使粉末共混物形成颗粒。也可以使用非水流体,其含或不表面活性剂和/或粘合剂,以使粉末共混物形成颗粒。接下来,可以任选地使用适合的碾磨机来碾磨湿润的颗粒。接下来,可以任选地通过以任何适合的方式干燥成分从而从配混物中除去水。接下来,可以任选地将干燥的颗粒碾磨至所需的大小。接下来,可以通过共混的方式加入颗粒外赋形剂(例如填充剂、稀释剂和崩解剂)。接下来,可以用硬脂酸镁和崩解剂(例如交联羧甲纤维素钠)进一步润滑大小已确定的颗粒。接下来,可以将本发明的颗粒组合物过筛足够的时间以得到正确的大小,然后可以在适合的冲头上压制以形成根据本发明的各种药物制剂。任选地,可以用薄膜衣、着色剂或其它包衣对片剂包衣。令人惊奇地,可以在基

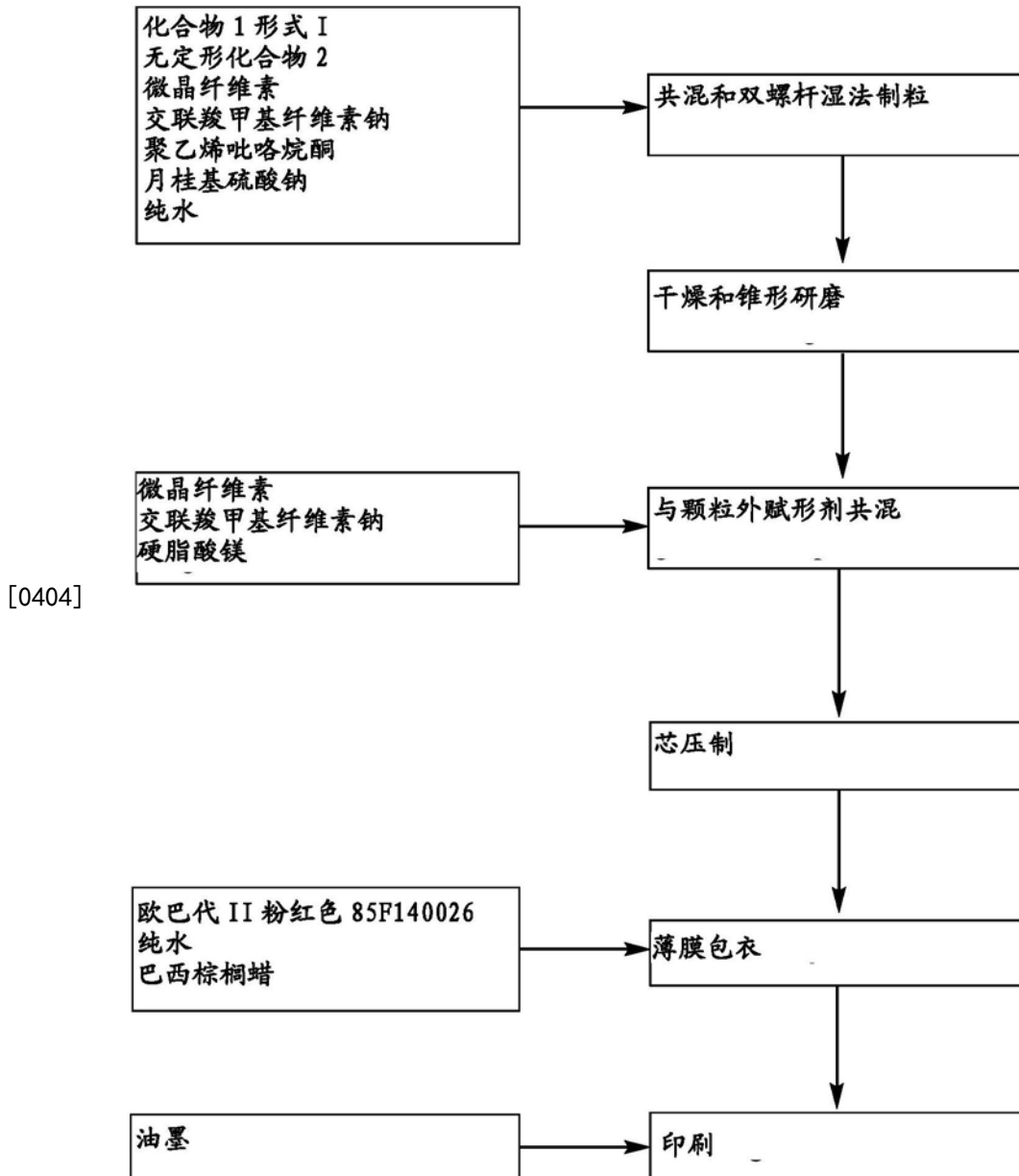
本上不损耗化合物1形式I或基本上无定形的化合物2的固态形式的情况下进行湿法制粒。

[0400] 在一个尤其有利的实施方案中,本发明的药物组合物通过连续双螺杆湿法制粒(TSWG)工艺制备。连续制造通过在线监测和控制提供高质量和高度一致的产品。连续制造还通过具有“数据丰富的”设计空间的设计开发而有利于质量,并易于理解上游变量对下游工艺和最终产品质量的影响。此外,本发明的药物组合物可及早在商业规模的设备上定型,这避免了工艺放大风险和开发晚期的配方变化。最后,连续制造具有商业制造优点,例如改进的工艺控制、减少的产品处理以及实时放行效率。总体结果是更稳健、可控和可放大的工艺,这种工艺具有更少的过程检查,从而实现产品质量的升高并因此实现更大的患者安全性。这些优点解决了Janet Woodcock的(药物评价和研究中心(Center for Drug Evaluation and Research) (CDER)的领导者)的关切,即化学、制造和控制(CMC)不能保持高效疗法的快速临床研发(“What we are seeing is that often the rate limiting step is going to be manufacturing,”2013年7月24日, Friends of Cancer hosted congressional briefing “Answering a Compelling Need: Expediting Life-Saving Treatments to Patients” to discuss the Food and Drug Administration’s Breakthrough Therapy Designation)。

[0401] 例如,高剪切制粒(HSG)(一种常见的制粒技术)熟知的是存在过度制粒和工艺控制不良的风险。该工艺的放大极具挑战性,并涉及重大风险。从HSG工艺变成连续TSWG工艺允许使用相同的设备进行放大以通过运行更长的时间产生不同的批量。这消除了湿法使用其它制粒工艺通常遇到的放大风险。另外,据发现,TSWG工艺更稳健、不易制粒过度。如在化合物1片剂的图3中可以看出,HSG工艺显示出随着水含量的增加溶出的明显减缓,而TSWG工艺对于类似的水添加范围未显示出变化。令人惊讶的是,对于使用双螺杆湿法制粒工艺的包含45-55重量%的化合物1的片剂制剂和包含60-70重量%的化合物1的片剂制剂未发现性能的变化。而HSG工艺则并非如此。另外,这种连续的且高产品质量的工艺解决了FDA关于对其有需要的患者无药可用的普遍抱怨。

[0402] 在一个实施方案中,该连续工艺以单独的赋形剂和化合物1和化合物2通过失重式进料进入连续在线共混机而开始。从该共混机,材料按以下过程连续传输并加工:双螺杆湿法制粒、干燥、研磨、颗粒外添加赋形剂、共混、压片和包薄膜衣。

[0403] 例如,在一个实施方案中,可根据以下流程图连续制备包含包含化合物1和化合物2的片剂。



[0405] 这种示例性配混物的每种成分如上文和下文的实例所述。此外，该配混物可以包含任选的添加剂，例如上文和下文的实施例描述的一种或多种着色剂、一种或多种矫味剂和/或一种或多种芳香剂。在一些实施方案中，上文和下文的实施例还提供了该配混物中的这些成分（和任何任选的添加剂）的每一者的相对浓度（例如wt%）。可以按顺序或以任何添加组合来提供构成该配混物的成分；并且可以按任何顺序提供这些成分或成分的组合。在一个实施方案中，润滑剂是最后加入配混物的最终成分。

[0406] 在另一个实施方案中，配混物包含化合物1形式I、固体分散体的基本上无定形的化合物2和任何一种或多种以下赋形剂的组合物：粘合剂、表面活性剂、稀释剂、润滑剂、崩解剂和填充剂，其中这些成分的每一者以粉末形式提供（例如，作为具有通过光散射法测得的250 $\mu\text{m}$ 或更低（例如150 $\mu\text{m}$ 或更低、100 $\mu\text{m}$ 或更低、50 $\mu\text{m}$ 或更低、45 $\mu\text{m}$ 或更低、40 $\mu\text{m}$ 或更低或35 $\mu\text{m}$ 或更低）的平均直径的粒子而提供）。

[0407] 在另一个实施方案中，将配混物压制成片剂通过如下方式实现：用配混物填充模板（例如模具），并对配混物施加压力。这可以使用模压机或其它类似的设备来实现。在一些

实施方案中,可以首先将化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和赋形剂的配混物加工成颗粒形式。然后,可以根据制药领域已知的方法筛分颗粒并压制成片剂或进行配制以用于包封。还应注意,对模板中的配混物施加压力可以在每次压制期间使用相同的压力进行重复,或在压制期间使用不同的压力进行。在另一个实例中,可以使用施加足够压力的模压机来压制粉状成分或颗粒的配混物,以形成在约30分钟时溶出约50%或更多(例如,在约30分钟时溶出约55%或更多,或在约30分钟时溶出约60%或更多)的片剂。例如,使用模压机来压制配混物,以产生至少约5kP(至少约5.5kP、至少约6kP、至少约7kP、至少约10kP或至少15kP)的片剂硬度。在一些情况下,压缩配混物以产生约5与20kP之间的片剂硬度。

[0408] 在一些实施方案中,包含如本文所述的药物组合物的片剂可以用按片剂的重量计约3.0重量%的薄膜衣进行包衣,其中薄膜衣包含着色剂。在某些情况下,用于对片剂包衣的着色剂悬浮液或溶液包含按着色剂悬浮液或溶液重量计约20%w/w的固体。在其它情况下,可以将包衣片标上徽标、其它图像或文字。

[0409] 在另一个实施方案中,用于生产药物组合物的方法包括:提供固体形式的配混物,例如,粉末和/或液体成分的配混物,该配混物包含包含化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和一种或多种选自以下的赋形剂:粘合剂、稀释剂、表面活性剂、润滑剂、崩解剂和填充剂;将配混物混合,直到配混物基本上均匀为止,并将配混物压制或压缩成颗粒形式。然后,如上文或下文的实例中所述,可以将包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的颗粒组合物压制成片剂,或配制成胶囊剂。作为另外一种选择,用于生产药物组合物的方法包括:提供化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和一种或多种下列赋形剂的配混物:例如粘合剂、稀释剂、表面活性剂、润滑剂、崩解剂和填充剂;将配混物混合,直到配混物基本上均匀为止,并使用辊压机使用如下文实例所示的干法制粒组合物将配混物压制/压缩成颗粒形式。药物制剂(例如,如本文所述的片剂)可以用颗粒来制备,所述颗粒除了结合选定的本文所述的赋形剂之外还结合了化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体而制备。

[0410] 在一些实施方案中,使用手工混合、混合机、共混机、其任何组合等通过搅拌、共混、摇动等方式对配混物进行混合。当按顺序添加成分或成分的组合时,混合可以在顺序添加之间进行、在添加成分的整个过程中连续进行、在添加所有成分或成分的组合之后进行,或以其任何组合形式进行。对配混物进行混合,直到其具有基本上均匀的组成为止。

[0411] 在另一个实施方案中,本发明包括以适于产生具有高比率的0.1微米与50微米之间粒度的粒子的空气压力在适合的、常规碾磨设备中喷射研磨包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的药物组合物。在另一个实施方案中,该粒度在0.1微米与20微米之间。在另一个实施方案中,该粒度在0.1微米与10微米之间。在另一个实施方案中,该粒度在1.0微米与5微米之间。在又一个实施方案中,所述药物组合物具有为2.0微米的粒度D50。

[0412] 本发明的制剂提供两种APIs的固定剂量以便有效地治疗囊性纤维化,即已接受仅两种来自FDA的突破性疗法认定之一和确实具有正如通过化合物2的无定形固体形式少量损失所确定的令人惊奇的稳定性的组合。图4示出在60%相对湿度下预平衡后在50°C在PC-XVII中随时间变化的化合物2的结晶度。甚至在这些条件下接近1000小时后,5%以下重量

的化合物2已经结晶。图5显示对于PC-XVII,甚至在60%相对适度下预平衡后在60°C的较高温度下,在这些条件下接近1000小时时,10%以下重量的化合物2已经结晶。图6和7显示PC-XIX的结果。因此,本制剂提供在两人惊奇的稳定的药物组合物中两种突破性API的固定剂量的便利性。这样的制剂增加直接涉及搅拌有效治疗的患者的依从性。

[0413] 如上所述制备的剂型可接受根据Test 711“Dissolution”in United States Pharmacopoeia 29,United States Pharmacopoeial Convention,Inc.,Rockville,Md.,2005(“USP”)《美国药典》第29版711溶出度试验,马里兰州罗克维尔美国药典委员会,2005年)的体外溶出度评价,以测定活性物质从该剂型中释放的速率。通过例如高效液相色谱(HPLC)的技术方便地测定活性物质的含量和杂质水平。

[0414] 在一些实施方案中,本发明包括使用包装材料,例如高密度聚乙烯(HDPE)、低密度聚乙烯(LDPE)和或聚丙烯和/或玻璃的容器和密封盒,玻璃纸薄片,铝箔袋和由铝或高密度聚氯乙烯(PVC)(任选地包括干燥剂)、聚乙烯(PE)、聚偏二氯乙烯(PVDC)、PVC/PE/PVDC等组成的泡罩或条板。在使用制药领域常用的化学或物理灭菌技术将包装及其内含物进行适当的灭菌之后,这些包装材料可用于以无菌方式储存各种药物组合物和制剂。

[0415] 施用药物组合物的方法

[0416] 在一个方面,可每天或大约每24小时向患者施用本发明的药物组合物一次。作为另外一种选择,可每天两次向患者施用本发明的药物组合物。作为另外一种选择,大约每12小时一次向患者施用本发明的药物组合物。以口服制剂施用这些药物组合物,所述口服制剂包含约25mg、50mg、100mg、125mg、150mg、200mg、250mg、300mg或400mg化合物1形式I;和约25mg、50mg、100mg、125mg、150mg、200mg或250mg的基本上无定形的化合物2。在该方面,除了化合物1形式I和基本无定形的化合物2之外,药物组合物还包含填充剂;崩解剂;表面活性剂;粘合剂;和润滑剂(取决于药物组合物是颗粒还是片剂)。例如,400mg的化合物1形式I的剂量可包括两片本发明的片剂,每片包含200mg化合物1形式I。250mg的基本上无定形的化合物2的剂量可以包括2片本发明的片剂,其各自包含125mg的基本上无定形的化合物2。

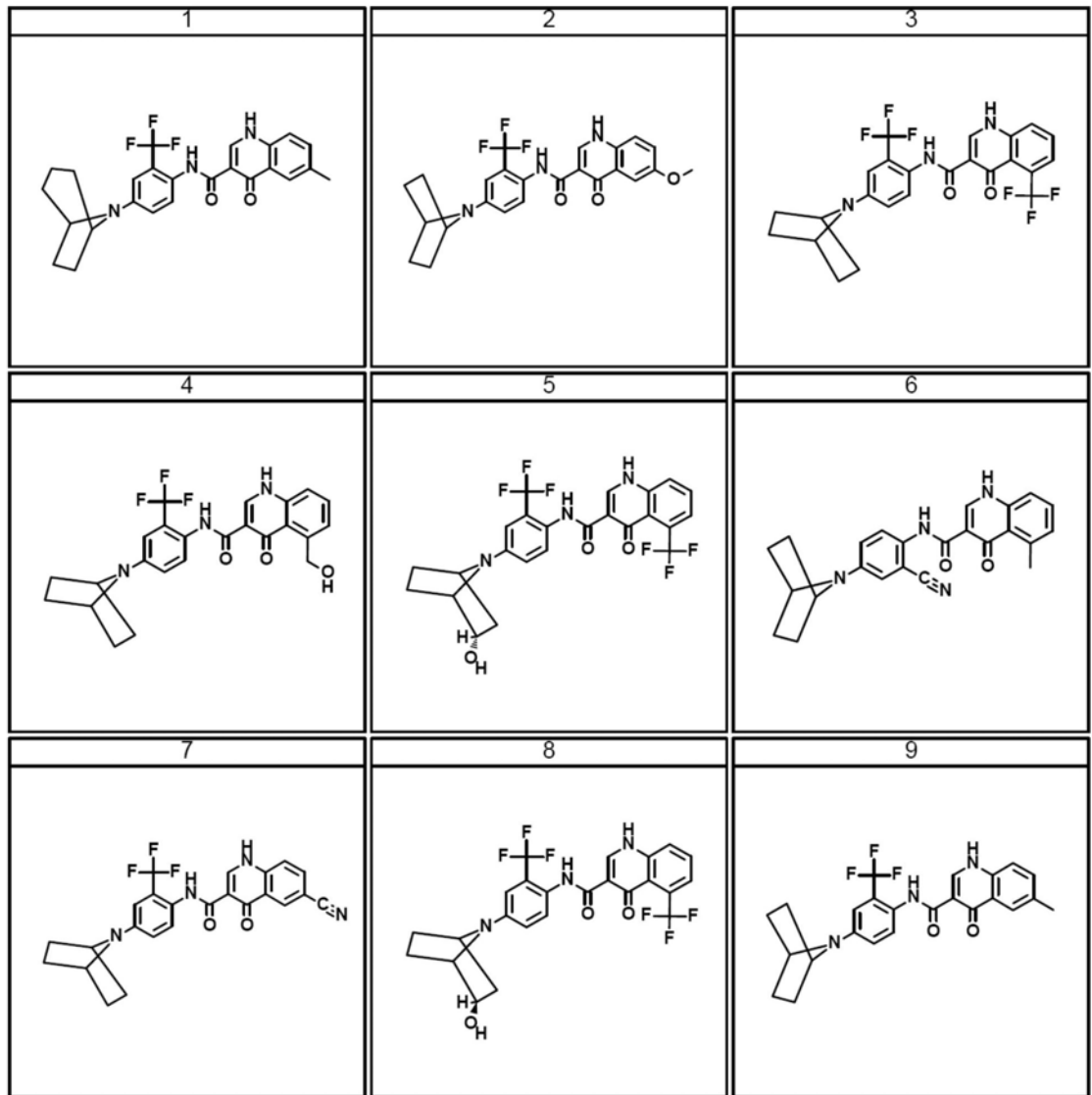
[0417] 将认识到,本发明的化合物以及药学上可接受的组合物和制剂可以在联合疗法中使用;也就是说,化合物1形式I和固体分散体的基本上无定形的化合物2及其药学上可接受的组合物可与一种或多种其它所需的治疗剂或医疗程序同时、在其之前或在其之后施用。

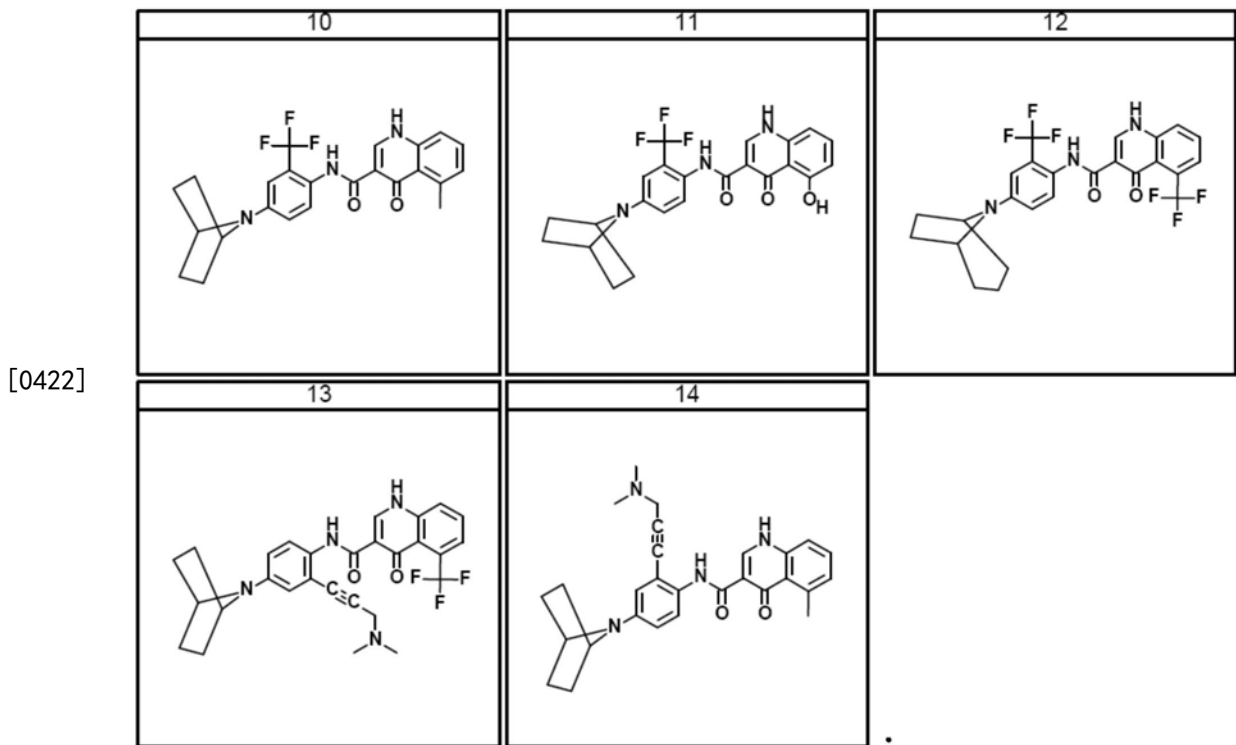
[0418] 在一个实施方案中,该另外的治疗剂选自溶粘蛋白剂、支气管扩张剂、抗生素、抗感染剂、抗炎剂、化合物1形式I和基本无定形的化合物2或营养剂之外的诱导CFTR活性的化合物。

[0419] 在一个实施方案中,该另外的药剂为(R)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(1-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-1H-吡啶-5-基)环丙烷甲酰胺。在另一个实施方案中,该另外的药剂为4-(3-(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)异喹啉-1-基)苯甲酸。在另一个实施方案中,该另外的药剂选自表1:

[0420] 表1.

[0421]





[0422]

[0423] 在另一个实施方案中,该另外的药剂为上述药剂的任意组合。例如,所述组合可以包含本发明的药物组合物或片剂,其包含化合物1形式I和固体分散体的基本上无定形的化合物2,且另外的治疗剂是(R)-1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)-N-(1-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-2-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)-1H-吡啶-5-基)环丙烷甲酰胺。在另一个实例中,所述组合可以包含本发明的药物组合物或片剂,其包含化合物1形式I和固体分散体的基本上无定形的化合物2,且另外的治疗剂是4-(3-(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)异喹啉-1-基)苯甲酸。在另一个实例中,所述组合可以包含本发明的药物组合物或片剂,其包含化合物1形式I和固体分散体的基本上无定形的化合物2,且另外的治疗剂是来自表1的化合物即化合物1至表1的14的任意一种或其任意的组合。

[0424] 在另一个实施方案中,另外的药剂选自表1:

[0425]

表 1
公开在美国专利号 US7, 407, 976 中的化合物 (第 13 栏, 第 35 行-第 66 栏, 第 67 行; 表 1 中化合物 1-100, 第 67 栏, 第 1 行-第 127 栏, 第 42 行)
公开在美国专利号 US7, 645, 789 中的化合物 (第 16 栏, 第 52 行-第 50 栏, 第 22 行; 表 1 中化合物 1-322, 第 50 栏, 第 24 行-第 167 栏, 第 42 行)
公开在美国专利号 US7, 659, 268 中的化合物 (第 16 栏, 第 20 行-第 70 栏, 第 52 行; 表 1 中化合物 1-528, 第 70 栏, 第 53 行-第 331 栏, 第 34 行)
公开在美国专利号 US7, 671, 221 中的化合物 (第 16 栏, 第 12 行-第 54 栏, 第 48 行; 表 1 中化合物 1-1216, 第 54 栏, 第 49 行-第 699 栏, 第 27 行)
公开在美国专利号 US7, 691, 902 中的化合物 (第 16 栏, 第 11 行-第 54 栏, 第 29 行; 表 1 中化合物 1-959, 第 54 栏, 第 29 行-第 683 栏, 第 44 行)
公开在美国专利号 US 中的化合物 7, 741, 321 (第 16 栏, 第 25 行-第 72 栏, 第 7 行 17; 表 1 中化合物 1-422, 第 72 栏, 第 20 行-第 279 栏, 第 15 行)
公开在美国专利号 US7, 754, 739 中的化合物 (第 16 栏, 第 1 行-第 22 栏, 第 47 行; 表 1 中化合物 1-2, 第 18 栏, 第 26-65 行)
公开在美国专利号 US7, 776, 905 中的化合物 (第 16 栏, 第 23 行-第 38 栏, 第 40 行; 表 1 中化合物 1-306, 第 38 栏, 第 45 行-第 96 栏, 第 40 行)
公开在美国专利号 US7, 973, 169 中的化合物 (第 9 栏, 第 16 行-第 40 栏, 第 40 行; 表 1 中化合物 1-289, 第 40 栏, 第 41 行-第 289 栏, 第 39 行)
公开在美国专利号 US7, 977, 322 中的化合物 (第 6 栏, 第 26 行-第 37 栏, 第 47 行; 表 1 中化合物 1-498, 第 37 栏, 第 50 行-第 141 栏, 第 40 行)
公开在美国专利号 US7, 999, 113 中的化合物 (第 6 栏, 第 13 行-第 10 栏, 第 67 行; 表 1 中化合物 1-13, 第 11 栏, 第 5 行-第 13 栏, 第 65 行)
公开在美国专利号 US8, 227, 615 中的化合物 (第 6 栏, 第 10 行-第 29 栏, 第 66 行; 表 1 中化合物 1-78, 第 30 栏, 第 1 行-第 46 栏, 第 48 行)
公开在美国专利号 US8, 299, 099 中的化合物 (第 6 栏, 第 10 行-第 34 栏, 第 18 行; 表 1 中化合物 1-47, 第 34 栏, 第 20 行-第 42 栏, 第 35 行)
公开在美国公布的申请号 US2006-0052358 中的化合物 ([0034]-[0056]; [0077]-[0240]段; [0241]段的表 1 中的化合物 1-320)
公开在美国公布的申请号 US 2009-0143381 中的化合物 ([0102]-[0263]段; 表 1 中 [0264]段的化合物 1-28)
公开在美国公布的申请号 US2009-0170905 中的化合物 ([0012]-[0013]; [0030]-[0051]段)
公开在美国公布的申请号 US2009-0253736 中的化合物 ([0031]-[0162]段; [0163]段表 1 中的化合物 1-15)

	公开在美国公布的申请号 US 2011-0263654 中的化合物 ( [0012]-[0013]; [0066]-[0141]段)
	公开在美国公布的申请号 US2011-0251253 中的化合物 ( [0012]-[0013]; [0054]-[0079]段)
[0426]	公开在 PCT 申请 WO2008141119 中的表 1 中化合物 ( [0100]-[0339]段; [0340]的段化合物 1-117)
	公开在美国申请号 US11/047, 361 中的化合物
	公开在美国公布的申请号 US2013-0116238 中的化合物 ( [0028]-[0044]; [0117]-[0128]段)或其组合

[0427] 在另一个实施方案中,另外的药剂选自表2:

	表 2
	公开在美国公布的申请号 US2005-0113423 中的化合物 ( [00146]段; [0391]-[0392]段的表 1 和 2 中的化合物 IA-1-IA-136 和化合物 I-1-I-21)
	公开在美国公布的申请号 US2005-0059687 中的化合物 ( [00100]-[00101]段; [0169]段的表 1 中的化合物 1-405)
	美国专利号 US7, 598, 412 中公开的化合物 1-108 (第 22 栏, 第 14 行-第 79 栏, 第 20 行; 表 1)
	美国专利号 US7, 495, 103 中公开的化合物 1-485 (第 51 栏, 第 1 行-第 63 栏, 第 43 行; 表 1)
	美国专利号 US8, 354, 427 中公开的化合物 1-718 (第 51 栏, 第 3 行-第 71 栏, 第 46 行; 表 1)
	美国公布的申请号 US2007-0105833 中公开的化合物 1-233 ( [00145]段; 表 1)
[0428]	美国专利号 US8, 242, 149 中公开的化合物 1-26 (第 46 栏, 第 47 行-第 57 栏, 第 37 行; 表 1)
	美国专利号 US8, 314, 256 中公开的化合物 1-18 (第 21 栏, 第 1 行-第 26 栏, 第 19 行)
	美国专利号 US8, 399, 479 中公开的化合物 1-14 (第 36 栏, 第 20 行-第 38 栏, 第 40 行; 表 1)
	美国专利号 US8, 188, 283 中公开的化合物 1-18 (第 38 栏, 第 43 行-第 43 栏, 第 36 行; 表 1)
	美国公布的申请号 US2010-0249180 中公开的化合物 1-16 ( [0173]段; 表 1)
	美国公布的申请号 US2011-0008259 中公开的化合物 1-19 ( [0172]段; 表 1)
	美国专利号 US8, 367, 660 中公开的化合物 1-129 (第 57 栏, 第 31 行-第 81 栏, 第 24 行; 表 1)

[0429] 在一个实施方案中,该另外的治疗剂为抗生素。可用于本文的示例性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(包括雾化形式的氨曲南)、阿米卡星(包括其脂质体制剂)、环丙沙星(包括其适于吸入给药的制剂)、左氧氟沙星(包括其雾化制剂)以及两种抗生素的组合(例如磷霉素和妥布霉素)。

[0430] 在另一个实施方案中,该另外的药剂为粘液溶解剂(mucolyte)。可用于本文的示例性粘液溶解剂包括**Pulmozyme®**。

[0431] 在另一个实施方案中,该另外的药剂为支气管扩张剂。示例性支气管扩张剂包括沙丁胺醇、硫酸奥西那林(metaproterenol sulfate)、醋酸吡布特罗、沙美特罗或硫酸特布他林(tetrabuline sulfate)。

[0432] 在另一个实施方案中,该另外的药剂对于恢复肺气管表面液体有效。此类药剂改善盐进出细胞,从而使得在肺气管中的粘液更加水化,并因此更容易地清除。示例性的此类药剂包括高渗盐水、地纽福索钠([[ (3S,5R) -5- (4-氨基-2-氧代嘧啶-1-基) -3-羟基氧杂戊环-2-基]甲氧基-羟基磷酰基][[( (2R,3S,4R,5R) -5- (2,4-二氧代嘧啶-1-基) -3,4-二羟基氧杂戊环-2-基]甲氧基-羟基磷酰基]氧杂-羟基磷酰基]磷酸氢盐)或bronchitol(甘露糖醇的吸入制剂)。

[0433] 在另一个实施方案中,该另外的药剂为抗炎剂,即可减少肺部炎症的药剂。可用于本文的示例性的此类药剂包括:布洛芬、二十二碳六烯酸(DHA)、西地那非、吸入的谷胱甘肽、吡格列酮、羟基氯喹或辛伐他汀。

[0434] 在另一个实施方案中,该另外的药剂为化合物1形式I或包含基本上无定形的化合物2的固体分散体之外的增加或诱导CFTR活性的药剂,即,具有增强或诱导CFTR活性的作用的药剂。示例性的此类药剂包括ataluren(“**PTC124®**”;3-[5-(2-氟苯基)-1,2,4-噁二唑-3-基]苯甲酸)、西那普肽、兰考韦泰、地来司他(人重组嗜中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂)和考前列酮(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)。

[0435] 在另一个实施方案中,该另外的药剂为营养剂。示例性营养剂包括胰脂肪酶(胰腺酶替代物),包括**Pancrease®**、**Pancreacarb®**、**Ultrase®**或

**Creon®**、**Liprotomase®** (formerly **Trizyte®**)、**Aquadeks®**或谷胱甘肽吸入剂。在一个实施方案中,该另外的营养剂为胰脂肪酶。

[0436] 在另一个实施方案中,该另外的药剂为选自以下的化合物:庆大霉素、姜黄素、环磷酸胺、4-苯基丁酸酯、麦格司他、非洛地平、尼莫地平、Philoxin B、染料木黄酮、芹菜素、cAMP/cGMP增强剂或诱导剂例如咯利普兰、西地那非、米力农、他达拉非、氨力农、异丙肾上腺素、沙丁胺醇和沙美特罗、脱氧精胍菌素、HSP 90抑制剂、HSP 70抑制剂、蛋白体抑制剂例如环氧酶素(epoxomicin)、乳胞素等。

[0437] 在另一个实施方案中,该另外的药剂是选自如下的化合物:3-氨基-6-(4-氟-苯基)-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸(3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;5-氨基-6'-甲基-3-三氟甲基-[2,3]联吡啶-6-甲酸(3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-6-环丙基-N-(3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基丙基)-5-(三氟甲基)吡啶酰胺;3-氨基-6-甲氧基-N-(3,3,3-三氟-2-羟基-2-(三氟甲基)丙基)-5-(三氟甲基)吡啶酰胺;3-氨基-6-(4-氟-苯基)-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((S)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-6-甲氧基-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((S)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-6-甲氧基-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((R)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-6-(2,4-二氯-苯基)-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((S)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-

丙基)-酰胺;3-氨基-6-(2,4-二氯-苯基)-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((R)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-6-(4-氟-苯基)-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸(2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-5,6-双-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((S)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-5,6-双-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((R)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;(S)-3-氨基-6-乙氧基-N-(3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基丙基)-5-(三氟甲基)吡啶酰胺;3-氨基-6-甲氧基-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((S)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-6-甲氧基-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((R)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-6-(4-氟-苯基)-5-三氟甲基-吡啶-2-甲酸(3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-5,6-双-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((S)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺;3-氨基-5,6-双-三氟甲基-吡啶-2-甲酸((R)-3,3,3-三氟-2-羟基-2-甲基-丙基)-酰胺或其药学上可接受的盐。在另一个实施方案中,该另外的药剂是公开在美国专利号US8,247,436和国际PCT公开号W0 2011113894中的化合物,各专利均整体以引用方式并入本文。

[0438] 在另一个实施方案中,该另外的药剂可以是上皮钠通道(ENaC)调节剂,其公开在PCT公开号W02012035158、W02009074575、W02011028740、W02009150137、W02011079087或W02008135557中,各专利均整体以引用方式并入本文。

[0439] 在其它实施方案中,该另外的药剂是在W0 2004028480、W02004110352、W0 2005094374、W0 2005120497或W0 2006101740中公开的化合物,各专利均整体以引用方式并入本文。在另一个实施方案中,该另外的药剂是表现出CFTR诱导或增强活性的苯并[c]喹啉鎓衍生物或表现出CFTR诱导或增强剂活性的苯并吡喃衍生物。在另一个实施方案中,该另外的药剂是在美国专利号US7,202,262、美国专利号US6,992,096、US20060148864、US20060148863、US20060035943、US20050164973、W02006110483、W02006044456、W02006044682、W02006044505、W02006044503、W02006044502或W02004091502中公开的化合物,各专利均整体以引用方式并入本文。在另一个实施方案中,该另外的药剂是在W02004080972、W02004111014、W02005035514、W02005049018、W02006099256、W02006127588或W02007044560中公开的化合物,各专利均整体以引用方式并入本文。

[0440] 在一个实施方案中,可以对有此需要的受试者施用400mg的化合物1形式I和250mg的基本上无定形的化合物2。在这些实施方案中,可以通过施用本发明的一片或多片片剂实现所述剂量。例如,可以通过施用2片各自包含200mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的片剂实现施用400mg的化合物1形式I和250mg的基本上无定形的化合物2。施用期限可以持续至疾病实现改善或直到受试者临床医师建议为止,例如,施用期限可以为1周以下、1周、2周、3周、4周(28天)或1个月或以上。在一个实施方案中,可以将2片各自包含200mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的片剂每天施用于患者。在另一个实施方案中,可以将2片同时施用或在当天的不同时间施用。在另一个实施方案中,可以每隔12小时施用1片。

[0441] 在一个实施方案中,可以对有此需要的受试者施用400mg的化合物1形式I和500mg的基本上无定形的化合物2。在这些实施方案中,可以通过施用2片各自包含200mg的化合物1形式I和250mg的基本上无定形的化合物2的片剂实现所述剂量。在一个实施方案中,可以每隔12小时施用1片。在另一个实施方案中,还可以通过每隔12小时施用2片实现所述剂量,

所述2片各自包含100mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2。在另一个实施方案中,还可以通过以分开的片剂施用化合物1形式I和基本上无定形的化合物2实现所述剂量。例如,可以通过施用包含200mg的化合物1形式I的片剂2片和包含125mg的基本上无定形的化合物2的片剂4片或包含150mg的基本上无定形的化合物2的片剂2片和包含100mg的基本上无定形的化合物2的片剂2片实现所述剂量。施用期限可以持续至疾病实现改善或直到受试者临床医师建议为止,例如,施用期限可以为1周以下、1周、2周、3周、4周(28天)或1个月或以上。在一个实施方案中,可以每天给患者施用包含200mg的化合物1形式I的片剂2片和包含125mg的基本上无定形的化合物2的片剂4片。在一个实施方案中,可以每天给患者施用包含200mg的化合物1形式I的片剂2片,和每天2次给患者施用包含150mg和100mg的基本上无定形的化合物2的片剂2片。在另一个实施方案中,可以同时或在当天的不同时间施用片剂2片。在另一个实施方案中,可以每隔12小时施用包含200mg的化合物1的片剂1片,且每隔12小时施用包含150mg和100mg的基本上无定形的化合物2的片剂2片。

[0442] 在一个实施方案中,可以对有此需要的受试者施用300mg的化合物1形式I和250mg的基本上无定形的化合物2。在这些实施方案中,可以通过施用本发明的1片或多片实现所述剂量。例如,施用300mg的化合物1形式I和250mg的基本上无定形的化合物2可以通过施用各自包含150mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的片剂2片实现。施用期限可以持续至疾病实现改善或直到受试者临床医师建议为止,例如,施用期限可以为1周以下、1周、2周、3周、4周(28天)或1个月或以上。在一个实施方案中,可以每天给患者施用各自包含150mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的片剂2片。在另一个实施方案中,可以同时或在当天的不同时间施用2片。在另一个实施方案中,可以每隔12小时施用1片。

[0443] 在一个实施方案中,可以对有此需要的受试者施用600mg的化合物1形式I和500mg的基本上无定形的化合物2。在这些实施方案中,可以通过施用2片实现所述剂量。例如,施用600mg的化合物1形式I和500mg的基本上无定形的化合物2可以通过每隔12小时施用各自包含150mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的片剂2片实现。施用期限可以持续至疾病实现改善或直到受试者临床医师建议为止,例如,施用期限可以为1周以下、1周、2周、3周、4周(28天)或1个月或以上。在一个实施方案中,可以每天给患者施用各自包含150mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的片剂4片。在另一个实施方案中,可以同时或在当天的不同时间施用4片。在另一个实施方案中,可以每隔12小时施用2片。

[0444] 在一个实施方案中,可以对有此需要的受试者施用800mg的化合物1形式I和500mg的基本上无定形的化合物2。在这些实施方案中,可以通过施用本发明的1片或多片片剂实现所述剂量。例如,施用800mg的化合物1形式I和500mg的基本上无定形的化合物2可以通过施用各自包含200mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的4片实现。施用期限可以持续至疾病实现改善或直到受试者临床医师建议为止,例如,施用期限可以为1周以下、1周、2周、3周、4周(28天)或1个月或以上。在一个实施方案中,可以每天给患者施用各自包含200mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的片剂4片。在另一个实施方案中,可以同时或在当天的不同时间施用4片。在另一个实施方案中,每次给药机会可以施用2片且每天有2次给药机会。在另一个实施方案中,可以通过每天2次(BID)施用各自包含

200mg的化合物1和125mg的化合物2的片剂2片给患者施用800mg的化合物1和500mg的化合物2。在另一个实施方案中,可以通过每隔12小时(q12h)施用各自包含200mg的化合物1和125mg的化合物2的片剂2片给患者施用800mg的化合物1和500mg的化合物2。

[0445] 在一个实施方案中,可以对有此需要的受试者施用600mg的化合物1形式I和250mg的基本上无定形的化合物2。在这些实施方案中,可以通过施用本发明的1片或多片片剂实现所述剂量。例如,施用600mg的化合物1形式I和250mg的基本上无定形的化合物2可以通过施用各自包含200mg的化合物1形式I和83.3mg的基本上无定形的化合物2的片剂3片实现。施用期限可以持续至疾病实现改善或直到受试者临床医师建议为止,例如,施用期限可以为1周以下、1周、2周、3周、4周(28天)或1个月或以上。在一个实施方案中,可以每天给患者施用各自包含200mg的化合物1形式I和83.3mg的基本上无定形的化合物2的片剂3片。在另一个实施方案中,可以同时或在当天的不同时间施用片剂3片。在另一个实施方案中,可以同时施用3片。

[0446] 在一个实施方案中,可以对有此需要的受试者施用600mg的化合物1形式I和500mg的基本上无定形的化合物2。在这些实施方案中,可以通过施用本发明的1片或多片片剂实现所述剂量。例如,施用600mg的化合物1形式I和500mg的基本上无定形的化合物2可以通过施用各自包含200mg的化合物1形式I和83.3mg的基本上无定形的化合物2的片剂3片、再施用各自包含125mg的化合物2的另外2片片剂实现。施用期限可以持续至疾病实现改善或直到受试者临床医师建议为止,例如,施用期限可以为1周以下、1周、2周、3周、4周(28天)或1个月或以上。在一个实施方案中,可以每天施用600mg的化合物1(qd)和每天2次施用250mg的化合物2(bid),通过每天施用各自包含200mg的化合物1形式I和83.3mg的基本上无定形的化合物2的片剂3片(qd)和每隔12小时施用各自包含125mg的化合物的片剂2片(q12h)来进行。在一个实施方案中,可以每天施用600mg的化合物1(qd)和每隔12小时施用250mg的化合物2(q12h),通过每天施用各自含200mg的化合物1形式I和83.3mg的基本上无定形的化合物2的片剂3片(qd)和每隔12小时施用各自包含125mg的化合物2的片剂2片(q12h)来进行。

[0447] 这些组合用于治疗本文所述的疾病,包括囊性纤维化。这些组合还用于本文所述的药盒。在另一个方面,本发明的特征在于药盒,其包含本发明的药物组合物或片剂(包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体)和单独的另外的治疗剂或其药物组合物。在另一个实施方案中,本发明的药物组合物或片剂、单独的另外的治疗剂或其药物组合物在公开的容器中。在另一个实施方案中,所述公开的容器是瓶子。在另一个实施方案中,所述公开的容器是小瓶。在另一个实施方案中,所述公开的容器是泡罩包装。

[0448] 存在于本发明组合物中的另外的治疗剂的量将不超过在包含该治疗剂作为唯一活性剂的组合物中通常施用的量。优选地,在本发明所公开的组合物中的另外的治疗剂的量将在包含该药剂作为唯一治疗活性剂的组合物中通常存在的量的约50%至100%的范围内。

[0449] 组合物的治疗用途

[0450] 在一个方面,本发明还提供治疗患者的疾病、减轻所述疾病的严重性或对症治疗所述疾病的方法,该方法包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中该疾病选自:囊性纤维化、哮喘、吸烟诱发的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(CBAVD)导致的男性不育症、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、遗传性血色病、凝血-纤溶缺陷 (例如蛋白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 $\beta$ 脂蛋白血症、溶酶体贮积症 (例如I-细胞病/假性赫尔勒综合征)、粘多糖症、桑德霍夫/泰-萨克斯病、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、聚糖病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缺乏症、尿崩症 (DI)、神经生长性DI、肾性DI、夏-马-图综合征、佩-梅病、神经变性疾病 (例如阿尔茨海默病)、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、进行性核上性麻痹、皮克病、若干聚谷氨酰胺神经性障碍 (例如亨廷顿病)、I型脊髓小脑性共济失调、脊髓与延髓肌肉萎缩症、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 (由朊病毒蛋白加工缺陷导致)、法布里病、格-斯-施综合征、COPD、干眼病或斯耶格伦氏综合征、骨质疏松症、骨质减少、骨愈合与骨生长 (包括骨修复、骨再生、骨吸收减少和骨吸收增加)、戈勒姆综合征、氯离子通道病变例如先天性肌强直 (汤姆森和贝克尔型)、巴特综合征III型、登特病、过度惊跳症、癫痫症、溶酶体贮存病、安格曼综合征和原发性纤毛运动障碍 (PCD) (用于纤毛结构和/或功能遗传障碍的术语),包括具有左右转位的PCD (也称作卡特金纳综合征)、没有左右转位和纤毛发育不良的PCD。

[0451] 在一个方面,本发明还提供治疗患者的疾病、减轻所述疾病的严重性或对症治疗所述疾病的方法,该方法包含给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中该疾病选自:全面性癫痫伴热性惊厥附加症 (GEFS+)、全面性癫痫伴热性和非热性惊厥、肌强直、先天性副肌强直、钾加重肌强直、高钾型周期性麻痹、LQTS、LQTS/布鲁加综合征、常染色体显性LQTS伴耳聋、常染色体隐性LQTS、LQTS伴生理缺陷、先天性和获得性LQTS、提摩西综合征、持续性幼儿型胰岛素过度分泌低血糖症、扩张型心肌病、常染色体显性LQTS、Dent病、骨硬化病、巴特综合征III型、中央轴空病、恶性高热和儿茶酚胺敏感性多形性心动过速。

[0452] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其N1303K、 $\Delta$  I507或R560T。

[0453] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其G551D。在另一个实施方案中,所述患者为纯合型的G551D。在另一个实施方案中,所述患者为杂合型的G551D,其中另一种CFTR遗传突变为 $\Delta$  F508、G542X、N1303K、W1282X、R117H、R553X、1717-1G $\rightarrow$ A、621+1G $\rightarrow$ T、2789+5G $\rightarrow$ A、3849+10kbC $\rightarrow$ T、R1162X、G85E、3120+1G $\rightarrow$ A、 $\Delta$  I507、1898+1G $\rightarrow$ A、3659delC、R347P、R560T、R334W、A455E、2184delA或711+1G $\rightarrow$ T的任意一种。

[0454] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其 $\Delta$  F508。在另一个实施方案中,所述患者为纯合型的 $\Delta$  F508。在另一个实施方案中,所述患者为杂合型的 $\Delta$  F508,其中另一种CFTR遗传突变为G551D、G542X、N1303K、W1282X、R117H、R553X、1717-1G $\rightarrow$ A、621+1G $\rightarrow$ T、2789+5G $\rightarrow$ A、3849+10kbC $\rightarrow$ T、

R1162X、G85E、3120+1G→A、Δ I507、1898+1G→A、3659delC、R347P、R560T、R334W、A455E、2184delA或711+1G→T的任意一种。

[0455] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V、G1069R、R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N、D1152H、1717-1G→A、621+1G→T、3120+1G→A、1898+1G→A、711+1G→T、2622+1G→A、405+1G→A、406-1G→A、4005+1G→A、1812-1G→A、1525-1G→A、712-1G→T、1248+1G→A、1341+1G→A、3121-1G→A、4374+1G→T、3850-1G→A、2789+5G→A、3849+10kbC→T、3272-26A→G、711+5G→A、3120G→A、1811+1.6kbA→G、711+3A→G、1898+3A→G、1717-8G→A、1342-2A→C、405+3A→C、1716G/A、1811+1G→C、1898+5G→T、3850-3T→G、IVS14b+5G→A、1898+1G→T、4005+2T→C和621+3A→G。

[0456] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V和G1069R。在该方面的一个实施方案中,本发明提供治疗CFTR的方法,包括给具有人CFTR突变的患者施用化合物1,所述突变选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R和S1251N。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自E193K、F1052V和G1069R。在该方面的一些实施方案中,所述方法产生大于基线氯离子转运10-倍的氯离子转运增加。

[0457] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N和D1152H。在该方面的一个实施方案中,所述方法产生大于或等于基线氯离子转运10%的氯离子转运增加。

[0458] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自1717-1G→A、621+1G→T、3120+1G→A、1898+1G→A、711+1G→T、2622+1G→A、405+1G→A、406-1G→A、4005+1G→A、1812-1G→A、1525-1G→A、712-1G→T、1248+1G→A、1341+1G→A、3121-1G→A、4374+1G→T、3850-1G→A、2789+5G→A、3849+10kbC→T、3272-26A→G、711+5G→A、3120G→A、1811+1.6kbA→G、711+3A→G、1898+3A→G、1717-8G→A、1342-2A→C、405+3A→C、1716G/A、1811+1G→C、1898+5G→T、3850-3T→G、IVS14b+5G→A、1898+1G→T、4005+2T→C和621+3A→G。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自1717-1G→A、1811+1.6kbA→G、2789+5G→A、3272-26A→G和3849+10kbC→T。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自2789+5G→A和3272-26A→G。

[0459] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V、G1069R、R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N、D1152H、1717-1G→A、621+1G→T、3120+1G→A、1898+1G→A、711+1G→T、2622+1G→A、405+1G→A、406-1G→A、4005+1G→A、1812-1G→A、1525-1G→A、712-1G→T、1248+1G→A、1341+1G→A、3121-1G→A、4374+1G→T、3850-1G→A、2789+5G→A、3849+10kbC→T、3272-26A→G、711+5G→A、3120G→A、1811+1.6kbA→G、711+3A→G、1898+3A→G、1717-8G→A、1342-2A→C、405+3A→C、1716G/A、1811+1G→C、1898+5G→T、3850-3T→G、IVS14b+5G→A、1898+1G→T、4005+2T→C和621+3A→G,且所述患者具有人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。

[0460] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V和G1069R,且所述患者具有人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R和S1251N,且所述患者具有人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自E193K、F1052V和G1069R,且所述患者具有人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在该方面的一些实施方案中,所述方法产生大于基线氯离子转运10-倍的氯离子转运增加。

[0461] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N和D1152H,且所述患者具有人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在该方面的一个实施方案中,所述方法产生大于或等于基线氯离子转运10%以上的氯离子转运增加。

[0462] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自1717-1G→A、621+1G→T、3120+1G→A、1898+1G→A、711+1G→T、2622+1G→A、405+1G→A、406-1G→A、4005+1G→A、1812-1G→A、1525-1G→A、712-1G→T、1248+1G→A、1341+1G→A、3121-1G→A、4374+1G→T、3850-1G→A、2789+5G→A、3849+10kbC→T、3272-26A→G、711+5G→A、3120G→A、1811+1.6kbA→G、711+3A→G、1898+3A→G、1717-8G→A、1342-2A→C、405+3A→C、1716G/A、1811+1G→C、1898+5G→T、3850-3T→G、IVS14b+5G→A、1898+1G→T、4005+2T→C和621+3A→G,且所述患者具有人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或,其中所述患者具

有CFTR遗传突变,其选自1717-1G→A、1811+1.6kbA→G、2789+5G→A、3272-26A→G和3849+10kbC→T,且所述患者具有人CFTR突变,其选自ΔF508,R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自2789+5G→A和3272-26A→G,且所述患者具有人CFTR突变,其选自ΔF508,R117H。

[0463] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V、G1069R、R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N、D1152H、1717-1G→A、621+1G→T、3120+1G→A、1898+1G→A、711+1G→T、2622+1G→A、405+1G→A、406-1G→A、4005+1G→A、1812-1G→A、1525-1G→A、712-1G→T、1248+1G→A、1341+1G→A、3121-1G→A、4374+1G→T、3850-1G→A、2789+5G→A、3849+10kbC→T、3272-26A→G、711+5G→A、3120G→A、1811+1.6kbA→G、711+3A→G、1898+3A→G、1717-8G→A、1342-2A→C、405+3A→C、1716G/A、1811+1G→C、1898+5G→T、3850-3T→G、IVS14b+5G→A、1898+1G→T、4005+2T→C和621+3A→G,且所述患者具有人CFTR突变,其选自ΔF508,R117H和G551D。

[0464] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V和G1069R。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R和S1251N。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自E193K、F1052V和G1069R。在该方面的一些实施方案中,所述方法产生大于基线氯离子转运10-倍的氯离子转运增加。

[0465] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N和D1152H。在该方面的一个实施方案中,所述方法产生大于或等于基线氯离子转运10%以上的氯离子转运增加。

[0466] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自1717-1G→A、621+1G→T、3120+1G→A、1898+1G→A、711+1G→T、2622+1G→A、405+1G→A、406-1G→A、4005+1G→A、1812-1G→A、1525-1G→A、712-1G→T、1248+1G→A、1341+1G→A、3121-1G→A、4374+1G→T、3850-1G→A、2789+5G→A、3849+10kbC→T、3272-26A→G、711+5G→A、3120G→A、1811+1.6kbA→G、711+3A→G、1898+3A→G、1717-8G→A、1342-2A→C、405+3A→C、1716G/A、1811+1G→C、1898+5G→T、3850-3T→G、IVS14b+5G→A、1898+1G→T、4005+2T→C和621+3A→G。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患

者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自1717-1G->A、1811+1.6kba->G、2789+5G->A、3272-26A->G和3849+10kbc->T。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自2789+5G->A和3272-26A->G。

[0467] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V、G1069R、R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N、D1152H、1717-1G->A、621+1G->T、3120+1G->A、1898+1G->A、711+1G->T、2622+1G->A、405+1G->A、406-1G->A、4005+1G->A、1812-1G->A、1525-1G->A、712-1G->T、1248+1G->A、1341+1G->A、3121-1G->A、4374+1G->T、3850-1G->A、2789+5G->A、3849+10kbc->T、3272-26A->G、711+5G->A、3120G->A、1811+1.6kba->G、711+3A->G、1898+3A->G、1717-8G->A、1342-2A->C、405+3A->C、1716G/A、1811+1G->C、1898+5G->T、3850-3T->G、IVS14b+5G->A、1898+1G->T、4005+2T->C和621+3A->G,且所述患者具有人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。

[0468] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R、S1251N、E193K、F1052V和G1069R,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自G178R、G551S、G970R、G1244E、S1255P、G1349D、S549N、S549R和S1251N,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自E193K、F1052V和G1069R,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在该方面的一些实施方案中,所述方法产生大于基线氯离子转运10-倍的氯离子转运增加。

[0469] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自R117C、D110H、R347H、R352Q、E56K、P67L、L206W、A455E、D579G、S1235R、S945L、R1070W、F1074L、D110E、D1270N和D1152H,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。所述方法产生大于或等于基线氯离子转运10%以上的氯离子转运增加。

[0470] 在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自1717-1G->A、621+1G->T、3120+1G->A、1898+1G->A、711+1G->T、

2622+1G→A、405+1G→A、406-1G→A、4005+1G→A、1812-1G→A、1525-1G→A、712-1G→T、1248+1G→A、1341+1G→A、3121-1G→A、4374+1G→T、3850-1G→A、2789+5G→A、3849+10kbC→T、3272-26A→G、711+5G→A、3120G→A、1811+1.6kba→G、711+3A→G、1898+3A→G、1717-8G→A、1342-2A→C、405+3A→C、1716G/A、1811+1G→C、1898+5G→T、3850-3T→G、IVS14b+5G→A、1898+1G→T、4005+2T→C和621+3A→G,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自1717-1G→A、1811+1.6kba→G、2789+5G→A、3272-26A→G和3849+10kbC→T,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。在一个方面,本发明涉及治疗或对症治疗患者的囊性纤维化、减轻其严重性的方法,包括给患者、优选哺乳动物施用有效量的本发明的药物组合物或片剂,其中所述患者具有CFTR遗传突变,其选自2789+5G→A和3272-26A→G,且所述患者具有一种或多种人CFTR突变,其选自 $\Delta$ F508、R117H和G551D。

[0471] 在一些实施方案中,包含化合物1形式I和固体分散体的基本上无定形的化合物2的本发明的药学上可接受的组合物或片剂可用于治疗患者中的囊性纤维化、减轻囊性纤维化的严重性或对症治疗囊性纤维化,所述患者在呼吸和非呼吸性上皮细胞的顶端膜中表现出残余的CFTR活性。在上皮细胞表面存在残余的CFTR活性可以容易地使用本领域已知的方法检测,例如标准电生理学、生物化学或组织化学技术。此类方法使用体内或离体电生理学技术,汗液或唾液中Cl<sup>-</sup>浓度的测量,或者离体生物化学或组织化学技术来监测细胞表面密度从而确定CFTR活性。使用此类方法,可以容易地在为多种不同突变杂合或纯合的患者中检测残余的CFTR活性,包括为最常见的突变 $\Delta$ F508以及例如G551D突变或R117H突变的其它突变纯合或杂合的患者。在一些实施方案中,包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的药物组合物或片剂可用于治疗患者中的囊性纤维化、减轻囊性纤维化的严重性或对症治疗囊性纤维化,所述患者表现出很低的或不表现出残余CFTR活性。在一些实施方案中,包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的药物组合物或片剂可用于治疗患者中的囊性纤维化、减轻囊性纤维化的严重性或对症治疗囊性纤维化,所述患者在呼吸性上皮细胞的顶端膜中表现出很低的或不表现出残余CFTR活性。

[0472] 在另一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可用于治疗具有诱导的或增强的残余CFTR活性的患者中的囊性纤维化或减轻所述囊性纤维化的严重性,这种残余CFTR诱导剂或增强剂可使用药理学方法实现。在另一个实施方案中,本发明的化合物和组合物可用于治疗具有使用基因疗法诱导的或增强的残余CFTR活性的患者中的囊性纤维化或减轻所述囊性纤维化的严重性。此类方法增加存在于细胞表面的CFTR的量,从而在患者中诱导迄今不存在的CFTR活性或在患者中增强残余CFTR活性的现有水平。

[0473] 在一个实施方案中,如本文所述的包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的本发明药物组合物和片剂可用于治疗患者中的囊性纤维化或减轻其严重性,该患者具有某些表现出残余CFTR活性的表型,例如I类突变(不合成)、II类突变(错折叠)、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)。

[0474] 在一个实施方案中,如本文所述的包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的本发明药物组合物和片剂可用于在具有某些临床表型(例如典型地与

上皮细胞顶端膜中残余CFTR活性的量有关的中度到轻度临床表型)的患者中治疗囊性纤维化、减轻囊性纤维化的严重性或对症治疗囊性纤维化。此类表型包括表现出胰腺功能不全(pancreatic sufficiency)的患者。

[0475] 在一个实施方案中,如本文所述的包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的本发明药物组合物和片剂可用于治疗经诊断患有以下疾病的患者、减轻所述疾病的严重性或对症治疗所述疾病:胰腺功能不全、特发性胰腺炎和先天性双侧输精管缺失或轻度肺病,其中该患者表现出残余CFTR活性。

[0476] 在一个实施方案中,如本文所述的包含化合物1形式I和包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的本发明药物组合物和片剂可用于治疗经诊断患有以下疾病的患者、减轻所述疾病的严重性或对症治疗所述疾病:胰腺功能不全、特发性胰腺炎和先天性双侧输精管缺失或轻度肺病,其中该患者具有野生型CFTR。

[0477] 除了囊性纤维化以外,CFTR活性的调节还可有益于其它不直接由CFTR突变所导致的疾病,例如分泌性疾病和其它由CFTR介导的蛋白折叠疾病。这些疾病包括但不限于慢性阻塞性肺病(COPD)、干眼病和斯耶格伦氏综合征。COPD的特征在于进行性的并且不完全可逆的气流受限。气流受限是由于粘液分泌过多、肺气肿和细支气管炎。突变或野生型CFTR的活化剂提供COPD中常见的粘液分泌过多和粘膜纤毛清除力受损的潜在治疗。具体地讲,增加跨CFTR的阴离子分泌可有利于体液转运进气道表面液体,以水化粘液并优化纤毛周围的体液粘度。这将引起粘膜纤毛清除力增强和与COPD有关的症状的减轻。干眼病的特征在于泪水的产生减少和异常泪膜脂质、蛋白和粘蛋白行为。干眼有很多原因,其中一些包括年龄、Lasik眼手术、关节炎、药物治疗、化学/热灼伤、变态反应和疾病,例如囊性纤维化和斯耶格伦氏综合征。增加经由CFTR的阴离子分泌将增强体液从角膜内皮细胞和眼周围分泌腺体的转运,从而增加角膜的水化作用。这将有助于缓解与干眼病有关的症状。斯耶格伦氏综合征是一种自身免疫疾病,其中免疫系统攻击体内各处产生水分的腺体,包括眼、口、皮肤、呼吸组织、肝、阴道和肠。症状包括眼、口和阴道干燥以及肺部疾病。该疾病也与类风湿性关节炎、系统性狼疮、系统性硬化和多肌炎/皮肤炎有关。有缺陷的蛋白运输据信会导致该疾病,其治疗选择是有限的。CFTR活性的增强剂或诱导剂可以水化各种受疾病影响的器官,并帮助改善有关症状。

[0478] 在一个实施方案中,本发明涉及在体外或体内增强或诱导阴离子通道活性的方法,包括使该通道与药物组合物PC-I-PC-XXV的任意一种接触。在另一个实施方案中,阴离子通道为氯离子通道或碳酸氢根通道。在另一个实施方案中,阴离子通道为氯离子通道。

[0479] 所需的确切量将在受试者之间有所不同,这取决于受试者的物种、年龄和一般状况、感染的严重性、具体的药剂、其施用模式等。优选将本发明化合物配制成单位剂型以易于施用和保持剂量均匀。本文所用的表达“单位剂型”是指适合于待治疗的患者的药剂的物理离散单元。然而,应当理解,本发明的化合物和组合物的总每日用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。用于任何特定患者或生物体的具体有效剂量水平将取决于包括如下各项在内的多种因素:所治疗的病症和该病症的严重性;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、总体健康情况、性别和饮食;所使用的具体化合物的施用时间、施用途径以及排泄速率;治疗持续时间;与所使用的具体化合物联合或同时使用的药物,以及医学领域熟知的类似因素。本文所用的术语“患者”意指动物,优选哺乳动物,

并且最优选人。

[0480] 在本申请中如果化合物的名称未能正确描述化合物的结构,则结构代替名称,以结构为准。

### 具体实施方案

[0481] XRPD (X-射线粉末衍射)

[0482] 化合物1形式I的X射线衍射 (XRD) 数据在具有HI-STAR 2维检测器和扁平石墨单色器的Bruker D8 DISCOVER粉末衍射仪上采集。在40kV、35mA下使用具有K $\alpha$ 辐射的Cu密封管。在25°C下将样品置于零背景的硅晶片上。对每一样品而言,各自以2个不同的 $\theta_2$ 角在120秒采集两个数据帧:8°和26°。用GADDS软件对数据积分并用DIFFRACT<sup>plus</sup>EVA软件合并。所报告的峰位置的不确定值为 $\pm 0.2$ 度。

[0483] 示差扫描量热法 (DSC)

[0484] 化合物1形式I的差示扫描量热法 (DSC) 数据用DSC Q100 V9.6 Build290 (特拉华州纽卡斯尔TA仪器公司 (TA Instruments, New Castle, DE) 采集。温度用钢校准,而热容用蓝宝石校准。称取3-6mg样品到铝盘中,将铝盘轧上带有1个针孔的褶皱盖。在25°C至350°C范围内以1.0°C/min的加热速率并以50ml/min的氮气吹扫进行样品扫描。数据通过Thermal Advantage Q Series<sup>TM</sup>软件2.2.0.248版采集并通过Universal Analysis软件4.1D版 (特拉华州纽卡斯尔TA仪器公司) 分析。报告的数值代表单次分析。

[0485] 化合物1形式I单晶结构测定

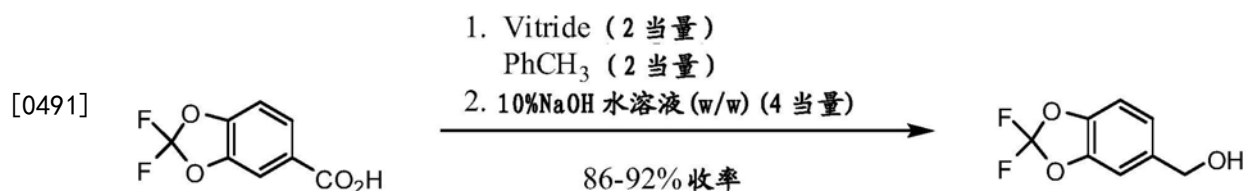
[0486] 衍射数据在配备有密封管Cu K $\alpha$ 源和Apex II CCD检测器的Bruker Apex II衍射仪上获得。使用SHELX程序 (Sheldrick, G.M., Acta Cryst., (2008) A64, 112-122 (Sheldrick, G.M., 《晶体学报》, 2008年, 第A64期, 112-122页)) 对结构进行解析和精修。基于系统消光和强度统计,解析和精修P2<sub>1</sub>/n空间群中的结构。

[0487] **Vitride®** (二氢双(2-甲氧乙氧基)铝酸钠 [或NaAlH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 65wt%的甲苯溶液) 购自德里奇化学公司 (Aldrich Chemicals)。

[0488] 2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-甲酸购自Saltigo (Lanxess公司)。

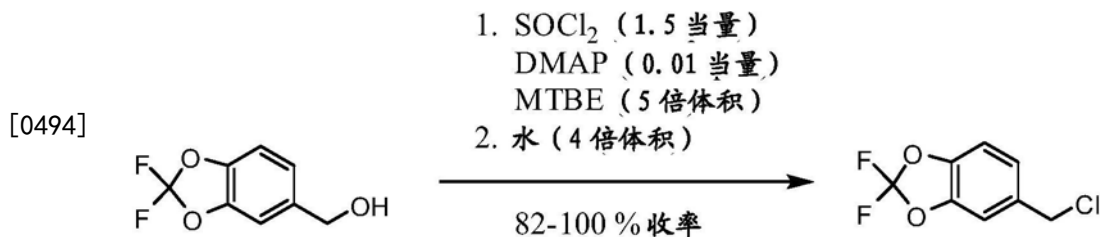
[0489] 化合物1的制备

[0490] (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇的制备。



[0492] 使市售2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-甲酸(1.0当量)在甲苯(10倍体积)中浆化。将**Vitride®**(2当量)经由加料漏斗以将温度维持在15-25°C的速率加入。在添加结束时,将温度增至40°C维持2小时(h),然后将10%(w/w)的NaOH水溶液(aq, 4.0当量)经由加料漏斗小心加入,将温度维持在40-50°C。再搅拌30分钟(min)后,让层在40°C下分离。将有机相冷却到20°C,然后用水(2×1.5倍体积)洗涤、干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、过滤并浓缩得到直接用于下一步的粗(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇。

[0493] 5-氯甲基-2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯的制备.



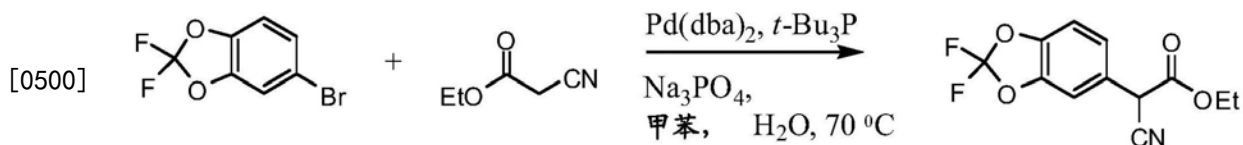
[0495] 将(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-甲醇(1.0当量)溶于MTBE(5倍体积)。将催化量的4-(N,N-二甲基)氨基吡啶(DMAP)(1mol%)加入并经由加料漏斗将 $\text{SOCl}_2$ (1.2当量)加入。将 $\text{SOCl}_2$ 以将反应器中的温度维持在15-25℃的速率加入。将温度增至30℃保持1h,然后冷却到20℃。将水(4倍体积)经加料漏斗加入,同时将温度维持在30℃以下。再搅拌30min后,进行层分离。对有机层进行搅拌,并将10%(w/v)的NaOH水溶液(4.4倍体积)加入。搅拌15至20min后,进行层分离。然后对有机相进行干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、过滤并浓缩,得到直接用于下一步的粗5-氯甲基-2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯。

[0496] (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈的制备.



[0498] 将5-氯甲基-2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(1当量)在DMSO(1.25倍体积)中的溶液加入NaCN(1.4当量)在DMSO(3倍体积)中的浆液,同时将温度维持在30-40℃之间。将混合物搅拌1h,然后将水(6倍体积)加入,再将甲基叔丁基醚(MTBE)(4倍体积)加入。搅拌30min后,将层分离。将含水层用MTBE(1.8倍体积)萃取。将合并的有机层用水(1.8倍体积)洗涤、干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、过滤并浓缩得到直接用于下一步的粗(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈(95%)。

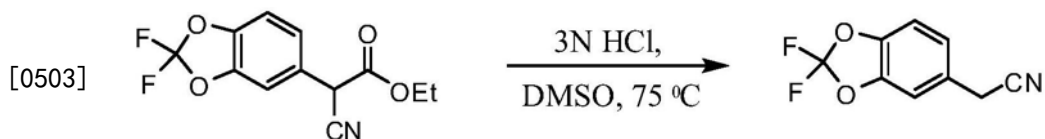
[0499] (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-1-乙酸乙酯-乙腈的合成



[0501] 将反应器用氮气吹扫,然后加入900mL甲苯。将溶剂经由不短于16h的氮鼓泡进行脱气。然后向反应器中加入 $\text{Na}_3\text{PO}_4$ (155.7g, 949.5mmol),再加入双(二亚苄基丙酮)钯(0)(7.28g, 12.66mmol)。将10%w/w的叔丁基膦的己烷溶液(51.23g, 25.32mmol)在23℃下经10min通过用氮气吹扫过的加料漏斗加入。将混合物搅拌50min,此时将5-溴-2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯(75g, 316.5mmol)经1min加入。再搅拌50min后,向混合物中经5min加入氰基乙酸乙酯(71.6g, 633.0mmol),然后将水(4.5mL)一次性加入。将混合物经40min加热到70℃,每1-2h通过HPLC分析反应物向产物的转化百分比。在观察到转化完成后(典型地在5-8h后转化率达到100%),将混合物冷却到20-25℃,然后通过硅藻土垫过滤。将硅藻土垫用甲苯(2×450mL)冲洗,将合并的有机物在真空和60-65℃下浓缩到300mL。向浓缩物中

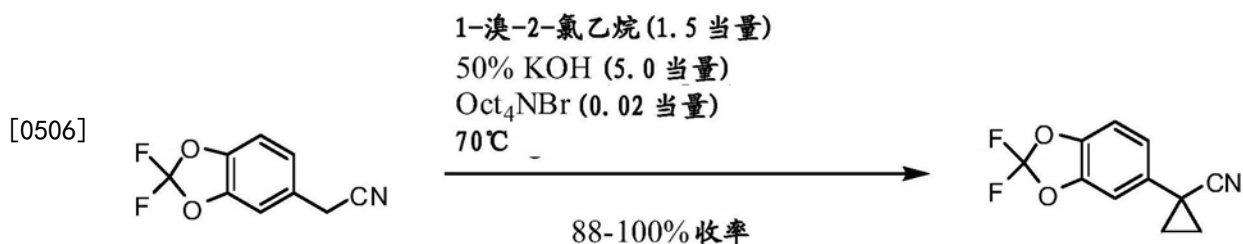
加入225mL DMSO,在真空和70-80℃下浓缩,直到活跃的溶剂蒸馏停止。将溶液冷却到20-25℃,用DMSO稀释到900mL,以为步骤2做准备。<sup>1</sup>H NMR (500MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.16-7.10 (m,2H), 7.03 (d,J=8.2Hz,1H), 4.63 (s,1H), 4.19 (m,2H), 1.23 (t,J=7.1Hz,3H)。

[0502] (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈的合成。



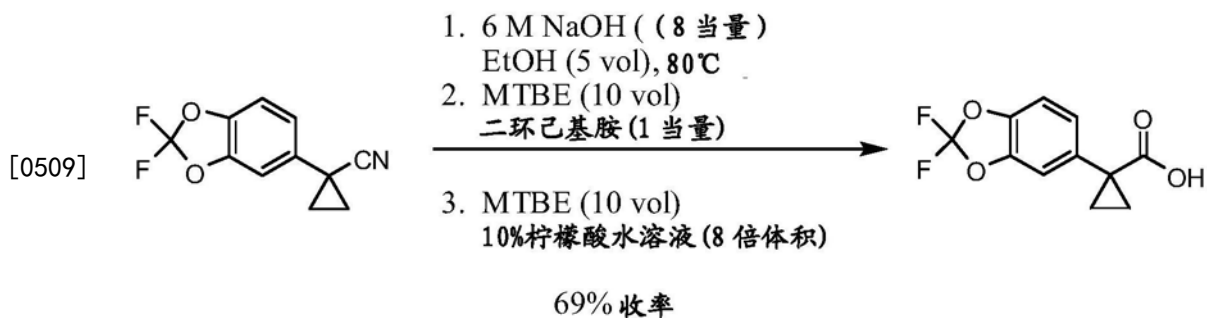
[0504] 经20min向上面得到的(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-1-乙酸乙酯-乙腈的DMSO溶液加入3N HCl (617.3mL,1.85mol),同时将内部温度维持在<40℃。然后经1h将混合物加热到75℃,并每1-2h通过HPLC分析转化百分比。当观察到转化率>99%时(典型地在5-6h后),将反应物冷却到20-25℃,用MTBE (2×525mL)萃取足够的时间,以允许在萃取过程中实现完全的相分离。将合并的有机萃取物用5%NaCl (2×375mL)洗涤。然后将溶液转移到配备经冷却的接收烧瓶的适于1.5-2.5托真空蒸馏的设备。将溶液在真空和<60℃下浓缩以除去溶剂。然后在125-130℃(炉温)和1.5-2.0托下将(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈从所得的油中蒸馏出来。(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈作为澄清的油以66%的收率从5-溴-2,2-二氟-1,3-苯并二氧杂环戊烯(2步)中分离,HPLC纯度为91.5%AUC(对应于95%的重量比测定)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz,DMSO) δ7.44 (brs,1H), 7.43 (d,J=8.4Hz,1H), 7.22 (dd,J=8.2,1.8Hz,1H), 4.07 (s,2H)。

[0505] (2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈的制备。



[0507] 将(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-乙腈(1.0当量)、50wt%的KOH水溶液(5.0当量)、1-溴-2-氯乙烷(1.5当量)和Oct<sub>4</sub>NBr(0.02当量)的混合物在70℃下加热1h。将反应混合物冷却,然后用MTBE和水后处理。将有机相用水和盐水洗涤。除去溶剂得到(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈。

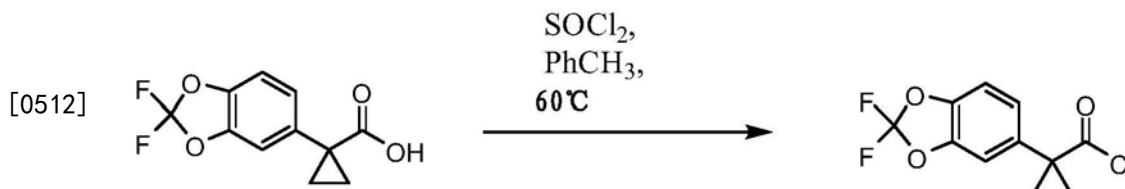
[0508] 1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸的制备。



[0510] 将(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲腈用6M的NaOH(8当量)的乙醇(5倍体积)溶液在80℃下水解过夜。将混合物冷却到室温,将乙醇在真空下蒸发。使

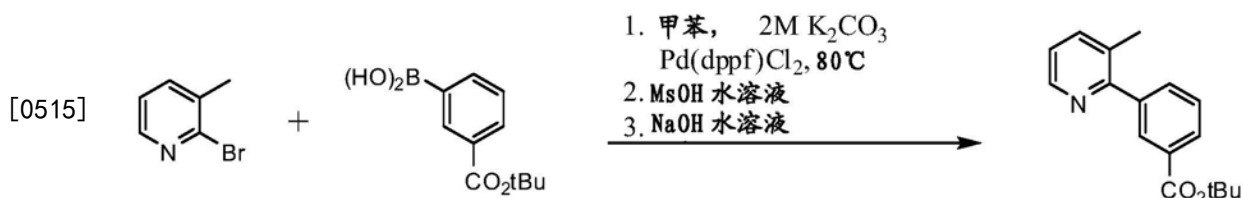
残余物吸收到水和MTBE中,将1M HCl加入,然后对层进行分离。然后将MTBE层用二环己基胺(DCHA) (0.97当量) 进行处理。将浆液冷却到0℃、过滤并用庚烷洗涤,得到相应的DCHA盐。使盐吸收到MTBE和10%柠檬酸中并搅拌直至所有固体溶解。对层进行分离,将MTBE层用水和盐水洗涤。溶剂交换成庚烷后过滤,在真空炉中在50℃干燥过夜后得到1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸。

[0511] 1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-本文羰基氯的制备。



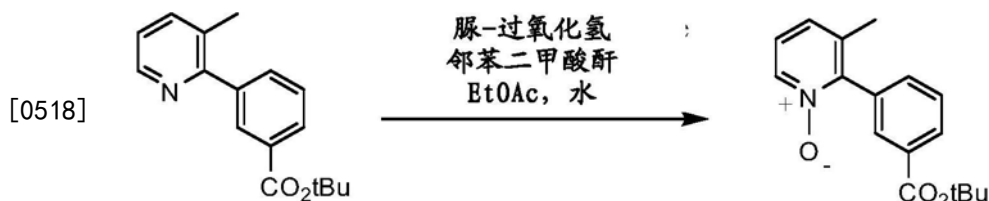
[0513] 将1-(2,2-二氟-1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-环丙烷甲酸(1.2当量)在甲苯(2.5倍体积)中浆化,将混合物加热到60℃。将SOCl<sub>2</sub>(1.4当量)经由加料漏斗加入。30分钟后将甲苯和SOCl<sub>2</sub>从反应混合物中蒸馏出来。将另外的甲苯(2.5倍体积)加入,对所得的混合物再次蒸馏,留下作为油状物的酰氯,其无需进一步纯化而使用。

[0514] 3-(3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯的制备。



[0516] 将2-溴-3-甲基吡啶(1.0当量)溶于甲苯(12倍体积)。将K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(4.8当量)加入,然后将水(3.5倍体积)加入。将所得的混合物在N<sub>2</sub>流下加热到65℃维持1小时。然后将3-(叔丁氧羰基)苯基硼酸(1.05当量)和Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(0.015当量)加入并将混合物加热到80℃。2小时后,停止加热,将水加入(3.5倍体积),并进行层分离。然后将有机相用水(3.5倍体积)洗涤,并用10%的甲磺酸水溶液(2当量MsOH,7.7倍体积)萃取。通过50%的NaOH水溶液(2当量)使水相呈碱性,并用EtOAc(8倍体积)萃取。对有机层进行浓缩得到直接用于下一步的粗3-(3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯(82%)。

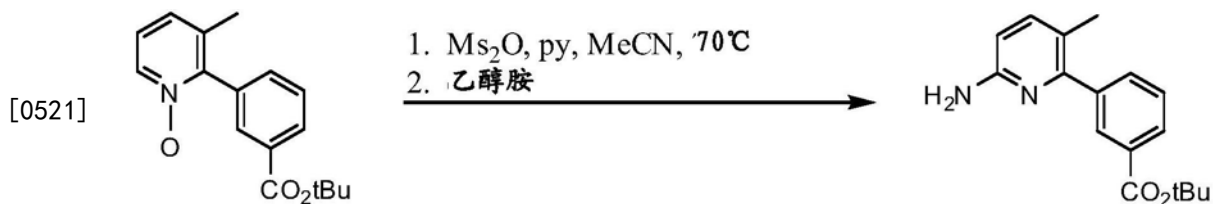
[0517] 2-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶-1-氧化物的制备



[0519] 将3-(3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯(1.0当量)溶于EtOAc(6倍体积)。将水(0.3倍体积)加入,然后将脲-过氧化氢(3当量)加入。然后将邻苯二甲酸酐(3当量)作为固体以将反应器中的温度维持在45℃以下的速率分批加入混合物。在完成邻苯二甲酸酐的添加后,将混合物加热到45℃。再搅拌4小时后,停止加热。将10%w/w的Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>水溶液(1.5当量)经由加料漏斗加入。在完成Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>的添加后,将混合物再搅拌30min,然后对层进行分离。对有机层进行搅拌,并将10%w/w的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液(2当量)加入。在搅拌30分钟后,进行层分离。

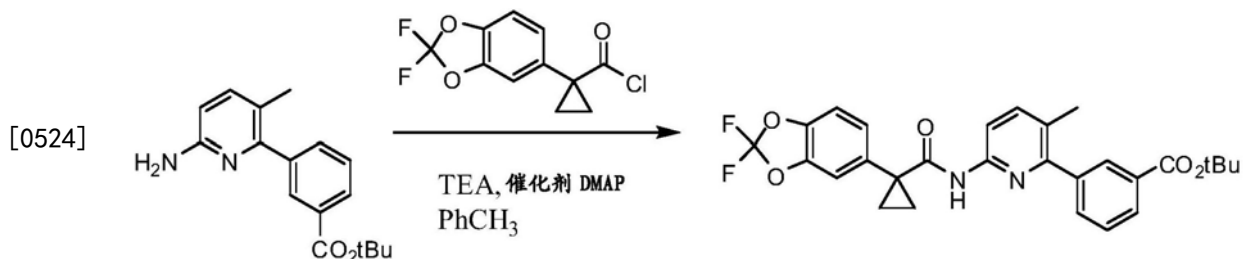
将有机相用13%w/v的NaCl水溶液洗涤。然后对有机相进行过滤并浓缩,得到直接用于下一步的粗2-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶-1-氧化物(95%)。

[0520] 3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯的制备。



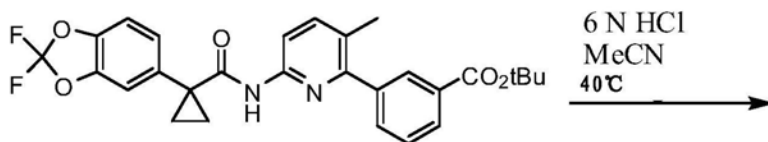
[0522] 将2-(3-(叔丁氧羰基)苯基)-3-甲基吡啶-1-氧化物(1当量)和吡啶(4当量)的乙腈(8倍体积)溶液加热到70℃。将甲磺酸酐(1.5当量)的MeCN(2倍体积)溶液经50min经由加料漏斗加入,同时将温度维持在75℃以下。完成添加后,将混合物再搅拌0.5小时。然后使混合物冷却到环境温度。将乙醇胺(10当量)经由加料漏斗加入。搅拌2小时后,将水(6倍体积)加入并将混合物冷却到10℃。搅拌3小时后,通过过滤收集固体,用水(3倍体积)、2:1乙腈/水(3倍体积)和乙腈(2×1.5倍体积)洗涤。将固体在真空炉中在50℃下通过轻微的N<sub>2</sub>流干燥到恒重(<1%的差值),得到作为红-黄色固体的3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯(53%的收率)。

[0523] 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)-苯甲酸叔丁酯的制备。

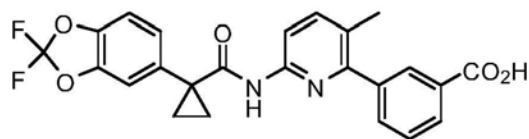


[0525] 将上文所述的粗酰氯溶于甲苯(按酰氯计为2.5倍体积),并经由加料漏斗加入3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯(1当量)、DMAP(0.02当量)和三乙胺(3.0当量)在甲苯(按3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯计为4倍体积)的混合物中。2小时后,将水(按3-(6-氨基-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸叔丁酯计为4倍体积)加入反应混合物。搅拌30分钟后,对层进行分离。然后对有机相进行过滤,并浓缩得到3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-苯甲酸叔丁酯(定量粗产率)的浓稠油。将乙腈(按粗产物计为3倍体积)加入,并蒸馏直至发生结晶。将水(按粗产物计为2倍体积)加入,并将混合物搅拌2h。通过过滤收集固体,用1:1(体积比)的乙腈/水(按粗产物计为2×1倍体积)洗涤,然后在过滤器上在真空下部分干燥。将固体在真空炉中在60℃下通过轻微的N<sub>2</sub>流干燥到恒重(<1%的差值),得到作为棕色固体的3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-苯甲酸叔丁酯。

[0526] 3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸·HCl盐的制备。



[0527]



• HCl

[0528] 向3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-苯甲酸叔丁酯(1.0当量)在MeCN(3.0倍体积)中的浆液加入水(0.83倍体积),然后加入浓盐酸水溶液(0.83倍体积)。将混合物加热到 $45 \pm 5^\circ\text{C}$ 。搅拌24至48h后,反应完成,并让混合物冷却到环境温度。将水(1.33倍体积)加入,对混合物进行搅拌。通过过滤收集固体,用水( $2 \times 0.3$ 倍体积)洗涤,然后在过滤器上在真空下部分干燥。将固体在真空炉中在 $60^\circ\text{C}$ 下通过轻微的 $\text{N}_2$ 流干燥到恒重( $<1\%$ 的差值),得到作为灰白色固体的3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸•HCl。

[0529] 化合物1的 $^1\text{H}$ NMR光谱在图8和图9中示出,其显示了作为HCl盐的化合物1的 $^1\text{H}$ NMR光谱。

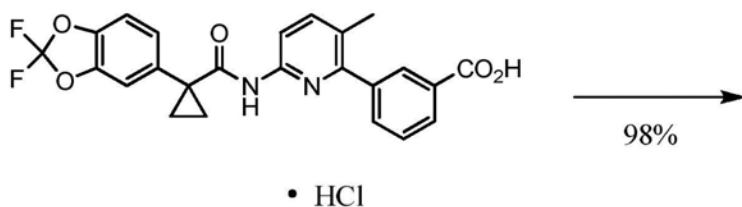
[0530] 下表2描述了的化合物1 $^1\text{H}$ NMR数据。

[0531] 表2.

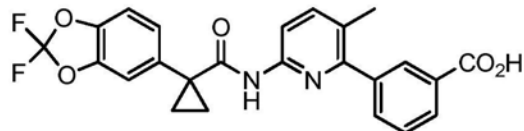
化合物编号	LC/MS M + 1	LC/RT 分钟	NMR
[0532] 1	453.3	1.93	$^1\text{H}$ NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 9.14 (s, 1H), 7.99-7.93 (m, 3H), 7.80-7.78 (m, 1H), 7.74-7.72 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.53-1.51 (m, 2H), 1.19-1.17 (m, 2H).

[0533] 化合物1形式I的制备

[0534] 化合物1形式I的制备,方法A.



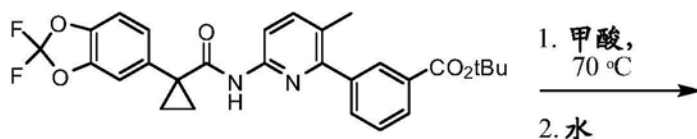
[0535]



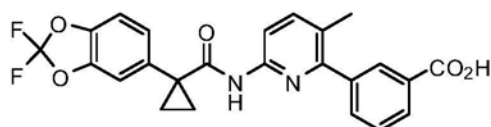
形式 I

[0536] 将3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)苯甲酸·HCl (1当量) 在水 (10倍体积) 中的浆液在环境温度下搅拌。在搅拌24h后采集样品。对样品过滤,将固体用水洗涤 (2次)。使固体样品接受DSC分析。当DSC分析表明完全转化成形式I后,通过过滤收集固体,用水 (2×1.0倍体积) 洗涤,并在过滤器上在真空下部分干燥。然后将固体在真空炉中在60℃下通过轻微的N<sub>2</sub>流干燥到恒重 (<1%的差值),得到作为灰白色固体的化合物1形式I (98%产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 9.14 (s, 1H), 7.99-7.93 (m, 3H), 7.80-7.78 (m, 1H), 7.74-7.72 (m, 1H), 7.60-7.55 (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.53-1.51 (m, 2H), 1.19-1.17 (m, 2H)。

[0537] 化合物1形式I的制备,方法B.



[0538]



形式 I

[0539] 将3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-苯甲酸叔丁酯 (1.0当量) 的甲酸 (3.0倍体积) 溶液在搅拌下加热到70±10℃维持8h。当色谱法表明不超过1.0%AUC的3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-苯甲酸叔丁酯) 剩余时,将反应视为完成。使混合物冷却到环境温度。将溶液加入水 (6倍体积) 中,在50℃下加热,并对混合物进行搅拌。然后将混合物加热到70±10℃,直到3-(6-(1-(2,2-二氟苯并[d][1,3]间二氧杂环戊烯-5-基)环丙烷甲酰氨基)-3-甲基吡啶-2-基)-苯甲酸叔丁酯的含量不超过0.8% (AUC)。通过过滤收集固体,用水 (2×3倍体积) 洗涤,然后在过滤器上在真空下部分干燥。将固体在真空炉中在60℃下通过轻微的N<sub>2</sub>流干燥到恒重 (<1%的差值),得到作为灰白色固体的化合物1形式I。

[0540] 化合物1形式I的DSC曲线在图10中示出。化合物1形式I的熔化发生在约204℃。

[0541] X射线衍射图从化合物1形式I的单晶结构计算而得，并在图1中示出。表3列出了图1的计算峰。

[0542] 表3.

[0543]

峰排序	2θ角[度]	相对强度[%]
11	14.41	48.2
8	14.64	58.8
1	15.23	100.0
2	16.11	94.7
3	17.67	81.9
7	19.32	61.3
4	21.67	76.5
5	23.40	68.7
9	23.99	50.8
6	26.10	67.4
10	28.54	50.1

[0544] 化合物1形式I的实际X射线粉末衍射图在图2中示出。表4列出了图2的实际峰。

[0545] 表4.

[0546]

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

[0547] 通过将浓缩的1-丁醇溶液以0.2℃/min的速率从75℃冷却到10℃得到了化合物1形式I的无色晶体。选择尺寸为0.50x 0.08x 0.03mm的晶体，用矿物油清洁，安装在MicroMount上并在Bruker APEX II系统上居中。得到了在倒易空间中分离的三批40帧，以提供取向矩阵和初始晶胞参数。获得了最终晶胞参数，并基于完整数据集进行了精化。

[0548] 以每帧30s暴露使用0.5°步进获得了倒易空间的衍射数据集，达到**0.82 Å**的分辨率。在100(2)K采集数据。强度的积分和晶胞参数的精化使用APEXII软件完成。在采集数据后观测晶体表明无分解迹象。

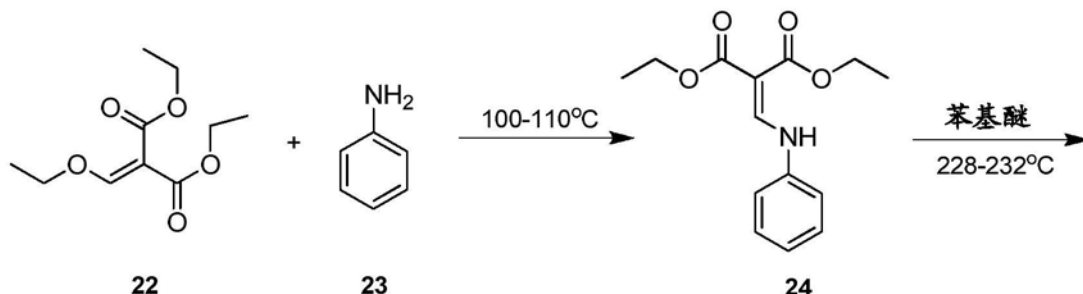
[0549] 基于单晶X射线分析的化合物1形式I的构象图在图11中示出。化合物1形式I为单

斜、 $P_21/n$ , 具有以下单位晶胞尺寸:  $a=4.9626(7) \text{ \AA}$ ,

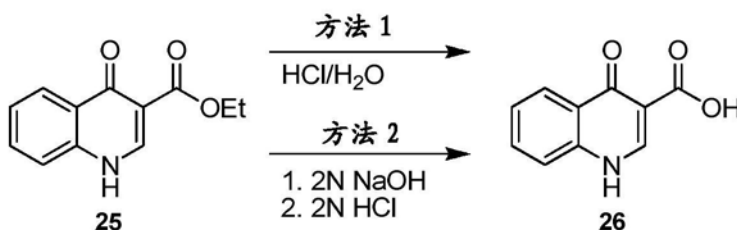
$b=12.299(2) \text{ \AA}$ ,  $c=33.075(4) \text{ \AA}$ ,  $\beta=93.938(9)^\circ$ ,  $V=2014.0 \text{ \AA}^3$ ,  $Z=4$ 。从结构数据计算的化合物1形式I的密度在100K时为 $1.492 \text{ g/cm}^3$ 。

[0550] 化合物2的制备

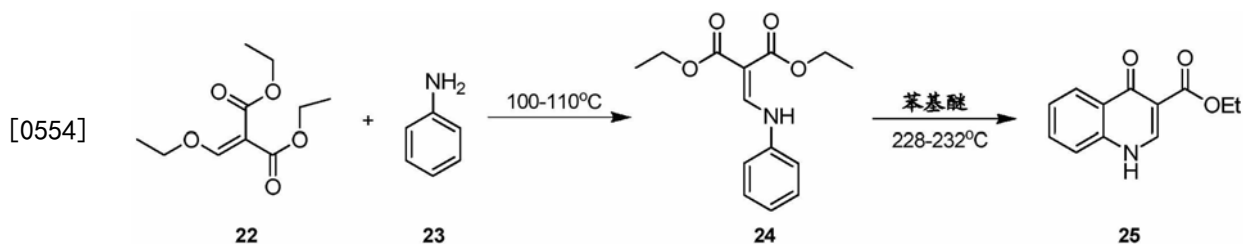
[0551] 4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酸(26)的合成



[0552]

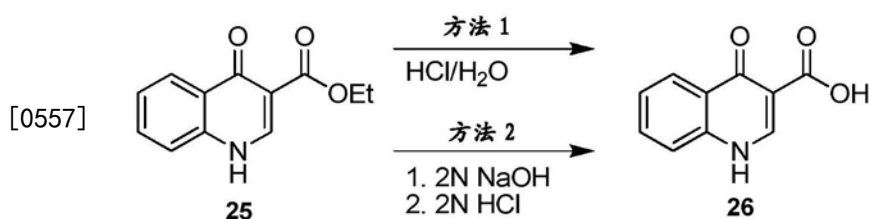


[0553] 制备4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酸乙酯(25)的方法



[0555] 将化合物23(4.77g, 47.7mmol)滴加到化合物22(10g, 46.3mmol)中, 下面通N<sub>2</sub>气流以驱除乙醇, 低于30℃0.5小时。然后将该溶液加热至100-110℃, 搅拌2.5小时。将该混合物冷却至低于60℃后, 加入二苯醚。将得到的溶液滴加到已经加热至228-232℃1.5小时的二苯醚中, 下面通N<sub>2</sub>气流以驱除乙醇。将该混合物在228-232℃再搅拌2小时, 冷却至低于100℃, 然后加入庚烷以沉淀产物。将得到的浆液在30℃搅拌0.5小时。然后过滤固体, 用庚烷洗涤饼状物, 真空干燥, 得到化合物25, 为棕色固体。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>; 400MHz)  $\delta$ 12.25 (s),  $\delta$ 8.49 (d),  $\delta$ 8.10 (m),  $\delta$ 7.64 (m),  $\delta$ 7.55 (m),  $\delta$ 7.34 (m),  $\delta$ 4.16 (q),  $\delta$ 1.23 (t)。

[0556] 制备4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酸(26)的方法



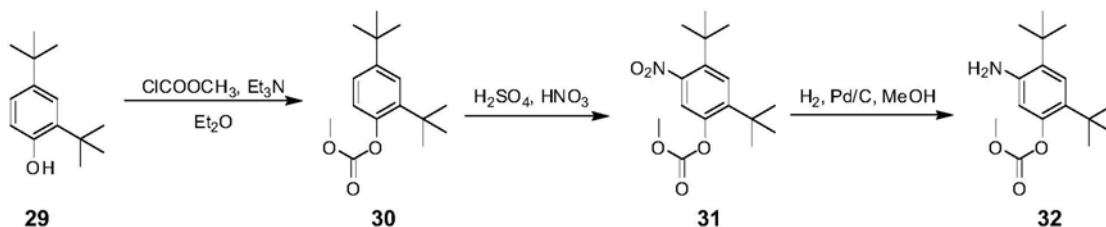
[0558] 方法1

[0559] 将化合物25 (1.0当量) 混悬于HCl (10.0当量) 和H<sub>2</sub>O (11.6倍体积) 的溶液。将该浆液加热至85-90℃, 不过, 可选温度也适合于该水解步骤。例如, 水解可以选择在约75—约100℃的温度下进行。在一些情况中, 水解在约80—约95℃的温度下进行。在其它情况中, 水解步骤在约82—约93℃ (例如, 约82.5—约92.5℃或约86—约89℃) 的温度下进行。在85-90℃搅拌约6.5小时后, 因反应完成, 对反应体系采样。可以在适合于水解的任意温度下进行搅拌。然后将该溶液冷却至20-25℃, 过滤。用H<sub>2</sub>O (2倍体积x 2) 冲洗反应器/饼状物。然后用2倍体积H<sub>2</sub>O洗涤饼状物至pH≥3.0。然后在60℃真空干燥该饼状物, 得到化合物26。

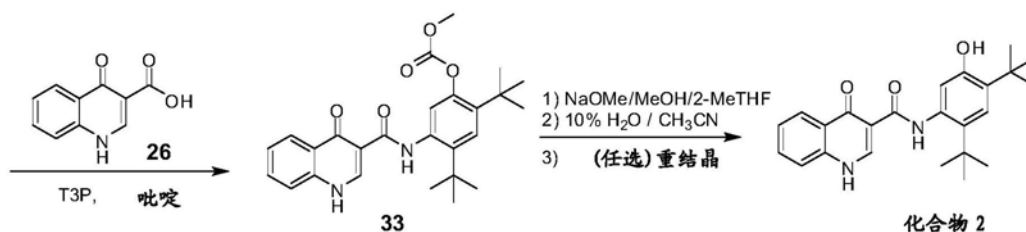
[0560] 方法2

[0561] 将化合物25 (11.3g, 52mmol) 加入到10%NaOH(aq) (10mL) 和乙醇(100mL) 的混合物中。将该溶液加热至回流16小时, 冷却至20-25℃, 然后用8%HCl将pH调整至2-3。然后将该混合物搅拌0.5小时, 过滤。用水(50mL) 洗涤饼状物, 然后真空干燥, 得到化合物26, 为棕色固体。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>; 400MHz) δ15.33 (s), δ13.39 (s), δ8.87 (s), δ8.26 (m), δ7.87 (m), δ7.80 (m), δ7.56 (m)。

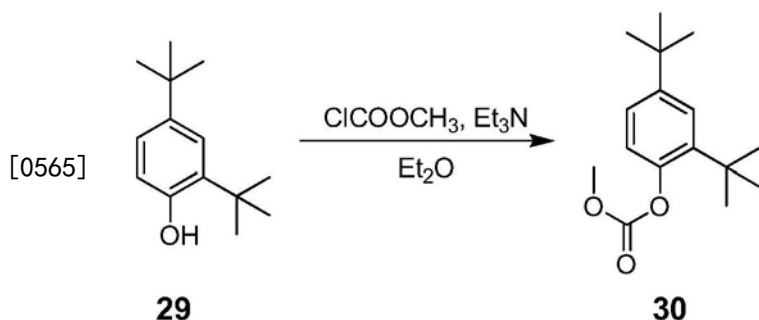
[0562] N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺(化合物2) 的总体合成



[0563]



[0564] 制备2,4-二叔丁基苯基甲基碳酸酯(30)的方法



[0566] 方法1

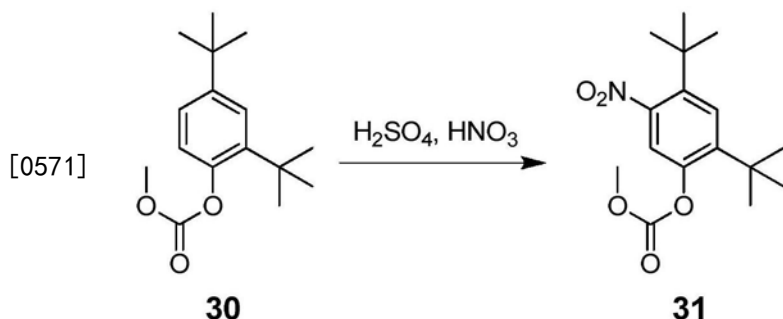
[0567] 在0℃向2,4-二叔丁基苯酚29 (10g, 48.5mmol) 在乙醚(100mL) 和三乙胺(10.1mL, 72.8mmol) 中的溶液中滴加氯甲酸甲酯(7.46mL, 97mmol)。然后将该混合物温至室温, 再搅拌2小时。然后再加入5mL三乙胺和3.7mL氯甲酸甲酯, 将该反应体系搅拌过夜。然后过滤该反应体系, 将滤液冷却至0℃, 然后再加入5mL三乙胺和3.7mL氯甲酸甲酯, 将该反应体系温至室温, 然后再搅拌1小时。此时, 反应几乎完成, 通过过滤后处理, 然后用水(2x)、再用盐水

洗涤。然后浓缩该溶液,得到黄色油状物,使用柱色谱法纯化,得到化合物30。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.35 (d, J=2.4Hz, 1H), 7.29 (dd, J=8.4, 2.4Hz, 1H), 7.06 (d, J=8.4Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 1.30 (s, 9H), 1.29 (s, 9H)。

[0568] 方法2

[0569] 向反应器容器中加入4-二甲基氨基吡啶 (DMAP, 3.16g, 25.7mmol) 和2,4-二叔丁基苯酚(化合物29, 103.5g, 501.6mmol), 加入二氯甲烷 (415g, 313mL), 将该溶液搅拌至全部固体溶解。然后加入三乙胺 (76g, 751mmol), 将该溶液冷却至0-5℃。然后在2.5-4小时内滴加氯甲酸甲酯 (52g, 550.3mmol), 同时保持该溶液温度在0-5℃。然后将该反应混合物缓慢地加热至23-28℃, 搅拌20小时。然后将该反应体系冷却至10-15℃, 加入150mL水。将该混合物在15-20℃搅拌35-45分钟, 然后分离水层, 用150mL二氯甲烷萃取。合并有机层, 用2.5% HCl (水溶液) 在5-20℃温度中和, 得到最终pH为5-6。然后用水洗涤有机层, 在低于20℃温度下真空浓缩至150mL, 得到在二氯甲烷中的化合物30。

[0570] 制备5-硝基-2,4-二叔丁基苯基甲基碳酸酯 (31) 的方法



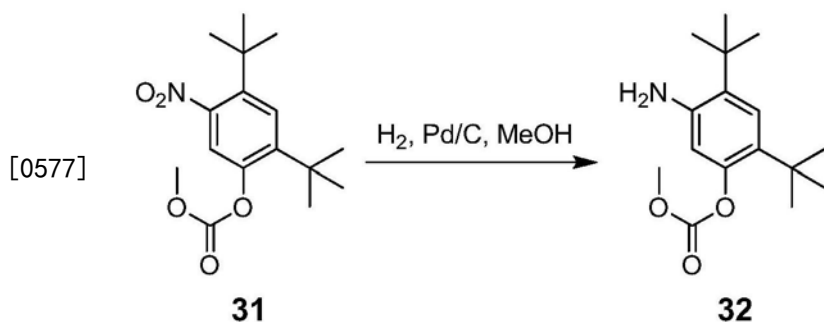
[0572] 方法1

[0573] 在0℃向搅拌的化合物30 (6.77g, 25.6mmol) 中滴加6mL 1:1的硫酸和硝酸混合物。将该混合物温至室温, 搅拌1小时。使用液相色谱法纯化产物 (ISCO, 120g, 0-7% EtOAc/己烷, 38min), 产生约8:1-10:1的化合物31的区域异构体混合物, 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.63 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.32 (s, 9H) .HPLC ret.time 3.92min 10-99% CH<sub>3</sub>CN, 5min run; ESI-MS 310m/z (MH)<sup>+</sup>。

[0574] 方法2

[0575] 向化合物30 (100g, 378mmol) 中加入DCM (540g, 408mL)。将该混合物搅拌至全部固体溶解, 然后冷却至-5-0℃。然后滴加浓硫酸 (163g), 同时维持反应的内部温度, 将该混合物搅拌4.5小时。然后在2-4小时内滴加硝酸 (62g), 同时维持反应的内部温度, 然后在该温度下再搅拌4.5小时。然后将该反应混合物缓慢地加入到冷水中, 维持温度低于5℃。然后将猝灭的反应体系加热至25℃, 取出水层, 用二氯甲烷萃取。用水洗涤合并的有机层, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 浓缩至124-155mL。加入己烷 (48g), 将得到的混合物再浓缩至124-155mL。随后向该混合物中再加入己烷 (160g)。然后将该混合物在23-27℃搅拌15.5小时, 然后过滤。向滤饼中加入己烷 (115g), 将得到的混合物加热至回流, 搅拌2-2.5小时。然后将该混合物冷却至3-7℃, 再搅拌1-1.5小时, 过滤, 得到化合物31, 为淡黄色固体。

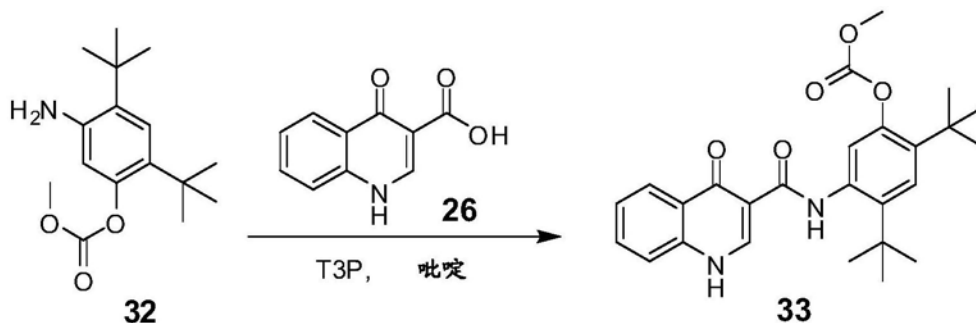
[0576] 制备5-氨基-2,4-二叔丁基苯基甲基碳酸酯 (32) 的方法



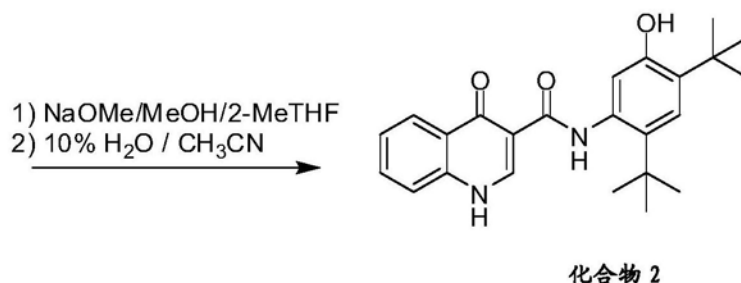
[0578] 将2,4-二叔丁基-5-硝基苯基甲基碳酸酯(1.00当量)加入到适合的氢化反应器中,再加入5%Pd/C(基于干重2.50wt%,Johnson-Matthey Type 37)。向反应器中加入MeOH(15.0倍体积),密封该系统。向该系统中充N<sub>2</sub>(g),然后用H<sub>2</sub>(g)加压至2.0巴。在25°C+/-5°C反应温度下进行反应。当完成时,过滤该反应体系,用MeOH(4.00倍体积)洗涤反应器/饼状物。在不超过50°C真空蒸馏得到的滤液至8.00倍体积。在45°C+/-5°C加入水(2.00倍体积)。将得到的浆液冷却至0°C+/-5。将浆液保持在0°C+/-5°C不少于1小时,过滤。用将0°C+/-5°C MeOH/H<sub>2</sub>O(8:2)(2.00倍体积)饼状物洗涤1次。在35°C-40°C真空干燥(-0.90巴和-0.86巴)饼状物,得到化合物32。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.05(s,1H),6.39(s,1H),4.80(s,2H),3.82(s,3H),1.33(s,9H),1.23(s,9H)。

[0579] 一旦反应完成,则用约5-10倍体积的MeOH(例如,约6-约9倍体积的MeOH、约7-约8.5倍体积的MeOH、约7.5-约8倍体积的MeOH或约7.7倍体积的MeOH)稀释得到的混合物,加热至约35±5°C的温度,如上所述过滤,洗涤,干燥。

[0580] N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的制备。



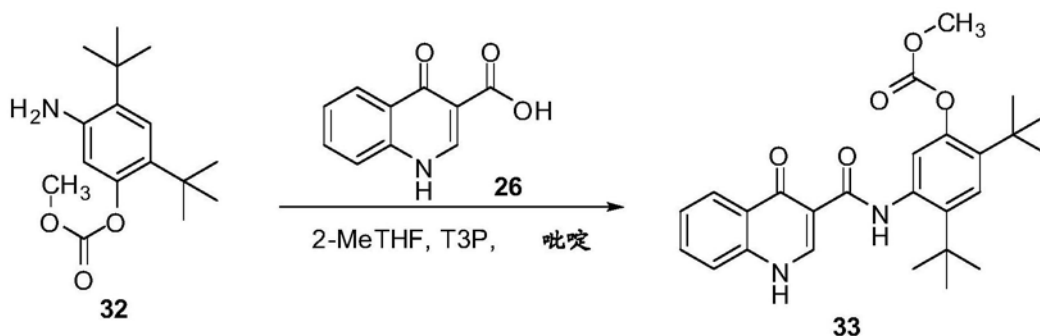
[0581]



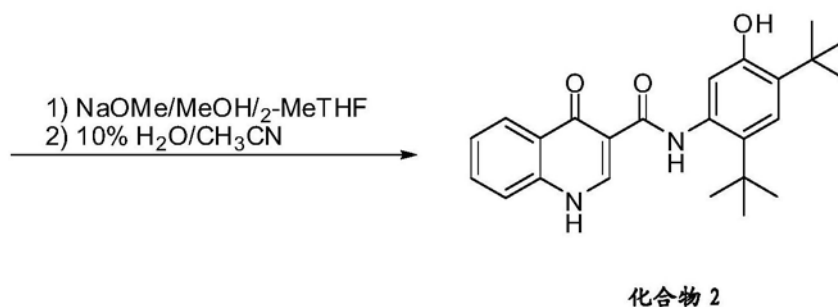
[0582] 将4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酸26(1.0当量)和5-氨基-2,4-二叔丁基苯基甲基碳酸酯至32(1.1当量)加入到反应器中。加入2-MeTHF(4.0倍体积,相对于酸),再加入T3P<sup>®</sup> 50%在2-MeTHF中的溶液(1.7当量)。将添加T3P的容器用2-MeTHF(0.6倍体积)洗涤。然后加

入吡啶 (2.0当量), 将得到的混悬液加热至 $47.5\pm 5.0^{\circ}\text{C}$ , 保持在该温度下8小时。取样, 通过HPLC检查完成。一旦完成, 则将得到的混合物冷却至 $25.0\pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 。加入2-MeTHF (12.5倍体积) 以稀释该混合物。用水 (10.0倍体积) 将该反应混合物洗涤2次, 加入2-MeTHF使反应的总体积达到40.0倍体积 (~16.5倍加入的体积)。向该溶液中加入NaOMe/MeOH (1.7当量) 以进行甲醇解。将该反应体系搅拌不少于1.0小时, 通过HPLC检查完成。一旦完成, 则用1N HCl (10.0倍体积) 使反应停止, 用0.1N HCl (10.0倍体积) 洗涤。精滤有机溶液以除去任何颗粒物, 放入第二个容器中。将过滤的溶液在不超过 $35^{\circ}\text{C}$ 下 (夹套温度) 和不低于 $8.0^{\circ}\text{C}$  (内部反应温度), 在减压下浓缩至20倍体积。加入 $\text{CH}_3\text{CN}$ 至40倍体积, 在不超过 $35^{\circ}\text{C}$ 下 (夹套温度) 和不低于 $8.0^{\circ}\text{C}$  (内部反应温度), 在减压下浓缩该溶液至20倍体积。将添加 $\text{CH}_3\text{CN}$ 和浓缩循环重复2次以上, 总计添加3次 $\text{CH}_3\text{CN}$ 和4次浓缩至20倍体积。最终浓缩至20倍体积后, 加入16.0倍体积的 $\text{CH}_3\text{CN}$ , 再加入4.0倍体积的 $\text{H}_2\text{O}$ , 制成最终浓度为相对于起始酸40倍体积的10% $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 。将该浆液加热至 $78.0\pm 5.0^{\circ}\text{C}$  (回流)。然后将该浆液搅拌不少于5小时。将该浆液在5小时内冷却至 $0.0\pm 5.0^{\circ}\text{C}$ , 过滤。用 $0.0\pm 5.0^{\circ}\text{C}$   $\text{CH}_3\text{CN}$  (5倍体积) 将饼状物洗涤4次。在 $50.0\pm 5.0^{\circ}\text{C}$ 在真空炉中干燥得到的固体 (化合物2)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 12.8 (s, 1H), 11.8 (s, 1H), 9.2 (s, 1H), 8.9 (s, 1H), 8.3 (s, 1H), 7.2 (s, 1H), 7.9 (t, 1H), 7.8 (d, 1H), 7.5 (t, 1H), 7.1 (s, 1H), 1.4 (s, 9H), 1.4 (s, 9H)。

[0583] N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺 (化合物2) 的另一种制备。



[0584]

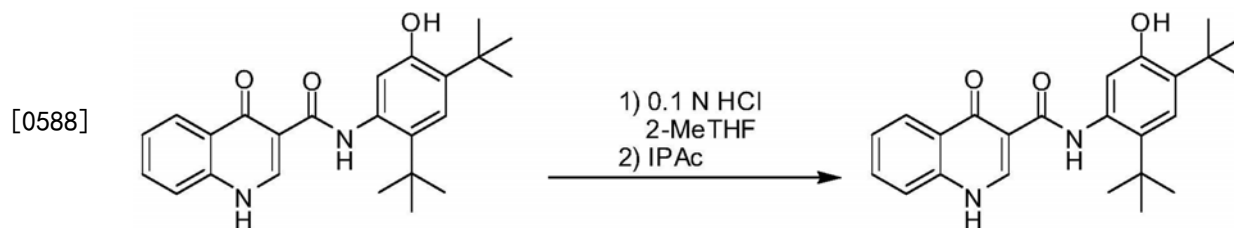


[0585] 将4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酸, 26, (1.0当量) 和5-氨基-2,4-二叔丁基苯基甲基碳酸酯32 (1.1当量) 加入到反应器中。加入2-MeTHF (4.0倍体积, 相对于酸), 再加入T3P<sup>®</sup> 50%在2-MeTHF中的溶液 (1.7当量)。将添加T3P的容器用2-MeTHF (0.6倍体积) 洗涤。然后加入吡啶 (2.0当量), 将得到的混悬液加热至 $47.5\pm 5.0^{\circ}\text{C}$ , 保持在该温度下8小时。取样, 通过HPLC检查完成。一旦完成, 则将得到的混合物冷却至 $20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。加入2-MeTHF

(12.5倍体积)以稀释该混合物。用水(10.0倍体积)将该反应混合物洗涤2次,将2-MeTHF(16.5倍体积)加入到反应器中。向该溶液中加入30%w/w NaOMe/MeOH(1.7当量)以进行甲醇解。将该反应体系在25.0°C+/-5.0°C搅拌不少于1.0小时,通过HPLC检查完成。一旦完成,则用1.2N HCl/H<sub>2</sub>O(10.0倍体积)使反应停止,用0.1N HCl/H<sub>2</sub>O(10.0倍体积)洗涤。精滤有机溶液以除去任何颗粒物,放入第二个容器中。

[0586] 将过滤的溶液在不超过35°C下(夹套温度)和不低于8.0°C(内部反应温度),在减压下浓缩至20倍体积。加入CH<sub>3</sub>CN至40倍体积,在不超过35°C下(夹套温度)和不低于8.0°C(内部反应温度),在减压下浓缩至20倍体积。将添加CH<sub>3</sub>CN和浓缩循环重复2次以上,总计添加3次CH<sub>3</sub>CN和4次浓缩至20倍体积。最终浓缩至20倍体积后,加入16.0倍体积的CH<sub>3</sub>CN,再加入4.0倍体积的H<sub>2</sub>O,制成最终浓度为相对于起始酸40倍体积的10%H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN。将该浆液加热至78.0°C+/-5.0°C(回流)。然后将该浆液搅拌不少于5小时。将该浆液在5小时内冷却至20-25°C,过滤。用加热至20-25°C4次的CH<sub>3</sub>CN(5倍体积)洗涤饼状物。在50.0°C+/-5.0°C在真空炉中干燥得到的固体(化合物2)。<sup>1</sup>HNMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ12.8(s,1H),11.8(s,1H),9.2(s,1H),8.9(s,1H),8.3(s,1H),7.2(s,1H),7.9(t,1H),7.8(d,1H),7.5(t,1H),7.1(s,1H),1.4(s,9H),1.4(s,9H)。

[0587] N-(2,4-二叔丁基-5-羟基苯基)-4-氧代-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺(化合物2)的重结晶方法



[0589] 将化合物2(1.0当量)加入到反应器中。加入2-MeTHF(20.0倍体积),再加入0.1N HCl(5.0倍体积)。搅拌双相溶液,分离,再用0.1NHCl(5.0倍体积)将上部的有机相洗涤2次。精滤有机溶液,以除去任何颗粒物,放入第二个反应器。在不超过35°C下(夹套温度)和不超过8.0°C(内部反应温度),在减压下浓缩过滤溶液至10倍体积。加入乙酸异丙酯(IPAc)(10倍体积),在不超过35°C下(夹套温度)和不超过8.0°C(内部反应温度),在减压下浓缩该溶液至10倍体积。将添加IPAc和浓缩重复2次以上,总计添加3次IPAc和4次浓缩至10倍体积。最终浓缩后,加入10倍体积IPAc,将浆液加热至回流,维持在该温度下5小时。将浆液在5小时内冷却至0.0°C+/-5°C,过滤,用IPAc(5倍体积)将饼状物洗涤1次。在50.0°C+/-5.0°C在真空炉中干燥得到的固体。

[0590] 包含基本上无定形的化合物2的固体分散体的制备

[0591] 在反应器中将根据90wt%MEK/10wt%DI水比例配制的MEK和DI水的溶剂系统加热至20-30°C的温度,所述反应器配有磁搅拌器和热力循环。根据19.5wt%醋酸琥珀酸羟丙甲纤维素/0.5wt%SLS/80wt%化合物2的比例将醋酸琥珀酸羟丙甲纤维素聚合物(HPMCAS)(HG级)、SLS和化合物2加入到该溶剂系统中。得到的化合物包含10.5wt%固体。用于生成该混合物的成分和溶剂的实际用量如下表5中所示:

[0592] 表5:用于中间体F的固体喷雾分散体的成分

[0593]

单位	批量
----	----

化合物2Kg	70.0
HPMCAS Kg	17.1
SLS Kg	0.438
总固体Kg	87.5
MEK Kg	671
水Kg	74.6
总溶剂Kg	746
总喷雾溶液重量Kg	833

[0594] 将该混合物温度调整至20-45℃的范围并且混合至它基本上均匀且所有成分基本上溶解为止。

[0595] 在正常喷雾干燥模式下,按照下表6中所示的干燥喷雾工艺参数使用喷雾干燥器 Niro PSD4 Commercial Spray Dryer,其配有安装了anti-bearding cap的压力喷嘴(具有孔口/芯大小54/21的SpraySystems Maximum Passage系列SK-MFP)。

[0596] 表6:用于生成中间体F的干燥喷雾工艺参数

参数	值
进料压力	20 巴
进料流速	92 - 100 Kg/hr
入口温度	93 - 99 °C
出口温度	53 - 57 °C
真空干燥器温度	80 °C, 2 小时, 然后 110 °C (+/-5 °C)
真空干燥时间	20 - 24 小时

[0597] [0598] 高效率旋风分离器将湿产物与喷雾气体和溶剂蒸汽分离开。湿产物包含8.5-9.7%MEK和0.56-0.83%水并且具有17-19um的平均粒度和0.27-0.33g/cc的堆积密度。将湿产物转入4000L不锈钢双锥形真空干燥器以便干燥减少残留溶剂至低于约5000ppm的水平,并且生成无定形化合物2的喷雾干燥分散体,其包含<0.03%MEK和0.3%水。

[0599] 由完全连续的湿法制粒工艺形成片剂

[0600] 设备/工艺

[0601] 设备

[0602] 全连续展开和发射成套装置(Fully Continuous Development and Launch Rig) (DLR) 或类似型号的设备。

[0603] 过筛

[0604] 在单独的中间料箱容器(intermediate bin containers) (IBCs) 中调配化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和赋形剂。可以使用“料箱-料箱”过筛操作对这些材料过筛。适当的筛号为20目、40目或60目。

[0605] 共混

[0606] 使包含化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和赋形剂的IBCs紧邻进料器系统,其可以例如使用体积或重量损失进料器以受控方式将材料进料入连续共混机。各成分的进料速率根据制剂组成和总管线速率决定。管线速率可以为8kg/hr—30kg/hr。连续共混机可以具有不同的刀片构造以允许适合的共混,且这些刀片的旋转速度可以在80RPM至300RPM之间。

[0607] 湿法制粒

[0608] 可以通过使用700RPM搅拌速度的高架搅拌器将48g月桂基硫酸钠和159g聚乙烯吡咯烷酮溶于1,626g水制备制粒液。可以将制粒液放入容器,可以使用具有质量流动计量表和控制器的蠕动泵,应用适合于该工艺的流速从其中将其泵送入双螺杆制粒机。可以使用双螺杆制粒机例如作为DLR组成部分的制粒机将共混物制粒。可以使用重量损失进料器例如DLR上的K-Tron进料器以8kg/hr—24kg/hr的进料速率将共混物加入到双螺杆制粒机中。所述双螺杆制粒机以25℃的筒温和200—950RPM的螺杆速度运转。对于小批量规模,该制粒工艺可以进行3分钟;或对于大批量规模,可以进行几小时。

[0609] 干燥

[0610] 可以将湿颗粒直接进料入流化床干燥器,例如DLR上的分段流化床干燥器。可以将干燥终点选择在40—55℃的卸料过程中的产品温度,此时颗粒的含水量可以为2.1%w/w(“干燥失重,L0D”)或以下。干燥时间可以为12分钟或可短可长,以达到期望的干燥终点。

[0611] 研磨

[0612] 可以研磨干燥颗粒以减小颗粒大小。锥形磨例如集成的Quadro U10CoMil可以用于该目的。

[0613] 共混

[0614] 可使用重量损失进料器和连续共混机将颗粒与颗粒外赋形剂例如填充剂和润滑剂共混。共混速度可以为80-300RPM。

[0615] 压制

[0616] 可以使用单台或旋转式压片机例如Courtoy Modul P压片机(为DLR系统的组成部分),应用适当大小的刀具将压缩的共混物压制成片剂。对于200mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的剂量的片重可以约为500或600mg。

[0617] 薄膜包衣

[0618] 可以使用为DLR系统的组成部分的创新的 $\omega$ 薄膜包衣机给片剂包薄膜衣。该包衣机能够给1—4kg的小批量快速包薄膜衣,以便连续制造。

[0619] 印刷

[0620] 使用例如Ackley变速印刷机将薄膜衣片在片剂的一个或两个表面上印上字母图案。

[0621] 由双螺杆湿法制粒工艺形成片剂

[0622] 设备/工艺

[0623] 设备

[0624] 双螺杆湿法制粒机:ConsiGma-1,ConsiGma-25或Leistritz nano。

[0625] 过筛/称重

[0626] 在称出前可以将化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和赋形剂过筛。适当的筛号为20目、40目或60目。可以将化合物1形式I和/或包含基本上无定形的化合物2的固体分散体与所述赋形剂的一种或多种预先共混，以简化过筛。

[0627] 共混

[0628] 可以将化合物1形式I、包含基本上无定形的化合物2的固体分散体和赋形剂以不同次序加入到共混机中。共混可以在Turbula共混机、v-型外壳共混机或料箱共混机中进行。可以将成分共混10分钟。

[0629] 湿法制粒

[0630] 可以通过使用700RPM搅拌速度的高架搅拌器将48g月桂基硫酸钠和159g聚乙烯吡咯烷酮溶于1,626g水制备制粒液。可以使用双螺杆制粒机例如ConsiGma-1将共混物制粒。可以使用蠕动泵ConsiGma-1上的泵以67g/min的进料速率将制粒液加入到双螺杆制粒机中。可以使用重量损失进料器例如ConsiGma-1上的Brabender进料器以10kg/hr的进料速率将共混物加入到双螺杆制粒机中。该双螺杆制粒机可以以25℃的筒温和400RPM的螺杆速度运行。该制粒工艺可以进行4分钟。该制粒工艺可以进行较短或较长时间期限，以生产较小或较大量的湿颗粒。

[0631] 干燥

[0632] 可以将湿颗粒直接进料入流化床干燥器，例如ConsiGma-1上的干燥室或CTL-25上的分段流化床干燥器。可以将干燥终点选择在43℃的产品温度，此时颗粒的含水量可以为1.6%w/w（“干燥失重，LOD”）。干燥时间可以为12分钟或可短可长，以达到期望的干燥终点。干燥可以以59m<sup>3</sup>/min空气流速和60℃的入口温度进行。或者，可以将来源于双螺杆制粒机的湿颗粒采集入料箱或容器确定的时间期限，此后，将湿颗粒转入单独的独立式流化床干燥器，例如Vector Multi 15。

[0633] 研磨

[0634] 可以研磨干燥颗粒以减小颗粒大小。锥形磨例如Quadro 194CoMil可以用于该目的。

[0635] 共混

[0636] 可使用V-型外壳共混机或料箱共混机将颗粒与颗粒外赋形剂例如填充剂和润滑剂共混。共混时间可以为5、3或1分钟。

[0637] 压制

[0638] 可以使用单台或旋转式压片机例如Courtoy Modul P压片机，应用0.55' x 0.33'卵形刀具将压缩的共混物压制成片剂。对于200mg的化合物1形式I和125mg的基本上无定形的化合物2的剂量的片重可以约为500或600mg。

[0639] 薄膜包衣

[0640] 可以使用盘式包衣锅例如Thomas Engineering Compu-Lab包衣锅给片剂包薄膜衣。可以加入痕量的巴西棕榈蜡以改善片剂外观和加工能力。

[0641] 印刷

[0642] 通过例如Hartnett Delta印刷机将薄膜衣片在片剂的一个或两个表面上印上字母图案。

[0643] 由连续双螺杆湿法制粒工艺形成片剂

[0644] 设备/工艺

[0645] 设备

[0646] 制粒机:ConsiGma或Leistritz或Thermo Fisher双螺杆制粒机。

[0647] 过筛/称重

[0648] 可在称取之前或之后对化合物1和赋形剂过筛。可能的筛号为20目、40目或60目。化合物1可与赋形剂中的一种或多种预混以简化过筛。

[0649] 共混

[0650] 化合物1和赋形剂可按不同的顺序加入共混机中。共混可在Turbula共混机、V形壳共混机、料箱共混机(bin blender)或连续共混机中进行。对于分批共混机而言,可将成分共混10分钟,或对于连续共混机而言,可连续共混。

[0651] 制粒操作

[0652] 制粒液-将SLS和粘合剂加入纯化水,并混合直至溶解。适合的比率为2.5%w/w的SLS水溶液和10.0%w/w的PVP K30水溶液。

[0653] 制粒-可将含有化合物1和赋形剂的共混物使用失重式进料机以10kg/h的速率定量加入双螺杆制粒机。可使用蠕动泵以3.5kg/h的速率添加制粒液。制粒机可以400RPM的速度运行。本发明的双螺杆湿法制粒工艺的一个值得注意的优点是使用包含表面活性剂和粘合剂两者的制粒液,以通过增强的可润湿性更好地制粒。在一个实施方案中,表面活性剂为SLS。另一个值得注意的优点在于,由于该工艺是连续的并且在任何时间只加工有限量的材料,因此该工艺可得到很好的控制并产生高质量的产品。

[0654] 研磨

[0655] 在干燥前或干燥后或它们两者的情况下用筛网磨机或锥形磨使颗粒尺寸减小。

[0656] 干燥

[0657] 可将颗粒用真空炉、托盘烘干机、双锥形烘干机或流化床烘干机干燥。

[0658] 共混

[0659] 可将颗粒与颗粒外赋形剂共混。将颗粒用300升料箱共混机共混了60转。

[0660] 压制

[0661] 将压缩共混物用Courtoy Modul P旋转压片机压成片。

[0662] 薄膜包衣

[0663] 将片剂用包衣锅(例如O'Hara Labcoat)包薄膜衣。

[0664] 印刷

[0665] 通过例如Hartnett Delta印刷机将薄膜衣片在片剂的一个或两个表面上印上字母图案。

[0666] 测定法

[0667] 方案1

[0668] 用于检测和测量化合物的 $\Delta F508$ -CFTR增效特性的测定法

[0669] 用于测定化合物的 $\Delta F508$ -CFTR调节性质的膜电位光学测定法

[0670] 本测定法采用荧光电压传感染料以便使用荧光培养板读出器(例如,FLIPR III, Molecular Devices, Inc.)测定膜电位的改变,作为NIH 3T3细胞中功能性 $\Delta F508$ -CFTR增加的读出值。对于该响应的驱动力在于在预先用化合物处理且随后加载电压传感染料后通

过单一液体添加步骤导致的氯离子梯度生成并且结合通道活化。

[0671] 增效剂化合物的鉴定

[0672] 为了鉴定  $\Delta$ F508-CFTR的增效剂,开发了双重添加HTS测定方式。这种HTS测定法采用荧光电压传感染料以便测定FLIPR III上的膜电位,作为温度纠正的  $\Delta$ F508 CFTR NIH 3T3细胞中门控(电导)  $\Delta$ F508CFTR增加的测量值。对于该响应的驱动力在于在预先用增效剂化合物(或DMSO媒介物对照)处理且随后加载再分布染料后采用荧光培养板读出器例如FLIPR III的单一液体添加步骤中的Cl<sup>-</sup>离子并且结合使用福司柯林的通道活化。

[0673] 溶液

[0674] 温溶液#1:(单位mM)NaCl 160、KCl 4.5、CaCl<sub>2</sub> 2、MgCl<sub>2</sub> 1、HEPES10,用NaOH调至pH 7.4。

[0675] 不含氯化物的温溶液:温溶液#1(上述)中的氯化物盐被葡糖酸盐代替。

[0676] 细胞培养

[0677] 将稳定表达  $\Delta$ F508-CFTR的NIH3T3小鼠成纤维细胞用于膜电位的光学测量。将细胞维持在37°C、5%CO<sub>2</sub>和90%湿度下的175cm<sup>2</sup>培养烧瓶中的达尔伯克氏(Dulbecco)改良伊格尔(Eagle)培养基中,该培养基补充了2mM谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、 $\beta$ -ME、1X青霉素/链霉素和25mM HEPES。对于所有光学测定,将细胞以~20,000/孔接种在384-孔基质胶-包被的培养板上并且在37°C培养2hrs,然后在27°C培养24hrs,用于增效剂测定。对于纠正测定,将细胞在27°C或37°C与和与化合物一起温育16-24小时。

[0678] 用于测定化合物的  $\Delta$ F508-CFTR调节性质的电生理学测定法。

[0679] Ussing室测定

[0680] 对表达  $\Delta$ F508-CFTR的极化上皮细胞进行Ussing室实验,以进一步表征在光学测定法中鉴定的  $\Delta$ F508-CFTR增效剂或诱导剂。从如上所述培养的支气管组织中分离非-CF和CF气道上皮(Galietta、L.J.V.,Lantero,S.,Gazzolo,A.,Sacco,O.,Romano,L.,Rossi,G.A.,&Zegarra-Moran,O.(1998) *In Vitro Cell.Dev.Biol.*34,478-481)并且置于用NIH3T3-条件培养基预包被的**Costar**<sup>®</sup>Snapwell<sup>™</sup>过滤器上。4天后,除去顶端培养基,使细胞生长在空气液体界面上>14天,然后使用。这产生完全分化的柱状细胞单层,其具纤毛,以气道上皮的特征为特征。从不具有任何已知肺病的非吸烟者中分离非-CF HBE。从对于  $\Delta$ F508纯合的患者中分离CF-HBE。

[0681] 将生长在**Costar**<sup>®</sup>Snapwell<sup>™</sup>细胞培养插管上的HBE固定在Ussing室内(加利福尼亚州圣迭戈生理仪器公司(Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA)),并利用电压钳系统(爱荷华州爱荷华大学生物工程系(Department of Bioengineering, University of Iowa, IA))测定基底外侧至顶端Cl<sup>-</sup>梯度(I<sub>sc</sub>)存在下的经上皮电阻和短路电流。简而言之,在37°C在电压钳系统记录条件下(V<sub>保持</sub>=0mV)检查HBE。基底外侧溶液包含(mM单位)145NaCl、0.83K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3.3KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.2MgCl<sub>2</sub>、1.2CaCl<sub>2</sub>、10葡萄糖、10HEPES(用NaOH将pH调整至7.35),且顶端溶液包含(mM单位)145葡萄糖酸钠、1.2MgCl<sub>2</sub>、1.2CaCl<sub>2</sub>、10葡萄糖、10HEPES(用NaOH将pH调整至7.35)。

[0682] 增效剂化合物的鉴定

[0683] 典型的方案采用基底外侧至顶端膜的Cl<sup>-</sup>浓度梯度。为了建立这种梯度,在基底外侧膜上使用正常的套环,而顶端NaCl被等摩尔葡糖酸钠代替(用NaOH滴定至pH7.4),以得到

跨上皮的大Cl<sup>-</sup>浓度梯度。添加福司柯林(10μM)和所有供试化合物至细胞培养插管的顶端侧。将推定ΔF508-CFTR增效剂的性能与已知增效剂染料木黄酮的效能进行比较。

#### [0684] 膜片钳记录

[0685] 采用如上所述的穿孔膜记录构象监测ΔF508-NIH3T3细胞中的总Cl<sup>-</sup>电流(Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) *J. Neurosci. Methods* 37, 15-26)。在22℃采用Axopatch 200B膜片钳放大器(加利福尼亚州福斯特城Axon仪器公司(Axon Instruments Inc., Foster City, CA))进行电压箝记录。移液管溶液包含(单位mM)150N-甲基-D-葡萄糖胺(NMDG)-Cl、2MgCl<sub>2</sub>、2CaCl<sub>2</sub>、10EGTA、10HEPES和240μg/mL两性霉素-B(用HCl将pH调整至7.35)。胞外培养基包含(单位mM)150NMDG-Cl、2MgCl<sub>2</sub>、2CaCl<sub>2</sub>、10HEPES(用HCl将pH调整至7.35)。采用配有Digidata 1320A/D界面结合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10μM福司柯林和20μM染料木黄酮,并且每隔30秒监测一次电流-电压关系。

#### [0686] 增效剂化合物的鉴定

[0687] 还采用穿孔的-斑片-记录技术研究了ΔF508-CFTR增效剂在增加稳定表达ΔF508-CFTR的NIH3T3细胞中宏观ΔF508-CFTR Cl<sup>-</sup>电流(I<sub>ΔF508</sub>)的能力。从光学测定法中鉴定的增效剂引起I<sub>ΔF508</sub>的剂量依赖性增加,其功效和效能与在光学测定法中观察到的功效和效能类似。在检验的所有细胞中,施加增效剂之前和过程中的逆转电位约为-30mV,其为计算的E<sub>Cl</sub>(-28mV)。

#### [0688] 细胞培养

[0689] 将稳定表达ΔF508-CFTR的NIH3T3小鼠成纤维细胞用于全细胞记录。将细胞维持在37℃、5%CO<sub>2</sub>和90%湿度下的175cm<sup>2</sup>培养烧瓶中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中,该培养基补充了2mM谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、β-ME、1X青霉素/链霉素和25mM HEPES。对于全细胞记录,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24-48hrs,然后用于测试增效剂的活性;并且与或不与纠正化合物一起在37℃温育,以测定纠正剂活性。

#### [0690] 单通道记录

[0691] 如上所述(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)使用切下的膜内侧翻外膜片、应用Axopatch 200B膜片钳放大器(Axon仪器公司)观察在NIH3T3细胞中表达的wt-CFTR和温度校正的ΔF508-CFTR的门控活性。移液管包含(单位mM):150NMDG、150天冬氨酸、5CaCl<sub>2</sub>、2MgCl<sub>2</sub>和10HEPES(用Tris碱将pH调整至7.35)。温浴液包含(单位mM):150NMDG-Cl、2MgCl<sub>2</sub>、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-依赖的蛋白激酶的催化亚单位(PKA; Promega Corp. Madison, WI)和10mM NaF活化wt-和ΔF508-CFTR,以抑制蛋白磷酸酶,这防止电流衰减。将微电极维持在80mV。从包括≤2个活性通道的膜片分析通道活性。同时开放的最大值决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,在100Hz下“离线”过滤从120s的ΔF508-CFTR活性记录的数据,然后用于构建所有点的振幅直方图,该直方图用BioPatch分析软件(法国比奥罗杰公司(Bio-Logic Comp. France))通过多高斯函数拟合。通过

120s的通道活性确定总微观电流和开放概率( $P_o$ )。使用Bio-Patch软件或由关系式 $P_o = I/i(N)$ 测定 $P_o$ ，其中 $I$  = 平均电流， $i$  = 单通道电流振幅，并且 $N$  = 膜片中活性通道的数量。

#### [0692] 细胞培养

[0693] 将稳定表达 $\Delta F508$ -CFTR的NIH3T3小鼠成纤维细胞用于切下的膜片钳记录。将细胞维持在37°C、5%CO<sub>2</sub>和90%湿度下的175cm<sup>2</sup>培养烧瓶中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中，该培养基补充了2mM谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、 $\beta$ -ME、1X青霉素/链霉素和25mM HEPES。对于单通道记录，将2,500-5,000个细胞接种在聚-L-赖氨酸-包被的玻璃盖玻片上并且在27°C培养24-48hrs，然后使用。

#### [0694] 方案2

[0695] 用于检测和测量化合物的 $\Delta F508$ -CFTR纠正特性的测定法

[0696] 用于测定化合物的 $\Delta F508$ -CFTR调节特性的膜电位光学法。

[0697] 光学膜电位测定法采用Gonzalez和Tsien所述的电压敏感性FRET传感器(参见Gonzalez, J.E. and R.Y.Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells" *Biophys J* 69 (4):1272-80 (Gonzalez, J.E. 和 R.Y.Tsien, 1995年, "在单细胞中通过荧光共振能量转移感测电压", 《生物物理杂志》, 第69期第4卷, 第1272-1280页), 以及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 (Gonzalez, J.E. 和 R.Y.Tsien, 1997年, "使用荧光共振能量转移的细胞膜电位的改进指标", 《化学与生物学》, 第4期第4卷, 第269-277页)) 连同测量荧光变化的仪器, 例如电压/离子探针读数器(VIPR) (参见Gonzalez, J.E., K.Oades, 等人 (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screen ion-channel targets" *Drug Discov Today* 4 (9):431-439 (Gonzalez, J.E., K.Oades等人, 1999年, "基于细胞的测定法和筛选离子通道靶标的仪器", 《Drug Discov. Today》, 第4期第9卷, 第431-439页))。

[0698] 这些电压敏感性测定法基于膜溶性、电压敏感性染料DiSBAC<sub>2</sub>(3)与荧光磷脂CC2-DMPE之间的荧光共振能量转移(FRET)的变化, 所述荧光磷脂连接到质膜的外部小叶并充当FRET供体。膜电位( $V_m$ )的变化导致带负电的DiSBAC<sub>2</sub>(3)跨越质膜重新分布, 并且从CC2-DMPE转移的能量的量相应地改变。荧光发射的变化用VIPR<sup>TM</sup>II加以监测, 它是一种集成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。

#### [0699] 纠正化合物的鉴定

[0700] 为了鉴定纠正与 $\Delta F508$ -CFTR相关的运输缺陷的小分子, 开发了单一添加HTS测定方式。在37°C下将细胞在存在或不存在(阴性对照)供试化合物的情况下在不含血清的培养基中温育16小时。作为阳性对照, 将在384孔板中铺板的细胞在27°C下温育16小时至"温度-校正" $\Delta F508$ -CFTR。然后用Krebs Ringers溶液将细胞冲洗3次并加载电压敏感性染料。为了活化 $\Delta F508$ -CFTR, 将10 $\mu$ M福司柯林和CFTR增效剂染料木黄酮(20 $\mu$ M)与不含Cl<sup>-</sup>的培养基加到各孔中。添加不含Cl<sup>-</sup>的培养基促进了响应于 $\Delta F508$ -CFTR活化的Cl<sup>-</sup>外流, 并使用基于FRET的电压传感器染料以光学方式监测所产生的膜去极化。

#### [0701] 增效剂化合物的鉴定

[0702] 为了鉴定 $\Delta F508$ -CFTR的增效剂, 开发了双重添加HTS测定方式。在第一次添加过程中, 在存在或不存在供试化合物的情况下向各孔中添加不含Cl<sup>-</sup>的培养基。22秒后, 第二

次添加不含Cl<sup>-</sup>的含2-10μM福司柯林的培养基以活化ΔF508-CFTR。两次添加后的胞外Cl<sup>-</sup>浓度为28mM,这促进了响应于ΔF508-CFTR活化的Cl<sup>-</sup>外流,并使用基于FRET的电压传感器染料以光学方式监测所产生的膜去极化。

[0703] 溶液

[0704] 温溶液#1:(单位mM) NaCl 160、KCl 4.5、CaCl<sub>2</sub> 2、MgCl<sub>2</sub> 1、HEPES 10,用NaOH调至pH 7.4。

[0705] 不含氯化物的温溶液:温溶液#1(上述)中的氯化物盐被葡糖酸盐代替。

[0706] CC2-DMPE:制备成10mM的DMSO储备溶液并储存在-20℃下。

[0707] DiSBAC<sub>2</sub>(3):制备成10mM的DMSO储备溶液并储存在-20℃下。

[0708] 细胞培养

[0709] 将稳定表达ΔF508-CFTR的NIH3T3小鼠成纤维细胞用于膜电位的光学测量。将细胞维持在37℃、5%CO<sub>2</sub>和90%湿度下的175cm<sup>2</sup>培养烧瓶中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中,该培养基补充了2mM谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、β-ME、1X青霉素/链霉素和25mM HEPES。对于所有光学测定,均以30,000个/孔将细胞接种在384孔基质胶包被的板上并在37℃下培养2hrs,然后在27℃下培养24hrs,以用于增效剂测定。对于纠正测定,将细胞在27℃或37℃下与和不与化合物一起培养16-24小时。

[0710] 用于测定化合物的ΔF508-CFTR调节性质的电生理测定法

[0711] Ussing室测定

[0712] 对表达ΔF508-CFTR的极化上皮细胞进行Using室实验,以进一步表征在光学测定法中鉴定的ΔF508-CFTR增效剂或诱导剂。将生长在Costar Snapwell细胞培养插管上的FRT<sup>ΔF508-CFTR</sup>上皮细胞固定在Ussing室内(加利福利亚州圣迭戈生理仪器公司(Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA)),并利用电压钳系统(爱荷华州爱荷华大学生物工程系(Department of Bioengineering, University of Iowa, IA)和加利福利亚州圣迭戈生理仪器公司)连续使单层短路。通过施加2mV脉冲测量跨上皮电阻。在这些条件下,FRT上皮表现出4KΩ/cm<sup>2</sup>或更高的电阻。将溶液维持在27℃下,并鼓入空气。利用无细胞插管校正电极偏移电位和流体电阻。在这些条件下,电流反映Cl<sup>-</sup>通过在顶端膜中所表达的ΔF508-CFTR的流动。利用MP100A-CE界面和AcqKnowledge软件(v3.2.6;加利福尼亚州圣巴巴拉BIOPAC系统公司(BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA))以数字方式获取I<sub>sc</sub>。

[0713] 纠正化合物的鉴定

[0714] 典型的方案采用基底外侧至顶端膜的Cl<sup>-</sup>浓度梯度。为了建立这种梯度,在基底外侧膜上使用正常的套环,而顶端NaCl被等摩尔葡糖酸钠代替(用NaOH滴定至pH7.4),以得到跨上皮的大Cl<sup>-</sup>浓度梯度。所有实验均用完整单层进行。为了完全活化ΔF508-CFTR,施加福司柯林(10μM)和PDE抑制剂IBMX(100μM),然后添加CFTR增效剂染料木黄酮(50μM)。

[0715] 正如在其它细胞类型中所观察到的,在低温下温育稳定表达ΔF508-CFTR的FRT细胞会增加CFTR在质膜中的功能密度。为了测定纠正化合物的活性,将细胞与10μM供试化合物在37℃下温育24小时,随后洗涤3次,然后记录。将cAMP-和染料木黄酮-介导的化合物处理细胞中的I<sub>sc</sub>归一化到27℃和37℃对照,并以百分比活性表示。与37℃对照相比,细胞用纠正化合物预温育显著增加了cAMP-和染料木黄酮-介导的I<sub>sc</sub>。

[0716] 增效剂化合物的鉴定

[0717] 典型的方案采用基底外侧至顶端膜的Cl<sup>-</sup>浓度梯度。为了建立这种梯度,在基底外侧膜上使用正常的套环并用制霉菌素(360μg/mL)透化,而顶端NaCl被等摩尔葡萄糖酸钠代替(用NaOH滴定至pH7.4),以得到跨越上皮的大Cl<sup>-</sup>浓度梯度。所有实验均在制霉菌素透化后30min进行。向细胞培养插管两侧施加福司柯林(10μM)和所有供试化合物。将推定的ΔF508-CFTR增效剂的效能与已知增效剂染料木黄酮的效能进行比较。

#### [0718] 溶液

[0719] 基底外侧溶液(单位mM):NaCl(135)、CaCl<sub>2</sub>(1.2)、MgCl<sub>2</sub>(1.2)、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2.4)、KHPO<sub>4</sub>(0.6)、N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)(10)和右旋糖(10)。用NaOH将该溶液滴定至pH7.4。

[0720] 顶端溶液(单位mM):与基底外侧溶液相同,但NaCl被葡萄糖酸钠(135)替代。

#### [0721] 细胞培养

[0722] 将表达ΔF508-CFTR(FRT<sup>ΔF508-CFTR</sup>)的Fisher大鼠上皮(FRT)细胞用于从我们的光学测定法鉴定的推定ΔF508-CFTR调节剂的Ussing室实验。在Costar Snapwell细胞培养插管上培养细胞并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下在Coon's改良Ham's F-12培养基中培养五天,该培养基补充了5%胎牛血清、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素。在用于表征化合物的增效剂活性前,将细胞在27°C温育16-48h以纠正ΔF508-CFTR。为了测定纠正化合物的活性,将细胞在27°C或37°C与和与化合物一起温育24小时。

#### [0723] 全细胞记录

[0724] 使用穿孔的膜片全细胞记录监测温度和供试化合物纠正的稳定表达ΔF508-CFTR的NIH3T3细胞中的宏观ΔF508-CFTR电流(I<sub>ΔF508</sub>)。简而言之,在室温下用Axopatch 200B膜片钳放大器(加利福尼亚州福斯特城Axon仪器公司(Axon Instruments Inc., Foster City, CA))进行I<sub>ΔF508</sub>的电压钳记录。全部记录均在10kHz采样频率下获取并在1kHz下低通滤波。微电极在充满胞内溶液时具有5-6MΩ的电阻。在这些记录条件下,在室温下计算的Cl<sup>-</sup>逆转电位(E<sub>Cl</sub>)为-28mV。全部记录均具有>20GΩ的密封电阻和<15MΩ的串联电阻。使用配备了Digidata 1320A/D界面与Clampex 8(Axon仪器公司)的PC进行脉冲发生、数据采集和分析。温浴液包含<250μL的盐水并使用重力驱动的灌注系统以2mL/min的速率连续灌注。

#### [0725] 纠正化合物的鉴定

[0726] 为了测定纠正化合物增加质膜中功能性ΔF508-CFTR密度的活性,我们利用上述开孔膜片记录技术测量用纠正化合物处理24小时后的电流密度。为了完全活化ΔF508-CFTR,向细胞加入10μM福司柯林和20μM染料木黄酮。在我们的记录条件下,在27°C下温育24小时后的电流密度高于在37°C下温育24小时后的观测值。这些结果与低温温育对质膜中ΔF508-CFTR密度的已知影响是一致的。为了测定纠正化合物对CFTR电流密度的影响,将细胞与10μM供试化合物在37°C下温育24小时,与27°C和37°C对照比较电流密度(活性%)。在记录之前,将细胞用细胞外记录介质洗涤3次,以除去任何剩余的供试化合物。与37°C对照相比,用10μM纠正化合物预温育显著增加了cAMP-和染料木黄酮-依赖性电流。

#### [0727] 增效剂化合物的鉴定

[0728] 还用穿孔膜片记录技术研究了ΔF508-CFTR增效剂增加稳定表达ΔF508-CFTR的NIH3T3细胞中宏观ΔF508-CFTR Cl<sup>-</sup>电流(I<sub>ΔF508</sub>)的能力。从光学测定法中鉴定的增效剂引起了与在光学测定法中观察到的类似效力和效能的I<sub>ΔF508</sub>剂量依赖性增加。在所有研究的

细胞中,施加增效剂之前和过程中的逆转电位为约-30mV,它是计算的 $E_{Cl}$  (-28mV)。

[0729] 溶液

[0730] 胞内溶液(单位mM):天冬氨酸铯(90)、CsCl(50)、MgCl<sub>2</sub>(1)、HEPES(10)和240μg/mL两性霉素-B(用CsOH将pH调至7.35)。

[0731] 胞外溶液(单位mM):N-甲基-D-葡糖胺(NMDG)-Cl(150)、MgCl<sub>2</sub>(2)、CaCl<sub>2</sub>(2)、HEPES(10)(用HCl将pH调至7.35)。

[0732] 细胞培养

[0733] 将稳定表达ΔF508-CFTR的NIH3T3小鼠成纤维细胞用于全细胞记录。将细胞维持在37℃、5%CO<sub>2</sub>和90%湿度下的175cm<sup>2</sup>培养烧瓶中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中,该培养基补充了2mM谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、β-ME、1X青霉素/链霉素和25mM HEPES。对于全细胞记录,将2,500-5,000个细胞接种在聚-L-赖氨酸包被的盖玻片上并在27℃下培养24-48h,然后用于测试增效剂的活性;并且与或不与纠正化合物一起在37℃温育,以便测量纠正剂的活性。

[0734] 单通道记录

[0735] 使用切下的膜内侧翻外膜片观察在NIH3T3细胞中稳定表达的温度校正的ΔF508-CFTR的单通道活性以及增效剂化合物的活性。简而言之,在室温下用Axopatch 200B膜片钳放大器(Axon仪器公司)进行单通道活性的电压钳记录。全部记录均在10kHz采样频率下获取并在400Hz下低通过滤。膜片微电极由Corning Kovar Sealing#7052玻璃(佛罗里达州萨拉索塔世界精密仪器公司(World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL))制成并在充满胞外溶液时具有5-8MΩ的电阻。在切下后通过添加1mM Mg-ATP和75nM cAMP依赖性蛋白激酶催化亚单位(PKA;威斯康星州麦迪逊普洛麦格公司(Promega Corp. Madison, WI))活化了ΔF508-CFTR。在通道活性稳定后,使用重力驱动微量灌注系统灌注膜片。使内流接近膜片,从而导致在1-2s内完全交换溶液。为了维持快速灌注过程中的ΔF508-CFTR活性,将非特异性磷酸酶抑制剂F<sup>-</sup>(10mM NaF)加入温浴液中。在这些记录条件下,通道活性在整个膜片记录期间保持恒定(至多60min)。从胞内溶液运动至胞外溶液(阴离子以相反方向运动)的正电荷所产生的电流显示为正电流。将微电极电位( $V_p$ )维持在80mV。

[0736] 从包括≤2个活性通道的膜片分析通道活性。同时开放的最大值决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,在100Hz下“离线”过滤从120s的ΔF508-CFTR活性记录的数据,然后用于构建所有点的振幅直方图,该直方图用Bio-Patch分析软件(法国比奥罗杰公司(Bio-Logic Comp. France))通过多高斯函数拟合。通过120s的通道活性确定总微观电流和开放概率( $P_o$ )。使用Bio-Patch软件或由关系式 $P_o = I/i(N)$ 测定 $P_o$ ,其中 $I$ =平均电流, $i$ =单通道电流振幅,并且 $N$ =膜片中活性通道的数量。

[0737] 溶液

[0738] 胞外溶液(单位mM):NMDG(150)、天冬氨酸(150)、CaCl<sub>2</sub>(5)、MgCl<sub>2</sub>(2)和HEPES(10)(用Tris碱将pH调至7.35)。

[0739] 胞内溶液(单位mM):NMDG-Cl(150)、MgCl<sub>2</sub>(2)、EGTA(5)、TES(10)和Tris碱(14)(用HCl将pH调至7.35)。

[0740] 细胞培养

[0741] 将稳定表达ΔF508-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℃、5%CO<sub>2</sub>和90%湿度下的175cm<sup>2</sup>培养烧瓶中的达尔伯克氏改良伊格尔培养基中,该培养基补充了2mM谷氨酰胺、10%胎牛血清、1X NEAA、β-ME、1X青霉素/链霉素和25mM HEPES。对于单通道记录,将2,500-5,000个细胞接种在聚-L-赖氨酸包被的盖玻片上并在27℃下培养24-48h后使用。

[0742] 本发明的化合物1和化合物2用作CFTR活性增效剂或诱导剂。下表5示例化合物1和化合物2的EC<sub>50</sub>和相对效能。在下表5中,如下含义适用。EC<sub>50</sub>:“+++”是指<10μM;“++”是指10μM-25μM;“+”是指25μM-60μM。%效能:“+”是指<25%;“++”是指25%-100%;“+++”是指>100%。

[0743] 表5.

化合物 编号	EC <sub>50</sub> (μM)	%活性
1	+++	+++
2	+++	++

[0745] 其它实施方案

[0746] 本公开中提及的所有出版物和专利均以引用方式并入本文,达到如同各个出版物或专利申请具体且单独地表明以引用方式并入的相同程度。以引用方式并入的任何专利或出版物中的术语的含义与本公开中所用的术语的含义冲突时,旨在以本公开中的术语的含义为准。此外,前述讨论公开和描述的仅仅是本发明的示例性实施方案。本领域的技术人员将容易从这些讨论中以及从附图和权利要求中认识到:在不背离如下权利要求书中所定义的本发明的精神和范围的情况下可以做出各种变化、修改和变更。

Lin (计数)

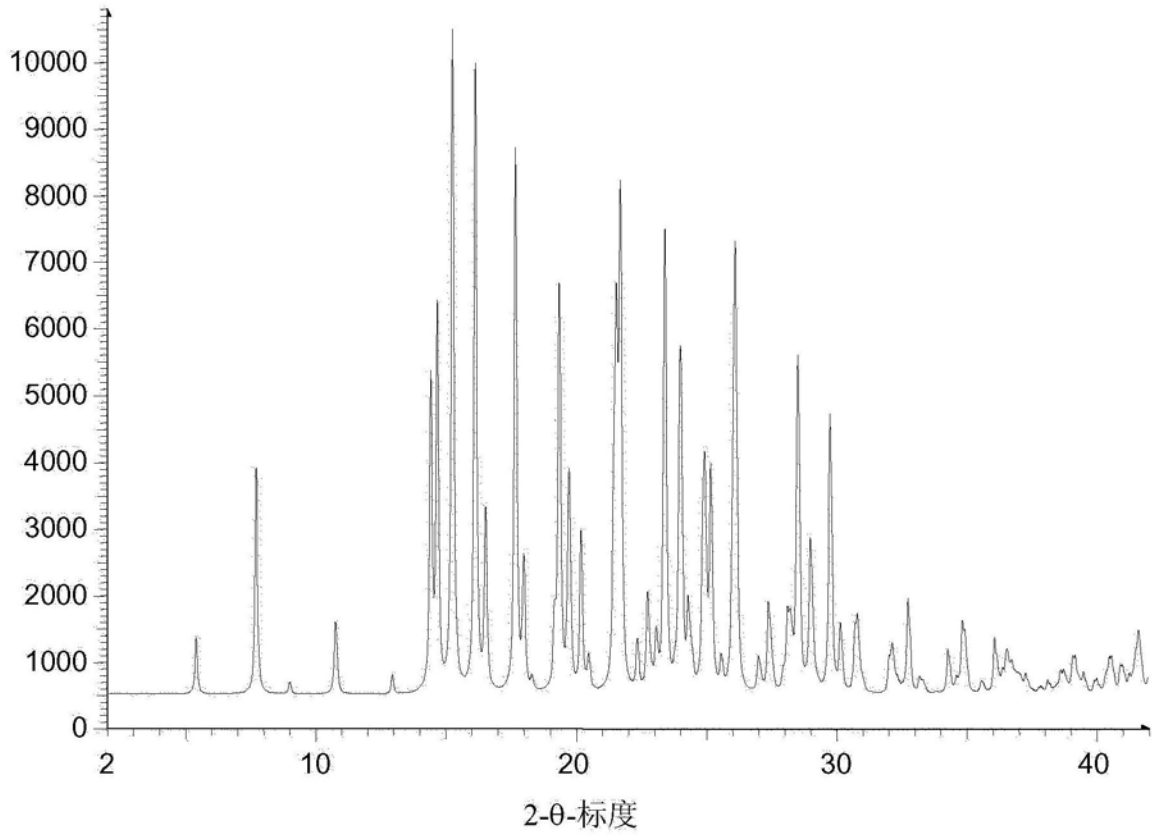


图1

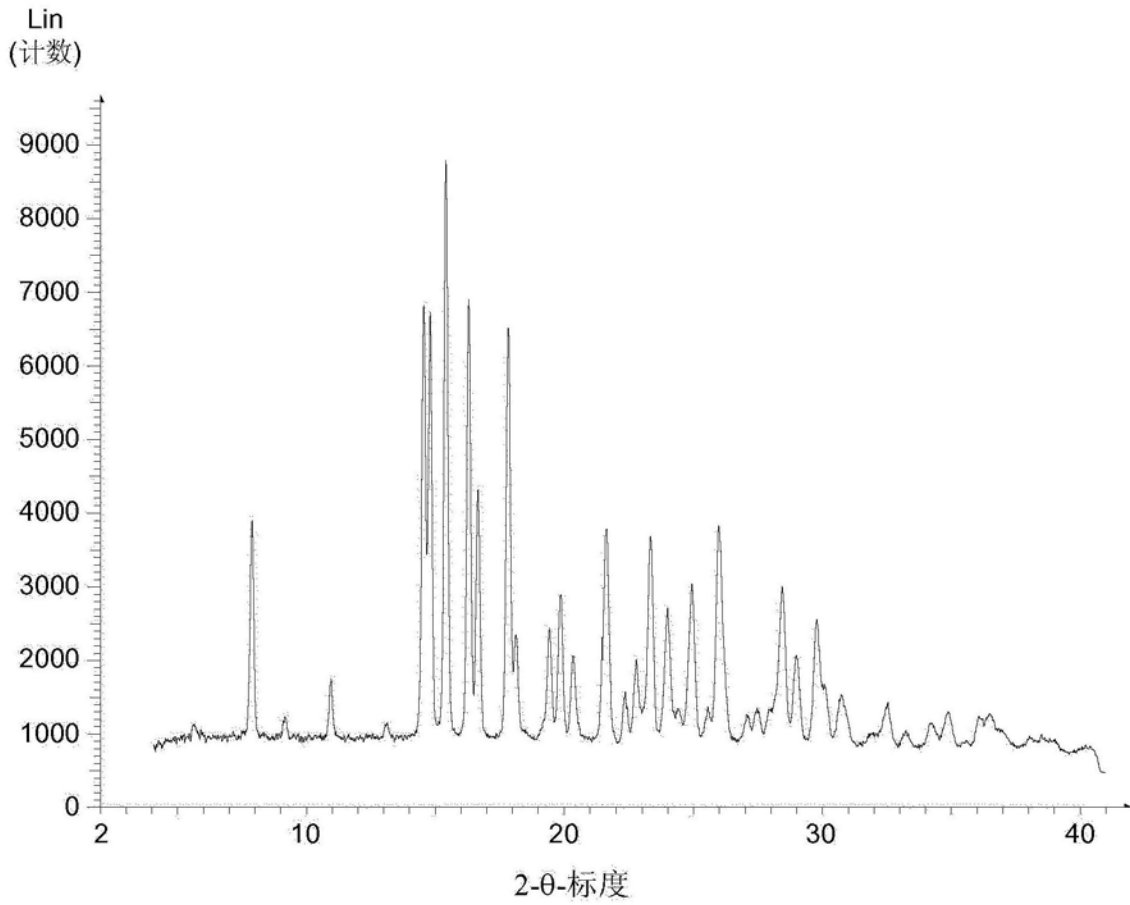


图2

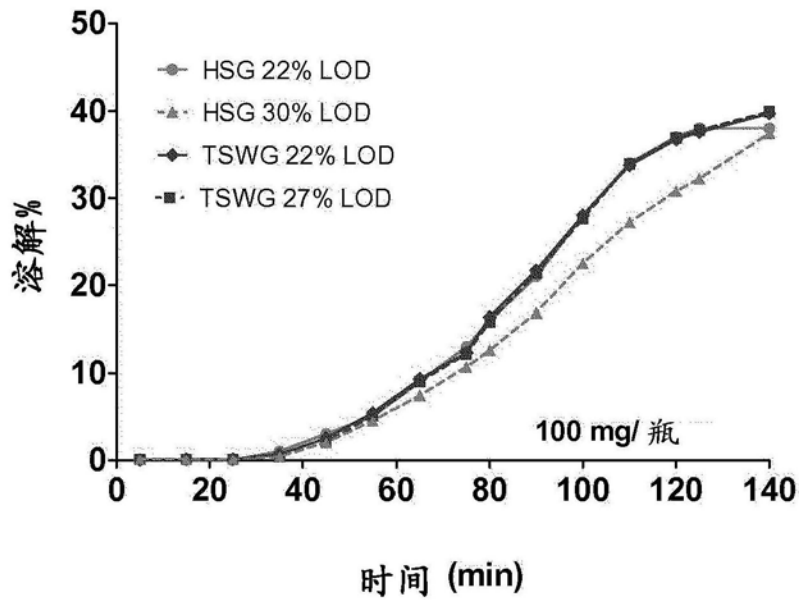


图3

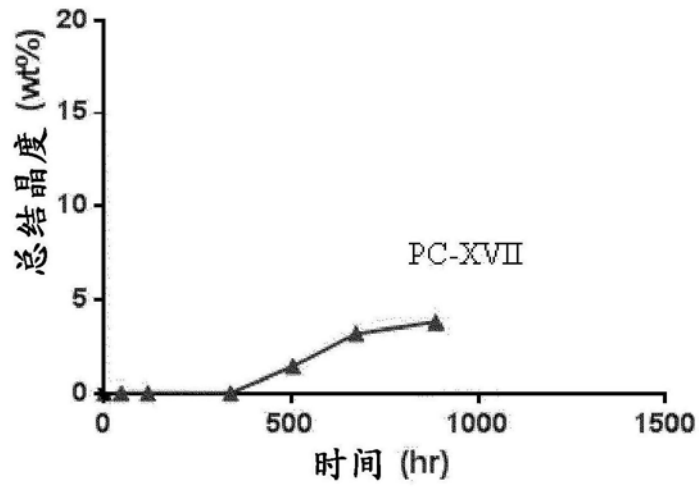


图4

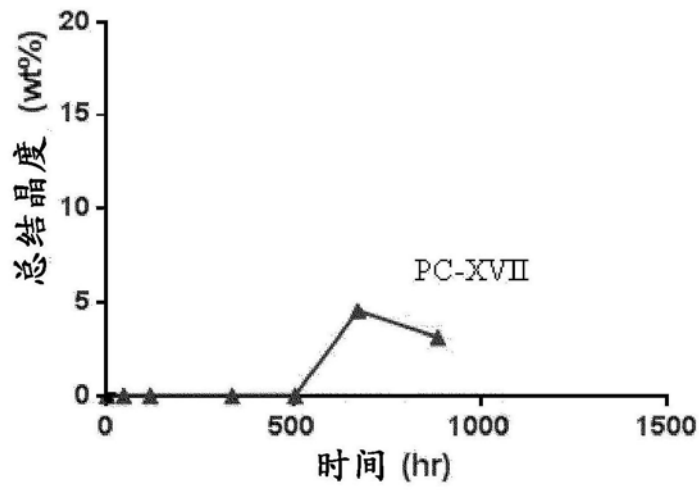


图5

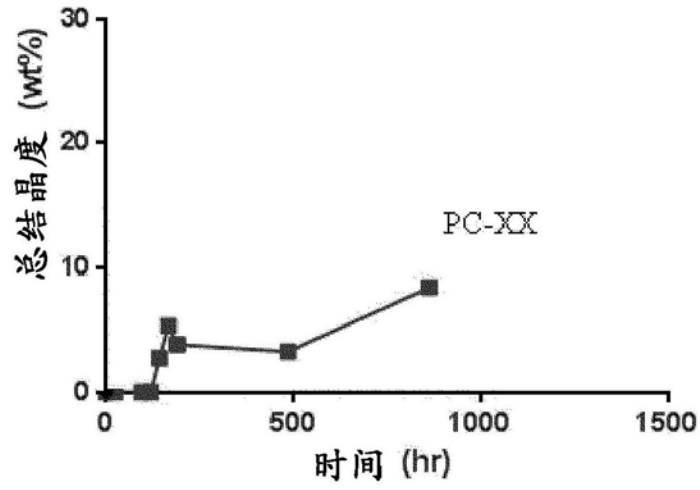


图6

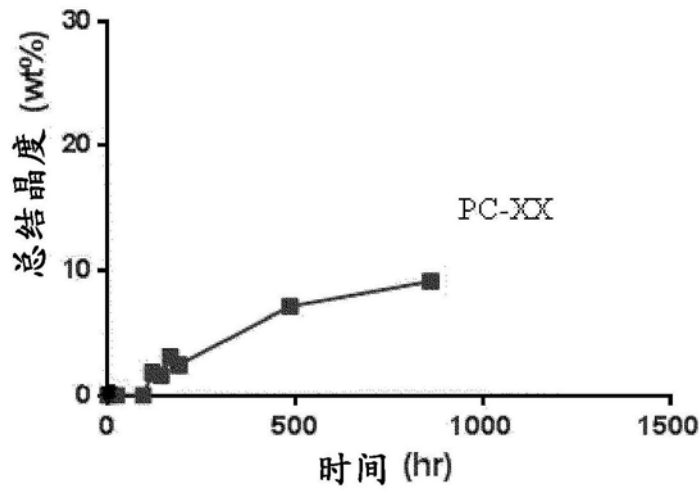


图7

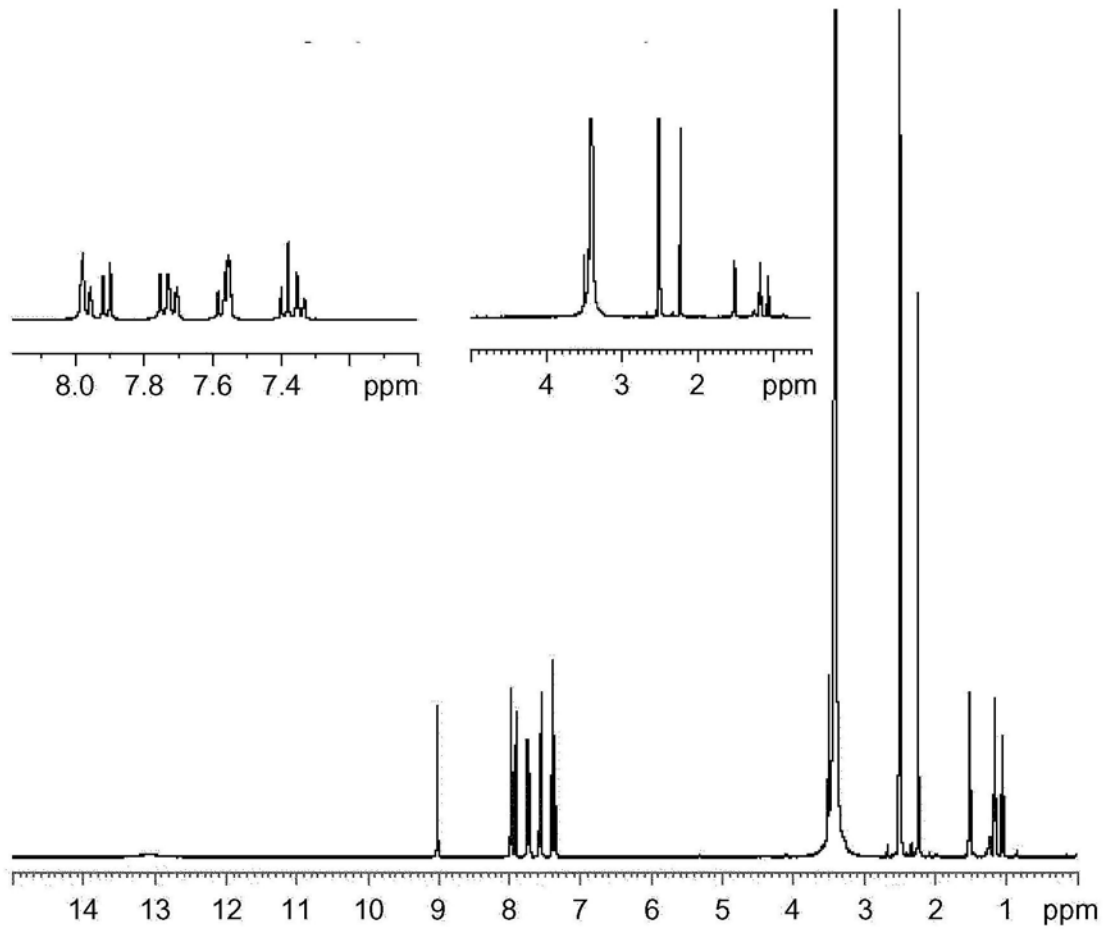


图8

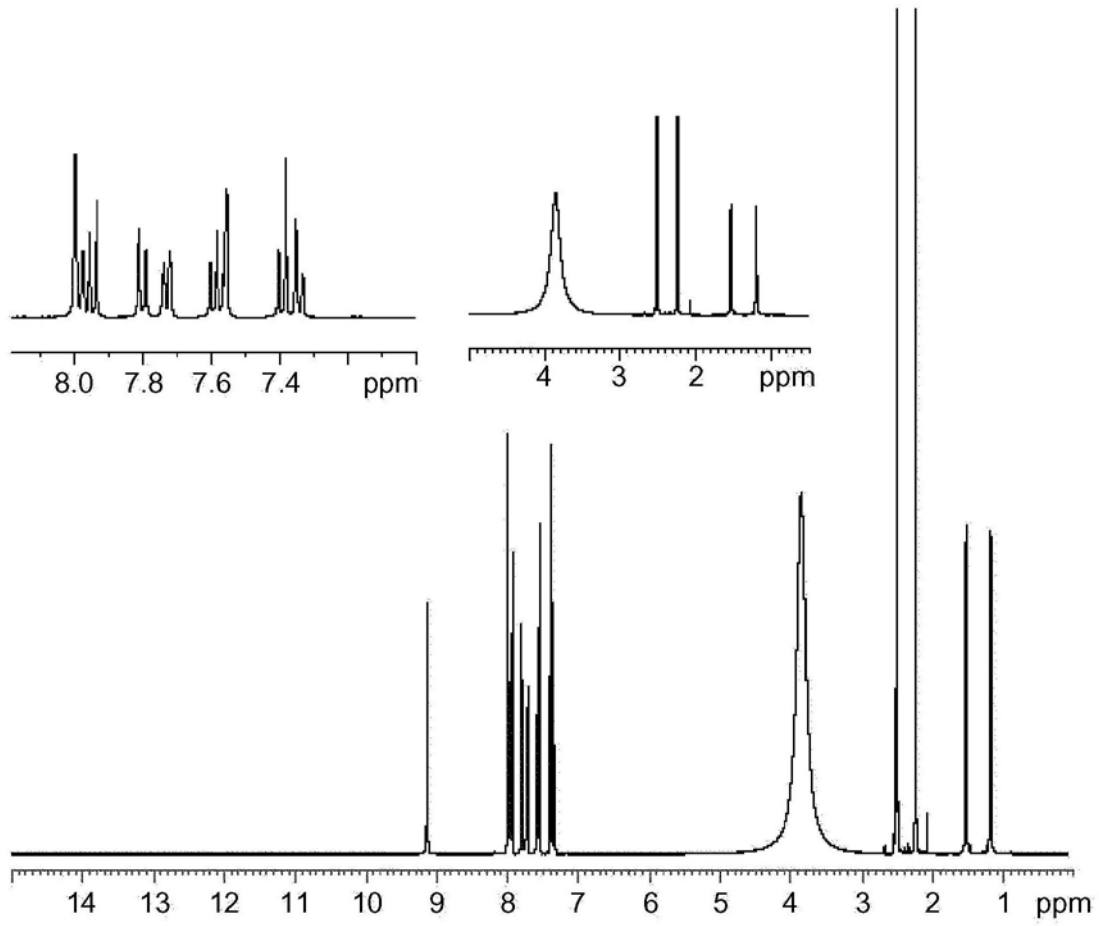


图9

热流 (W/g)

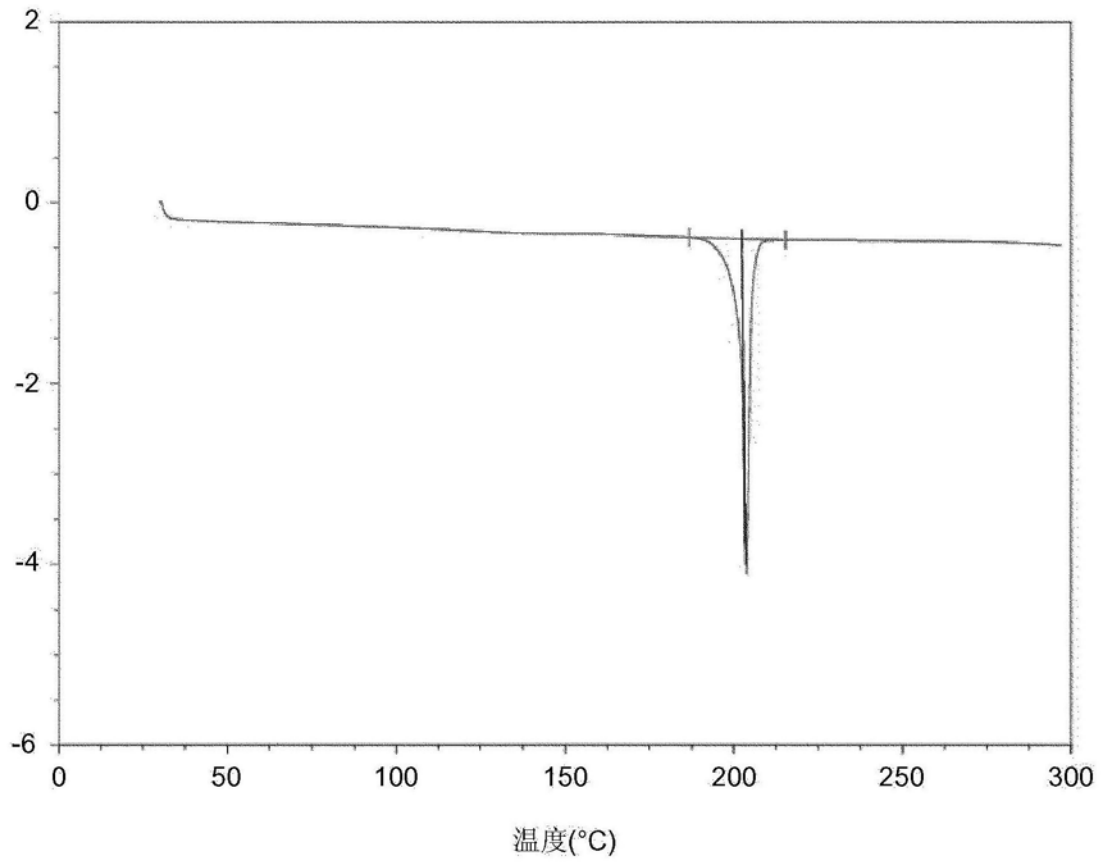


图10

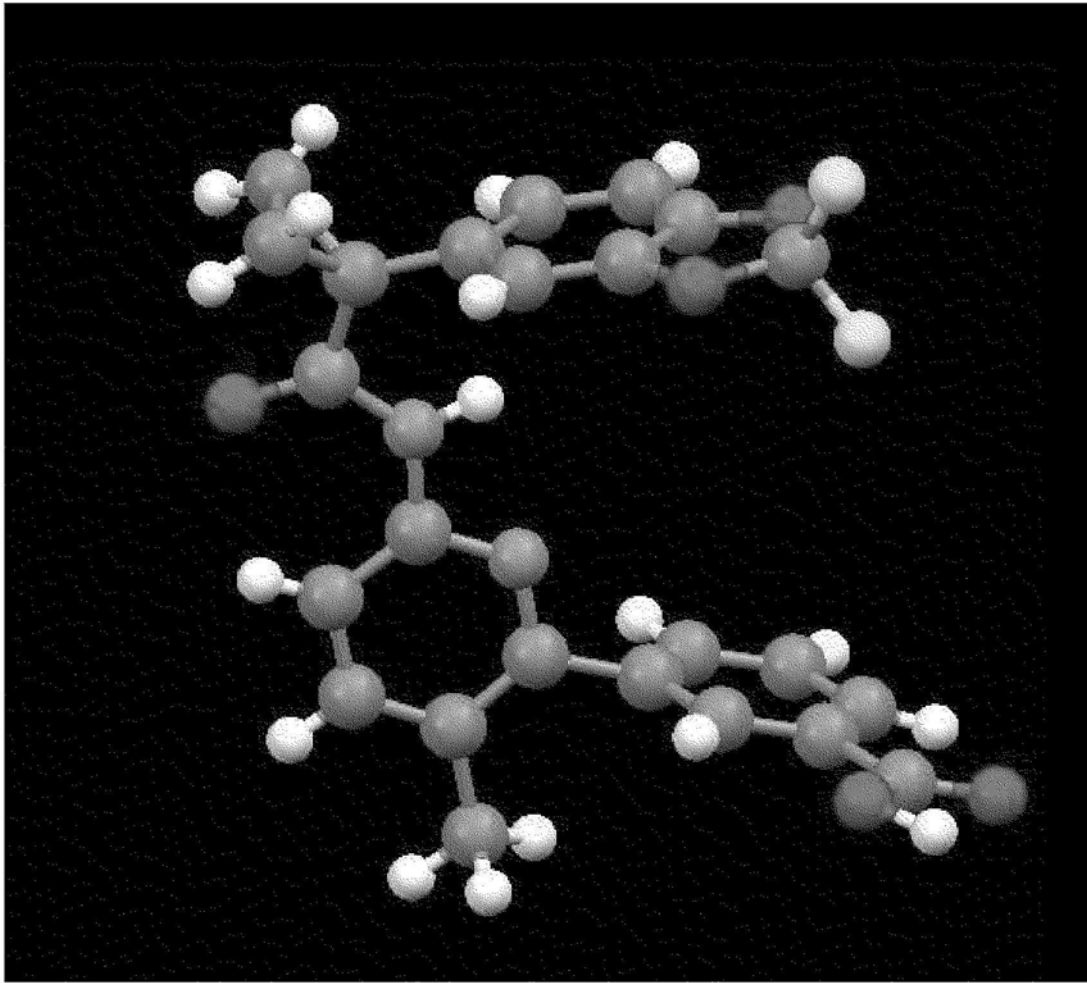


图11