



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0063170  
(43) 공개일자 2015년06월08일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 31/443 (2006.01) A61K 31/36 (2006.01)<br/>A61K 31/44 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 31/443 (2013.01)<br/>A61K 31/192 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7013201(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2008년12월04일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2010-7014875<br/>원출원일자(국제) 2008년12월04일<br/>심사청구일자 2013년12월03일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년05월20일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2008/085456</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/073757<br/>국제공개일자 2009년06월11일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>61/012,162 2007년12월07일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>버텍스 파마슈티칼스 인코포레이티드<br/>미국 매사추세츠주 02210 보스턴 15쓰 플로어 노던 애비뉴 50</p> <p>(72) 발명자<br/>케사바르츠-쇼크리 알리<br/>미국 캘리포니아주 92130 샌 디에고 코트 랑고스티노 4285<br/>장 베일리<br/>미국 캘리포니아주 92130 샌 디에고 쇼어포인트웨이 4505<br/>크라비에즈 마리우시<br/>미국 매사추세츠주 01752 말보로 리틀필드 레인 46</p> <p>(74) 대리인<br/>장훈</p> |
|--|---|

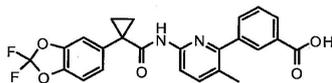
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 고체 형태

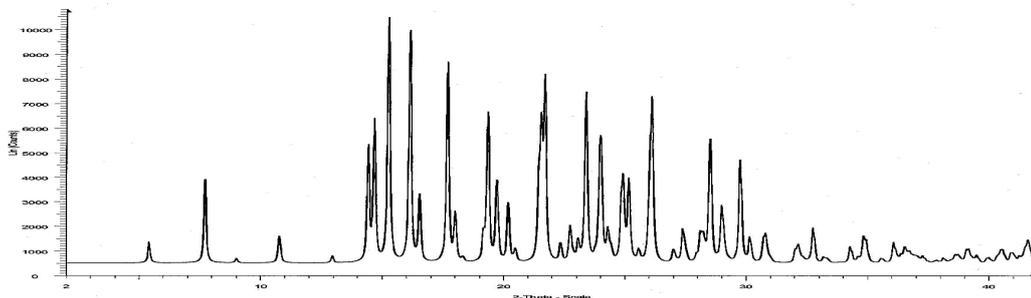
(57) 요약

본 발명은 화학식 I의 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 실질적인 결정질 및 유리 고체 상태 형태(형태 I), 이의 약제학적 조성물 및 이와 관련된 치료 방법에 관한 것이다.

화학식 I



대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 31/36* (2013.01)

*A61K 31/44* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

Cu K 알파 방사선에 의해 얻어진 X선 분말 회절에서 15.2 내지 15.6도, 16.1 내지 16.5도, 14.3 내지 14.7도, 14.6 내지 15.0도, 및 17.6 내지 18.0도에서의 하나 이상의 피크를 특징으로 하는, 형태 I로서 특정된 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산, 약제학적으로 허용되는 담체, 및 N-(5-하이드록시-2,4-디-3급-부틸-페닐)-4-옥소-1H-퀴놀린-3-카복스아미드를 포함하는, 낭포성 섬유증 치료용 약제학적 조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

- [0001] 관련 출원에 관한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 하에 2007년 12월 7일자로 출원된 미국 가특허원 제61/012,162호의 이익을 청구하고, 이는 본원에 전문이 참조로서 인용된다.
- [0003] 본 발명은 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 고체 상태 형태, 예를 들면, 결정 형태, 이의 약제학적 조성물 및 이와 관련된 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

- [0004] CFTR은 흡수 및 분비 상피 세포를 포함한 다양한 세포 유형에서 발현되는 cAMP/ATP-매개된 음이온 채널이고, 이는 막을 가로지르는 음이온 유동을 조절할 뿐만 아니라 다른 이온 채널 및 단백질의 활성을 조절한다. 상피 세포에서, CFTR의 정상적인 작용은 호흡 및 소화 조직을 포함한 신체 전체에 걸친 전해질 수송의 유지에 중요하다. CFTR은 각각 6개의 막통과 나선(transmembrane helix) 및 뉴클레오티드 결합 도메인을 함유하는 막통과 도메인의 반복 염기부분(tandem repeat)으로 이루어진 단백질을 인코딩하는 약 1480개의 아미노산으로 구성된다. 2개의 막통과 도메인은, 채널 활성 및 세포 교환을 조절하는 다중 인산화 부위를 가진 큰 극성 조절(R)-도메인에 의해 연결된다.
- [0005] CFTR을 인코딩하는 유전자는 확인되고 서열화되어 있다[참조: Gregory, R. J. et al.(1990) Nature 347:382-386; Rich, D. P. et al.(1990) Nature 347:358-362; and Riordan, J. R. et al.(1989) Science 245:1066-1073]. 당해 유전자에서 결함은 CFTR에서 변이를 유발하며, 이는 사람에서 가장 흔한 치명적인 유전병인 낭포성 섬유증(cystic fibrosis: CF)을 야기한다. 낭포성 섬유증은 미국에서 매 2,500명의 유아 중 약 1명에게 영향을 미친다. 일반적인 미국 인구 내에서, 10,000,000명 이하의 사람은 명백한 부작용 없이 상기 결함있는 유전자의 단일 복사본(copy)을 가진다. 대조적으로, CF 관련 유전자의 2개의 복사본을 가진 개체는 만성 폐 질환을 포함한 CF의 쇠약화 및 치명적인 효과를 겪는다.
- [0006] 낭포성 섬유증을 가진 환자에서, 호흡기 상피에서 내생적으로 발현된 CFTR의 변이는, 이온 및 유액 수송에서 불균형을 야기하는 감소된 꼭지면 음이온 분비(apical anion secretion)를 야기한다. 그 결과 음이온 수송의 감소는, 폐에서의 증가된 점액 축적 및 미생물 감염의 수반에 기여하고, 이는 결국 CF 환자의 사망을 야기한다. 호흡기 질환 이외에도, CF 환자는 전형적으로 치료되지 않을 경우 사망에 이르는 위장관 문제 및 체장 기능 부전을 겪는다. 또한, 낭포성 섬유증을 가진 남성의 대부분은 불임이고, 낭포성 섬유증을 가진 여성 중에서 출산력이 감소한다. CF 관련 유전자의 두 복사본의 몇몇 효과와 대조적으로, CF 관련 유전자의 단일 복사본을 가진 개체는 콜레라에 및 설사를 야기하는 탈수에 증가된 내성을 나타내고, 이는 아마도 인구 내의 CF 유전자의 상대적으로 높은 빈도를 설명한다.
- [0007] CF 염색체의 CFTR 유전자의 서열 분석으로 변이를 유발하는 다양한 질환을 밝혀냈다[참조: Cutting, G. R. et al.(1990) Nature 346:366-369; Dean, M. et al.(1990) Cell 61:863:870; and Kerem, B-S. et al.(1989) Science 245:1073-1080; Kerem, B-S et al.(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8447-8451]. 현재까지, CF

유전자에 변이를 일으키는 1000개 이상의 질환이 확인되었다[참조: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>]. 가장 우세한 변이는 CFTR 아미노산 서열의 위치 508에서의 페닐알라닌의 결실(deletion)이고, 일반적으로 ΔF508-CFTR로서 언급된다. 당해 변이는 낭포성 섬유증의 경우 약 70%에서 발생하고 중증 질환과 관련된다.

[0008]

ΔF508-CFTR에서 잔기 508의 결실은 초기 단백질이 정확하게 폴딩되는 것을 방지한다. 이로써 변이 단백질은 ER을 나갈 수 없고, 원형질 막을 왕래(trafficking)할 수 없게 된다. 그 결과, 막에 존재하는 채널의 수는, 야생형 CFTR를 발현하는 세포에서 관찰되는 것보다 훨씬 적다. 손상된 왕래 이외에도, 변이는 결합있는 채널 통문(gating)을 야기한다. 함께, 막의 채널의 감소된 수 및 결합있는 통문은, 상피를 가로지르는 감소된 음이온 수송을 야기하고, 이는 결합있는 이온 및 유액 수송을 야기한다[참조: Quinton, P. M.(1990), FASEB J. 4: 2709-2727]. 그러나, 연구는 막에서 ΔF508-CFTR의 감소된 수가, 야생형 CFTR보다 적기는 하지만, 작용함을 보여주었다[참조: Dalemans et al.(1991), Nature Lond. 354:526-528; Denning et al., supra; Pasyk and Foskett(1995), J. Cell. Biochem. 270:12347-50]. ΔF508-CFTR 이외에도, 결합있는 왕래, 합성 및/또는 채널 통문을 야기하는 CFTR에서 변이를 유발하는 다른 질환은 상향 또는 하향 조절되어 음이온 분비를 변경하고 질환 진행 및/또는 중증도를 변형할 수 있다.

[0009]

CFTR은 음이온 이외에도 다양한 분자를 수송함에도 불구하고, 이러한 역할(음이온의 수송)이 상피를 가로지르는 이온 및 물의 중요한 수송 메커니즘에서의 하나의 요소임이 분명하다. 나머지 요소들은 상피  $Na^+$  채널, ENaC,  $Na^+/2Cl^-/K^+$  코-트랜스포터,  $Na^+-K^+$ -ATPase 펌프 및 기저외측 막  $K^+$  채널을 포함하고, 이는 염화물이 세포로 흡수 되도록 한다.

[0010]

이들 요소는 함께 작용하여, 세포 내에서 이의 선택적 발현 및 국소화를 통해 상피를 가로지르는 직접적인 수송을 달성한다. 염화물 흡수는 꼭지면 막 및  $Na^+-K^+$ -ATPase 펌프, 및 세포의 기저외측 표면에 발현된  $Cl^-$  채널에 존재하는 ENaC 및 CFTR의 공동작용하는 활성에 의해 발생한다. 내강으로부터의 염화물 2차 활성 수송은 세포내 염화물의 축적을 야기하고, 이는 그 후 벡터 수송을 야기하는  $Cl^-$  채널을 통해 수동적으로 세포를 떠날 수 있다. 기저외측 표면 및 내강의 CFTR에서  $Na^+/2Cl^-/K^+$  코-트랜스포터,  $Na^+-K^+$ -ATPase 펌프 및 기저외측 막  $K^+$  채널의 배열은 내강 위의 CFTR를 통해 염화물의 분비를 조정한다. 아마도 물은 스스로를 절대 능동적으로 수송하지 않기 때문에, 상피를 가로지르는 물의 유동은 나트륨 및 염화물의 큰 흐름에 의해 유발된 작은 경상피 삼투압 구배에 따라 좌우된다.

[0011]

상기 논의된 바와 같이, ΔF508-CFTR에서 잔기 508의 결실은 초기 단백질이 정확하게 폴딩되는 것을 방지하고, 이는 이의 변이 단백질이 ER을 나가고 원형질 막을 왕래할 수 없도록 하는 것으로 사료된다. 결과적으로, 불충분한 양의 성숙 단백질이 원형질 막에 존재하고 상피 조직 내의 염화물 수송은 뚜렷하게 감소한다. 사실, 이러한 ER 기관에 의한 ABC 트랜스포터의 결합있는 ER 과정의 세포내 현상은, CF 질환 뿐만 아니라 다른 분리되고 유전된 광범위한 질환의 기초가 되는 것으로 보여져 왔다. ER 기관의 제대로 작동할 수 없는 2가지 방식은, 분해를 야기하는 단백질의 ER 배출에 대한 커플링의 소실이거나 또는 이들 결합있는/잘못폴딩된(misfolding) 단백질의 ER 축적이다[참조: Aridor M, et al., Nature Med., 5(7), pp 745-751(1999); Shastry, B.S., et al., Neurochem. International, 43, pp 1-7(2003); Rutishauser, J., et al., Swiss Med Wkly, 132, pp 211-222(2002); Morello, JP et al., TIPS, 21, pp. 466-469(2000); Bross P., et al., Human Mut., 14, pp. 186-198(1999)].

[0012]

염 형태의 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산은 CFTR-매개된 질환, 예를 들면, 낭포성 섬유증의 치료에 유용한 CFTR 활성의 조절제로서 PCT 공보 제WO 2007056341호(상기 공보는 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된다)에 기재되어 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

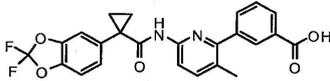
[0013]

그러나, 치료제로서 사용되기에 적합한 약제학적 조성물에 용이하게 사용될 수 있는, 상기 화합물의 안정한 고체 형태가 요구된다.

**과제의 해결 수단**

[0014] 본 발명은 하기 구조를 갖는 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산(이하 "화합물 1")의 고체 형태에 관한 것이다.

[0015] 화합물 1



[0016]

[0017] 화합물 1 및 약제학적으로 허용되는 이의 조성물은 낭포성 섬유증을 치료하거나 이의 증증도를 경감시키는데 유용하다. 하나의 측면에서, 화합물 1은 본원에 기재되고 특정된 바와 같은 형태 I로서 언급된 실질적인 결정질 및 염 유리 형태이다.

[0018] 본원에 기재된 방법은 형태 I을 포함하는 본 발명의 조성물을 제조하는데 사용될 수 있다. 상기 방법에 사용된 성분의 양 및 특징은 본원에 기재된 바와 같을 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0019] 도 1은 형태 I의 화합물 1의 단결정 구조로부터 계산된 X선 회절 패턴이다.

도 2는 형태 I의 화합물 1의 실제 X선 분말 회절 패턴이다.

도 3은 형태 I의 화합물 1의 단결정으로부터 계산된 X선 회절 패턴과 형태 I의 화합물 1의 실제 X선 분말 회절 패턴의 오버레이이다.

도 4는 형태 I의 화합물 1의 시차 주사 열량계(DSC) 기록선이다.

도 5는 단결정 X선 분석을 기초로 한 형태 I의 화합물 1의 입체형태도(conformational picture)이다.

도 6은 카복실산 그룹을 통해 형성된 이량체로서 단결정 X선 분석을 기초로 한 형태 I의 화합물 1의 입체형태도이다.

도 7은 서로 쌓여진(stacked) 분자를 보여주는 단결정 X선 분석을 기초로 한 형태 I의 화합물 1의 입체형태도이다.

도 8은 다른 관점을 나타내는 단결정 X선 분석을 기초로 한 형태 I의 화합물 1의 입체형태도이다(a 아래).

도 9는 T(0)에서 0.5 메틸 셀룰로스-폴리소르베이트 80 현탁액 중의 형태 I의 화합물 1 50mg/ml의 <sup>1</sup>HNMR 분석이다.

도 10은 실온에서 24시간 동안 보관한 0.5 메틸 셀룰로스-폴리소르베이트 80 현탁액 중의 형태 I의 화합물 1 50mg/ml의 <sup>1</sup>HNMR 분석이다.

도 11은 화합물 1·HCl 표준의 <sup>1</sup>HNMR 분석이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0020] **정의**

[0021] 본원에서 사용되는 바와 같이, 달리 기재되지 않는 한 하기 정의가 적용될 것이다.

[0022] 본원에서 사용되는 용어 "CFTR"은 낭포성 섬유증 막통과 전도도 조절자 또는 조절자 활성이 있을 수 있는 이의 변이를 의미하고, ΔF508 CFTR 및 G551D CFTR를 포함하지만 이에 제한되지 않는다(예를 들면, CFTR 변이에 대해 사이트 <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>를 참조한다).

[0023] 본원에서 사용되는 "결정질"은 구조적 단위가 고정된 기하학적 패턴 또는 격자로 배열되어 결정질 고체가 강성의 길다란 범위 순서로 되어 있는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 결정 구조를 구성하는 구조적 단위는 원자,

분자 또는 이온일 수 있다. 결정질 고체는 한정된 용점을 나타낸다.

- [0024] 본원에서 사용되는 용어 "조절"은 측정할 수 있는 양에 의해, 예를 들면, 활성을 증가시키거나 감소시키는 것을 의미한다.
- [0025] 하나의 측면에서, 본 발명은 형태 I로서 특정된 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 형태를 특징으로 한다.
- [0026] 또 다른 양태에서, 형태 I은 Cu K 알파 방사선에 의해 얻어진 X선 분말 회절에서 15.2 내지 15.6도, 16.1 내지 16.5도 및 14.3 내지 14.7도에서의 하나 이상의 피크를 특징으로 한다.
- [0027] 또 다른 양태에서, 형태 I은 15.4, 16.3 및 14.5도에서의 하나 이상의 피크를 특징으로 한다.
- [0028] 또 다른 양태에서, 형태 I은 14.6 내지 15.0도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0029] 또 다른 양태에서, 형태 I은 14.8도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0030] 또 다른 양태에서, 형태 I은 17.6 내지 18.0도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0031] 또 다른 양태에서, 형태 I은 17.8도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0032] 또 다른 양태에서, 형태 I은 16.4 내지 16.8도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0033] 또 다른 양태에서, 형태 I은 16.4 내지 16.8도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0034] 또 다른 양태에서, 형태 I은 16.6도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0035] 또 다른 양태에서, 형태 I은 7.6 내지 8.0도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 형태 I은 7.8도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 형태 I은 25.8 내지 26.2도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0038] 또 다른 양태에서, 형태 I은 26.0도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0039] 또 다른 양태에서, 형태 I은 21.4 내지 21.8도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 형태 I은 21.6도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 형태 I은 23.1 내지 23.5도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 형태 I은 23.3도에서의 피크를 추가의 특징으로 한다.
- [0043] 몇몇 양태에서, 형태 I은 도 1의 회절 패턴과 실질적으로 유사한 회절 패턴을 특징으로 한다.
- [0044] 몇몇 양태에서, 형태 I은 도 2의 회절 패턴과 실질적으로 유사한 회절 패턴을 특징으로 한다.
- [0045] 몇몇 양태에서, 형태 I에 있어서 D90의 입자 크기 분포가 약 82 $\mu$ m 이하이다.
- [0046] 몇몇 양태에서, 형태 I에 있어서 D50의 입자 크기 분포가 약 30 $\mu$ m 이하이다.
- [0047] 하나의 측면에서, 본 발명은 형태 I 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0048] 하나의 측면에서, 본 발명은 사람에게 형태 I의 유효량을 투여함을 포함하는, 상기 사람에서 CFTR 매개된 질환을 치료하는 방법을 특징으로 한다.
- [0049] 몇몇 양태에서, 상기 방법은 추가의 치료제를 투여함을 포함한다.
- [0050] 몇몇 양태에서, 상기 질환은 낭포성 섬유증, 유전성 폐기종, 유전성 혈색소 침착증, 응고-용해 결핍증 (coagulation-fibrinolysis deficiency), 예를 들면, 단백질 C 결핍증, 1형 유전성 맥관부종, 지질 처리 결핍증, 예를 들면, 가족성 콜레스테롤과다혈증, 1형 킬로미크론혈증, 무베타지방단백혈증, 리소좀 저장 질환, 예를 들면, I-세포 질환/가성-후롤리, 뮤코다당증, 샌드호프/테이-삭스, 크리글러-나자르 II형, 다발성 내분비병증/고인슐린혈증, 진성 당뇨병, 라론 왜소증, 마에로퍼옥시데이스 결핍증, 원발성 부갑상선 기능 저하증, 흑색증, 글리카노시스 CDG 1형, 유전성 폐기종, 선천성 갑상선기능항진증, 골형성 부전증, 유전성 저섬유소원혈증, ACT 결핍증, 요붕증(DI), 신경물리학적 DI(neurophyseal DI), 신성 DI(neprogenic DI), 샤르코-마리 투스 증후군,

펠리제우스-메르츠바하병, 신경변성 질환, 예를 들면, 알츠하이머병, 파킨슨병, 루게릭병(근위축성 측삭 경화증), 진행성 핵성 마비, 픽병, 몇몇 폴리글루타민 신경 장애, 예를 들면, 헌팅턴, 척수소뇌성 실조증 I형, 척수 및 연수 근위축증, 소뇌치상적핵 위축(dentatorubal pallidoluyian) 및 근긴장성 이영양증 뿐만 아니라 해면상 뇌 질환, 예를 들면, 유전성 크로이츠펠트-야콥병, 파브리병, 슈트라우슬러-샤인커 증후군(Straussler-Scheinker syndrome), COPD, 안구 건조증 및 쇼그렌 병(Sjogren's disease)으로부터 선택된다.

[0051] 하나의 양태에서, 본 발명은 사람에게 형태 I의 유효량을 투여함을 포함하는, 사람에서 낭포성 섬유증을 치료하는 방법을 제공한다.

[0052] 하나의 측면에서, 본 발명은 형태 I 및 이의 사용 설명서를 포함하는 키트를 특징으로 한다.

[0053] 하나의 측면에서, 본 발명은 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 HCl 염을 적절한 용매에 유효 시간(effective amount of time) 동안 분산시키거나 용해시킴을 포함하는 형태 I의 제조 방법을 특징으로 한다.

[0054] 하나의 양태에서, 본 발명은 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 HCl 염을 적절한 용매에 유효 시간 동안 분산시킴을 포함하는 형태 I의 제조 방법을 특징으로 한다.

[0055] 몇몇 양태에서, 상기 적절한 용매는 물 또는 알코올/물 혼합물이다.

[0056] 몇몇 양태에서, 상기 적절한 용매는 물 또는 50% 메탄올/물 혼합물이다.

[0057] 몇몇 양태에서, 상기 적절한 용매는 물이다.

[0058] 몇몇 양태에서, 상기 적절한 용매는 50% 메탄올과 50% 물을 포함하는 혼합물이다.

[0059] 몇몇 양태에서, 유효 시간은 약 2 내지 약 1일이다. 몇몇 양태에서, 유효 시간은 약 2 내지 약 18시간이다. 몇몇 양태에서, 유효 시간은 약 2 내지 약 12시간이다. 몇몇 양태에서, 유효 시간은 약 2 내지 약 6시간이다.

[0060] 하나의 측면에서, 본 발명은 단사정계, P2<sub>1</sub>/n 공간 그룹(space group) 및 하기 단위 격자 크기를 갖는 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 결정 형태를 특징으로 한다: a = 4.9626(7) Å, b = 12.2994(18) Å, c = 33.075(4) Å, α = 90°, β = 93.938(9)°, 및 γ = 90°.

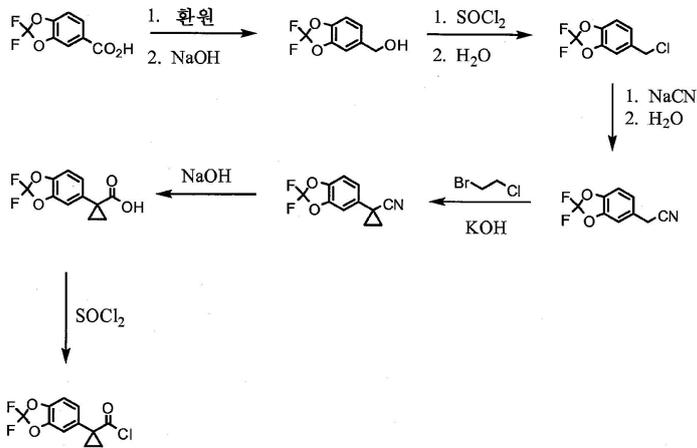
[0061] 형태 I의 제조 방법

[0062] 하나의 양태에서, 형태 I은 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 염 형태, 예를 들면, HCl을 적절한 용매에 유효 시간 동안 분산시키거나 용해시켜 제조한다. 또 다른 양태에서, 형태 I은 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 염 형태, 예를 들면, HCl을 적절한 용매에 유효 시간 동안 분산시켜 제조한다. 또 다른 양태에서, 형태 I은 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트 및 적절한 산, 예를 들면, 포름산으로부터 직접적으로 형성된다. 하나의 양태에서, 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 HCl 염 형태는 출발 지점이고, 하나의 양태에서 반응식 1 내지 3에 따라 산 클로라이드 잔기를 아민 잔기와 커플링시켜 제조할 수 있다.

[0063]

[반응식 1]

산 클로라이드 잔기의 합성

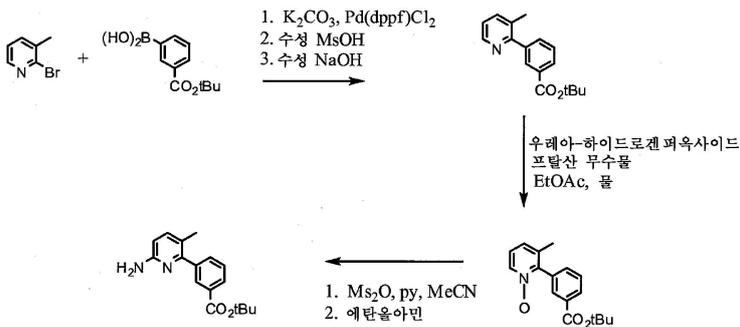


[0064]

[0065]

[반응식 2]

아민 잔기의 합성

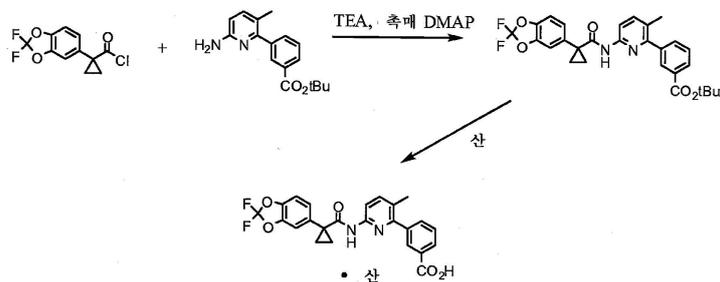


[0066]

[0067]

[반응식 3]

3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 산 염의 형성



[0068]

[0069]

출발점으로서 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 HCl, 예를 들면, 염 형태를 사용하여, 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 HCl 염 형태를 적절한 용매에 유효 시간 동안 분산시키거나 용해시켜 형태 I을 고수율로 수득할 수 있다. 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 다른 염 형태, 예를 들면, 다른 무기 또는 유기 산 형태를 사용할 수 있다. 다른 염 형태는 상응하는 산에 의한 t-부틸 에스테르의 가수분해로부터 야기된다. 다른 산/염 형태는 질산, 황산, 인산, 붕산, 아세트산, 벤조산, 말론산 등을 포함한다. 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 염 형태는 사용된 용매에 따라 가용성이

거나 가용성이 아닐 수 있지만, 가용성의 부족이 형태 I의 형성을 저지하지 않는다. 예를 들면, 하나의 양태에서, 심지어 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 HCl 염 형태가 물에 부족하게만 용해되에도 불구하고, 적절한 용매는 물 또는 알코올/물 혼합물, 예를 들면, 50% 메탄올/물 혼합물일 수 있다. 하나의 양태에서, 적절한 용매는 물이다.

[0070]

3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 염 형태로부터 형태 I을 형성하는 유효 시간은 2 내지 24시간 또는 그 이상 중 임의의 시간일 수 있다. 일반적으로, 24시간 이상은 고수율(약 98%)을 수득하는데 필요하지 않지만, 특정한 용매는 보다 큰 시간량을 필요로 할 수 있다. 또한 필요한 시간량은 온도에 반비례함이 인식된다. 온도가 높을수록 형태 I을 형성하는 산의 해리를 수행하는데 필요한 시간은 적어진다. 용매가 물인 경우, 실온에서 약 24시간 동안 분산액을 교반하여 형태 I을 약 98% 수율로 제공한다. 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산의 염 형태 용액이 공정 목적을 위해 바람직한 경우, 상승된 온도가 사용될 수 있다. 상승된 온도에서 유효 시간 동안 용액을 교반한 다음, 냉각 상의 재결정화는 형태 I의 실질적으로 순수한 형태를 수득한다. 하나의 양태에서, 실질적으로 순수함은 약 90% 이상의 순도를 나타낸다. 또 다른 양태에서, 실질적으로 순수함은 약 95% 이상의 순도를 나타낸다. 또 다른 양태에서, 실질적으로 순수함은 약 98% 이상의 순도를 나타낸다. 또 다른 양태에서, 실질적으로 순수함은 약 99% 이상의 순도를 나타낸다. 선택된 온도는 부분적으로 사용된 용매에 따라 좌우되고, 당해 분야의 숙련가의 능력 내에서 잘 결정된다. 하나의 양태에서, 온도는 실온 내지 약 80°C이다. 또 다른 양태에서, 온도는 실온 내지 약 40°C이다. 또 다른 양태에서, 온도는 40 내지 약 60°C이다. 또 다른 양태에서, 온도는 약 60 내지 약 80°C이다.

[0071]

몇몇 양태에서, 형태 I은 유기 용매로부터 재결정화하여 추가로 정제할 수 있다. 유기 용매의 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 톨루엔, 큐멘, 아니솔, 1-부탄올, 이소프로필아세테이트, 부틸 아세테이트, 이소부틸 아세테이트, 메틸 t-부틸 에테르, 메틸 이소부틸 케톤 또는 1-프로판올/물(다양한 비율)을 포함한다. 온도는 상기 기재된 바와 같이 사용할 수 있다. 예를 들면, 하나의 양태에서, 형태 I은 완전히 용해될 때까지 75°C에서 1-부탄올에 용해시킨다. 용액을 0.2°C/min의 속도로 10°C로 냉각시켜, 여과에 의해 분리할 수 있는 형태 I의 결정을 수득한다.

[0072]

용도, 제형화 및 투여

[0073]

약제학적으로 허용되는 조성물

[0074]

본 발명의 또 다른 측면에서, 약제학적으로 허용되는 조성물이 제공되고, 여기서 이들 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 형태 I을 포함하고, 추가로 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 또는 비히클을 포함한다. 특정한 양태에서, 이들 조성물은 임의로 하나 이상의 추가의 치료제를 추가로 포함한다.

[0075]

상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 본원에서 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 또는 비히클을 포함하고, 목적하는 특정한 투여형에 적합한 임의의 및 모든 용매, 희석제 또는 기타 액체 비히클, 분산 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함한다. 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin(Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)]에는 약제학적으로 허용되는 조성물을 제형화하는데 사용된 다양한 담체 및 공지된 이의 제조 기술이 기재되어 있다. 임의의 통상적인 담체 매질이, 예를 들면, 임의의 목적하지 않는 생물학적 효과를 생성함으로써 또는 약제학적으로 허용되는 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 해로운 방식으로 상호작용함으로써 본 발명의 화합물과 불혼화성인 경우를 제외하고, 이의 사용은 본 발명의 범위 내에서 계획된다. 약제학적으로 허용되는 담체로서 제공될 수 있는 물질의 몇몇 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 이온 교환기, 알루미늄, 스테아르산알루미늄, 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들면, 사람 혈청 알부민, 완충제 성분, 예를 들면, 포스페이트, 글리신, 소르브산 또는 칼륨 소르베이트, 포화된 식물성 지방산의 부분적 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예를 들면, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 삼규산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 양모지, 당, 예를 들면, 락토스, 글루코스 및 슈크로스; 전분, 예를 들면, 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예를 들면, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말 트라카간트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예를 들면, 코코아 버터 및 좌제 왁스; 오일, 예를 들면, 땅콩유, 면실유; 홍화유; 참깨유; 올리브유; 옥수수유 및 대두유; 글리콜; 예를 들면, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜; 에스테르, 예를 들면, 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예를 들면, 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 피로젠-무함유 물; 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알코올 및

인산염 완충 용액 뿐만 아니라 기타 비독성 혼화성 운환제, 예를 들면, 나트륨 라우릴 설페이트 및 스테아르산 마그네슘을 포함할 뿐만 아니라 착색제, 이형제, 피복제, 감미제, 향미제 및 향료, 보존제 및 항산화제가 또한 조제자의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.

[0076]

화합물 및 약제학적으로 허용되는 조성물의 용도

[0077]

또 다른 측면에서, 본 발명은 CFTR과 관련된 상태, 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 특정한 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 형태 I의 고체 상태 형태를 포함하는 조성물을 투여할 필요가 있는 개체, 바람직하게는 포유동물에게, 본원에 기재된 형태 I의 고체 상태 형태를 포함하는 조성물을 투여함을 포함하는, CFTR 활성의 결함과 관련된 상태, 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0078]

본원에서 사용되는 "CFTR-매개된 질환"은 낭포성 섬유증, 유전성 폐기종, 유전성 혈색소 침착증, 응고-용해 결핍증, 예를 들면, 단백질 C 결핍, 1형 유전성 맥관부종, 지질 과정 결핍증, 예를 들면, 가족성 콜레스테롤과다혈증, 1형 킬로미크론혈증, 무베타지방단백혈증, 리소좀 저장 질환, 예를 들면, I-세포 질환/가성-후롤러, 뮤코다당증, 샌드호프/테이-삭스, 크리글러-나자르 II형, 다발성 내분비병증/고인슐린혈증, 진성 당뇨병, 라폰 왜소증, 마에로퍼옥시데이스 결핍증, 원발성 부갑상선 기능 저하증, 흑색종, 글리카노시스 CDG 1형, 유전성 폐기종, 선천성 갑상선기능항진증, 골형성 부진증, 유전성 저섬유소원혈증, ACT 결핍증, 요붕증(DI), 신경물리학적 DI, 신성 DI, 샤르코-마리 투스 증후군, 펠리제우스-메르츠바하병, 신경변성 질환, 예를 들면, 알츠하이머병, 파킨슨병, 루게릭병(근위축성 측삭 경화증), 진행성 핵성 마비, 픽병, 몇몇 폴리글루타민 신경 장애, 예를 들면, 헌팅턴, 척수소뇌성 실조증 I형, 척수 및 연수 근위축증, 소뇌치상적핵 위축 및 근긴장성 이영양증 뿐만 아니라 해면상 뇌 질환, 예를 들면, 유전성 크로이츠펠트-야콥병, 파브리병, 슈트라우슬러-샤인커 증후군, COPD, 안구 건조증 및 쇼그렌 병으로부터 선택된 질환이다.

[0079]

특정한 양태에서, 본 발명은 사람에게 본원에 기재된 형태 I을 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 사람에서 CFTR-매개된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0080]

대안적인 바람직한 양태에 따라, 본 발명은 사람에게 본원에 기재된 형태 I을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 사람에서 낭포성 섬유증을 치료하는 방법을 제공한다.

[0081]

본 발명에 따라, 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물의 "유효량"은 상기 기재된 임의의 질환을 치료하거나 이의 중증도를 경감시키는데 효과적인 양이다.

[0082]

형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물은 상기 기재된 하나 이상의 질환을 치료하거나 이의 중증도를 경감시키는데 효과적인 임의의 양 및 임의의 투여 경로를 사용하여 투여할 수 있다.

[0083]

특정한 양태에서, 본원에 기재된 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물은 호흡기 및 비호흡기 상피의 꼭지면 막에서 잔여 CFTR 활성을 나타내는 환자에서 낭포성 섬유증을 치료하거나 이의 중증도를 경감시키는데 유용하다. 상피 표면에서의 잔여 CFTR 활성의 존재는, 당해 분야, 예를 들면, 표준 전기생리학적, 생화학적 또는 조직화학 기술 분야에 알려진 방법을 사용하여 용이하게 검출될 수 있다. 이러한 방법은, 생체내 또는 생체의 전기생리학적 기술, 땀 또는 타액의  $Cl^-$  농도 측정, 또는 세포 표면 밀도를 모니터링하는 생체의 생화학적 또는 조직화학적 기술을 사용하여 CFTR 활성을 확인한다. 이러한 방법을 사용하여, 잔여 CFTR 활성은 가장 일반적인 변이인  $\Delta F508$ 에 대하여 동형 또는 이형인 환자를 포함하여 다양한 상이한 변이에 대하여 이형 또는 동형인 환자에서 용이하게 검출될 수 있다.

[0084]

하나의 양태에서, 본원에 기재된 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물은 잔여 CFTR 활성을 나타내는 특정한 유전형, 예를 들면, 분류 III 변이(손상된 조절 또는 통문), 분류 IV 변이(변경된 전도성) 또는 분류 V 변이(감소된 합성)를 가진 환자에서 낭포성 섬유증을 치료하거나 이의 중증도를 경감시키는데 유용하다[참조: Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521-529, 2000]. 잔여 CFTR 활성을 나타내는 유전형의 다른 환자는 이들 분류 중 하나에 대한 동형 또는 분류 I 변이, 분류 II 변이, 또는 분류법이 부족한 변이를 포함한 변이의 임의의 다른 분류와 이형인 환자를 포함한다.

[0085]

하나의 양태에서, 본원에 기재된 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물은 특정한 임상학적 표현형, 예를 들면, 전형적으로 상피의 꼭지면 막에서 잔여 CFTR 활성의 양과 서로 관련이 있는 약간 중간 정도의 임상학적 표현형이 있는 환자에서 낭포성 섬유증을 치료하거나 이의 중증도를 경감시키는데 유용하다. 이러한 표현

형은 췌장 기능부전을 나타내는 환자 또는 특발성 췌장염 및 수정관의 선천성 양측성 부재 또는 가벼운 폐 질환을 진단받은 환자를 포함한다.

- [0086] 정확한 필요량은 개체의 종, 연령 및 일반적인 상태, 감염의 중증도, 특정한 제제, 이의 투여 방식 등에 따라 개체들 사이에서 가변적일 것이다. 본 발명의 화합물은 바람직하게는 투여의 용이함 및 투여량의 단일성을 위해 단일 제형으로 제형화한다. 본원에서 사용되는 표현 "투여량 단위 형태"는 치료되는 환자에 적절한 제제의 물리적으로 분리된 단위를 나타낸다. 그러나 본 발명의 화합물 및 조성물의 총 1일 사용량은 타당한 의학적 판단의 범위에서 주치의에 의해 결정될 것임이 이해될 것이다. 임의의 특정한 환자 또는 유기체를 위한 특정한 유효 용량 수준은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 사용된 특정한 화합물의 활성; 사용된 특정한 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식단; 투여 시간, 투여 경로 및 사용된 특정한 화합물의 배설율; 치료 기간; 사용된 특정한 화합물과의 배합물로 사용되거나 동시에 사용되는 약물 및 의학 분야에 잘 알려진 이러한 인자를 포함한 다양한 인자에 따라 좌우될 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "환자"는 동물, 바람직하게는 포유 동물, 가장 바람직하게는 사람을 의미한다.
- [0087] 본 발명의 약제학적으로 허용되는 조성물은 사람 및 다른 동물에게 치료 중인 감염의 중증도에 따라 경구적으로, 직장으로, 비경구적으로, 수조내, 질내, 복막내로, 국소적으로(분말, 연고 또는 드립제에 의해), 구강으로, 경구 또는 비강 스프레이 등에 의해 투여될 수 있다. 특정한 양태에서, 본 발명의 화합물은 경구적으로 또는 비경구적으로 1일 개체 체중의 약 0.01mg/kg 내지 약 50mg/kg, 바람직하게는 약 1mg/kg 내지 약 25mg/kg의 투여량 수준으로 일일 1회 이상 투여되어 목적하는 치료학적 효과를 획득할 수 있다.
- [0088] 특정한 양태에서, 투여량 단위 형태 중의 형태 I의 투여량은 100mg 내지 1,000mg이다. 또 다른 양태에서, 형태 I의 투여량은 200mg 내지 900mg이다. 또 다른 양태에서, 형태 I의 투여량은 300mg 내지 800mg이다. 또 다른 양태에서, 형태 I의 투여량은 400mg 내지 700mg이다. 또 다른 양태에서, 형태 I의 투여량은 500mg 내지 600mg이다.
- [0089] 주사용 제형, 예를 들면, 살균 주사용 수성 또는 유성 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당해 분야에 따라 제형화될 수 있다. 살균 주사용 제형은 또한 비독성 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 살균 주사용 용액, 현탁액 또는 에멀전, 예를 들면, 1,3-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에서 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 추가로, 살균, 고정유는 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 사용된다. 당해 목적을 위해, 임의의 브랜드 고정유는 합성 모노글리세리드 또는 디글리세리드를 포함하여 사용될 수 있다. 추가로, 지방산, 예를 들면, 올레산은 주사용 제형에서 사용된다.
- [0090] 주사용 제형은, 예를 들면, 박테리아-보유 필터를 통하여 여과하거나 사용 전 살균수 또는 기타 살균 주사용 매질 중에 용해되거나 분산될 수 있는 살균 고체 조성물의 형태로 살균제를 도입함으로써 살균할 수 있다.
- [0091] 직장 또는 질 투여용 조성물은 바람직하게는 본 발명의 화합물과, 상온에서 고체지만 체온에서 액체이기 때문에 직장 또는 질강에서 용융되어 활성 화합물을 방출하는 적합한 비자극성 부형제 또는 담체, 예를 들면, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 또는 좌제 왁스를 혼합함으로써 제조할 수 있는 좌제이다.
- [0092] 경구 투여용 고체 제형은 캡슐, 정제, 필제(pill), 분말 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 제형에서, 활성 화합물은 하나 이상의 불활성, 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체, 예를 들면, 시트르산나트륨 또는 인산이 칼슘 및/또는 a) 충전제 또는 증량제, 예를 들면, 전분, 락토스, 슈크로스, 만니톨 및 규산, b) 결합제, 예를 들면, 예를 들면, 카복시메틸셀룰로스, 알지네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 슈크로스 및 아카시아, c) 보습제, 예를 들면, 글리세롤, d) 붕괴제, 예를 들면, 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정한 실리케이트 및 탄산나트륨, e) 용액 지연제, 예를 들면, 파라핀, f) 흡수 촉진제, 예를 들면, 4급 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예를 들면, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제, 예를 들면, 카올린 및 벤토나이트 클레이 및 i) 윤활제, 예를 들면, 탈크, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 필제의 경우에서, 제형은 또한 완충제를 포함할 수 있다.
- [0093] 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 부형제, 예를 들면, 락토스 또는 유당 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 연질 및 경질-충진된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 사용될 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 필제 및 과립의 고체 제형은 코팅 및 쉘, 예를 들면, 장용 코팅 및 약제학적 제형 분야에 잘 알려진 다른 코팅에 의해 제조될 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 함유할 수 있고 이들은 단지 활성 성분(들)을 방출하게

나 또는 바람직하게는 임의로 지연된 방식으로 장관의 특정한 부분에서 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 삼입 조성물의 예는 중합체성 성분 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 부형제, 예를 들면, 락토스 또는 유당 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 연질 및 경질-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 사용될 수 있다.

[0094] 활성 화합물은 또한 상기 기재된 바와 같은 하나 이상의 부형제에 의해 마이크로캡슐화될 수 있다. 정제, 당의 정, 캡슐, 필제 및 과립의 고체 제형은 코팅 및 쉘, 예를 들면, 장용 코팅, 방출 조절 코팅 및 약제학적 제형 분야에 잘 알려진 다른 코팅에 의해 제조될 수 있다. 이러한 고체 제형에서 활성 화합물은 하나 이상의 불활성 희석제, 예를 들면, 슈크로스, 락토스 또는 전분과 혼합될 수 있다. 이러한 제형은 또한 전형적인 관례로 불활성 희석제 이외의 추가의 성분, 예를 들면, 정제 운할제 및 다른 정제 보조제, 예를 들면, 스테아르산마그네슘 및 미세결정질 셀룰로스를 포함할 수 있다. 캡슐, 정제 및 필제의 경우에, 제형은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 함유할 수 있고 이들은 단지 활성 성분(들)을 방출하거나 또는 바람직하게는 임의로 지연된 방식으로 장관의 특정한 부분에서 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 삼입 조성물의 예는 중합체성 성분 및 왁스를 포함한다.

[0095] 또한 본원에 기재된 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물이 병행 치료법으로 사용될 수 있는, 즉, 하나 이상의 다른 목적하는 치료제 또는 의외 과정과 동시에, 전에 또는 후에 투여될 수 있음이 인식될 것이다. 병행 계획에서 사용하는 특정한 치료법(치료제 또는 과정)의 병행은 목적하는 치료제 및/또는 과정 및 달성되는 목적하는 치료학적 효과의 혼화성을 고려해야 할 것이다. 또한 사용되는 치료법이 동일한 장애에 대한 목적하는 효과를 달성할 수 있거나(예를 들면, 본 발명의 화합물은 동일한 장애를 치료하는데 사용되는 또 다른 제제와 동시에 투여되거나), 상이한 효과(예를 들면, 임의의 부작용의 조절)를 달성할 수 있음이 인지될 것이다. 본원에서 사용되는 특정한 질환 또는 상태를 치료하거나 예방하는데 일반적으로 투여되는 추가의 치료제는 "치료 중인 질환 또는 상태에 적절하다"라고 알려져 있다.

[0096] 하나의 양태에서, 상기 추가의 제제는 점액용해제, 기관지확장제, 항생제, 항감염제, 소염제, 본 발명의 화합물 이외의 CFTR 조절제, 또는 영양제로부터 선택된다.

[0097] 또 다른 양태에서, 상기 추가의 제제는 젠타마이신, 커큐민, 사이클로포스파미드, 4-페닐부티레이트, 미글루스타트, 펠로디핀, 니모디핀, 필록신 B, 제니에스테인, 아피제닌, cAMP/cGMP 조절제, 예를 들면, 폴리프람, 실테나필, 밀리논, 타달라필, 암리논, 이소프로테레놀, 알부테롤 및 알메테롤, 데옥시스페르구알린, HSP 90 억제제, HSP 70 억제제, 프로테오솜 억제제, 예를 들면, 에폭소미신, 락타시스틴 등으로부터 선택된 화합물이다.

[0098] 또 다른 양태에서, 상기 추가의 제제는 제WO 2004028480호, 제WO 2004110352호, 제WO 2005094374호, 제WO 2005120497호 또는 제WO 2006101740호에 기재된 화합물이다.

[0099] 또 다른 양태에서, 상기 추가의 제제는 CFTR 조절 활성을 나타내는 벤조(c)퀴놀리지늄 유도체 또는 CFTR 조절 활성을 나타내는 벤조피란 유도체이다.

[0100] 또 다른 양태에서, 상기 추가의 제제는 제US 7202262호, 제US 6992096호, 제US 20060148864호, 제US 20060148863호, 제US 20060035943호, 제US 20050164973호, 제WO2006110483호, 제WO 2006044456호, 제WO 2006044682호, 제WO 2006044505호, 제WO 2006044503호, 제WO 2006044502호 또는 제WO 2004091502호에 기재된 화합물이다.

[0101] 또 다른 양태에서, 상기 추가의 제제는 제WO 2004080972호, 제WO 2004111014호, 제WO 2005035514호, 제WO 2005049018호, 제WO 2006002421호, 제WO 2006099256호, 제WO 2006127588호 또는 제WO 2007044560호에 기재된 화합물이다.

[0102] 또 다른 양태에서, 전문이 본원에서 참조로 인용되는 2005년 6월 24일자로 출원된 미국 특허 공보 제 2006/0074075호로서 공개된 미국 특허 제11/165,818호에 기재된 화합물로부터 선택된다. 또 다른 양태에서, 상기 추가의 제제는 N-(5-하이드록시-2,4-디-3급-부틸-페닐)-4-옥소-1H-퀴놀린-3-카복스아미드이다. 이들 배합물은 낭포성 섬유증을 포함한 본원에 기재된 질환의 치료에 유용하다. 이들 배합물은 또한 본원에 기재된 키트에서 유용하다.

[0103] 본 발명의 조성물에 존재하는 추가의 치료제의 양은 일반적으로 오직 활성제로서 치료제를 포함하는 조성물로 투여되는 양 이하일 것이다. 바람직하게는 본원에 기재된 조성물 중의 추가의 치료제의 양은 오직 치료학적 활성제로서 제제를 포함하는 조성물에 일반적으로 존재하는 양의 약 50% 내지 100% 범위일 것이다.

[0104] 본원에 기재된 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물은 또한 이식용 의료 장치, 예를 들면, 인공보철물, 인공 판막, 연결관, 스텐트 및 카테터를 피복하기 위해 조성물로 혼입될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또 다른 측면에서 본원에 기재된 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물 및, 이의 분류 및 하위분류에서, 이식용 장치를 피복하는데 적합한 담체를 포함하는 이식용 장치를 피복하기 위한 조성물을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 형태 I 또는 이의 약제학적으로 허용되는 조성물, 및 이식용 장치를 피복하는데 적합한 담체를 포함하는 조성물로 피복된 이식용 장치를 포함한다. 적합한 피복물 및 피복된 이식용 장치의 일반적인 제조는 미국 특허 제6,099,562호, 제5,886,026호 및 제5,304,121호에 기재되어 있다. 피복물은 전형적으로 생체적합성 중합체성 물질, 예를 들면, 하이드로젤 중합체, 폴리메틸디실록산, 폴리카프로락톤, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리락트산, 에틸렌 비닐 아세테이트 및 이들의 혼합물이다. 피복물은 임의로 조성물에 조절된 방출 특성을 부여하기 위해 플루오로실리콘, 다당류, 폴리에틸렌 글리콜, 인지질 또는 이의 배합물의 적합한 탑코트에 의해 추가로 커버링될 수 있다.

[0105] 본원에 기재된 본 발명이 보다 완전하게 이해될 수 있기 위해, 하기 실시예를 기재한다. 이들 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이고 임의의 방식으로 본 발명을 제한함으로써 해석되지 않음이 이해되어야 한다.

[0106] **실시예**

[0107] **방법 및 물질**

[0108] 시차 주사 열량계(DSC)

[0109] 형태 I의 시차 주사 열량계(DSC) 데이터는 DSC Q100 V9.6 Build 290(TA Instruments, New Castle, DE)을 사용하여 수집하였다. 온도는 인덱스로 눈금을 정하고, 열용량은 사파이어로 정하였다. 3 내지 6mg의 샘플은 1 핀홀의 리드를 사용하여 크리핑(crimping)된 알루미늄 팬으로 칭량하였다. 1.0°C/min의 가열 속도로 질소 기체 퍼지 50ml/min으로 25°C로부터 350°C로 샘플을 스캐닝하였다. Thermal Advantage Q Series™ 버전 2.2.0.248 소프트웨어로 데이터를 수집하고 Universal Analysis 소프트웨어 버전 4.1D(TA Instruments, New Castle, DE)로 분석하였다. 기록된 숫자는 단일 분석을 나타낸다.

[0110] XRPD(X선 분말 회절)

[0111] 형태 I의 X선 회절(XRD) 데이터를 HI-STAR 2-차원 검출기 및 평평한 흑연 단색화장치가 있는 Bruker D8 DISCOVER 분말 회절계 상에 수집하였다. K $\alpha$  방사선이 있는 Cu 밀봉된 튜브를 40kV, 35mA에서 사용하였다. 샘플을 25°C에서 0-배경 규소 웨이퍼 상에 놓았다. 각각의 샘플에 있어서, 각각 2개의 상이한  $\Theta_2$  각도, 8° 및 26° 에서 2개의 데이터 프레임을 각각 120초에서 수집하였다. GADDS 소프트웨어로 데이터를 통합하고 DIFFRACT<sup>plus</sup> EVA 소프트웨어로 병합하였다. 보고된 피크 위치에 대한 불확실성은  $\pm 0.2$ 도이다.

[0112] Vitride®(나트륨 비스(2-메톡시에톡시)알루미늄 하이드리드[또는 NaAlH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 톨루엔 중의 65중량% 용액)는 Aldrich Chemicals로부터 구입하였다.

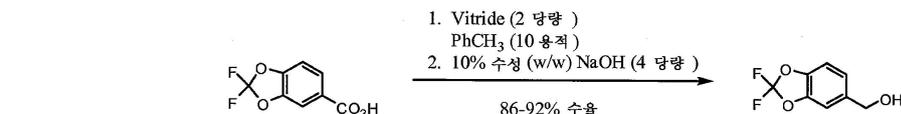
[0113] 2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-카복실산은 Saltigo(Lanxess Corporation의 계열사)로부터 구입하였다.

[0114] 본원에서 화합물의 명칭이 화합물의 구조를 정확하게 설명하지 않을 수 있는 경우, 어디에서나 구조는 명칭을 대신하고 결정한다.

[0115] **3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산·HC 1의 합성**

[0116] **산 클로라이드 잔기**

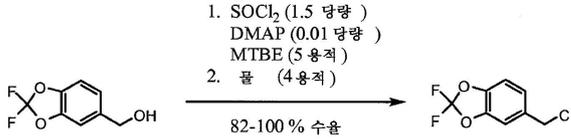
[0117] **(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-메탄올의 합성**



[0119] 시중에서 구입할 수 있는 2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-카복실산(1.0당량)을 톨루엔(10용적)에 현탁한다. 온도를 15 내지 25°C로 유지하는 속도로 첨가 깔대기를 통해 Vitride®(2당량)를 가한다. 첨가가 완료되면 온

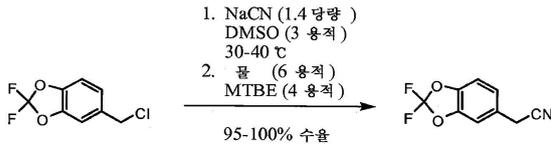
도는 2시간 동안 40℃로 증가하고, 그 다음, 온도를 40 내지 50℃로 유지하면서 첨가 깔대기를 통해 10%(w/w) 수성 NaOH(4.0당량)를 조심스럽게 가한다. 추가 30분 동안 교반한 다음, 40℃에서 층들이 분리되도록 한다. 유기 상을 20℃로 냉각한 다음, 물(2×1.5용적)로 세척하고, 건조시키고(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 여과하고, 농축하여 조악한 (2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-메탄올을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용한다.

[0120] 5-클로로메틸-2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔의 합성



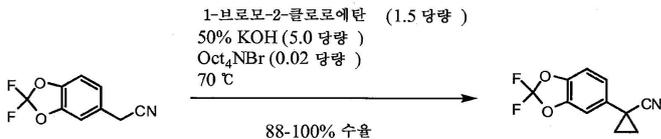
(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-메탄올(1.0당량)을 MTBE(5용적)에 용해시킨다. 촉매량의 DMAP(1mol%)를 가하고, SOCl<sub>2</sub>(1.2당량)를 첨가 깔대기를 통해 가한다. 반응기의 온도가 15 내지 25℃로 유지하는 속도로 SOCl<sub>2</sub>를 가한다. 온도는 1시간 동안 30℃로 상승하고, 그 다음, 20℃로 냉각한 다음, 온도를 30℃ 미만으로 유지하면서 물(4용적)을 첨가 깔대기를 통해 가한다. 추가 30분 동안 교반한 다음, 층들이 분리되도록 한다. 유기 층을 교반하고, 10%(w/v) 수성 NaOH(4.4용적)를 가한다. 15 내지 20분 동안 교반한 다음, 층들이 분리되도록 한다. 그 다음, 유기 상을 건조시키고(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 여과하고, 농축하여 조악한 5-클로로메틸-2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접적으로 사용한다.

[0123] (2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-아세토니트릴의 합성



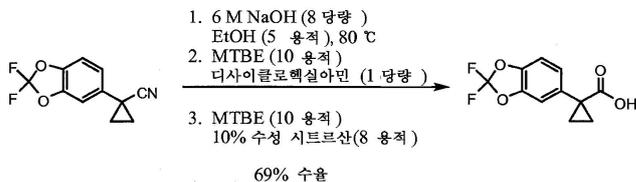
온도를 30 내지 40℃로 유지하면서 DMSO(1.25용적) 중의 5-클로로메틸-2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔(1당량) 용액을 DMSO(3용적) 중의 NaCN(1.4당량) 현탁액에 가한다. 혼합물을 1시간 동안 교반한 다음, 물(6용적)을 가한 후, MTBE(4용적)를 가한다. 30분 동안 교반한 다음, 층을 분리한다. 수성 층을 MTBE(1.8용적)로 추출한다. 배합된 유기 층을 물(1.8용적)로 세척하고, 건조시키고(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 여과하고, 농축하여 조악한(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-아세토니트릴(95%)을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접적으로 사용한다.

[0126] (2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-사이클로프로판카보니트릴의 합성



(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-아세토니트릴(1.0당량), 50중량% 수성 KOH(5.0당량) 1-브로모-2-클로로에탄(1.5당량) 및 Oct<sub>4</sub>NBr(0.02당량)의 혼합물을 70℃에서 1시간 동안 가열한다. 그 다음, 반응 혼합물을 냉각하고, MTBE 및 물로 후처리한다. 유기 상을 물 및 염수로 세척한 다음, 용매를 제거하여 (2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-사이클로프로판카보니트릴을 수득한다.

[0129] 1-(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-사이클로프로판카복실산의 합성

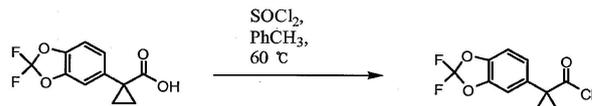


[0131]

(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-사이클로프로판카보니트릴을 80℃에서 밤새 에탄올(5용적) 중의 6M NaOH(8당량)을 사용하여 가수분해한다. 상기 혼합물을 실온으로 냉각하고, 에탄올을 진공하에 증발시킨다. 잔사를 물 및 MTBE로 혼입하고, 1M HCl를 가하고, 층을 분리한다. 그 다음, MTBE 층을 디사이클로헥실아민(0.97당량)으로 처리한다. 현탁액을 0℃으로 냉각하고, 여과하고, 헵탄으로 세척하여 상응하는 DCHA 염을 수득한다. 염을 MTBE 및 10% 시트르산으로 혼입하고, 모든 고체가 용해될 때까지 교반한다. 층을 분리하고, MTBE 층을 물 및 염수로 세척한다. 용매를 헵탄으로 교환한 다음, 밤새 50℃에서 진공 오븐에서 건조한 다음, 여과하고 1-(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-사이클로프로판카복실산을 수득한다.

[0132]

**1-(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-사이클로프로판카보닐 클로라이드의 합성**



[0133]

[0134]

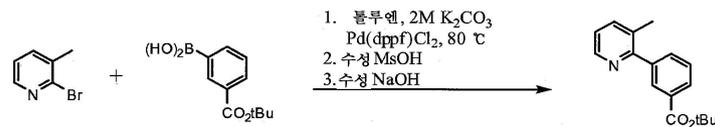
1-(2,2-디플루오로-1,3-벤조디옥솔-5-일)-사이클로프로판카복실산(1.2당량)을 톨루엔(2.5용적)에 현탁시키고, 혼합물을 60℃로 가열한다. SOCl<sub>2</sub>(1.4당량)를 첨가 깔대기를 통해 가한다. 30분 후, 톨루엔 및 SOCl<sub>2</sub>를 반응 혼합물로부터 증류시킨다. 추가의 톨루엔(2.5용적)을 가하고, 다시 증류시킨다.

[0135]

**아민 잔기**

[0136]

**3급-부틸-3-(3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트의 합성**



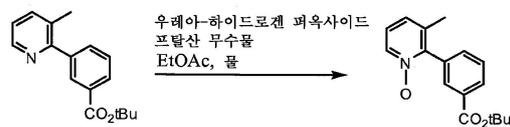
[0137]

[0138]

2-브로모-3-메틸피리딘(1.0당량)을 톨루엔(12용적)에 용해시킨다. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(4.8당량)을 가한 다음, 물(3.5용적)을 가하고, 혼합물을 N<sub>2</sub> 스트림하에 1시간 동안 65℃에서 가열한다. 그 다음, 3-(t-부톡시카보닐)페닐보론산(1.05당량) 및 Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(0.015당량)를 가하고, 혼합물을 80℃로 가열한다. 2시간 후, 가열을 중지하고, 물을 가하고(3.5용적), 층들이 분리되도록 한다. 그 다음, 유기 상을 물(3.5용적)로 세척하고, 10% 수성 메탄설폰산(2당량 MsOH, 7.7용적)으로 추출한다. 수성 상을 50% 수성 NaOH(2당량)로 염기성으로 만들고, EtOAc(8용적)로 추출한다. 유기 층을 농축하여 조약한 3급-부틸-3-(3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트(82%)를 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접적으로 사용한다.

[0139]

**2-(3-(3급-부톡시카보닐)페닐)-3-메틸피리딘-1-옥사이드의 합성**

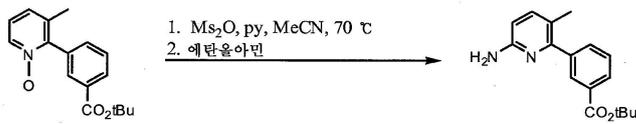


[0140]

[0141]

3급-부틸-3-(3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트(1.0당량)를 EtOAc(6용적)에 용해시킨다. 물(0.3용적)을 가한 다음, 우레아-과산화수소(3당량)를 가한다. 반응기의 온도를 45℃ 이하로 유지하면서 무수 프탈산(3당량)을 부분으로 나누어 고체로서 가한다. 무수 프탈산 첨가가 완료된 다음, 혼합물을 45℃로 가열한다. 추가 4시간 동안 교반한 다음, 가열을 중지한다. 10% w/w 수성 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(1.5당량)을 첨가 깔대기를 통해 가한다. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 첨가가 완료된 다음, 혼합물을 추가 30분 동안 교반하고, 층을 분리한다. 유기 층을 교반하고, 10% w/w 수성 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(2당량)을 가한다. 30분 동안 교반한 다음, 층들이 분리되도록 한다. 유기 상을 13% w/w 수성 NaCl로 세척한다. 그 다음, 유기 상을 여과하고, 농축하여 조약한 2-(3-(3급-부톡시카보닐)페닐)-3-메틸피리딘-1-옥사이드(95%)를 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접적으로 사용한다.

[0142] 3급-부틸-3-(6-아미노-3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트의 합성



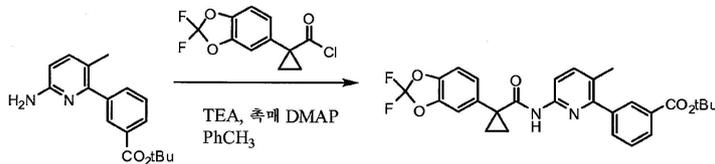
[0143]

[0144]

MeCN(8용적) 중의 2-(3-(3급-부톡시카보닐)페닐)-3-메틸피리딘-1-옥사이드(1당량) 및 피리딘(4당량) 용액을 70 °C로 가열한다. 온도를 75°C 미만으로 유지하면서 MeCN(2용적) 중의 무수 메탄설포산(1.5당량) 용액을 50분 동안 첨가 깔대기를 통해 가한다. 첨가가 완료된 후, 혼합물을 추가 0.5시간 동안 교반한다. 그 다음, 혼합물을 상온으로 냉각시킨다. 에탄올아민(10당량)을 첨가 깔대기를 통해 가한다. 2시간 동안 교반한 다음, 물(6용적)을 가하고, 혼합물을 10°C로 냉각한다. NLT 3시간 동안 교반한 다음, 고체를 여과로 수집하고, 물(3용적), 2:1 MeCN/물(3용적) 및 MeCN(2×1.5용적)으로 세척한다. 고체를 약한 N<sub>2</sub> 배출하에 50°C의 진공 오븐에서 일정한 중량(< 1% 차이)으로 건조시켜 3급-부틸-3-(6-아미노-3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트를 적황색 고체로서 수득한다(53% 수율).

[0145]

3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트의 합성



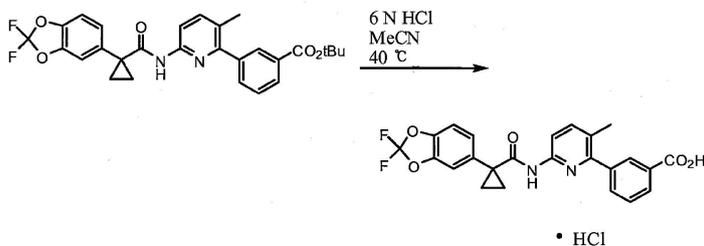
[0146]

[0147]

조약한 산 클로라이드를 톨루엔(산 클로라이드를 기준으로 2.5용적)에 용해시키고 첨가 깔대기를 통해 톨루엔(3급-부틸-3-(6-아미노-3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트를 기준으로 4 용적) 중의 3급-부틸-3-(6-아미노-3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트(1당량), 디메틸아미노피리딘(DMAP, 0.02당량) 및 트리에틸아민(3.0당량) 혼합물에 가한다. 2시간 후, 물(3급-부틸-3-(6-아미노-3-메틸피리딘-2-일)벤조에이트를 기준으로 4용적)을 반응 혼합물에 가한다. 30분 동안 교반한 다음, 층을 분리한다. 그 다음, 유기 상을 여과하고, 농축하여 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트의 진한 오일을 수득한다(정량 조약한 수율). MeCN(조약한 생성물을 기준으로 3용적)을 가하고, 결정이 발생할 때까지 증류한다. 물(조약한 생성물을 기준으로 2용적)을 가하고, 혼합물 2시간 동안 교반한다. 고체를 여과로 수집하고, 1:1(용적) MeCN/물(조약한 생성물을 기준으로 2×1용적)로 세척하고, 진공하에 필터 상에서 부분적으로 건조시킨다. 고체를 약한 N<sub>2</sub> 배출하에 60°C의 진공 오븐에서 일정한 중량(< 1% 차이)으로 건조시켜 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트를 갈색 고체로서 수득한다.

[0148]

3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산 · HCl 염의 합성



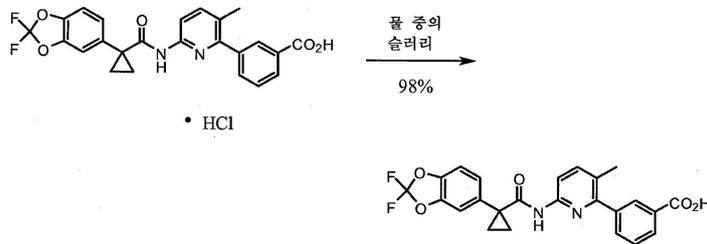
[0149]

[0150]

MeCN(3.0용적) 중의 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트(1.0당량) 현탁액에 물(0.83용적)을 가한 다음, 농축된 수성 HCl(0.83용적)을 가한다. 혼합물을 45 ± 5°C로 가열한다. 24 내지 48시간 동안 교반한 다음, 반응을 완료시키고, 혼합물이 상온으로 냉각되도록 한다. 물(1.33용적)을 가하고, 혼합물 교반한다. 고체를 여과로 수집하고, 물(2×0.3용

적)로 세척하고, 진공하에 필터 상에서 부분적으로 건조시킨다. 고체를 약한 N<sub>2</sub> 배출하에 60℃의 진공 오븐에서 일정한 중량(< 1% 차이)으로 건조시켜 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산·HCl을 회색 고체로서 수득한다.

[0151] 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산(형태 I)의 합성

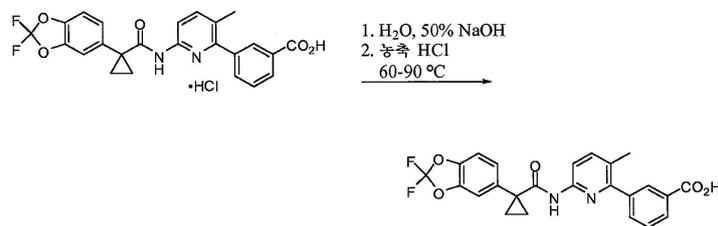


형태 I

[0152]

[0153] 물(10용적) 중의 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산·HCl(1당량) 현탁액을 상온에서 교반한다. 24시간 동안 교반한 다음, 샘플을 교반한다. 샘플을 여과하고, 고체를 물(2 x)로 세척한다. 고체 샘플을 DSC 분석한다. DSC 분석이 형태 I로의 완전한 전환을 지시할 때, 고체를 여과로 수집하고, 물(2×1.0용적)로 세척하고, 진공하에 필터 상에서 부분적으로 건조시킨다. 고체를 약한 N<sub>2</sub> 배출하에 60℃의 진공 오븐에서 일정한 중량(< 1% 차이)으로 건조시켜 형태 I을 회색 고체로서 수득한다(98% 수율). <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).

[0154] 물 및 염기를 사용하는 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산(형태 I)의 합성

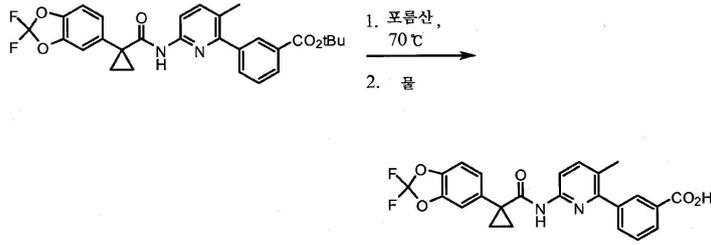


형태 I

[0155]

[0156] 상온에서 교반한 물(10용적) 중의 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산·HCl(1당량)의 현탁액에 50% w/w 수성 NaOH(2.5당량)를 가한다. 혼합물을 NLT 15분 동안 또는 균질한 용액이 될 때까지 교반한다. 농축 HCl(4당량)을 결정질 형태 I에 가한다. t-부틸벤조에이트 에스테르의 수준을 감소시켜야 할 필요가 있는 경우, 혼합물을 60 또는 90℃로 가열한다. HPLC 분석이 NMT 0.8%(AUC) t-부틸벤조에이트 에스테르를 지시할 때까지 혼합물을 가열한다. 그 다음, 혼합물을 상온으로 냉각시키고, 고체를 여과로 수집하고, 물로 세척하고(3×3.4용적), 진공하에 필터 상에서 부분적으로 건조시킨다. 고체를 약한 N<sub>2</sub> 배출하에 60℃의 진공 오븐에서 일정한 중량(< 1% 차이)으로 건조시켜 형태 I을 회색 고체로서 수득한다(97% 수율).

[0157] 벤조에이트로부터 직접적인 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복스아미도)-3-메틸피리딘-2-일)벤조산(형태 I)의 합성



형태 I

[0158]

[0159]

포름산(3.0용적) 중의 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트(1.0당량) 용액을 70 ± 10°C로 가열한다. 반응을 반응이 완료될 때까지(NMT 1.0% AUC 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트) 계속 반응시키거나 NMT 8시간 동안 가열한다. 혼합물이 상온으로 냉각되도록 한다. 용액을 50°C로 가열한 물(6용적)에 가하고, 혼합물을 교반한다. 그 다음, 3-(6-(1-(2,2-디플루오로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)사이클로프로판카복사미도)-3-메틸피리딘-2-일)-t-부틸벤조에이트가 NMT 0.8%(AUC)의 수준이 될 때까지 혼합물을 70 ± 10°C로 가열한다. 고체를 여과로 수집하고, 물(2×3용적)로 세척하고, 진공하에 필터 상에서 부분적으로 건조시킨다. 고체를 약한 N<sub>2</sub> 배출하에 60°C의 진공 오븐에서 일정한 중량(< 1% 차이)으로 건조시켜 형태 I의 화합물 1을 회색 고체로서 수득한다.

[0160]

형태 I의 화합물 1의 단결정 구조로부터 계산된 X선 회절 패턴을 도 1에 나타낸다. 도 1에 대해 계산된 피크를 표 1에 열거한다.

표 1

피크 순위	2θ 각 [°]	상대적인 세기 [%]
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

[0161]

[0162]

형태 I의 화합물 1의 실질적인 X선 분말 회절 패턴을 도 2에 나타낸다. 도 2에 대한 실질적인 피크를 표 2에 열거한다.

표 2

피크 순위	2θ 각 [°]	상대적인 세기 [%]
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

[0163]

- [0164] 형태 I의 화합물 1의 단결정 구조로부터 계산된 X선 회절 패턴과 형태 I의 화합물 1의 실질적인 X선 분말 회절 패턴의 오버레이를 도 3에 나타낸다. 상기 오버레이는 계산된 피크 위치와 실질적인 피크 위치 간의 양호한 일치율을 보여주고, 차이는 겨우 약 0.15° 이다.
- [0165] 형태 I의 화합물 1의 DSC 기록선을 도 4에 나타낸다. 형태 I의 화합물 1에 대한 용융은 약 204°C에서 발생한다.
- [0166] 단결정 X선 분석을 기초로 한 형태 I의 화합물 1의 입체형태도를 도 5 내지 8에 나타낸다. 도 6 내지 8은 이량체의 카복실산 그룹과 결정에서 발생한 결과적인 쌓여진 구조(stacking structure) 사이의 수소 결합을 보여준다. 상기 결정 구조는 분자의 조밀한 패키징을 드러낸다. 형태 I의 화합물 1은 다음 단위 격자 크기를 갖는 단사정계, P2<sub>1</sub>/n이다: a = 4.9626(7)Å, b = 12.299(2)Å, c = 33.075(4)Å, β = 93.938(9)°, V = 2014.0Å<sup>3</sup>, Z = 4. 구조 데이터로부터 계산된 형태 I의 화합물 1의 밀도는 100K에서 1.492g/cm<sup>3</sup>이다.
- [0167] 화합물 1의 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼은 도 9 내지 11에 나타낸다(도 9 및 10은 0.5 메틸 셀룰로스-폴리소르베이트 80 현탁액 중의 형태 I의 화합물 1 50mg/mL를 나타내고, 도 11은 HCl 염으로서의 화합물 1을 나타낸다).
- [0168] 하기 도 3은 화합물 1에 대한 추가의 분석 데이터를 나타낸다.

**표 3**

화합물 번호	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
1	453.3	1.93	H NMR (400 MHz, 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)

- [0169]
- [0170] 검정
- [0171] 화합물들의 ΔF508-CFTR 교정 특성의 검출 및 측정을 위한 검정
- [0172] 화합물들의 ΔF508-CFTR 조절 특성을 검정하기 위한 막 전위 광학적 방법
- [0173] 광학적 막 전위 검정은, 곤잘레스(Gonzalez) 및 첸(Tsien)에 의해 기재된 전압-감응성 FRET 센서[참조: Gonzalez, J. E. and R. Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells" Biophys J 69(4): 1272-80, and 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]를 전압/이온 프로브 리더(Voltage/Ion Probe Reader: VIPR)와 같은 형광 변화 측정용 장치[참조: Gonzalez, J. E., K. Oades, et al. (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" Drug Discov Today 4(9): 431-439]와 함께 사용하였다.
- [0174] 이들 전압 감응성 검정은, 막-가용성 전압-감응성 염료인 DiSBAC<sub>2</sub>(3)와 원형질 막의 바깥 판(leaflet)에 결합되고 FRET 공여체로서 작용하는 형광성 인지질인 CC2-DMPE 사이의 형광 공명 에너지 전송(FRET)의 변화를 기초로 한다. 막 전위(V<sub>m</sub>)의 변화로 인해, 음으로 하전된 DiSBAC<sub>2</sub>(3)가 원형질 막을 가로질러 재분배되며, 따라서 CC2-DMPE로부터 에너지 전달의 양이 변화한다. 형광 방출의 변화는, 96- 또는 384-웰 마이크로티터 플레이트에서 세포-기반 스크린을 수행하도록 설계된 통합된 액체 핸들러 및 형광 검출기인 VIPR™ II를 사용하여 모니터링되었다.
- [0175] 1. 교정 화합물의 확인
- [0176] ΔF508-CFTR과 관련된 왕래 결합을 교정하는 소분자를 확인하기 위해, 단일-첨가 HTS 검정 형식을 전개하였다. 세포를 혈청-무함유 배지에서 16시간 동안 37°C에서 시험 화합물의 존재 또는 부재(음성 대조군)하에 항온배양하였다. 양성 대조군으로서, 384-웰 플레이트에 위치한 세포를 16시간 동안 27°C에서 "올바른-온도"의 ΔF508-

CFTR로 배양하였다. 후속적으로, 상기 세포를 Krebs Ringers 용액으로 3회 행구고, 전압-감응성 염료로 로딩하였다. ΔF508-CFTR을 활성화하기 위해, 10 μM 포스콜린 및 CFTR 증강제(potentiator), 제니스테인(20 μM)을 Cl<sup>-</sup>-무함유 배지와 함께 각각의 웰에 가하였다. ΔF508-CFTR 활성화에 반응하여 Cl<sup>-</sup>-무함유 배지의 첨가는 Cl<sup>-</sup> 유출을 촉진하고, 수득된 막 탈분극은 FRET계 염료를 사용하여 광학적으로 모니터링하였다.

[0177] 2. 증강제 화합물의 확인

[0178] ΔF508-CFTR의 증강제를 확인하기 위해, 이중-첨가 HTS 검정 형식을 전개하였다. 첫 번째 첨가 동안, Cl<sup>-</sup>-무함유 배지를 시험 화합물과 함께 또는 시험 화합물 없이 각각의 웰에 가하였다. 22초 후, 2 내지 10 μM 포스콜린을 함유한 Cl<sup>-</sup>-무함유 배지의 두 번째 첨가를 가하여 ΔF508-CFTR을 활성화하였다. 두 첨가 후, 세포의 Cl<sup>-</sup> 농도는 28mM이었고, 이는 ΔF508-CFTR 활성화에 반응하여 Cl<sup>-</sup> 유출을 촉진하고, 수득된 막 탈분극은 FRET계 전압-센서 염료를 사용하여 광학적으로 모니터링하였다.

[0179] 3. 용액

[0180] 배스 용액 #1: (mM 단위) NaCl 160, KCl 4.5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, NaOH에 의한 pH 7.4.

[0181] 염화물-무함유 배스 용액: 배스 용액 #1 중의 염화물 염을 글루코네이트 염으로 치환한다.

[0182] CC2-DMPE: DMSO 중의 10mM 스톡 용액으로 제조하고 -20°C에서 저장한다.

[0183] DiSBAC<sub>2</sub>(3): DMSO 중의 10mM 스톡으로 제조하고 -20°C에서 저장한다.

[0184] 4. 세포 배양

[0185] ΔF508-CFTR을 안정하게 발현하는 NIH3T3 마우스 섬유아세포를 막 전위의 광학적 측정을 위해 사용한다. 상기 세포를, 175cm<sup>2</sup> 배양 플라스크에서 2mM 글루타민, 10% 소 태아 혈청, 1 X NEAA, β-ME, 1 X pen/strep 및 25mM HEPES로 보충된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 90% 습도에서 유지하였다. 모든 광학적 검정을 위해, 세포를 384-웰 매트릭스-피복된 플레이트에서 30,000/웰로 집중하고, 증강제 검정을 위해 27°C에서 24시간 동안 배양하기 전에 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. 교정 검정을 위해, 세포를 27°C 또는 37°C에서 화합물과 함께 또는 화합물 없이 16 내지 24시간 동안 배양한다.

[0186] 화합물의 ΔF508-CFTR 조절 특성을 검정하기 위한 전기생리학적 검정

[0187] 1. 유성 챔버 검정

[0188] 유성 챔버(ussing chamber) 실험은 ΔF508-CFTR 발현하는 분극된 상피 세포 상에 수행하여, 추가로 광학적 검정에서 확인된 ΔF508-CFTR 조절제를 추가로 특성화한다. Costar Snapwell(Costar Snapwell) 세포 배양 삽입물에서 성장한 FRT<sup>ΔF508-CFTR</sup> 상피 세포를 유성 챔버(Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA)에 끼워넣고, 단일층을 전압 클램프 시스템(Department of Bioengineering, University of Iowa, IA, and, Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA)을 사용하여 계속 단락시켰다. 2mV 펄스를 적용하여 정상피 내성을 측정하였다. 이들 조건하에, FRT 상피는 4KΩ/cm<sup>2</sup> 이상의 내성을 증명하였다. 용액을 27°C에서 유지하고 공기로 버블링시켰다. 전극 오프셋 전위 및 유체 저항을 세포-무함유 삽입물 사용하여 교정하였다. 이들 조건하에, 전류는 꼭지면 막에서 발현된 ΔF508-CFTR을 통해 Cl<sup>-</sup>의 흐름을 반영한다. I<sub>sc</sub>는 MP100A-CE 인터페이스 및 AcqKnowledge 소프트웨어(v3.2.6; BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA)를 사용하여 디지털로 수득하였다.

[0189] 2. 교정 화합물의 확인

[0190] 전형적인 프로토콜은 꼭지면 막 Cl<sup>-</sup> 농도 구배에 대한 기저외측을 사용하였다. 당해 구배를 설정하기 위해, 정상 링거를 기저외측 막에 사용한 반면, 꼭지면 NaCl은 동몰량의 나트륨 글루코네이트(NaOH로 pH 7.4로 적정됨)로 교체하여, 상피를 가로지르는 큰 Cl<sup>-</sup> 농도 구배를 수득하였다. 모든 실험은 손상되지 않은 단일층으로 수행하였다. ΔF508-CFTR을 완전하게 활성화하기 위해, 포스콜린(10 μM) 및 PDE 억제제인 IBMX(100 μM)를 적용한 다음, CFTR 증강제인 제니스테인(50 μM)을 첨가하였다.

[0191] 다른 세포 유형에서 관찰된 바와 같이, ΔF508-CFTR을 안정하게 발현하는 FRT 세포의 저온 배양은 원형질

막에서 CFTR의 기능적 밀도를 증가시킨다. 교정 화합물의 활성을 측정하기 위해, 세포를 시험 화합물 10 μM과 함께 24시간 동안 37°C에서 배양한 다음, 기록 전에 3회 세척하였다. 화합물-처리된 세포에서 cAMP- 및 제니스테인-매개된 I<sub>sc</sub>를 27°C 및 37°C 대조군으로 표준화하고, 백분율 활성으로서 표현하였다. 교정 화합물이 있는 세포의 전배양은 37°C 대조군에 비해 cAMP- 및 제니스테인-매개된 I<sub>sc</sub>를 뚜렷하게 증가시켰다.

[0192] 3. 증강제 화합물의 확인

[0193] 전형적인 프로토콜은 꼭지면 막 Cl<sup>-</sup> 농도 구배에 대한 기저외측을 사용하였다. 당해 구배를 설정하기 위해, 정상 링거를 기저외측 막에 사용하고, 니스타틴(360 μg/ml)으로 투과화한 반면, 꼭지면 NaCl은 동몰량의 나트륨 글루코네이트(NaOH로 pH 7.4로 적정됨)로 교체하여 상피를 가로지르는 큰 Cl<sup>-</sup> 농도 구배를 수득하였다. 모든 실험은 니스타틴 투과화 30분 후 수행하였다. 포스콜린(10 μM) 및 모든 시험 화합물을 세포 배양 삽입물의 양 측에 가하였다. 추정되고 있는 ΔF508-CFTR 증강제의 효능을 공지된 증강제, 제니스테인의 효능과 비교하였다.

[0194] 4. 용액

[0195] 기저외측 용액(mM 단위): 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-하이드록시에틸피페라진-N'-2-에탄설포산(HEPES)(10) 및 텍스트로스(10). 용액은 NaOH로 pH 7.4로 적정하였다.

[0196] 꼭지면 용액(mM 단위): NaCl를 Na 글루코네이트(135)로 교체한 기저외측 용액과 동일하다.

[0197] 5. 세포 배양

[0198] ΔF508-CFTR(FRT<sup>ΔF508 CFTR</sup>)을 발현하는 피셔 랫트 상피(FRT: Fisher rat epithelial) 세포를 본원의 광학적 검정으로부터 확인된 추정되고 있는 ΔF508-CFTR 조절제를 위한 유성 챔버 실험에 사용하였다. 상기 세포를 Costar Snapwell 세포 배양 삽입물 상에서 배양하고, 5% 소 태아 혈청, 100U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 쿤 변형 햄 F-12 배지(Coon's modified Ham's F-12 medium)에서, 5일 동안 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 화합물들의 증강제 활성을 특성화하기 위해 사용하기 전에, 세포를 27°C에서 16 내지 48시간 동안 배양하여 ΔF508-CFTR을 위해 교정하였다. 교정 화합물들의 활성을 측정하기 위해, 세포를 27°C 또는 37°C에서 화합물과 함께 또는 화합물 없이 24시간 동안 배양하였다.

[0199] 6. 전세포 기록

[0200] ΔF508-CFTR을 안정하게 발현하는 온도-교정되고 시험 화합물-교정된 NIH3T3 세포에서 거시적 ΔF508-CFTR 전류(I<sub>ΔF508</sub>)를 천공된-패치, 전세포 기록을 사용하여 모니터링하였다. 간략하게, I<sub>ΔF508</sub>의 전압-클램프 기록은 Axopatch 200B 패치-클램프 증폭기(Axon Instruments Inc., Foster City, CA)를 사용하여 실온에서 수행하였다. 모든 기록은 10kHz의 샘플링 주파수에서 수득하고, 1kHz에서 로우-패스(low-pass) 여과하였다. 피펫은, 세포내 용액으로 충전된 경우, 저항이 5 내지 6MΩ이었다. 이들 기록 조건하에, 실온에서 Cl<sup>-</sup>에 대해 계산된 역 전위(E<sub>Cl</sub>)는 -28mV이었다. 모든 기록은 셀 저항이 > 20GΩ이고, 시리즈 저항이 < 15MΩ이었다. 펄스 발생, 데이터 수득 및 분석은 Clampex 8(Axon Instruments Inc.)와 함께 Digidata 1320 A/D 인터페이스가 갖춰진 PC를 사용하여 수행하였다. 배스는 식염수 250 μl 미만을 함유하고, 중력에 의한 살포(perfusion) 시스템을 사용하여 2ml/min의 속도로 계속 살포하였다.

[0201] 7. 교정 화합물의 확인

[0202] 원형질 막에서의 기능적 ΔF508-CFTR의 밀도의 증가를 위해 교정 화합물의 활성을 측정하기 위해, 상기 기재된 천공된-패치 기록 기술을 사용하여, 교정 화합물로의 24시간 처리 후의 전류 밀도를 측정하였다. ΔF508-CFTR을 완전히 활성화하기 위해, 10 μM 포스콜린 및 20 μM 제니스테인을 세포에 가하였다. 우리의 기록 조건하에, 27°C에서 24시간 항온배양 후의 전류 밀도는, 관찰된 37°C에서 24시간 항온배양 후 보다 높았다. 이들 결과는 원형질 막에서 ΔF508-CFTR의 밀도에서 저온 항온배양의 공지된 효과와 일치하였다. CFTR 전류 밀도에서 교정 화합물의 효과를 측정하기 위해, 상기 세포를 24시간 동안 37°C에서 시험 화합물 10 μM와 항온배양하고, 전류 밀도를 27°C 및 37°C 대조군(% 활성)과 비교하였다. 기록하기 전에, 상기 세포를 세포외 기록 배지로 3회 세척하여 임의의 잔여 시험 화합물을 제거하였다. 교정 화합물 10 μM과의 전배양은, 37°C 대조군과 비교하여 cAMP- 및 제니스테인-의존성 전류를 뚜렷하게 증가시켰다.

- [0203] 8. 증강제 화합물의 확인
- [0204] ΔF508-CFTR을 안정하게 발현하는 NIH3T3 세포에서 거시적인 ΔF508-CFTR Cl<sup>-</sup> 전류(I<sub>ΔF508</sub>)를 증가시키는 ΔF508-CFTR 증강제의 능력을 또한 천공된-패치-기록 기술을 사용하여 조사하였다. 광학적 검정으로부터 확인된 증강제는, 광학적 검정에서 관찰된 유사한 효과 및 효능을 가진 I<sub>ΔF508</sub>에서 용량-의존적 증가를 유발하였다. 모든 시험된 세포에서, 증강제 적용 전 및 적용 동안의 역 전위는 계산된 E<sub>Cl</sub>(-28mV)인 약 -30mV이었다.
- [0205] 9. 용액
- [0206] 세포내 용액(mM 단위): Cs-아스파르테이트(90), CsCl(50), MgCl<sub>2</sub>(1), HEPES(10) 및 240μg/ml 암포테리신-B(pH는 CsOH에 의해 7.35으로 조절하였다).
- [0207] 세포외 용액(mM 단위): N-메틸-D-글루카민(NMDG)-Cl(150), MgCl<sub>2</sub>(2), CaCl<sub>2</sub>(2), HEPES(10)(pH는 HCl에 의해 7.35으로 조절하였다).
- [0208] 10. 세포 배양
- [0209] ΔF508-CFTR을 안정하게 발현하는 NIH3T3 마우스 섬유아세포를 전세포 기록에 사용한다. 상기 세포를 175cm<sup>2</sup> 배양 플라스크에서 2mM 글루타민, 10% 소 태아 혈청, 1 X NEAA, β-ME, 1 X pen/strep 및 25mM HEPES로 보충된 둘베코 변형 이글 배지에서, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 90% 습도에서 유지하였다. 전세포 기록을 위해, 2,500 내지 5,000개의 세포를 폴리-L-라이신-피복된 유리 커버슬립 상에 접종하고, 증강제의 활성의 시험에 사용하기 전에 27°C에서 24 내지 48시간 동안 배양하고, 교정자의 활성을 측정하기 위한 37°C에서 교정 화합물과 함께 또는 교정 화합물 없이 항온배양하였다.
- [0210] 11. 단일-채널 기록
- [0211] NIH3T3 세포에서 안정하게 발현되는 온도-교정된 ΔF508-CFTR의 단일-채널 활성 및 증강제 화합물의 활성을, 제거된 뒤집힌 패치를 사용하여 관찰하였다. 간략하게, 단일-채널 활성의 전압-클램프 기록을 Axopatch 200B 패치-클램프 증폭기(Axon Instruments Inc.)로 실온에서 수행하였다. 모든 기록은 10kHz의 샘플링 주파수에서 취득하고, 400Hz에서 로우-패스 여과하였다. 패치 피펫은 Corning Kovar Sealing #7052 유리(World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL)로 제작되고, 세포외 용액으로 충전된 경우, 저항이 5 내지 8MΩ이었다. 1mM Mg-ATP 및 cAMP-의존성 단백질 키나제, 촉매 아단위(PKA; Promega Corp. Madison, WI) 75nM를 가함으로써 제거한 후에 ΔF508-CFTR을 활성화하였다. 채널 활성이 안정화된 후, 패치를 중력에 의한 마이크로살포 시스템을 사용하여 살포하였다. 유입물을 패치 근처에 두고, 1 내지 2초 내에 완전한 용액 변화를 야기하였다. 빠른 살포 동안 ΔF508-CFTR 활성을 유지하기 위해, 비특이적 포스파타제 억제제 F<sup>-</sup>(10mM NaF)를 배스 용액에 가하였다. 이들 기록 조건하에, 채널 활성이 패치 기록 기간(50분 이하)에 걸쳐 일정하게 유지되었다. 세포내 용액으로부터 세포외 용액으로의 양전하 이동에 의해 생성된 전류(반대 방향으로의 음이온 이동)는 양성 전류로서 나타난다. 피펫 전위(V<sub>p</sub>)는 80mV로 유지되었다.
- [0212] 채널 활성을 2개 이하의 활성 채널을 함유하는 막 패치로부터 분석하였다. 동시 개방의 최대 수는 실험의 진행 동안 활성 채널의 수를 결정하였다. 단일-채널 전류 진폭을 측정하기 위해, 120초로부터 기록된 ΔF508-CFTR 활성의 데이터를 100Hz에서 "오프라인(off-line)"으로 여과한 다음, 이를, Bio-Patch 분석 소프트웨어(Bio-Logic Comp. France)를 사용하여 멀티가우시안 함수를 갖춘 올-포인트(all-point) 진폭 히스토그램을 그리기 위해 사용하였다. 전체 거시적 전류 및 개방 가능성(open probability)(P<sub>0</sub>)은 채널 활성의 120초로부터 측정하였다. P<sub>0</sub>를 바이오-패치 소프트웨어를 사용하거나 관계식 P<sub>0</sub> = I/i(N)으로부터 측정하였고, 여기서 I는 평균 전류이고, i는 단일-채널 전류 진폭이고, N은 패치의 활성 채널의 수이다.
- [0213] 12. 용액
- [0214] 세포외 용액(mM 단위): NMDG(150), 아스파르트산(150), CaCl<sub>2</sub>(5), MgCl<sub>2</sub>(2) 및 HEPES(10)(pH는 트리스 염기에 의해 7.35으로 조절하였다).
- [0215] 세포내 용액(mM 단위): NMDG-Cl(150), MgCl<sub>2</sub>(2), EGTA(5), TES(10) 및 트리스 염기(14)(pH는 HCl에 의해 7.35로 조절하였다).

[0216] 13. 세포 배양

[0217] ΔF508-CFTR을 안정하게 발현하는 NIH3T3 마우스 섬유아세포를 절단된-막 패치-클램프 기록에 사용한다. 상기 세포를, 175cm<sup>2</sup> 배양 플라스크에서 2mM 글루타민, 10% 소 태아 혈청, 1 X NEAA, β-ME, 1 X pen/strep 및 25mM HEPES로 보충된 돌베코 변형 이글 배지에서, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 90% 습도에서 유지한다. 단일 채널 기록을 위해, 2,500 내지 5,000개의 세포를 폴리-L-라이신-피복된 유리 커버슬립 상에 접종하고, 사용 전에 27°C에서 24 내지 48시간 동안 배양하였다.

[0218] 상기 기재된 과정을 사용하여, 화합물 1의 활성, 즉, EC50를 측정하고 표 4에 나타낸다.

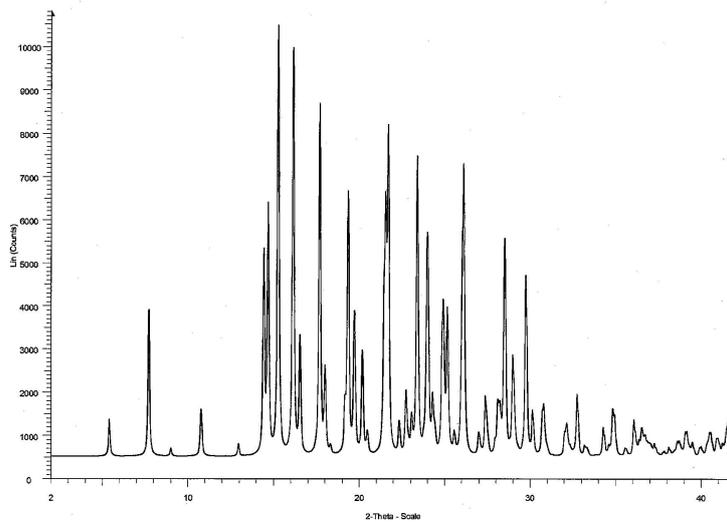
표 4

IC50/EC50 Bins: +++ <= 2.0 < ++ <= 5.0 < +		
PercentActivity Bins: + <= 25.0 < ++ <= 100.0 < +++		
화합물 번호	BinnedEC50	BinnedMaxEfficacy
1	+++	+++

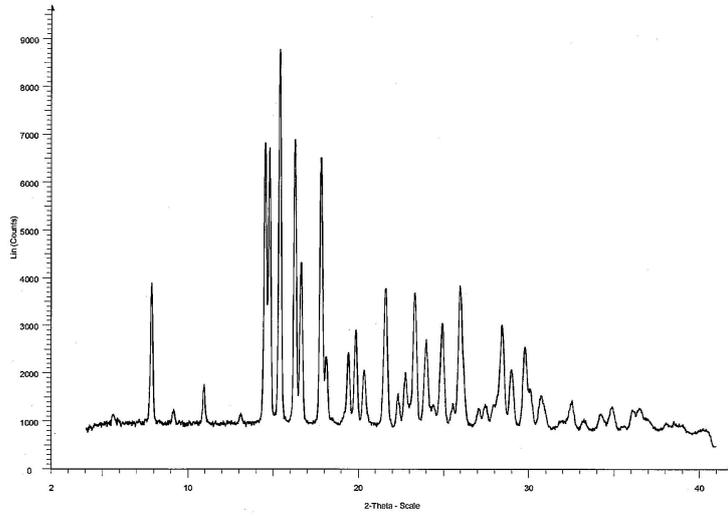
[0219]

도면

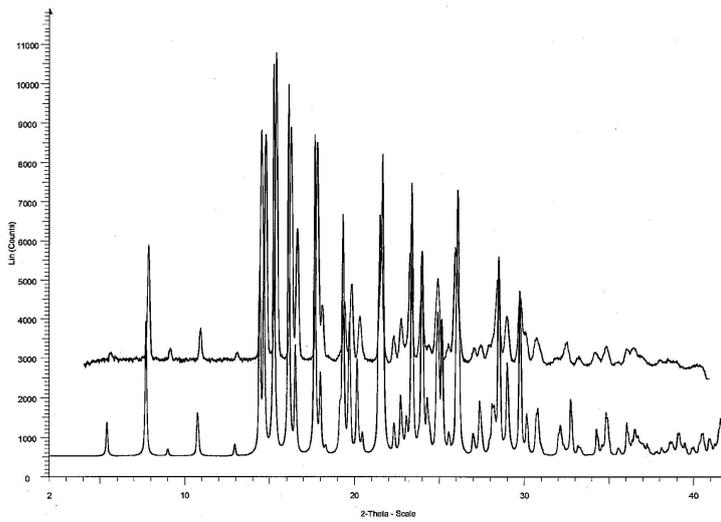
도면1



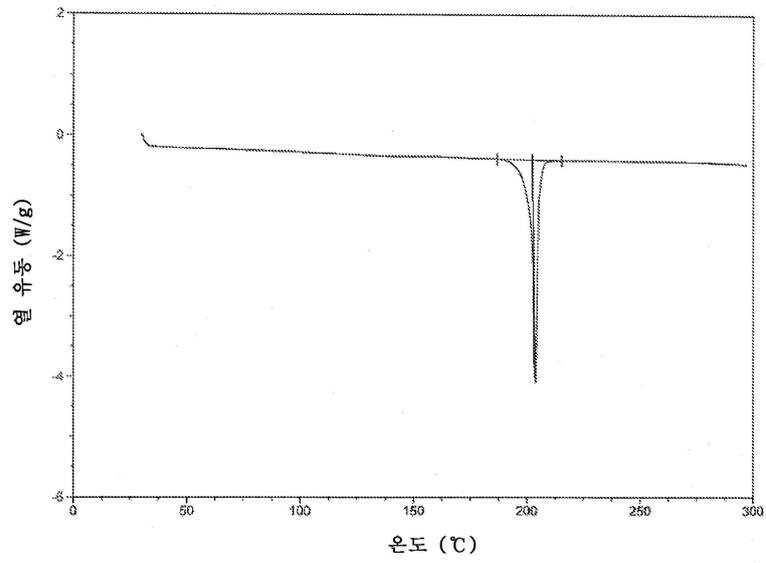
도면2



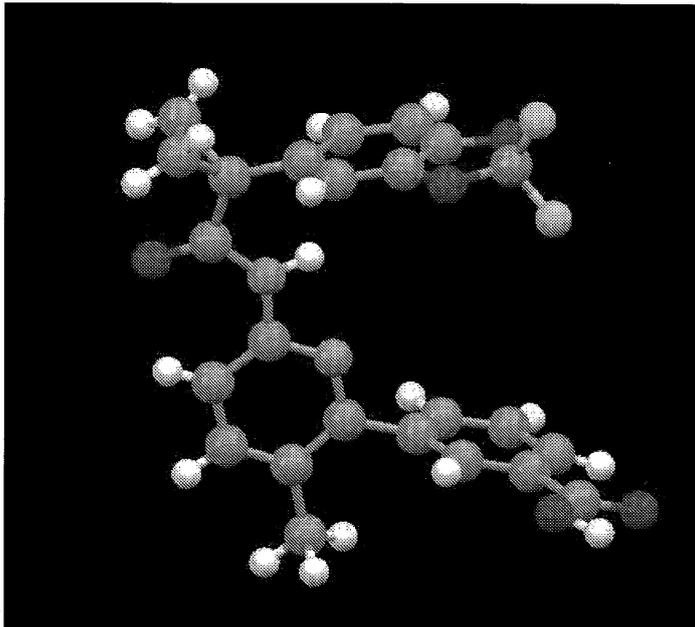
도면3



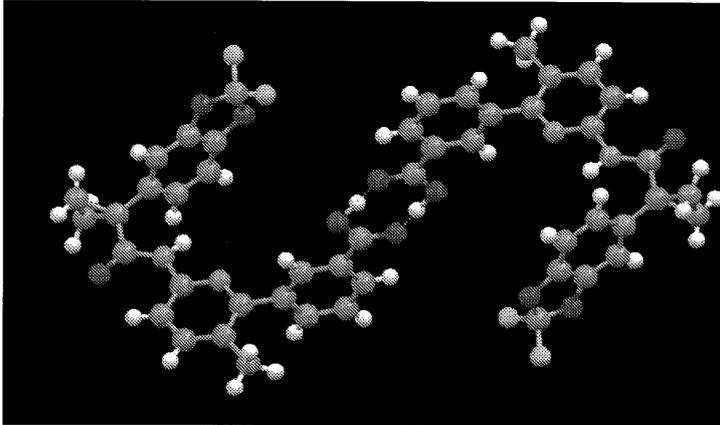
도면4



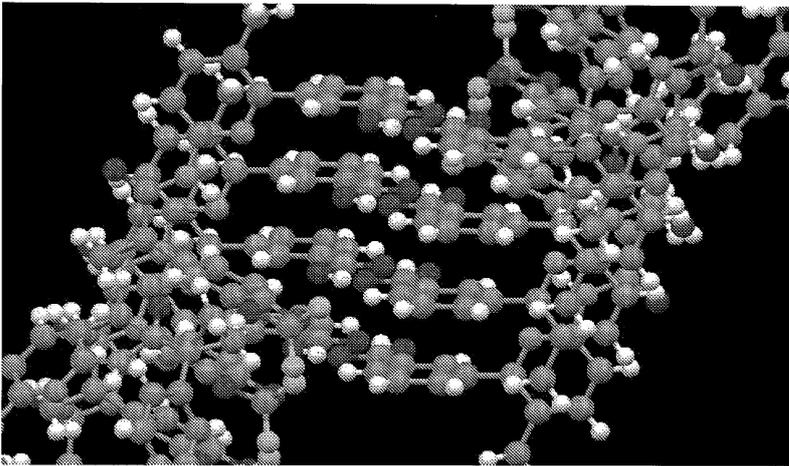
도면5



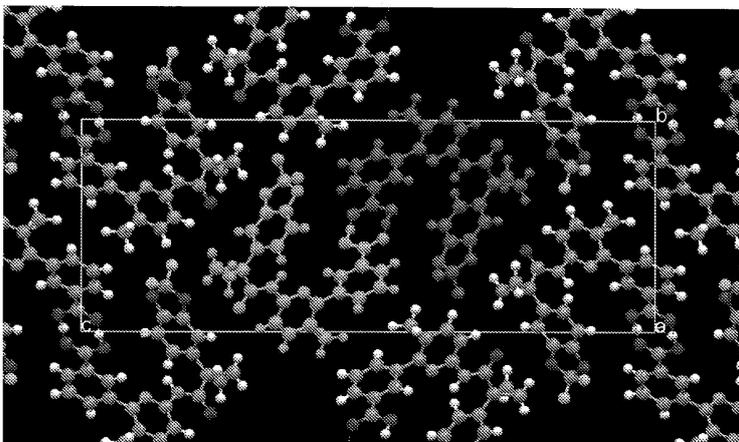
도면6



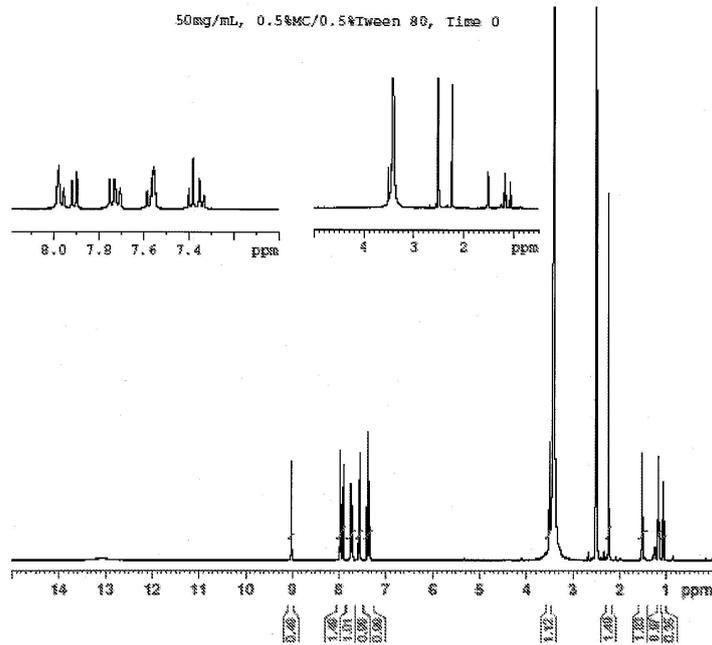
도면7



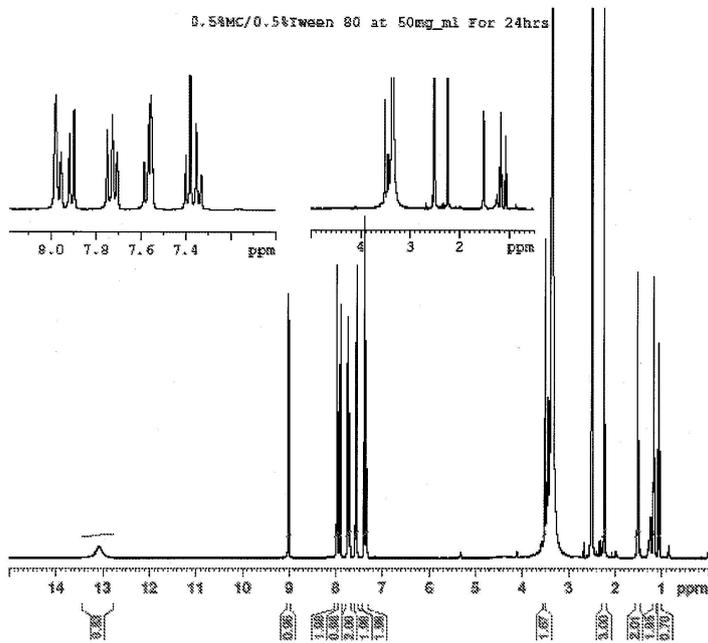
도면8



도면9



도면10



도면11

