



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102534** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C07D 405/12 (2006.01)
A61K 31/443 (2006.01)
A61P 11/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

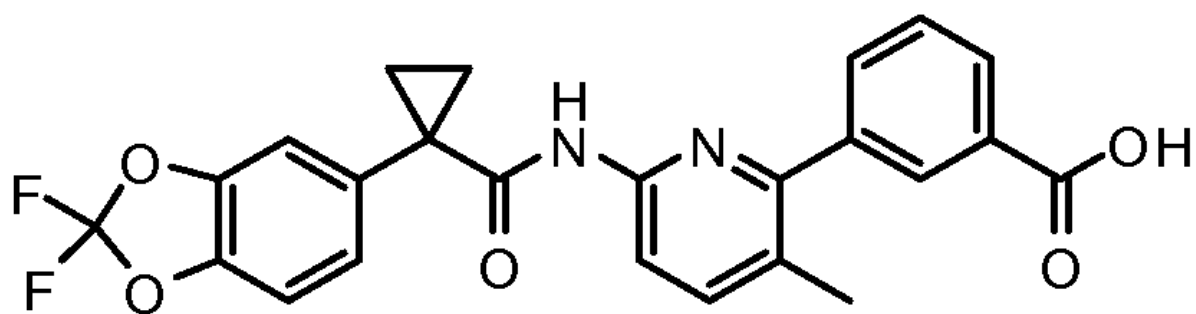
(21) Номер заявки: а 2010 08467	(72) Винахідник(и): Кесхаварз-Схокрі Алі (US), Чжан Бейлі (US), Кравец Маріуш (US)
(22) Дата подання заявки: 04.12.2008	
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.07.2013	
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/012,162	(73) Власник(и): ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ІНКОРПОРЕЙТЕД, 130 Waverly Street, Cambridge, MA 02139, United States of America (US)
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 07.12.2007	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007/056341 A (VERTEX PHARMA [US]; HADIDA RUAN SARA [US]; HAMILTON MATTHEW [US]; MILL), 18.05.2007
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.10.2010, Бюл.№ 19	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2013, Бюл.№ 14	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/US2008/085456, 04.12.2008	

(54) ТВЕРДА ФОРМА 3-(6-(1-(2,2-ДИФТОРБЕНЗО[d][1,3]-ДІОКСОЛ-5-ІЛ)-ЦИКЛОПРОПАНКАРБОКСА-МІДО)-3-МЕТИЛПІРИДИН-2-ІЛ)БЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТИ (ВАРІАНТИ)

(57) Реферат:

Винахід стосується по суті кристалічної форми вільної твердої речовини, 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти (Форма 1) формули 1, фармацевтичних композицій, що містять дану речовину, і її застосування в способах лікування.

UA 102534 C2



Сполука 1

ОПИС

Перехресне посилання на споріднену заявку

Ця заявка вимагає пріоритет згідно з § 11935 U.S.C. по Попередній Заявці на патент Сполучених Штатів № 61/012162, поданій 7 грудня 2007, вміст якої в повному обсязі включений в даний опис шляхом посилання.

Галузь техніки

Даний винахід стосується твердих форм, наприклад кристалічних форм, 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти, фармацевтичних композицій на їх основі і способів їх одержання.

Рівень техніки

Трансмембранний регулятор муковісцидозу (TPM) (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR) є аніонним каналом, опосередкованим цАМФ/АТФ, який експресується у множині типів клітин, включаючи абсорбційні і секреторні клітини епітелію, де він регулює потік аніонів через мембрану, так само як активність інших іонних каналів і білків. У клітинах епітелію нормальне функціонування TPM є важливим для підтримання транспорту електролітів у всьому організмі, включаючи дихальну і травну тканину. TPM складається з приблизно 1480 амінокислот, які кодують білок, що складається з тандемного повтору трансмембранних доменів, кожний з яких містить шість трансмембранних спіралей і нуклеотидзв'язувальний домен. Ці два трансмембранних домени зв'язані великим, полярним, регуляторним (R)-доменом з численними ділянками фосфорилювання, які регулюють активність каналу і клітинну міграцію.

Ген, що кодує TPM, був ідентифікований і секвенований (див. Gregory R. J., et al., (1990) Nature, 347: 382-386; Rich D. P., et al., (1990) Nature, 347: 358-362, Riordan, J. R., et al., (1989) Science, 245: 1066-1073). Дефект в цьому гені викликає мутації в TPM, які приводять до муковісцидозу, найпоширенішому смертельному генетичному захворюванню у людей. Муковісцидозом уражене приблизно одне з кожних 2500 немовлят в Сполучених Штатах. З всього населення Сполучених Штатів до 10 мільйонів чоловік несуть єдину копію дефектного гена без очевидного виявлення захворювання. Навпаки, люди з двома копіями гена, пов'язаного з муковісцидозом, страждають від ослаблення і фатальних ефектів муковісцидозу, включаючи хронічне захворювання легень.

У хворих муковісцидозом, мутації в TPM, ендегенно експресовані в дихальному епітелії, приводять до зниженої секреції апікальних аніонів, викликаючи нестабільність транспорту іонів і флюїду. Виникаюче зниження транспорту аніонів додає внесок в підвищене накопичення слизу в легенях і супутні мікробні інфекції, які, зрештою, викликають смерть хворих муковісцидозом. На доповнення до респіраторних захворювань хворі муковісцидозом звичайно страждають від шлунково-кишкових проблем і панкреатичної недостатності, яка, якщо її не лікувати, закінчується смертю. Крім того, більшість чоловіків з муковісцидозом безплідні, а плідність серед жінок з муковісцидозом знижується. На відміну від важких ефектів двох копій гена, пов'язаного з муковісцидозом, люди з єдиною копією гена, пов'язаного з муковісцидозом, демонструють підвищену стійкість до холери і дегідратації, що відбувається через пронос, що можливо пояснюється відносно високою частотою гена муковісцидозу в межах популяції.

Секвенування гена TPM хромосом муковісцидозу показало наявність множини мутацій, що викликають захворювання (Cutting, G.R., et al., (1990) Nature 346: 366-369; Dean, M., et al., (1990) Cell 61: 863-870; Kerem, B-S. et al., (1989) Science 245:1073-1080; and Kerem, B-S., et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Science 87: 8447-8451). До цього часу було ідентифіковано більше 1000 мутацій в гені муковісцидозу, які викликають захворювання, (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Найпоширенішою мутацією є усунення фенілаланіну в положенні 508 послідовності амінокислот TPM, і вона звичайно згадується як ΔF508-TPM. Ця мутація зустрічається приблизно у 70 % випадків муковісцидозу і пов'язана з важким захворюванням.

Видалення залишку 508 в ΔF508-TPM перешкоджає тому, щоб білок, що формується, склався правильно. Це приводить до нездатності білка-мутанта до виходу з ендоплазматичної мережі (ЕМ) і руху до плазматичної мембрани. В результаті кількість каналів, присутніх в мембрані, набагато менше, ніж спостерігається в клітинах, експресуючих дикий тип TPM. На доповнення до ослабленої міграції мутація приводить до дефекту ворітного механізму іонних каналів. Разом з тим, скорочена кількість каналів в мембрані і дефектний ворітний механізм іонних каналів приводять до зниженого транспорту аніонів через епітелій, що приводить до дефектного іонного і рідинного транспорту іонів і флюїду. (Quinton, P. M. (1990) FASEB J. 4: 2709-2727). Дослідження показали, однак, що знижена кількість ΔF508-TPM в мембрані функціональне, хоч і менше, ніж TPM дикого типу (Dalemans et al., (1991) Nature Lond. 354: 526-528; Denning et al., Supra; Pasyk і Foskett (1995), J. Cell. Biochem., 270: 12347-50). На доповнення до ΔF508-TPM, інші мутації в TPM, що викликають захворювання, які приводять до дефектної

міграції, синтезу, і (або) ворітного механізму, могли з підвищенням або пониженням регулюватися так, щоб змінити секрецію аніона і перебіг захворювання і (або) його тяжкість.

Хоч ТРМ транспортує множинну молекул на доповнення до аніонів, ясно, що ця роль (транспорт аніонів) представляє один елемент у важливому механізмі транспортування іонів і води через епітелій. Інші елементи включають епітеліальний Na^+ канал, ENaC , $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ співтранспортер, насос Na^+/K^+ -АТФази і базолатеральні мембранні K^+ канали, які відповідальні за накопичення хлориду в клітині.

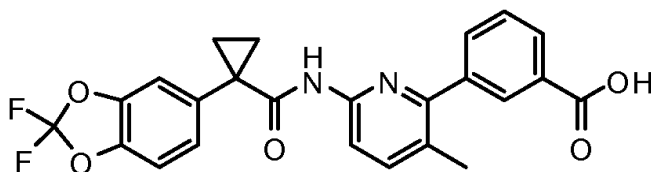
Ці елементи працюють разом, щоб досягнути направленою транспорту через епітелій шляхом їх селективної експресії і локалізації в межах клітини. Поглинання хлориду має місце за рахунок скоординованої активності ENaC і ТРМ, присутніх на апікальній мембрані, і насоса Na^+/K^+ -АТФази і каналів Cl^- , експресованих на базолатеральній поверхні клітини. Вторинний активний транспорт хлориду від сторони просвіту приводить до накопичення внутрішньоклітинного хлориду, який може потім пасивно залишити клітину через Cl^- канали, приводячи до векторного транспорту. Розташування $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ співтранспортера, насоса Na^+/K^+ -АТФази і базолатеральних мембранних K^+ каналів на базолатеральній поверхні і ТРМ на стороні просвіту координують секрецію хлориду за допомогою ТРМ на стороні просвіту. Оскільки вода, ймовірно, активно ніколи не транспортується сама по собі, її потік через епітелій залежить від крихітних трансепітеліальних осмотичних градієнтів, вироблених об'ємним потоком натрію і хлориду.

Як обговорено вище, вважається, що делеція залишку 508 в ΔF508 -ТРМ перешкоджає тому, щоб білок, що формується, склався правильно, що приводить до нездатності цього білка-мутанта вийти з ендоплазматичного ретикулума (ЕР) і рухатися до плазматичної мембрани. В результаті недостатня кількість зрілого білка присутня біля плазматичної мембрани, і транспорт хлориду в межах епітеліальних тканин значно знижується. Фактично, як показано, це клітинне явище дефектного ЕР, що оброблює АВС-транспортери механізмом ЕР, є основою не тільки муковісцидозу, але і широкого кола інших ізольованих і спадкових хвороб. Два шляхи, по яких механізм ЕР може не спрацювати, є або втратою зв'язку з відведенням ЕР білків, що приводить до розкладання, або накопиченням ЕР цих дефектних/неправильно складених білків [Aridor M., et al., *Nature Med.*, 5(7), 745-751 (1999); Shastry, B.S., et al., *Neurochem. International*, 43, 1-7 (2003); Rutishauser, J., et al., *Swiss Med. Wkly*, 132, 211-222 (2002); Morello, J.P., et al., *TIPS*, 21, 466-469 (2000); Bross P., et al., *Human Mut.*, 14, 186-198 (1999)].

3-(6-(1-(2,2-Дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойна кислота у формі солі розкрита в міжнародній публікації РСТ WO 2007056341 (вказана публікація включається тут посиланням повністю) як модулятор активності ТРМ і, таким чином, корисна в лікуванні ТРМ-опосередкованих хвороб, таких як муковісцидоз. Однак, є потреба в стійких твердих формах вказаної сполуки, які можуть легко використовуватися в фармацевтичних композиціях, придатних для використання як терапевтичні засоби.

Суть винаходу

Даний винахід стосується твердих форм 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти (надалі "Сполука 1"), яка має нижченаведену структуру:



Сполука 1

Сполука 1 і її фармацевтично прийнятні композиції корисні для лікування або зменшення тяжкості муковісцидозу. У одному аспекті Сполука 1 знаходиться в по суті кристалічній і несольовій формі, називаній Форма 1, як описано і характеризувано тут.

Процеси, описані тут, можуть використовуватися, щоб одержати композиції за цим винаходом, які включають Форму 1. Кількість і особливості компонентів, використовуваних в процесах, будуть такими, як описані тут.

Короткий опис креслень

Фіг.1 є спектром дифракції рентгенівських променів, розрахованим зі структури монокристала Сполуки 1 у Формі 1.

Фіг. 2 є реальним спектром дифракції рентгенівських променів Сполуки 1 у Формі 1.

Фіг. 3 є накладенням спектра дифракції рентгенівських променів, розрахованого зі структури монокристала Сполуки 1 у Формі 1, і реального спектра дифракції рентгенівських променів Сполуки 1 у Формі 1.

Фіг. 4 є кривою диференціальної скануючої калориметрії (ДСК) Сполуки 1 у Формі 1.

5 Фіг. 5 є конформаційною картиною Сполуки 1 у Формі 1 на основі рентгенографічного аналізу монокристала.

Фіг. 6 є конформаційною картиною Сполуки 1 у Формі 1 на основі рентгенографічного аналізу монокристала димеру, що утворився за допомогою карбоксильної групи.

10 Фіг. 7 є конформаційною картиною Сполуки 1 у Формі 1 на основі рентгенографічного аналізу монокристала, який показує, що молекули складаються купкою один над одним.

Фіг. 8 є конформаційною картиною Сполуки 1 у Формі 1 на основі рентгенографічного аналізу монокристала, що показує інший вигляд (вниз по (a)).

Фіг. 9 є ^1H ЯМР спектром Сполуки 1 у Формі 1 в 50 мг/мл суспензії 0,5 метилцелюлози полісорбату 80 при T(0).

15 Фіг. 10 є ^1H ЯМР спектром Сполуки 1 у Формі 1 в 50 мг/мл суспензії 0,5 метилцелюлози полісорбату 80 після зберігання при кімнатній температурі протягом 24 год.

Фіг. 11 є ^1H ЯМР спектром Сполуки 1 \times HCl стандарт.

Докладний опис винаходу

Визначення

20 Як використовується тут, наступні визначення повинні застосовуватися, якщо інакше не зазначено.

Термін "TPM", як використовується тут, означає трансмембранний регулятор муковісцидозу або його мутацію, здатну виявляти активність регулятора, включаючи, але не обмежуючись ними, $\Delta\text{F508-TPM}$ і G551D TPM (див., наприклад, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, для мутацій TPM).

25 Як використовується тут, "кристалічний" стосується сполук або складів, де структурні одиниці організовані в фіксовані геометричні структури або решітки так, що кристалічні тверді тіла мають твердий дальній порядок діапазону. Структурні одиниці, які складають кристалічну структуру, можуть бути атомами, молекулами або іонами. Кристалічні тверді речовини показують певну температуру плавлення.

Термін "модулюючий", як використовується тут, означає збільшення або зменшення, наприклад, активності, у вимірній кількості.

35 У одному аспекті винахід має форму 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти, що характеризується як Форма 1.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 характеризується одним або більше піками при 15,2-15,6 градусах, 16,1-16,5 градусах і 14,3-14,7 градусах на порошковій рентгенограмі, одержаній з використанням $\text{CuK}\alpha$ -випромінювання.

40 У іншому варіанті здійснення Форма 1 характеризується одним або більше піками при 15,4, 16,3 і 14,5 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 14,6-15,0 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 14,8 градусах.

45 У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 17,6-18,0 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 17,8 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 16,4-16,8 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 16,6 градусах.

50 У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 7,6 8,0 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 7,8 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 25,8-26,2 градусах.

55 У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 26,0 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 21,4-21,8 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 21,6 градусах.

60 У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 23,1-23,5 градусах.

У іншому варіанті здійснення Форма 1 додатково характеризується піком при 23,3 градусах.

У деяких варіантах здійснення Форма 1 характеризується дифракційною картиною, подібною картині за Фіг. 1.

У деяких варіантах здійснення Форма 1 характеризується дифракційною картиною, подібною картині за Фіг. 2.

У деяких варіантах здійснення гранулометричний склад D90 становить приблизно 82 мкм або менше для форми 1.

У деяких варіантах здійснення гранулометричний склад D50 становить приблизно 30 мкм або менше для форми 1.

У одному аспекті винахід представляє фармацевтичну композицію, яка включає Форму 1 і фармацевтично прийнятний носій.

У одному аспекті даний винахід представляє спосіб лікування хвороб, опосередковуваних ТРМ, який включає введення людині ефективної кількості форми 1.

У деяких варіантах здійснення спосіб включає застосування додаткового терапевтичного засобу.

У деяких варіантах здійснення захворювання вибирають з наступного: муковісцидоз, спадкова емфізема, спадковий гемохроматоз, недостатність коагуляції-фібринолізу, така як дефіцит білка C, спадковий ангіоневротичний набряк типу 1, недостатності переробки ліпідів, такі як сімейна гіперхолестеринемія, хіломікронемія типу 1, абеталіпопротеїнемія, лізосомні захворювання накопичення, такі як хвороба І-клітин (муколіпідоз II типу)/муколіпідоз III типу, мукополісахаридоз, хвороба Сандгофа/Тей-Сакс, хвороба Кріглера-Найяра типу II, поліендокринопатія/гіперінсулінемія, цукровий діабет, карликовість Ларона, дефіцит мієлопероксидази, первинний гіпопаратиреоз, меланома, гліканоз (синдром вуглевододефіцитних глікопротеїнів) (glycanosis CDG типу 1), спадкові емфіземи, природжений гіпертиреоз, неповний остеогенез, спадкова гіпофібриногенемія, дефіцит АСТ, нецукровий діабет (НД), нейрофізичний НД, нейрогенний НД, синдром Шарко-Мері-Тута, хвороба Перлізо-Мерцбахера, нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, аміотрофічний бічний склероз, прогресуючий супрануклеарний параліч (plasy), синдром Піка, декілька поліглютамічних неврологічних порушень, таких як хвороба Хантінгтона, спінально-церебелярна атаксія типу 1, спінальна і бульбарна м'язова атрофія, дентато-рубро-палідо-львівська (dentatorubal pallidoluysian) атрофія і міотонічна дистрофія, так само як губчасті енцефалопатії, такі як спадкова хвороба Крейтцфельда-Якоба, хвороба Фабрі, синдром Штрауслера-Шайнкера, ХОХЛ, хвороба сухих очей і хвороба Сьоргрена.

У одному варіанті здійснення даний винахід забезпечує спосіб лікування муковісцидозу у людей, який включає введення людині ефективної кількості форми 1.

У одному аспекті даний винахід передбачає набір, що включає Форму 1 і інструкцію по її застосуванню.

У одному аспекті даний винахід передбачає спосіб одержання форми 1, який включає диспергування або розчинення HCl солі 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти у придатному розчиннику протягом ефективного періоду часу.

У одному варіанті здійснення даний винахід передбачає спосіб одержання форми 1, який включає диспергування HCl солі 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти у придатному розчиннику протягом ефективного періоду часу.

У деяких варіантах здійснення придатним розчинником є вода або суміш спирт/вода.

У деяких варіантах здійснення придатним розчинником є вода або 50 % суміш метанол/вода.

У деяких варіантах здійснення придатним розчинником є вода.

У деяких варіантах здійснення придатним розчинником є суміш 50 % метанолу і 50 % води.

У деяких варіантах здійснення ефективна кількість часу складає від приблизно 2 годин до приблизно дня. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість часу складає від приблизно 2 до приблизно 18 годин. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість часу складає від приблизно 2 до приблизно 12 годин. У деяких варіантах здійснення ефективна кількість часу складає від приблизно 2 до приблизно 6 годин.

У одному аспекті винахід показує кристалічну форму 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти, що має моноклінну кристалічну систему, просторову групу P2₁/n і наступні розміри елементарної комірки: a=4,9626(7) Å, b=12,2994(18) Å, c=33,075(4) Å, α=90°, β=93,938(9)° і γ=90°.

Способи одержання форми 1.

У одному варіанті здійснення Форму 1 одержують з дисперсії або розчину сольової форми, такої як гідрохлорид 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти, у придатному розчиннику протягом ефективного періоду часу. У іншому варіанті здійснення Форму 1 одержують з дисперсії сольової форми, такої як гідрохлорид 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти, у придатному розчиннику протягом ефективного періоду часу. У іншому варіанті здійснення Форму 1 утворюють безпосередньо з 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату і відповідної кислоти, такої як мурашина кислота. У одному варіанті здійснення сольова форма гідрохлориду 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти є вихідною точкою і в одному варіанті може бути одержана поєднанням фрагмента хлорангідриду кислоти з фрагментом аміну згідно зі Схемами 1-3.

Схема 1. Синтез хлорангідриду кислоти

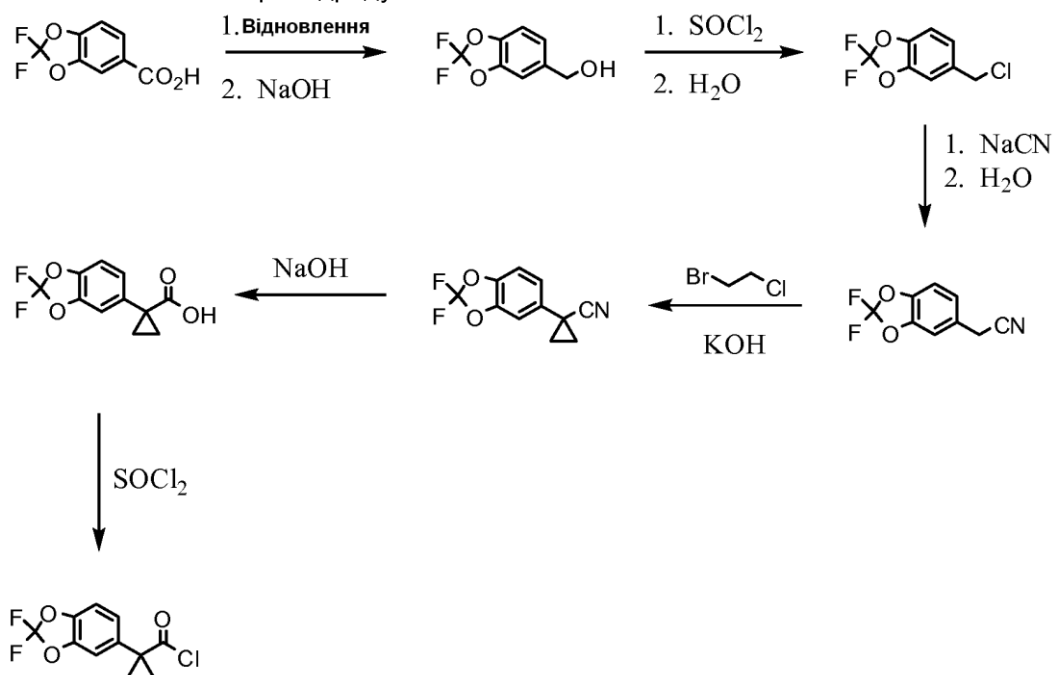


Схема 2. Синтез фрагмента аміну

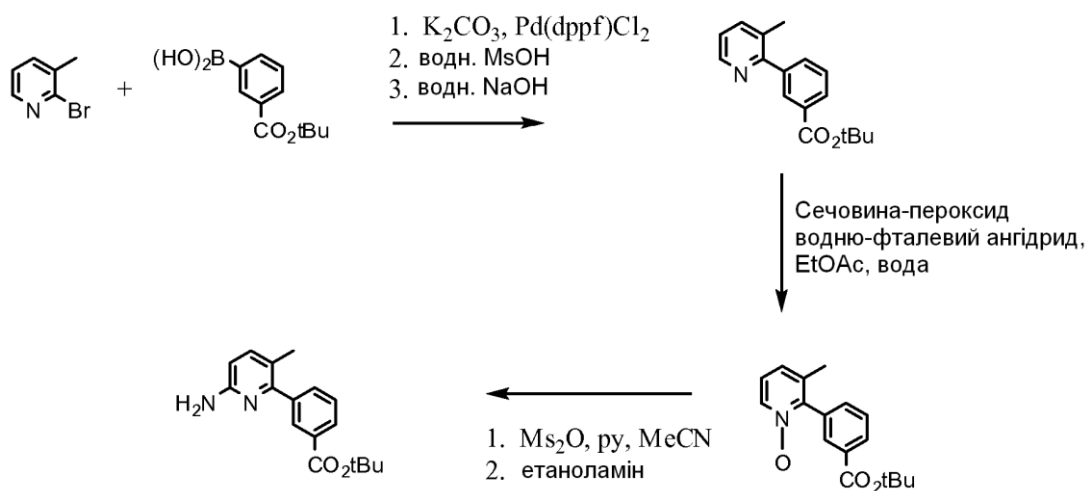
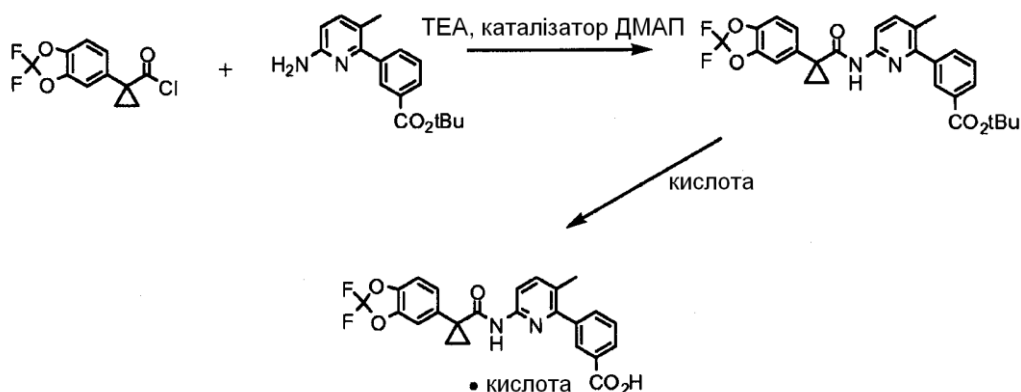


Схема 3. Утворення кислотної солі 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти



Використовуючи гідрохлорид (HCl), наприклад, як сольову форму 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної

кислоти як вихідну речовину, Форма 1 може бути одержана з високим виходом диспергуванням або розчиненням сольової форми гідрохлориду 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти у придатному розчиннику протягом ефективного періоду часу. Як інші сольові форми 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти можна використовувати, наприклад, сольові форми з іншими неорганічними або органічними кислотами. Інші сольові форми виникають при гідролізі трет-бутилового ефіру відповідної кислоти. Інші кислоти/сольові форми включають азотну, сірчану, фосфорну, борну, оцтову, бензойну, малонову і інші кислоти. Сольова форма 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти може бути або може не бути розчинна залежно від застосовуваного розчинника, але відсутність розчинності не перешкоджає утворенню Форми 1. Наприклад, в одному варіанті здійснення, придатним розчинником може бути вода або суміш спирт/вода, така як 50 % суміш метанол/вода, навіть при тому, що сольова форма гідрохлориду 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти є тільки помірно розчинною у воді. У одному варіанті здійснення придатним розчинником є вода.

Ефективним періодом часу для формування Форми 1 з сольової форми 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти може бути будь-який час між 2 і 24 годинами або більше. Звичайно, більше ніж 24 години не потрібно, щоб одержати високі виходи (приблизно 98 %), але певні розчинники можуть потребувати більшої кількості часу. Також зрозуміло, що необхідна кількість часу зворотно пропорційна температурі. Таким чином, чим вище температура, тим менше часу потрібно, щоб викликати дисоціацію кислоти з одержанням Форми 1. Коли розчинником є вода, перемішування дисперсії протягом приблизно 24 годин при кімнатній температурі дає Форму 1 приблизно з 98 % виходом. Якщо розчин сольової форми 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти бажаний, то підвищена температура може використовуватися для цілей процесу. Після перемішування розчину протягом ефективною кількості часу при підвищеній температурі, перекристалізація після охолодження дає по суті чисті форми Форми 1. У одному варіанті здійснення термін по суті чисті стосується більше ніж приблизно 90 % чистоти. У іншому варіанті здійснення термін по суті чисті стосується більше ніж приблизно 95 % чистоти. У іншому варіанті здійснення термін по суті чисті стосується більше ніж приблизно 98 % чистоти. У іншому варіанті здійснення термін по суті чисті стосується більше ніж приблизно 99 % чистоти. Вибрана температура залежить частково від використовуваного розчинника і в межах здібностей фахівця в технології визначити її. У одному варіанті здійснення температура знаходиться між кімнатною температурою і приблизно 80 °C. У іншому варіанті здійснення температура знаходиться між кімнатною температурою і приблизно 40 °C. У іншому варіанті здійснення температура знаходиться між приблизно 40 °C і приблизно 60 °C. У іншому варіанті здійснення температура знаходиться між приблизно 60 °C і приблизно 80 °C.

У деяких варіантах здійснення Форма 1 може бути додатково очищена перекристалізацією з органічного розчинника. Приклади органічних розчинників включають, але не обмежуються ними, толуол, кумол, анізол, 1-бутанол, ізопропілацетат, бутилацетат, ізобутилацетат, метил-трет-бутиловий ефір, метилізобутилкетон або суміш 1-пропанол/вода (в різних відношеннях). Температура може використовуватися, як описано вище. Наприклад, в одному варіанті

здійснення Форму 1 розчиняють в 1-бутанолі при 75 °С, поки вона повністю не розчиниться. Охолодження розчину до 10 °С зі швидкістю 0,2 °С/хв. дає кристали Форми 1, які можуть бути відділені фільтруванням.

Застосування, композиція і введення

5 Фармацевтично прийнятні композиції

У іншому аспекті даного винаходу забезпечують фармацевтично прийнятні композиції, причому ці композиції включають Форму 1, як описано тут, і необов'язково включають фармацевтично прийнятний носій, допоміжний засіб або транспортний засіб. У певних варіантах здійснення ці композиції необов'язково додатково включають один або більше додаткових

10 терапевтичних засобів.

Як описано вище, фармацевтично прийнятні композиції за даним винаходом додатково включають фармацевтично прийнятний носій, допоміжний засіб або наповнювач, які, як використовується тут, включають будь-який з розчинників, розріджувачів або інший рідкий наповнювач, дисперсійні або суспендувальні допоміжні речовини, поверхнево-активні засоби, ізотонічні засоби, загущувальні засоби або емульгатори, консерванти і тверді зв'язуючі

15 компоненти, мастила і т. д., придатні для певної бажаної лікарської форми. Довідник Remington Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton Pa., 1980) розкриває різні носії, використовувані в складанні фармацевтично прийнятних композицій, і відомі методики для їх одержання. Крім того, за винятком випадків, коли звичайне середовище носія несумісне із сполуками за винаходом, оскільки виконує яку-небудь небажану біологічну

20 дію або інакше взаємодіє шкідливим чином з будь-яким іншим компонентом фармацевтично прийнятної композиції, вважають, що використання цього носія знаходиться в рамках цього винаходу. Деякі приклади матеріалів, які можуть служити фармацевтично прийнятними носіями, включають, але не обмежуються ними, іонообмінні речовини, оксид алюмінію, стеарат алюмінію, лецитин, сироваткові білки, такі як людський сироватковий альбумін, буферні

25 речовини, такі як фосфати, гліцин, сорбінова кислота або сорбат калію, суміші неповних гліцеридів насичених рослинних жирних кислот, вода, солі або електроліти, така як сульфат протаміну, динатрійгідрофосфат, калійгідрофосфат, хлорид натрію, солі цинку, колоїдний оксид кремнію, трисилікат магнію, полівінілпіролідон, поліакрилати, воски, блок-полімери

30 поліетиленполіоксипропілену, ланолін, цукри, такі як лактоза, глюкоза і сахароза; крохмалі, такі як кукурудзяний крохмаль і картопляний крохмаль; целюлоза і її похідні, такі як натрійкарбоксиметилцелюлоза, етилцелюлоза і ацетатцелюлоза; порошковий трагакант; солод; желатин; тальк; інертні наповнювачі, такі як масло какао і віск супозиторіїв; олії, такі як арахісова олія, бавовняна олія; сафлорова олія; кунжутна олія; оливкова олія; кукурудзяна олія

35 і соєва олія; гліколі, такі пропіленгліколь або поліетиленгліколь; складні ефіри, такі як етилолеат і етиллаурат; агар-агар; буферні засоби, такі як гідроксид магнію і гідроксид алюмінію; альгінова кислота; апірогенна вода; ізотонічний сольовий розчин, розчин Рінгера; етиловий спирт і фосфатні буферні розчини, так само як інші нетоксичні сумісні мастильні речовини, такі як натрійлаурилсульфат і стеарат магнію, так само як пігменти, вивільняючі засоби, покривні

40 засоби, підсолоджувальні засоби, ароматичні засоби і віддушки, консервувальні засоби і антиоксиданти можуть також бути присутніми в складі, згідно з думкою фармацевта.

Застосування сполук і фармацевтично прийнятних композицій

У ще одному аспекті даний винахід забезпечує спосіб лікування стану, захворювання або порушення з участю ТРМ. У певних варіантах здійснення даний винахід забезпечує спосіб

45 лікування стану, захворювання або порушення, викликаного недостатністю активності ТРМ, який включає введення композиції, що включає форму твердого стану Форми 1, описаної тут, суб'єкту, переважно ссавцю, потребуючому цього.

Термін "ТРМ-опосередковане захворювання" як використовується тут, є захворюванням, вибраним з групи: муковісцидоз, спадкова емфізема, спадковий гемохроматоз, недостатність коагуляції-фібринолізу, така як дефіцит білка С, спадковий ангіоневротичний набряк типу 1, недостатності переробки ліпідів, такі як сімейна гіперхолестеринемія, хіломікронемія типу 1, абеталіпопротеїнемія, лізосомні захворювання накопичення, такі як хвороба І-клітин (муколіпідоз II типу)/муколіпідоз III типу, мукополісахаридоз, хвороба Сандгофа/Тей-Сакс, хвороба Кріглера-Найяра типу II, поліендокринопатія/гіперінсулінемія, цукровий діабет,

50 карликовість Ларона, дефіцит мієлопероксидази, первинний гіпопаратиреоз, меланома, гліканоз (синдром вуглеводдефіцитних глікопротеїнів) (glycanosis CDG типу 1), спадкові емфіземи, природжений гіпертиреоз, неповний остеогенез, спадкова гіпофібриногенемія, дефіцит АСТ, нецукровий діабет (НД), нейрофізичний НД, нейрогенний НД, синдром Шарко-Мері-Тута, хвороба Перлізо-Мерцбахера, нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера,

60 хвороба Паркінсона, аміотрофічний бічний склероз, прогресуючий супрануклеарний параліч

(plasy), синдром Піка, декілька поліглутамінних неврологічних порушень, таких як хвороба Хантінгтона, спінально-церебелярна атаксія типу 1, спінальна і бульбарна м'язова атрофія, дентато-рубро-палідо-львівська (dentatorubal pallidoluysian) атрофія і міотонічна дистрофія, так само як губчасті енцефалопатії, такі як спадкова хвороба Крейтцфельда-Якоба, хвороба Фабрі, синдром Штрауслера-Шайнкера, ХОХЛ, хвороба сухих очей і хвороба Сьоргрена.

У певних варіантах здійснення даний винахід забезпечує спосіб лікування ТРМ-опосередкованого захворювання людини, який включає стадію введення вказаній людині ефективною кількістю композиції, що включає Форму 1, описану тут.

Згідно з альтернативним переважним варіантом здійснення даний винахід забезпечує спосіб лікування муковісцидозу людини, який включає стадію введення вказаній людині композиції, що включає Форму 1, описану тут.

Згідно з винаходом "ефективна кількість" Форми 1 або її фармацевтично прийнятної композиції є кількістю, ефективною для лікування або зменшення серйозності будь-якої з хвороб, цитованих вище.

Форма 1 або її фармацевтично прийнятна композиція можуть бути введені, використовуючи будь-яку кількість і будь-який шлях введення, ефективний для лікування або зменшення серйозності одного або більше захворювань, цитованих вище.

У певних варіантах здійснення Форма 1, описана тут, або її фармацевтично прийнятна композиція корисні для лікування або зменшення тяжкості муковісцидозу у хворих, які показують залишкову активність ТРМ в апікальній мембрані дихального і недихального епітелію. Наявність залишкової активності ТРМ на епітеліальній поверхні може бути легко виявлена, використовуючи методи, відомі в технології, наприклад, стандартні електрофізіологічні, біохімічні або гістохімічні методики. Такі методи визначають активність ТРМ, що використовує *in vivo* або *ex vivo* електрофізіологічні методики, вимірювання концентрації Cl^- в поту або слині, або *ex vivo* біохімічні або гістохімічні методики, щоб контролювати густину поверхні клітини. Використовуючи такі методи, залишкова активність ТРМ може бути легко виявлена у хворих, гетерозиготних або гомозиготних відносно множини різних мутацій, включаючи хворих, гомозиготних або гетерозиготних по найбільш загальній мутації, $\Delta F508$.

У одному варіанті здійснення Форма 1, описана тут, або її фармацевтично прийнятна композиція корисні для лікування або зменшення тяжкості муковісцидозу у хворих в межах певних генотипів, що показують залишкову активність ТРМ, наприклад, клас III мутацій (ослаблене регулювання або ворітний механізм), клас IV мутацій (змінена провідність) або клас V мутацій (знижений синтез) (Lee R. Choo Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV і V Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy (Дефекти I, II, III, IV і V типу трансмембранного регулятора провідності муковісцидозу і можливості терапії), Current Opinion in Pulmonary Medicine 6: 521-529, 2000). Інші генотипи хворих, які показують залишкову активність ТРМ, включають хворих, гомозиготних по одному з цих класів або гетерозиготних по будь-якому іншому класу мутацій, включаючи клас I мутацій, клас II мутацій, або мутацію, яка не має класифікації.

У одному варіанті здійснення Форма 1, описана тут, або її фармацевтично прийнятна композиція корисні для лікування або зменшення тяжкості муковісцидозу у хворих в межах певних клінічних фенотипів, наприклад, від помірного до м'якого клінічного фенотипу, який звичайно корелює з кількістю залишкової активності ТРМ в апікальній мембрані епітелію. Такі фенотипи включають хворих, що показують панкреатичну недостатність, або пацієнтів, діагнованих з ідіопатичним панкреатитом і природженою двосторонньою відсутністю сім'явиносного протоку або захворюванням легень середньої тяжкості.

Точна необхідна кількість буде змінюватися від суб'єкта до суб'єкта залежно від різновиду, віку і загального стану суб'єкта, серйозності інфекції, конкретного засобу, способу його введення і т. д. Сполуки за винаходом переважно складають в стандартній лікарській формі для простоти введення і однорідності дозування. Вираз "стандартна форма одиниці дозування", як використовується тут, стосується фізично дискретної одиниці засобу, відповідної хворому, що підлягає лікуванню. Розуміють, однак, що повне щоденне використання сполук і композицій за даним винаходом буде вирішуватися лікуючим спеціалістом в рамках розумної медичної думки. Конкретний ефективний рівень дози для будь-якого конкретного хворого або організму буде залежати від множини факторів, включаючи порушення, що підлягає лікуванню, серйозність порушення; активність конкретної використовуваної сполуки; конкретну застосовувану композицію; вік, вагу тіла, загальне здоров'я, стать і дієту хворого; час призначення, спосіб введення і швидкість виділення конкретної використовуваної сполуки; тривалість лікування; композиції, які використовуються в комбінації або збігаються з конкретною використовуваною

сполукою, і інших факторів, відомих в медичних технологіях. Термін "пацієнт", як використовується тут, означає тварину, переважно ссавця і найбільш переважно людину.

Фармацевтично прийнятні композиції за винаходом можуть бути введені людям і іншим тваринам перорально, ректально, парентерально, інтрацистернально, інтравагінально, інтраперитонеально, місцево (як порошки, мазі або краплі), букально, як ротовий або назальний спрей або подібним чином, залежно від серйозності інфекції, що підлягає лікуванню. У певних варіантах здійснення сполуки за винаходом можуть бути введені перорально або парентерально при рівнях дозування від приблизно 0,01 мг/кг до приблизно 50 мг/кг і переважно від приблизно 1 мг/кг до приблизно 25 мг/кг ваги тіла на добу, один або більше разів на день, щоб одержати бажаний терапевтичний ефект.

У певних варіантах здійснення дозована кількість Форми 1 в стандартній лікарській формі складає від 100 мг до 1000 мг. У іншому варіанті здійснення дозована кількість Форми 1 складає від 200 мг до 900 мг. У іншому варіанті здійснення дозована кількість Форми 1 складає від 300 мг до 800 мг. У іншому варіанті здійснення дозована кількість Форми 1 складає від 400 мг до 700 мг. У іншому варіанті здійснення дозована кількість Форми 1 складає від 500 мг до 600 мг.

Ін'єктовані композиції, наприклад стерильні водні або масляні суспензії, можуть бути складені згідно з відомою технологією, використовуючи придатні диспергувальні або змочувальні речовини і суспендувальні засоби. Стерильною ін'єктованою композицією може також бути стерильний ін'єктований розчин, суспензія або емульсія в нетоксичному парентерально прийнятному розріджувачі або розчиннику, наприклад розчин в 1,3-бутандіолі. Прийнятними наповнювачами і розчинниками, які можуть використовуватися, є вода, розчин Рінгера і ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, стерильні, нелеткі масла звичайно використовуються як розчинник або суспендувальне середовище. З цією метою будь-яке м'яке нелетке масло може використовуватися, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. Крім того, жирні кислоти, такі як олеїнова кислота, використовуються в композиціях для ін'єкції.

Ін'єктовані склади можуть бути стерилізовані, наприклад, фільтрацією через фільтр, затримуючий бактерії, або включенням стерилізуючих засобів у формі стерильних твердих складів, які можуть бути розчинені або дисперговані в стерилізованій воді або іншому стерилізованому ін'єктованому середовищі перед використанням.

Композиціями для ректального або вагінального призначення є переважно свічки, які можуть бути одержані змішуванням сполук за цим винаходом з придатними неподразнювальними інертними наповнювачами або носіями, такими як масло какао, поліетиленгліколь або віск для свічок, які є твердими при температурі навколишнього середовища, але рідкими при температурі тіла і, отже, плавляться в прямій кишці або вагінальній порожнині і виділяють активну сполуку.

Тверді лікарські форми для перорального прийому включають капсули, таблетки, пілюлі, порошки і гранули. У таких твердих формах дозування активну сполуку змішують з щонайменше одним інертним, фармацевтично прийнятним наповнювачем або носієм, таким як цитрат натрію або дикальційфосфат і (або) а) наповнювачі, такі як крохмалі, лактоза, сахароза, глюкоза, маніт і кремнієвої кислота, б) зв'язуючі компоненти, такі як, наприклад, карбоксиметилцелюлоза, альгірати, желатин, полівінілпіролідінон, сахароза і акація, с) зволожувачі, такі як гліцерин, d) дезінтегруючі засоби, такі як агар-агар, карбонат кальцію, картопляний крохмаль або крохмаль тапіоки, альгінова кислота, визначені силікати і карбонат натрію, е) інгібітори розчинення, такі як парафіни, f) прискорювачі поглинання, такі як четвертинні амонієві сполуки, g) змочувальні речовини, такі як, наприклад, цетиловий спирт і моностеарат гліцерину, h) абсорбенти, такі як глини каолін і бентоніт, і i) мастильні речовини, такі як тальк, стеарат кальцію, стеарат магнію, тверді поліетиленгліколі, натрійлаурилсульфат і їх суміші. У випадку капсул, таблеток і пілюль, лікарська форма може також включати буферні засоби.

Тверді склади подібного типу можуть також використовуватися як наповнювачі в м'яких і твердих наповнених капсулах желатину, використовуючи таку інертну наповнювачі, як лактоза або молочний цукор, так само як високомолекулярні поліетиленгліколі і т. д. Тверді лікарські форми, такі як таблетки, драже, капсули, пілюлі і гранули, можуть бути одержані з покриттями і оболонками, такими як кишковорозчинні покриття і інші покриття, відомі в фармацевтичній технології композицій. Вони можуть необов'язково містити рентгеноконтрастні засоби і можуть також бути композицією, яка виділяє активний інгредієнт тільки, або переважно, в певній частині кишечника, необов'язково, відстроченим чином. Приклади інкапсулюючих композицій, які можуть використовуватися, включають полімерні речовини і віск. Тверді композиції подібного типу можуть також використовуватися як наповнювачі в м'яких і твердих наповнених капсулах желатину, що використовують такі інертні наповнювачі як лактозу або молочний цукор, так само як високомолекулярні поліетиленгліколі і т. д.

Активні сполуки можуть також бути в мікрокапсульній формі з одним або більше інертними наповнювачами, як відмічено вище. Тверді лікарські форми, таблетки, драже, капсули, пілюлі і гранули, можуть бути приготовані з покриттями і оболонками, такими як кишковорозчинні покриття, покриття для регульованого виділення і інші покриття, відомі в фармацевтичній технології складів. У таких твердих формах дозування активний склад може бути змішаний з щонайменше одним інертним розріджувачем, таким як сахароза, лактоза або крохмаль. Такі лікарські форми можуть також включати, як і відбувається в нормальній практиці, додаткові речовини, відмінні від інертних розріджувачів, наприклад таблетувальні мастильні речовини і інші таблетувальні допоміжні речовини, такі як стеарат магнію і мікрокристалічна целюлоза. У випадку капсул, таблеток і пілюль, лікарські форми можуть також включати буферні засоби. Вони можуть необов'язково містити рентгеноконтрастні засоби і можуть також бути композиціями, які виділяють активний інгредієнт тільки, або вибірно, в певній частині кишечника, необов'язково, відстроченим чином. Приклади включених композицій, які можуть використовуватися, включають полімерні речовини і віск.

Є важливим, що Форма 1, описана тут, або її фармацевтично прийнятна композиція, може використовуватися в комбінованих методах лікування, тобто Форма 1 може застосовуватися одночасно, до або після однієї або більше інших бажаних терапій або медичних процедур. Конкретна комбінація методів лікування (терапія або процедури), щоб використовуватися в комбінованому режимі, бере до уваги сумісність бажаної терапії і (або) процедур і бажаного терапевтичного ефекту, який буде досягнутий. Також цінно, що використовувані методи лікування можуть досягати бажаного ефекту для того ж самого порушення (наприклад, сполука за винаходом може застосовуватися одночасно з іншим засобом, використовуваним, щоб лікувати те ж саме порушення) або вони можуть досягати різних ефектів (наприклад, контроль будь-яких несприятливих ефектів). Як використовуються тут, додаткові терапевтичні засоби, які звичайно застосовуються, щоб лікувати або запобігти конкретному захворюванню або стану, відомі як "адекватні захворюванню або стану, що підлягає лікуванню".

У одному варіанті здійснення додатковий засіб вибирають з муколітичного засобу, бронхорозширювального засобу, антибіотика, протиінфекційного засобу, протизапального засобу, модулятора TPM, відмінного від сполуки за даним винаходом, або харчового засобу.

У іншому варіанті здійснення додатковий засіб є сполукою, такою як гентаміцин, куркумін, циклофосфамід, 4-фенілбутират, миглустат, фелодипін, німодипін, Філоксин В, геніестейн, Апігенін, модулятори цАМФ/цГМФ, такі як роліпрам, силденафіл, мілринон, тадалафіл, амринон, ізопротеренол, албутерол і алметерол, деоксиспергуалін, інгібітори HSP 90, інгібітори HSP 70, інгібітори протеосом, такі як епоксоміцин, лактацистин і т. д.

У іншому варіанті здійснення додатковим засобом є сполука, розкрита в патентах WO 2004028480, WO 2004110352, WO 2005094374, WO 2005120497 або WO 2006101740.

У іншому варіанті здійснення додатковим засобом є похідне бензо(с)хінолізинію, яке показує активність модуляції TPM, або похідне бензопірану, яке показує активність модуляції TPM.

У іншому варіанті здійснення додатковим засобом є сполука, розкрита в патентах US 7202262, US 6992096, US 20060148864, US 20060148863, US 20060035943, US 20050164973, WO 2006110483, WO 2006044456, WO 2006044682, WO 2006044505, WO 2006044503, WO 2006044502 або WO 2004091502.

У іншому варіанті здійснення додатковим засобом є сполука, розкрита в патентах WO 2004080972, WO 2004111014, WO 2005035514, WO 2005049018, WO 2006002421, WO 2006099256, WO 2006127588 або WO 2007044560.

У іншому варіанті здійснення додатковий засіб вибирають із сполук, розкритих в американській заявці на патент серійний № 11/165818, опублікованій як американська заявка на патент № 2006/0074075, подана 24 червня 2005, і, тим самим, включена посиланням повністю. У іншому варіанті здійснення додатковим засобом є N-(5-гідрокси-2,4-ди-трет-бутилфеніл)-4-оксо-1Н-хінолін-3-карбоксамід. Ці комбінації корисні для лікування хвороб, описаних тут, включаючи муковісцидоз. Ці комбінації також корисні в комплекті, описаному тут.

Кількість додаткового терапевтичного засобу, присутнього в композиціях за винаходом, буде не більшою, ніж кількість, яка звичайно застосовувалася б в композиції, що включає цей терапевтичний засіб, як єдиний активний засіб. Переважно, кількість додаткового терапевтичного засобу, присутнього в розкритих композиціях, змінюється від приблизно 50 до 100 % від кількості, звичайно присутньої в композиції, що включає цей засіб, як єдиний терапевтично активний засіб.

Форма 1, описана тут, або її фармацевтично прийнятна композиція може також бути включена в композиції для покриття імплантованого медичного пристрою, такого як протез, штучні клапани, судинні графти, стенти і зонди. Відповідно, даний винахід, в іншому аспекті,

включає композицію для покриття імплантованого пристрою, що включає Форму 1, описану тут, або її фармацевтично прийнятну композицію, і в класах і підкласах тут, і носій, придатний для покриття вказаного імплантованого пристрою. У іншому аспекті даний винахід включає імплантований пристрій, покритий складом, що включає Форму 1, описану тут, або її фармацевтично прийнятну композицію і носій, придатний для покриття вказаного імплантованого пристрою. Придатні покриття і загальне приготування покритих імплантованих пристроїв описані в Патентах США 6099562; 5886026; і 5304121. Покриття є звичайно біологічно сумісними полімерними матеріалами, такими як полімер гідрогелю, поліметилдисилоксан, полікапролактон, поліетиленгліколь, полімолочна кислота, співполімер етилен-вінілацетат і їх суміші. Покриття можуть необов'язково бути додатково покриті придатним поверхневим покриттям, таким як фторсилікон, полісахариди, поліетиленгліколь, фосфоліпіди або їх комбінації, щоб надати характеристики регульованого виділення композиціям.

Щоб винахід, описаний тут, міг бути більш повно зрозумілий, представлені наступні приклади. Потрібно розуміти, що ці приклади представлені тільки в ілюстративних цілях і не повинні бути розглянуті як такі, що обмежують цей винахід будь-яким чином.

ПРИКЛАДИ

Методи і матеріали

Диференціальна скануюча калориметрія (ДСК)

Дані диференціальної скануючої калориметрії (ДСК) Форми 1 одержували, використовуючи прилад DSC Q100 V9.6 Build 290 (Instrument TA, New Castle, DE). Температуру калібрували за допомогою індію, і теплоємність калібрували за допомогою сапфіру. Зразки 3-6 мг зважували в алюмінієвих посудинах, які закривають гвинтовою кришкою з 1 голчастим отвором. Зразки сканували від 25 °C до 350 °C при швидкості нагрівання 1,0 °C/хв., і з дуттям газу азоту 50 мл/хв. Дані одержували за допомогою програмного забезпечення Thermal Advantage Q Series TM version 2.2.0.248 і аналізували за допомогою програмного забезпечення Universal Analysis version 4.1D (Instrument TA, New Castle, DE). Наведені цифри представляють єдине дослідження.

ПДРП (Порошкова дифракція рентгенівських променів)

Дані дифракції рентгенівських променів (ДРП) Форми 1 одержували на порошковому дифрактометрі Bruker D8 DISCOVER з 2-розмірним детектором HI-STAR і плоским графітовим монохроматором. Герметична мідна трубка з К α -випромінюванням використовувалася при 40 кВ, 35 мА. Зразки поміщали на силіконові пластинки з нульовим фоном при 25 °C. Для кожного зразка два кадри даних збирали за 120 секунд, кожний під 2 різними кутами θ_2 : 8° і 26°. Дані інтегрували програмним забезпеченням GADDS і об'єднували програмним забезпеченням DIFFRACT^{plus}EVA. Невизначеність положень наведених піків, $\pm 0,2$ градуса.

Vitride® (натрій біс(2-метоксіетоксі)алюміній гідрид) [або NaAlH₂(OCH₂CH₂OCH₃)₂], 65 ваг. % розчин в толуолі) придбавали в Aldrich Chemicals.

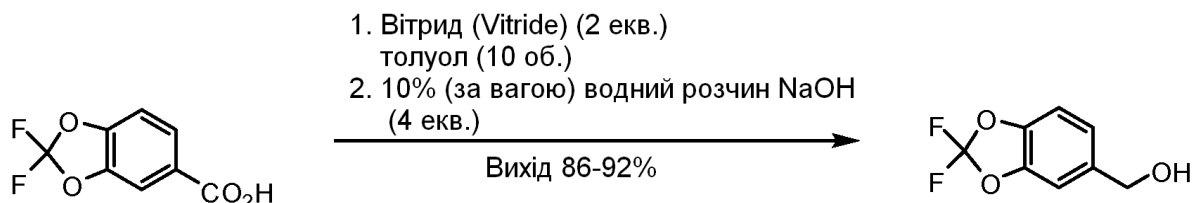
2,2-Дифтор-1,3-бензодіоксол-5-карбонова кислота була придбана в Saltigo (філіал Lanxess Corporation).

У даному винаході, якщо назва сполуки, можливо, не точно описує структуру сполуки, структура має перевагу перед назвою і визначає будову сполуки.

Синтез гідрохлориду 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти

Хлорангідридний фрагмент кислоти

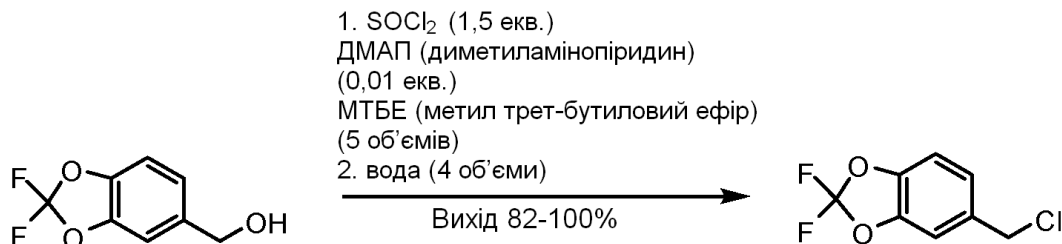
Синтез 2,2-дифторбензо-1,3-бензодіоксол-5-іл)метанолу



Комерційно доступну 2,2-дифторбензо-1,3-бензодіоксол-5-карбонову кислоту (1,0 екв.) суспендують в толуолі (10 об'ємів). Вітрид (2 екв.) додають через краплинну лійку з такою швидкістю, щоб підтримувати температуру 15-25 °C. Наприкінці додавання температуру підіймають до 40 °C протягом 2 годин, потім обережно додають 10 % (по вазі) водний розчин NaOH (4,0 екв.) через краплинну лійку, підтримуючи температуру 40-50 °C. Після перемішування протягом додаткових 30 хвилин шари розділяють при 40 °C. Органічну фазу охолоджують до 20 °C, потім промивають водою (2×1,5 об'єму), сушать (Na₂SO₄), фільтрують і

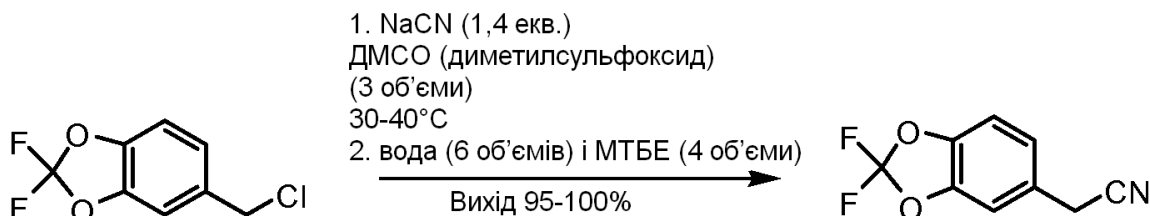
концентрують з одержанням сирого 2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)метанолу, який безпосередньо використовують на наступній стадії.

Синтез 5-хлорметил-2,2-дифтор-1,3-бензодіоксолу



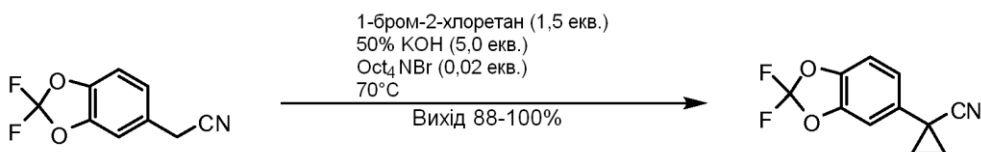
2,2-Дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)метанол (1,0 екв.) розчиняли в МТБЕ (5 об'ємів). Додають каталітичну кількість ДМАП (1 мол. %) і додають SOCl_2 (1,2 екв.) з краплинної лійки з такою швидкістю, щоб підтримувати температуру 15-25 °С. Температуру підвищують до 30 °С протягом 1 години, потім охолоджують до 20 °С і додають воду (4 об'єми) з краплинної лійки, підтримуючи температуру менше 30 °С. Після перемішування протягом додаткових 30 хвилин шари розділяють. Органічний шар перемішують і додають 10 % (маса до об'єму) водний розчин NaOH (4,4 об'єму). Після перемішування протягом 15-20 хвилин шари розділяють. Органічну фазу сушать (Na_2SO_4), фільтрують і концентрують з одержанням сирого 5-хлорметил-2,2-дифтор-1,3-бензодіоксолу, який безпосередньо використовують на наступній стадії.

Синтез (2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)ацетонітрилу



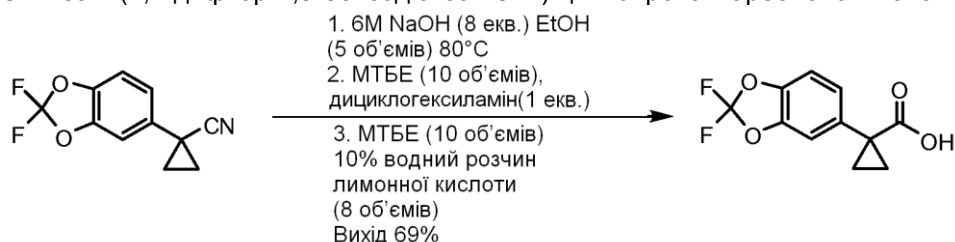
Розчин 5-хлорметил-2,2-дифтор-1,3-бензодіоксолу (1 екв.) в ДМСО (1,25 об'єму) додають до суспензії NaCN (1,4 екв.) в ДМСО (3 об'єми), підтримуючи температуру між 30 і 40 °С. Суміш перемішують протягом 1 години, потім додають воду (6 об'ємів) і МТБЕ (4 об'єми). Після перемішування протягом 30 хвилин шари розділяють. Водний шар екстрагують МТБЕ (1,8 об'єму). Об'єднані органічні шари промивають водою (1,8 об'єму), сушать (Na_2SO_4), фільтрують і концентрують з одержанням сирого (неочищеного) (2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)ацетонітрилу (95 %), який безпосередньо використовують на наступній стадії.

Синтез (2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)-циклопропанкарбонітрилу



Суміш (2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)ацетонітрилу (1,0 екв.), 50 ваг. % водного KOH (5,0 екв.), 1-бром-2-хлоретан (1,5 екв.) і Oct_4NBr (0,02 екв.) нагрівають при 70 °С протягом 1 години. Реакційну суміш охолоджують, потім обробляють МТБЕ і водою. Органічну фазу промивають водою і насиченим розчином солі, потім розчинник видаляють з одержанням (2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)циклопропанкарбонітрилу.

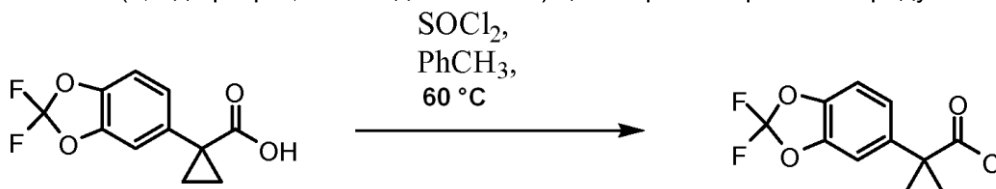
Синтез 1-(2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)-циклопропанкарбонової кислоти



(2,2-Дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)циклопропанкарбонітрил гідролізують, використовуючи 6M NaOH (8 екв.) в етанолі (5 об'ємів) при 80 °С протягом ночі. Суміш охолоджують до кімнатної

температури і етанол випаровують під вакуумом. Залишок обробляють водою і МТБЕ, додають 1М HCl і шари розділяють. Шар МТБЕ потім обробляють дициклогексиламіном (ДЦГА) (0,97 екв.). Суспензію охолоджують до 0 °С, фільтрують і промивають гептаном з одержанням відповідної солі з ДЦГА. Сіль обробляють МТБЕ і 10 % лимонною кислотою і перемішують доти, поки всі тверді частинки не розчиняться. Шари розділяють і шар МТБЕ промивають водою і насиченим розчином солі. Розчинник замінюють на гептан, подальша фільтрація дає 1-(2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)циклопропанкарбовою кислоту після сушіння у вакуумній сушильній шафі при 50 °С протягом ночі.

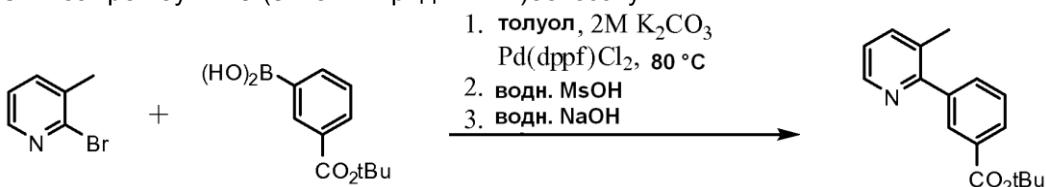
Синтез 1-(2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)-циклопропанкарбонілхлориду



1-(2,2-Дифтор-1,3-бензодіоксол-5-іл)циклопропанкарбовою кислоту (1,2 екв.) суспендують в толуолі (2,5 об'єму) і суміш нагрівають до 60 °С. SOCl_2 (1,4 екв.) додають з краплинної лійки. Толуол і SOCl_2 відганяють з реакційної суміші через 30 хвилин. Додатковий толуол (2,5 об'єму) додають і відганяють знов.

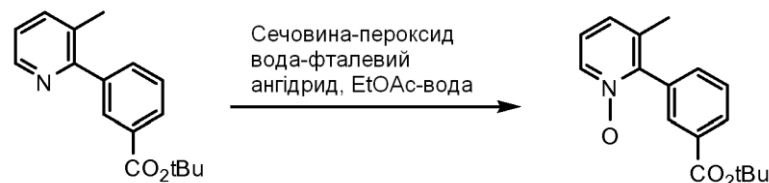
Амінний фрагмент

Синтез трет-бутил-3-(3-метилпіридин-2-іл)бензоату



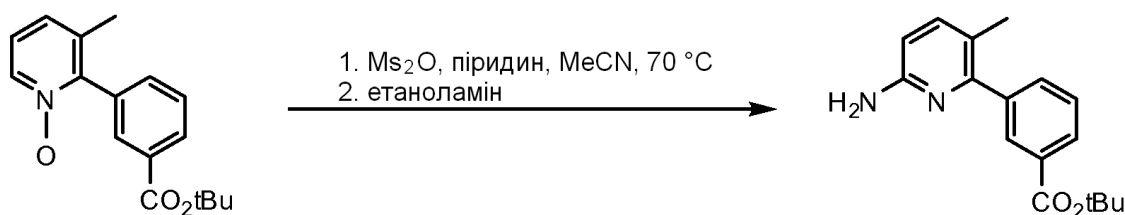
2-Бром-3-метилпіридин (1,0 екв.) розчиняють в толуолі (12 об'ємів), додають K_2CO_3 (4,8 екв.), потім воду (3,5 об'єму) і суміш нагрівають до 65 °С в потоці азоту протягом 1 години. Потім додають 3-(трет-бутоксикарбоніл)фенілборонову кислоту (1,05 екв.) і $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0,015 екв.) і суміш нагрівають до 80 °С. Через 2 години нагрівання припиняють, додають воду (3,5 об'єму) і шари розділяють. Органічну фазу потім промивають водою (3,5 об'єму) і екстрагують 10 % водною метансульфокислотою (2 екв. MsOH, 7,7 об'єму). Водну фазу роблять основною, додаючи 50 % водний NaOH (2 екв.), і екстрагують EtOAc (8 об'ємів). Органічний шар концентрують з одержанням сирого (неочищеного) трет-бутил-3-(3-метилпіридин-2-іл)бензоату (82 %), який безпосередньо використовують на наступній стадії.

Синтез 2-(3-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)-3-метилпіридин-1-оксиду



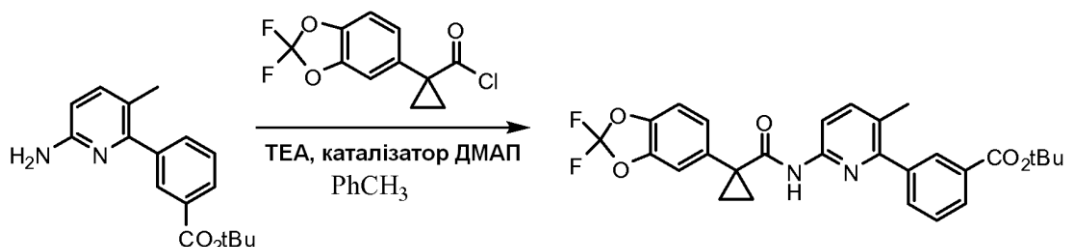
Трет-бутил-3-(3-метилпіридин-2-іл)бензоат (1,0 екв.) розчиняють в EtOAc (6 об'ємів). Додають воду (0,3 об'єму) потім сечовину-пероксид водню (3 екв.). Фталевий ангідрид (3 екв.) додають порціями як тверду речовину так, щоб підтримувати температуру в реакторі нижче 45 °С. Після завершення додавання фталевого ангідриду суміш нагрівають до 45 °С. Після перемішування протягом додаткових 4 годин нагрівання припиняють. Водний розчин Na_2SO_3 (10 ваг. %, 1,5 екв.) додають з краплинної лійки. Після завершення додавання Na_2SO_3 суміш перемішують протягом додаткових 30 хвилин і шари розділяють. Органічний шар перемішують і додають водний розчин Na_2CO_3 (10 ваг. %, 2 екв.). Після перемішування протягом 30 хвилин шари розділяють. Органічну фазу промивають 13 % (маса до об'єму) водним розчином NaCl. Органічну фазу потім фільтрують і концентрують з одержанням сирого 2-(3-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)-3-метилпіридин-1-оксиду (95 %), який безпосередньо застосовують на наступній стадії.

Синтез трет-бутил-3-(6-аміно-3-метилпіридин-2-іл)бензоату



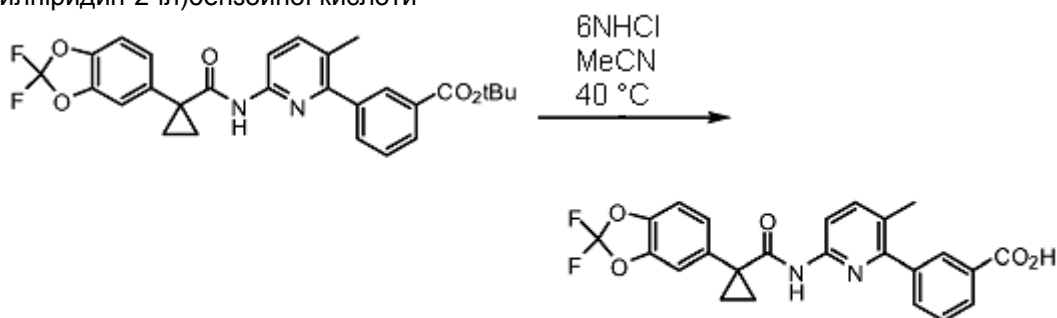
Розчин 2-(3-(трет-бутоксикарбоніл)феніл)-3-метилпіридин-1-оксиду (1 екв.) і піридину (4 екв.) в MeCN (8 об'ємів) нагрівають до 70 °С. Розчин ангідриду метансульфоїкислоти (1,5 екв.) в MeCN (2 об'єми) додають за 50 хвилин з краплинної лійки, підтримуючи температуру нижче 75 °С. Суміш перемішують протягом додаткового 0,5 години після завершення додавання. Суміші потім дозволяють охолотитися до навколишньої температури. Етаноламін (10 екв.) додають з краплинної лійки. Після перемішування протягом 2 годин додають воду (6 об'ємів), і суміш охолоджують до 10 °С. Після перемішування протягом не менше ніж 3 годин тверду речовину збирають фільтруванням і промивають водою (3 об'єми), 2:1 MeCN/вода (3 об'єми) і MeCN (2×1,5 об'єму). Речовину висушують до постійної ваги (різниця <1 %) у вакуумній сушильній шафі при 50 °С в слабкому струмені азоту з одержанням трет-бутил-3-(6-аміно-3-метилпіридин-2-іл)бензоату у вигляді червоно-жовтої твердої речовини (вихід 53 %).

Синтез 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату



Неочищений хлорангідрид кислоти розчиняють в толуолі (2,5 об'єму з розрахунку на хлорангідрид кислоти) і додають з краплинної лійки до суміші трет-бутил-3-(6-аміно-3-метилпіридин-2-іл)бензоату (1 екв.), диметиламінопіридину (ДМАП, 0,02 екв.) і триетиламіну (3,0 екв.) в толуолі (4 об'єми з розрахунку на трет-бутил-3-(6-аміно-3-метилпіридин-2-іл)бензоат). Після 2 годин воду (4 об'єми з розрахунку на трет-бутил-3-(6-аміно-3-метилпіридин-2-іл)бензоат) додають до реакційної суміші. Після перемішування протягом 30 хвилин шари розділяють. Органічну фазу потім фільтрують і концентрують з одержанням густого масла 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату (кількісний вихід неочищеного продукту). MeCN (3 об'єми з розрахунку на неочищений продукт) додають і відганяють доти, поки кристалізація не припиниться. Додають воду (2 об'єми з розрахунку на неочищений продукт) і суміш перемішують 2 години. Тверду речовину збирають фільтруванням, промивають сумішшю 1:1 (по об'єму) MeCN/вода (2×1 об'єм з розрахунку на неочищений продукт) і частково сушать на фільтрі під вакуумом. Тверду речовину сушать до постійної ваги (різниця <1 %) у вакуумній сушильній шафі при 60 °C в слабкому струмені азоту з одержанням 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбо-ксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату у вигляді коричневої твердої речовини.

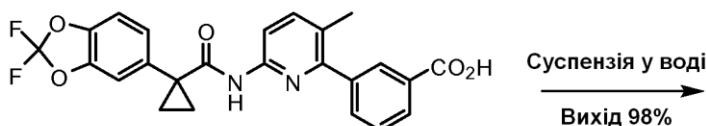
Синтез HCl солі 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти



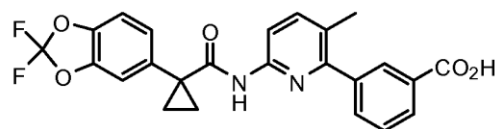
- HCl

До суспензії 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату (1,0 екв.) в MeCN (3 об'єми) додають воду (0,83 об'єму) і потім концентровану водну HCl (0,83 об'єму). Суміш нагрівають до 45 ± 5 °C. Після перемішування протягом 24-48 годин реакція завершується, і суміші дозволяють охолотитися до навколишньої температури. Воду (1,33 об'єму) додають і суміш перемішують. Тверду речовину збирають фільтруванням, промивають водою (2×0,3 об'єму), і частково сушать на фільтрі під вакуумом. Тверду речовину сушать до постійної ваги (різниця <1 %) у вакуумній сушильній шафі при 60 °C в слабкому струмені N₂ з одержанням HCl солі 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної

кислоти у вигляді не зовсім білої твердої речовини.
Синтез 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти (Форма 1).



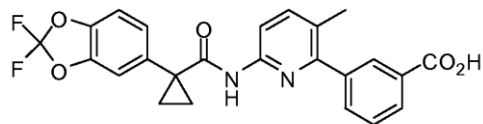
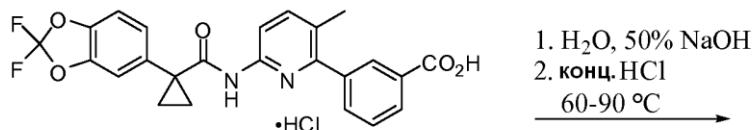
• HCl



Форма 1

Суспензію гідрохлориду 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти (1 екв.) у воді (10 об'ємів) перемішують при температурі навколишнього середовища. Зразок відбирають після перемішування протягом 24 годин. Зразок фільтрують і тверду речовину промивають водою (2×). Твердий зразок піддають аналізу ДСК. Коли аналіз ДСК вказує на повну конверсію в Форму 1, тверду речовину збирають фільтруванням, промивають водою (2×1 об'єм) і частково сушать на фільтрі під вакуумом. Тверду речовину сушать до постійної ваги (різниця <1 %) у вакуумній сушильній шафі при 60 °C в слабкому струмені N₂ з одержанням Форми 1 у вигляді не зовсім білої твердої речовини (вихід 98 %). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): 9,14 (с, 1H), 7,99-7,93 (м, 3H), 7,80-7,78 (м, 1H), 7,74-7,72 (м, 1H), 7,60-7,55 (м, 2H), 7,41-7,33 (м, 2H), 2,24 (с, 3H), 1,53-1,51 (м, 2H), 1,19-1,17 (м, 2H).

Синтез 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти (Форма 1) із застосуванням води і основи

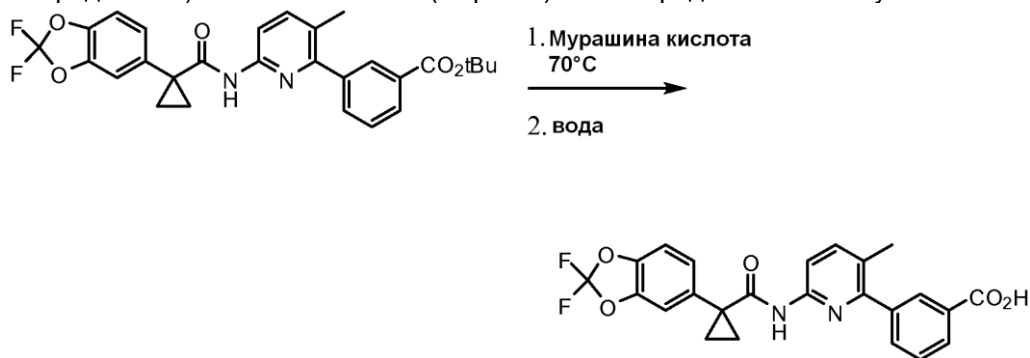


Форма 1

До суспензії гідрохлориду 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти (1 екв.) у воді (10 об'ємів), перемішуваний при температурі навколишнього середовища, додають 50 ваг. % водний розчин NaOH (2,5 екв.). Суміш перемішують не менше ніж 15 хвилин або до гомогенного розчину. Концентровану HCl (4 екв.) додають, щоб кристалізувати Форму 1. Суміш нагрівають до 60 або 90 °C, якщо треба, щоб знизити рівень трет-бутилбензоату. Суміш нагрівають, поки аналіз ВЕРХ не вказує на не більше ніж 0,8 % (площа під кривою) трет-бутилбензоату. Суміш потім охолоджують до температури навколишнього середовища, і тверду речовину збирають

фільтруванням, промивають водою (3×3,4 об'єму), і частково сушать на фільтрі під вакуумом. Тверду речовину сушать до постійної ваги (різниця <1 %) у вакуумній сушильній шафі при 60 °C і слабкому струмені N₂ з одержанням Форми 1 у вигляді не зовсім білої твердої речовини (вихід 97 %).

- 5 Синтез 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти (Форма 1) безпосередньо з бензоату



Форма 1

- Розчин 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбо-ксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату (1,0 екв.) в мурашиній кислоті (3 об'єми) нагрівають до 70±10 °C. Реакцію продовжують, поки реакція не завершиться (не більше ніж 1,0 % площі під кривою 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату) або нагрівають не більше 8 годин. Суміші дозволяють охолотитися до температури навколишнього середовища. Розчин додають у воду (6 об'ємів), нагріту до 50 °C, і суміш перемішують. Суміш потім нагрівають до 70±10 °C, поки рівень 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)-циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)-трет-бутилбензоату складе не більше 0,8 % (площа під кривою). Тверду речовину збирають фільтруванням, промивають водою (2×3 об'єми) і частково сушать на фільтрі під вакуумом. Тверду речовину сушать до постійної ваги (різниця <1 %) у вакуумній сушильній шафі при 60 °C в слабкому струмені N₂ з одержанням Сполуки 1 у Формі 1 у вигляді не зовсім білої твердої речовини.

Рентгенограма дифракції рентгенівських променів, обчислена зі структури монокристала Сполуки 1 у Формі 1, наведена на Фіг. 1. У Таблиці 1 наведені розрахункові піки для Фіг. 1.

Таблиця 1

Ранг піка	2θ кут (градуси)	Відносна інтенсивність (%)
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

- 25 Фактична рентгенограма порошкової дифракції рентгенівських променів Сполуки 1 у Формі 1 показана на Фіг. 2. Таблиця 2 наводить фактичні піки для Фіг. 2

Таблиця 2

Ранг піка	2 θ кут (градуси)	Відносна інтенсивність (%)
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

Накладення рентгенограми, розрахованої з монокристалічної структури Сполуки 1 у Формі 1, і фактичної порошкової рентгенограми Сполуки 1 у Формі 1 показано на Фіг. 3. Накладення показує хорошу відповідність між розрахунковими і фактичними положеннями піків, причому різниця становить тільки приблизно 0,15 градуса.

Крива ДСК Сполуки 1 у Формі 1 показана на Фіг. 4. Плавлення Сполуки 1 у Формі 1 має місце при приблизно 204 °C.

Конформаційні картини Сполуки 1 у Формі 1 на основі рентгенографічного аналізу монокристала показані на Фіг. 5-8. Фіг. 6-8 показують водневий зв'язок між карбоксильними групами димеру і утворюють купки, які мають місце в кристалі. Кристалічна структура показує густе упаковування молекул. Сполука 1 у Формі 1 є моноклінною, $P2_1/n$, з наступними розмірами елементарної комірки: $a=4,9626(7)$ Å, $b=12,299(2)$ Å, $c=33,075(4)$ Å, $\beta=93,938(9)^\circ$, $V=2014,0$ Å³, $Z=4$. Густина Сполуки 1 у Формі 1, розрахована зі структурних даних, становить 1,492 г/см³ при 100 К.

Спектри ¹H ЯМР Сполуки 1 показані на Фіг. 9-11 (Фіг. 9 і 10 зображують Сполуку 1 у Формі 1 в 50 мг/мл суспензії 0,5 метилцелюлози полісорбату 80, і Фіг. 11 зображує Сполуку 1 як сіль гідрохлориду).

Таблиця 3 нижче описує додаткові аналітичні дані для Сполуки 1.

Таблиця 3

№ сполуки	РХ/МС (рідинна хроматографія/мас-спектроскопія), M+1	РХ/КТ (рідинна хроматографія/кімнатна температура), хв.	¹ H ЯМР
1	453,3	1,93	¹ H ЯМР (400 МГц, DMSO-d ₆) 9,14 (с, 1H), 7,99-7,93 (м, 3H), 7,80-7,78 (м, 1H), 7,74-7,72 (м, 1H), 7,60-7,55 (м, 2H), 7,41-7,33 (м, 2H), 2,24 (с, 3H), 1,53-1,51 (м, 2H), 1,19-1,17 (м, 2H)

Аналізи

Аналізи для виявлення і вимірювання сполук-коректорів властивостей ΔF508-TRP

Оптичні методи мембранного потенціалу для аналізу сполук-модуляторів властивостей ΔF508-TRP

Оптичний аналіз мембранного потенціалу використовує чутливі до напруження датчики передачі енергії резонансу флуоресценції (ПЕРФ) (FRET, fluorescence resonance energy transfer), описані Гонсалесом і Цин (див. Gonzalez, J.E. and R.Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells" (Вимірювання напруження передачею енергії резонансу флуоресценції в одиночних клітинах) Biophys. J., 69 (4): 1272-80, і Gonzalez, J.E. and R.Y. Tsien (1997) "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer" (Поліпшені індикатори мембранного потенціалу клітини, які використовують передачу енергії резонансу флуоресценції) Chem. Biol., 4(4): 269-77) в

комбінації з апаратурою для вимірювання зміни флуоресценції, такою як рідер зонда напруження/іон (VIPR, voltage/ion probe reader, P3HI) (див. Gonzalez, J.E., K. Oades et al., (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" (Основані на клітці аналізи і апаратура для скринінгу цілей іонного каналу) Drug Discov. Today, 4(9): 431-439).

Ці аналізи, чутливі до напруження, основані на зміні передачі енергії резонансу флуоресценції (ПЕРФ, FRET) між чутливим до напруження, розчинним в мембрані барвником, DiSBAC₂(3), і флуоресцентним фосфоліпідом, CC2-DMPE, який приєднується до зовнішнього листа плазматичної мембрани і діє як донор ПЕРФ. Зміни в мембранному потенціалі (V_m) змушують негативно заряджений DiSBAC₂(3) перерозподілятися через плазматичну мембрану і кількість передачі енергії від CC2-DMPE змінюється відповідно. Зміни в емісії флуоресценції спостерігали, використовуючи P3HI (VIPR™ II), який є інтегрованим рідким пристроєм обробки і детектором флуоресценції, розробленим, щоб проводити скринінги клітин в 96- або 384-ямковому планшеті.

1. Виявлення сполук-коректорів

Для того, щоб виявити малі молекули, які виправляють дефект міграції, пов'язаний з $\Delta F508$ -TPM, розроблений метод високопродуктивного скринінгу за одне додавання. Клітини культивували в безсироватковому поживному середовищі протягом 16 годин при 37 °C в присутності або за відсутності (негативний контроль) випробуваної сполуки. Як позитивний контроль клітини, поміщені в 384-ямкові планшети, культивували протягом 16 годин при 27 °C, щоб "температурно виправити" $\Delta F508$ -TPM. Клітини потім промивали 3× розчином Кребса-Рінгера і завантажували чутливими до напруження барвниками. Щоб активувати $\Delta F508$ -TPM додавали 10 мкМ форсколіну і потенціатор TPM, геністеїн (20 мкМ), нарівні з поживним середовищем, що не містить Cl^- , в кожну ямку. Додавання поживного середовища, що не містить Cl^- , промтовало закінчення Cl^- у відповідь на активацію $\Delta F508$ -TPM, і кінцеву деполяризацію мембрани оптично спостерігали, використовуючи барвники, чутливі до напруження, на основі ПЕРФ.

2. Виявлення сполук-потенціаторів

Щоб ідентифікувати потенціатори $\Delta F508$ -TPM, розроблений формат високопродуктивного скринінгу з подвійним додаванням. Під час першого додавання поживне середовище, що не містить Cl^- , з випробуваною сполукою або без, додавали в кожну ямку. Через 22 секунди додавали друге поживне середовище, що не містить Cl^- і містить 2-10 мкМ форсколіну, щоб активувати $\Delta F508$ -TPM. Позаклітинна концентрація Cl^- після обох додавань становила 28 мМ, яка промтовувала закінчення Cl^- у відповідь на активацію $\Delta F508$ -TPM, і кінцеву деполяризацію мембрани оптично спостерігали, використовуючи барвники, чутливі до напруження, на основі ПЕРФ.

3. Розчини

Омивальний розчин #1: (в мМ)

NaCl 160, KCl 4,5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES (N-2-гідроксіетилпіперазин-N-2-етансульфокислота) 10, pH 7,4 з NaOH.

Омивальний розчин, що не містить Cl^-

хлориди в розчині #1 замінюють глюконатами.

CC2-DMPE:

Готують як 10 мМ основний розчин в диметилсульфоксиді (ДМСО) і зберігають при -20 °C.

DiSBAC₂(3):

Готують як 10 мМ вихідний розчин в ДМСО і зберігають при -20 °C.

4. Клітинна культура

Фібробласти миші NIH3T3, стійко експресуючі $\Delta F508$ -TPM, застосовують для оптичних вимірювань мембранного потенціалу. Клітини витримують при 37 °C, 5 % CO₂ і 90 % вологості в поживному середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко, з додаванням 2 мМ глутаміну, 10 % ембріональної бичачої сироватки, 1× NEAA (non-essential amino acids, замінні амінокислоти), β -ME (beta-mercaptoethanol, 2-меркаптоетанол), 1× пеніцилін/стрептоміцин і 25 мМ HEPES в 175 мл культуральних колбах. Для всіх оптичних аналізів клітини висівали в кількості 30000/ямку в 384-ямковому планшеті, покритому матриксгелем (еластичний гель гіалуронової кислоти), і культивували протягом 2 годин при 37 °C перш ніж культивували при 27 °C протягом 24 годин для аналізу потенціатора. Для корекційного аналізу клітини культивують при 27 °C або 37 °C з і без сполук протягом 16-24 годин.

Електрофізіологічні аналізи для виявлення сполук з властивостями модуляції $\Delta F508$ -TPM

1. Застосування камерного аналізу

Камерні експерименти виконували на поляризованих клітинах епітелію, експресуючих $\Delta F508$ -TPM, щоб додатково характеризувати модулятори $\Delta F508$ -TPM, ідентифіковані в

оптичних аналізах. Епітеліальні клітини репродуктивного тракту самиць, РТС, (FRT^{ΔF508-TPM}), вирощені на вставках клітинної культури Costar Snapwell, встановлювали в камері Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), і моношари безперервно коротко замикали, використовуючи вольт-кламп систему (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA, and Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA). Трансепітеліальний опір вимірювали, застосовуючи імпульс 2 мВ. У цих умовах епітелій РТС демонстрував опір 4 кΩ/см² або більше. Розчини підтримували при 27 °С і барботували повітрям. Електродний початковий потенціал і опір флюїду виправляли, використовуючи безклітинну вставку. У цих умовах струм відображає потік Cl⁻ через ΔF508-TPM, експресований в апікальній мембрані. I_{sc} одержували в цифровій формі, використовуючи інтерфейс MP100A-CE і програмне забезпечення AcqKnowledge (v3.2.6; BIOPAC System, Santa Barbara, CA).

2. Виявлення сполук-коректорів

Типовий протокол використовував градієнт концентрації Cl⁻ від базолатеральної до апікальної мембрани. Щоб встановити цей градієнт, нормальний рінгер використовували на базолатеральній мембрані, тоді як апікальний NaCl заміняли еквімолекулярною кількістю глюконату натрію (титрованого NaOH до pH 7,4), щоб дати великий градієнт концентрацій Cl⁻ через епітелій. Всі експерименти виконували з інтактними моношарами. Щоб повністю активувати ΔF508-TPM, форсколін (10 мкМ) і інгібітор фосфодієстерази (ФДЕ), IBMX (100 мкМ) застосовували з подальшим додаванням потенціатора TPM, геністеїну (50 мкМ).

Як спостерігають в інших типах клітин, культивування при низьких температурах клітин РТС, стійко експресуючих ΔF508-TPM, збільшує функціональну густину TPM в плазматичній мембрані. Щоб визначити активність сполук-коректорів, клітини культивували з 10 мкМ випробуваної сполуки протягом 24 годин при 37 °С і потім промивали 3× до фіксації. I_{sc}, опосередкований цАМФ і геністеїном, в клітинах, оброблених сполукою, нормалізували до 27 °С і 37 °С контрольних прикладів і виражали як активність в процентах. Попереднє культивування клітин із сполукою-коректором значно збільшувало цАМФ- і геністеїн-опосередкований I_{sc} в порівнянні з 37 °С контрольного прикладу.

3. Виявлення сполук-потенціаторів

Типовий протокол використовував градієнт концентрації Cl⁻ від базолатеральної до апікальної мембрани. Щоб встановити цей градієнт, нормальні рінгери використовували на базолатеральній мембрані і пермеабілізували ністатином (360 мкг/мл, тоді як апікальний NaCl заміняли еквімолекулярною кількістю глюконату натрію (титрованого NaOH до pH 7,4), щоб дати великий градієнт концентрацій Cl⁻ через епітелій. Всі експерименти виконували через 30 хвилин після пермеабілізації ністатином. Форсколін (10 мкМ) і всі випробувані сполуки додавали на обидві сторони вставок клітинної культури. Ефективність передбачуваних потенціаторів ΔF508-TPM порівнювали з ефективністю відомого потенціатора, геністеїну.

4. Розчини

Базолатеральний розчин (в мМ): NaCl (135), CaCl₂ (1,2), MgCl₂ (1,2), K₂HPO₄ (2,4), KHPO₄ (0,6), HEPES (N-2-гідроксietилпіперазин-N'-2-етансульфо кислота) (10) і декстроза (10). Розчин титрували NaOH до pH 7,4.

Апікальний розчин (в мМ): Той же самий, що і базолатеральний розчин з NaCl, заміненим на глюконат натрію (135).

5. Клітинна культура

Епітеліальні клітини РТС щурів Фішера, експресуючі ΔF508-TPM (РТС^{ΔF508-TPM}), використовували для експериментів в камері Ussing для передбачуваних модуляторів ΔF508-TPM, виявлених з наших оптичних аналізів. Клітини культивували на вставках клітинної культури Costar Snapwell і культивували протягом п'яти днів при 37 °С і 5 % CO₂ в поживному середовищі F-12 Хема, модифікованому Куном, з додаванням 5 % ембріональної сироватки теляти, 100 Е/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Перед застосуванням для характеристики потенціюючої активності сполук, клітини культивували при 27 °С протягом 16-48 годин, щоб виправити ΔF508-TPM. Щоб визначити активність сполук-коректорів, клітини культивували при 27 °С або 37 °С із сполуками і без протягом 24 годин.

6. Фіксації потенціалу цілої комірки

Макроскопічний струм ΔF508-TPM (I_{ΔF508}) в клітинах N1H3T3, виправлених температурою і випробуваною сполукою, стійко експресуючих ΔF508-TPM, спостерігали, використовуючи варіант перфорований патч-фіксації потенціалу цілої клітини. Коротко, вольт-кламп фіксації I_{ΔF508} виконували при кімнатній температурі, використовуючи Axopatch 200 В петч-кламп підсилювач фіксації потенціалу (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Всі фіксації одержували при частоті відбору проб 10 кГц і низькочастотному фільтруванні при 1 кГц. Піпетки мали опір 5-

6 МΩ, коли наповнені внутрішньоклітинним розчином. У цих умовах фіксації розрахунковий потенціал реверсії для Cl^- (E_{Cl}) при кімнатній температурі становив -28 мВ. Всі фіксації мали замикаючий опір >20 ГΩ і додатковий опір <15 МΩ. Генерацію імпульсу, одержання і накопичення даних і аналіз виконували, використовуючи ПК, обладнаний інтерфейсом 1320 Digidata A/D в поєднанні з Clampex 8 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Ванна містила <250 мкл сольового розчину і безперервно протікала по нормі 2 мл/хвилину, використовуючи керовану силою тяжіння систему течії.

7. Виявлення сполук-коректорів

Щоб визначити активність сполук-коректорів для зростаючої густини функціонального ΔF508-TPM в плазматичній мембрані, використовували вищеописані методики перфорований патч-фіксації, щоб виміряти густину струму після обробки протягом 24 годин сполуками-коректорами. Щоб повністю активувати ΔF508-TPM, 10 мкМ форсколіну і 20 мкМ геністеїну додавали до клітин. У наших умовах фіксації густина струму після культивування 24 години при 27 °C була більш високою, ніж спостережувана після культивування 24 години при 37 °C. Ці результати сумісні з відомими впливами низькотемпературного культивування на густину ΔF508-TPM в плазматичній мембрані. Щоб визначити впливи сполук-коректорів на густину струму TPM, клітини культивували з 10 мкМ випробуваної сполуки протягом 24 годин при 37 °C, і густину струму порівнювали з контрольним прикладом при 27 °C і 37 °C (% активності). Перед фіксацією клітини промивали 3× з позаклітинним середовищем фіксації, щоб видалити сліди випробуваної сполуки, що залишається. Попереднє культивування з 10 мкМ сполук виправлення значно збільшувало цАМФ- і геністеїн-залежний струм в порівнянні з контрольним прикладом при 37 °C.

8. Виявлення сполук-потенціаторів

Здатність потенціаторів ΔF508-TPM збільшити макроскопічний ΔF508-TPM струм Cl^- ($I_{\Delta F508}$) в клітинах NIH3T3, стійко експресуючих ΔF508-TPM, також досліджували, застосовуючи методики перфорований патч-фіксації. Потенціатори, виявлені з оптичних аналізів, викликали залежне від дози збільшення $I_{\Delta F508}$ з подібною потенцією і ефективністю, спостережуваною в оптичних аналізах. У всіх досліджених клітинах потенціал реверсії перед і під час застосування потенціатора становив приблизно -30 мВ, який є розрахунковим E_{Cl} (-28 мВ).

9. Розчини

Внутрішньоклітинний розчин (в мМ):	Cs-аспартат (90), CsCl (50), MgCl ₂ (1), HEPES (10) і 240 мкг/мл амфотерицину-В (рН приводять CsOH до 7,35).
Позаклітинний розчин (в мМ):	N-метил-D-глюкамін (NMDG)Cl (150), MgCl ₂ (2), CaCl ₂ (2), HEPES (10) (рН приводять HCl до 7,35).

10. Клітинна культура

Фібробласти миші NIH3T3, стійко експресуючі ΔF508-TPM, використовуються для фіксації потенціалу всієї клітини. Клітини витримують при 37 °C, 5 % CO₂ і 90 % вологості в поживному середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко, з додаванням 2 мМ глютаміну, 10 % ембріональної бичачої сироватки, 1× NEAA (замінні амінокислоти), β-ME (2-меркаптоетанол), 1× пеніцилін/стрептоміцин і 25 мМ HEPES в 175 мл культуральній колбі. Для фіксації потенціалу всієї клітини 2500-5000 клітин висівали на покривні стекла, покриті полі-L-лізином, і культивували протягом 24-48 годин при 27 °C перед використанням, щоб випробувати активність потенціаторів; і культивували із сполуками-коректорами або без при 37 °C для того, щоб виміряти активність коректорів.

11. Одноканальна фіксація

Одноканальні активності виправленого температурою ΔF508-TPM, стійко експресованого в клітинах NIH3T3, і активність потенціаторів спостерігали, використовуючи варіант внутрішня сторона назовні на вирізаному фрагменті мембрани. Коротко, вольт-кламп фіксації потенціалу одноканальної активності виконували при кімнатній температурі з петч-кламп підсилювачем Axopatch 200 B (Axon Instruments Inc.). Всі фіксації одержували при частоті відбору проб 10 кГц і низькочастотному фільтруванні при 400 Гц. Піпетку виготовляли зі скла Corning Kovar Sealing #7052 (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL), і вона мала опір 5-8 МΩ, коли наповнена позаклітинним розчином. ΔF508-TPM активували після вирізування, додаючи 1 мМ Mg-АТФ і 75 нМ цАМФ-залежної протеїнкінази, каталітичної субодиниці РКА (протеїнкіназа) (Promega Corp. Madison, WI). Після того, як активність каналу стабілізувалася, фрагмент поливали, використовуючи керовану силою тяжіння систему мікрополиву. Приплив поміщали поруч з фрагментом, що приводить до повного обміну розчину в межах 1-2 секунд. Щоб підтримувати активність ΔF508-TPM під час швидкого протікання, неспецифічний інгібітор фосфатази F⁻ (10 мМ NaF) додавали до розчину ванни. У цих умовах фіксації активність каналу залишалася постійною по всій тривалості фіксації потенціалу фрагмента (до 60 хвилин). Струми, що

проводяться позитивним зарядом, який рухається від внутрішньо- до позаклітинних розчинів (аніони, рухаються в протилежному напрямі), показані як позитивні струми. Потенціал піпетки (V_p) підтримували при 80 мВ.

- Активність каналу аналізували з фрагментів мембран, що містять ≤ 2 активних канали.
- 5 Максимальна кількість одночасних отворів визначала кількість активних каналів протягом експерименту. Щоб визначити амплітуду одноканального струму, дані, зареєстровані за 120 секунд активності $\Delta F508$ -TRP, фільтрували "офлайн" при 100 Гц і потім використовували, щоб створити гістограми амплітуди по всіх точках, які були оснащені мультигауссовими функціями, використовуючи програмне забезпечення Bio-Patch Analysis (Bio-Logic Comp. France). Повний
- 10 мікроскопічний струм і відкриту імовірність (P_0) визначали зі 120 секунд активності каналу. P_0 визначали, використовуючи програмне забезпечення Bio-Patch, або із залежності $P_0 = I/i(N)$, де I = струм, i = амплітуда одноканального струму і N = число активних каналів в ділянці.

12. Розчини

Позаклітинний розчин (в мМ):

NMDG (150), аспарагінова кислота (150), CaCl_2 (5), MgCl_2 (2), і HEPES (10) (pH приведений до 7,35 основою Tris.

Внутрішньоклітинний розчин (в мМ):

NMDG-Cl (150), MgCl_2 (2), EGTA (етиленглікольтетраоцтова кислота) (5), TES (10) і основа Tris (14) (pH приведений HCl до 7,35).

13. Клітинна культура

- 15 Фібробласти миші NIH3T3, стійко експресуючі $\Delta F508$ -TRP, застосовують для патч-кламп фіксації потенціалу вирізаної мембрани. Клітини витримують при 37 °C, 5 % CO_2 і 90 % вологості в поживному середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко, з додаванням 2 мМ глутаміну, 10 % ембріональної бичачої сироватки, 1× NEAA (замінні амінокислоти), β ME (2-меркаптоетанол), 1× пеніцилін/стрептоміцин і 25 мМ HEPES в 175 мл культуральній колбі. Для
- 20 одноканальних фіксацій 2500-5000 клітин висівали на покривні стекла, покриті полі-L-лізином, і культивували протягом 24-48 годин при 27 °C перед використанням.

Використовуючи процедури, описані вище, активність, тобто E_{K50} , Сполуки 1 була виміряна і показана в Таблиці 4.

Таблиця 4

Завантаження IK_{50}/E_{K50} : +++<=2,0<+<-5,0<+

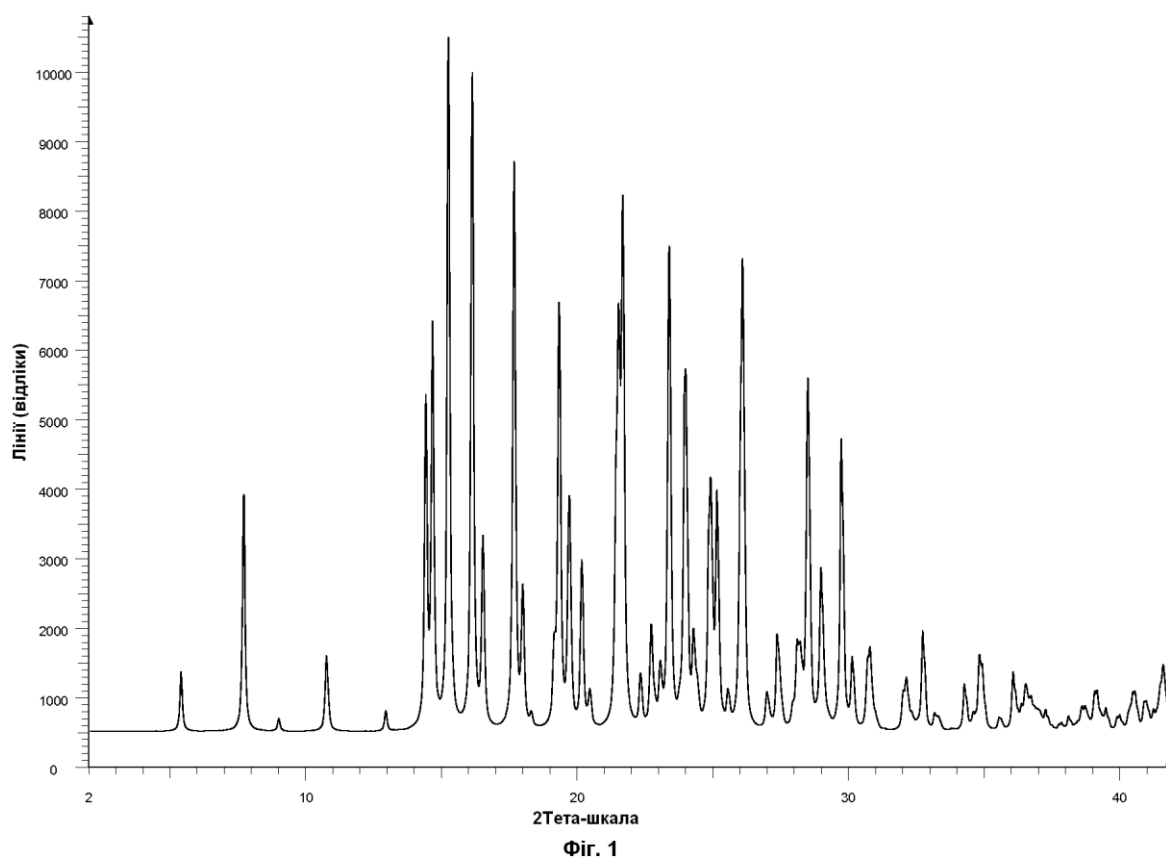
Завантаження % активності: +<=25,0<+<=100,0<+++		
№ сполуки	Відсортована E_{K50}	Відсортована максимальна ефективність
1	+++	+++

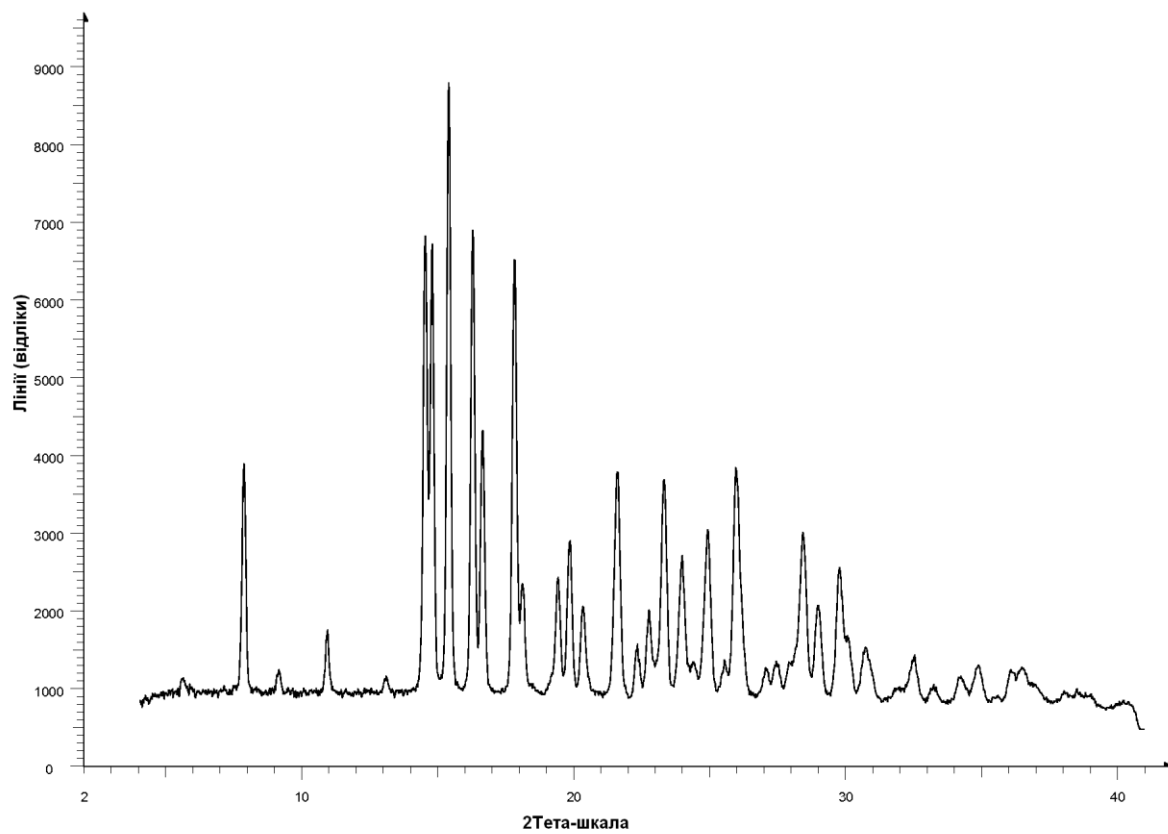
25

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

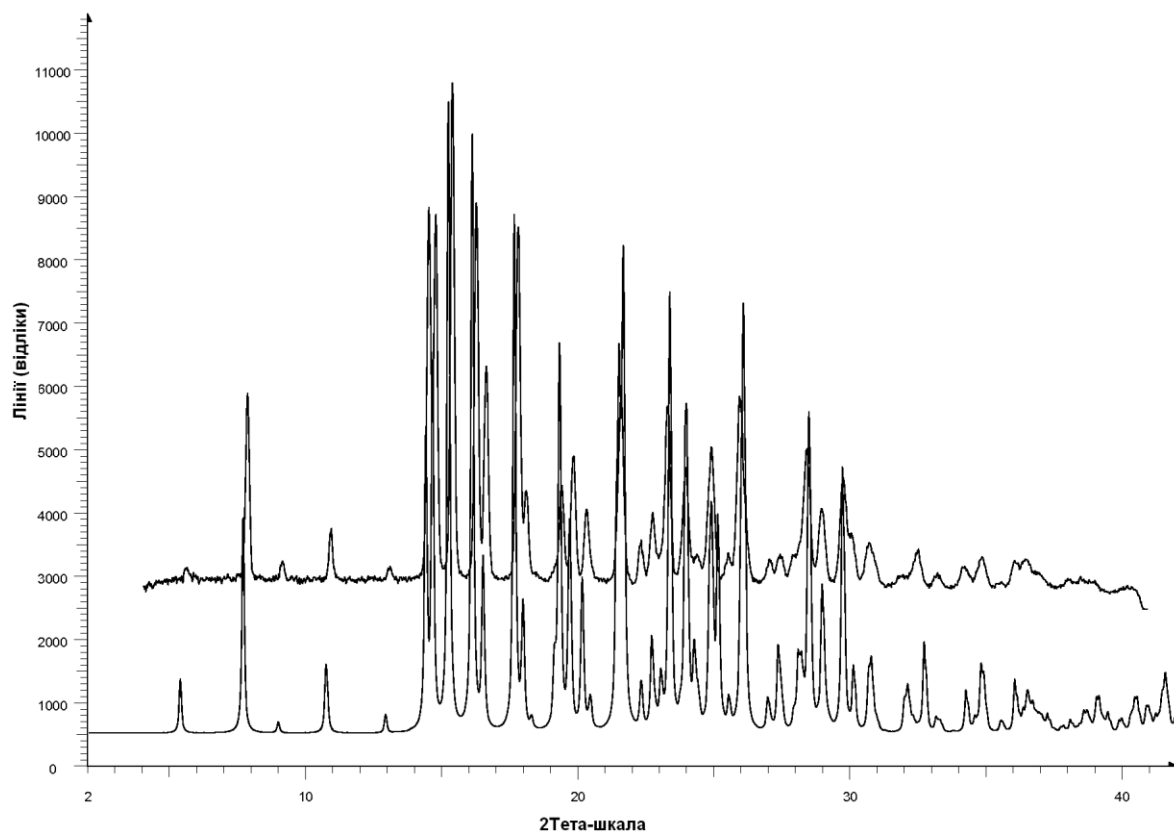
1. 3-(6-(1-(2,2-Дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойна кислота, охарактеризована у вигляді Форми 1, яка характеризується одним або
- 30 більше піками при 15,2-15,6 градусах, 16,1-16,5 градусах, 14,3-14,7 градусах, 14,6-15,0 градусах і 17,6-18,0 градусах на порошковій рентгенограмі, одержаній з використанням $\text{CuK}\alpha$ випромінювання.
2. Форма 1 за п. 1, яка характеризується одним або більше піками при 15,4, 16,3 і 14,5 градусах.
- 35 3. Форма 1 за п. 1, яка додатково характеризується піком при 14,8 градусах.
4. Форма 1 за п. 1, яка додатково характеризується піком при 17,8 градусах.
5. Форма 1 за п. 1, яка додатково характеризується піком при 16,4-16,8 градусах.
6. Форма 1 за п. 5, яка додатково характеризується піком при 16,4-16,8 градусах.
7. Форма 1 за п. 6, яка додатково характеризується піком при 16,6 градусах.
- 40 8. Форма 1 за п. 6, яка додатково характеризується піком при 7,6-8,0 градусах.
9. Форма 1 за п. 8, яка додатково характеризується піком при 7,8 градусах.
10. Форма 1 за п. 8, яка додатково характеризується піком при 25,8-26,2 градусах.
11. Форма 1 за п. 10, яка додатково характеризується піком при 26,0 градусах.
12. Форма 1 за п. 10, яка додатково характеризується піком при 21,4-21,8 градусах.
- 45 13. Форма 1 за п. 12, яка додатково характеризується піком при 21,6 градусах.
14. Форма 1 за п. 12, яка додатково характеризується піком при 23,1-23,5 градусах.
15. Форма 1 за п. 14, яка додатково характеризується піком при 23,3 градусах.

16. Форма 1 за п. 1, яка характеризується картиною дифракції, по суті подібною картині на Фіг. 1.
17. Форма 1 за п. 1, яка характеризується картиною дифракції, по суті подібною картині на Фіг. 2.
- 5 18. Форма 1 за п. 1, в якій розподіл частинок за розмірами D90 становить приблизно 82 мкм або менше.
19. Форма 1 за п. 1, в якій розподіл частинок за розмірами D50 становить приблизно 30 мкм або менше.
20. Фармацевтична композиція, що містить Форму 1 за п. 1 і фармацевтично прийнятний носій.
- 10 21. Спосіб лікування муковісцидозу у ссавця, який включає введення ссавцеві ефективної кількості Форми 1 за п. 1.
22. Спосіб за п. 21, який включає введення додаткового терапевтичного засобу.
23. Набір, який включає Форму 1 за п. 1 і інструкцію по її застосуванню.
24. Спосіб одержання Форми 1 за п. 1, який включає суспендування або розчинення HCl-солі 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти у придатному розчиннику протягом ефективного періоду часу.
- 15 25. Спосіб за п. 24, в якому придатним розчинником є вода або 50% суміш метанол/вода.
26. Спосіб за п. 24, в якому придатним розчинником є вода.
27. Спосіб за п. 24, в якому ефективний період часу становить 2-24 години.
- 20 28. Спосіб за п. 24, в якому ефективний період часу становить 2-6 годин.
29. Кристалічна форма 3-(6-(1-(2,2-дифторбензо[d][1,3]-діоксол-5-іл)циклопропанкарбоксамідо)-3-метилпіридин-2-іл)бензойної кислоти, що має моноклінну кристалічну систему, просторову групу P2₁/n і наступні розміри елементарної комірки:
a=4,9626(7) Å; α=90°;
25 b= 12,2994(18) Å; β=93,938(9)°;
c=33,075(4) Å; γ=90°.

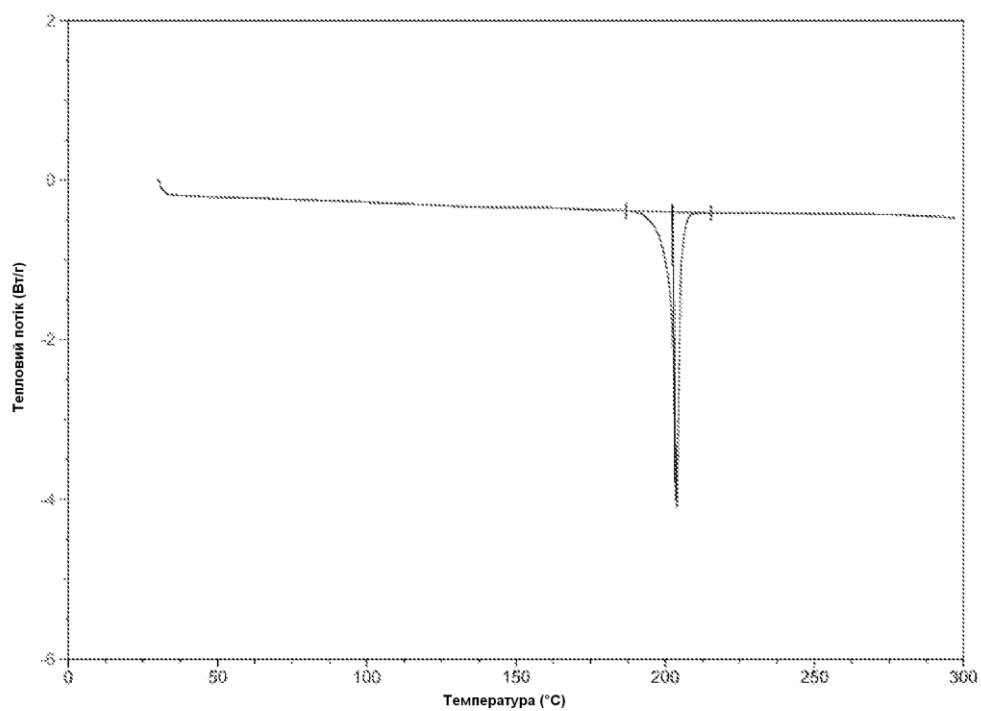




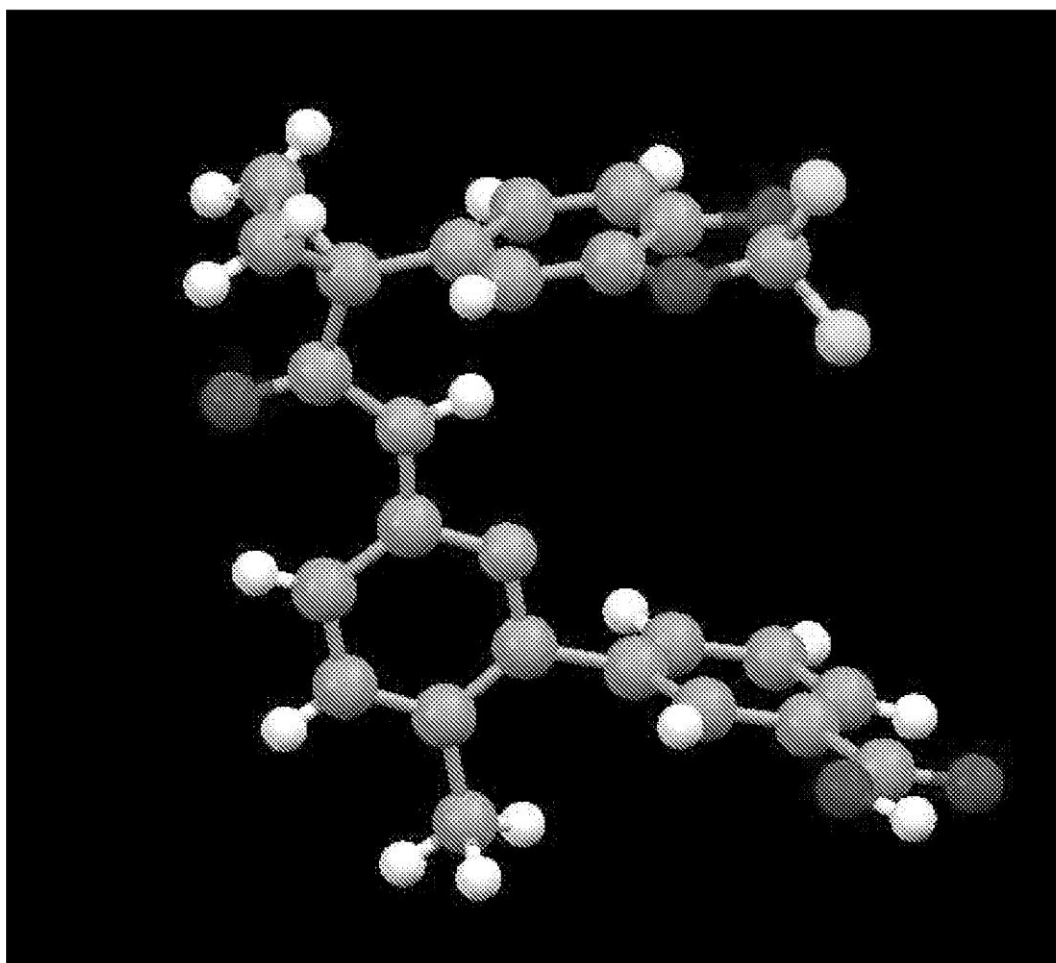
Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5

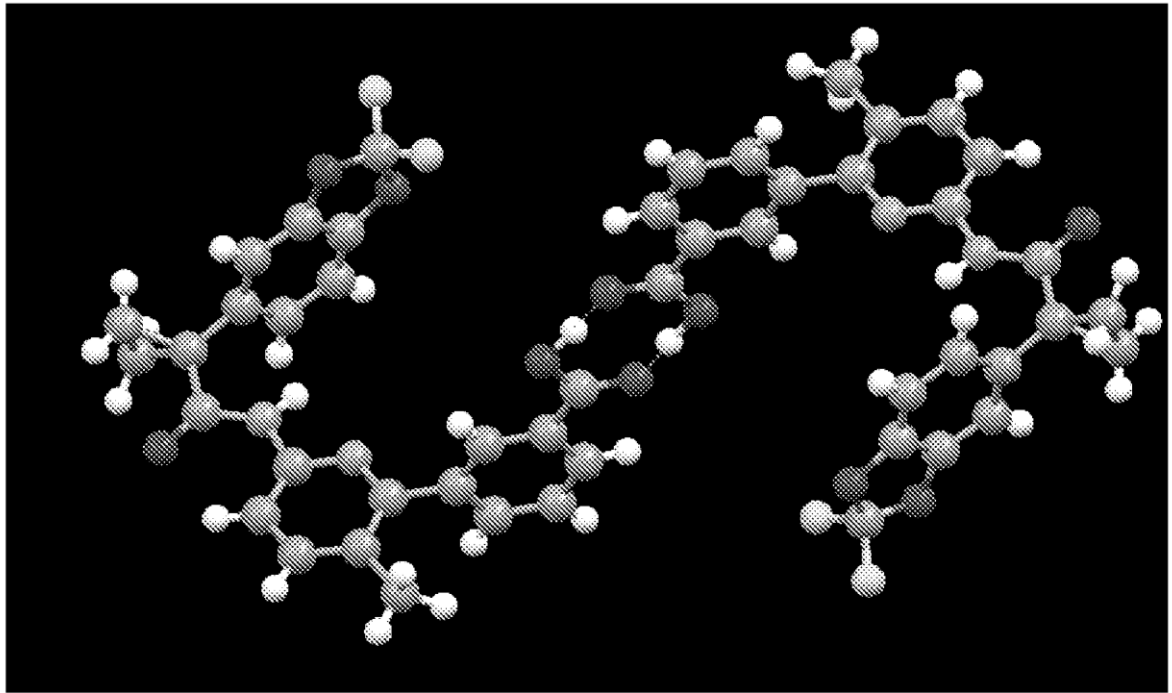


Fig. 6

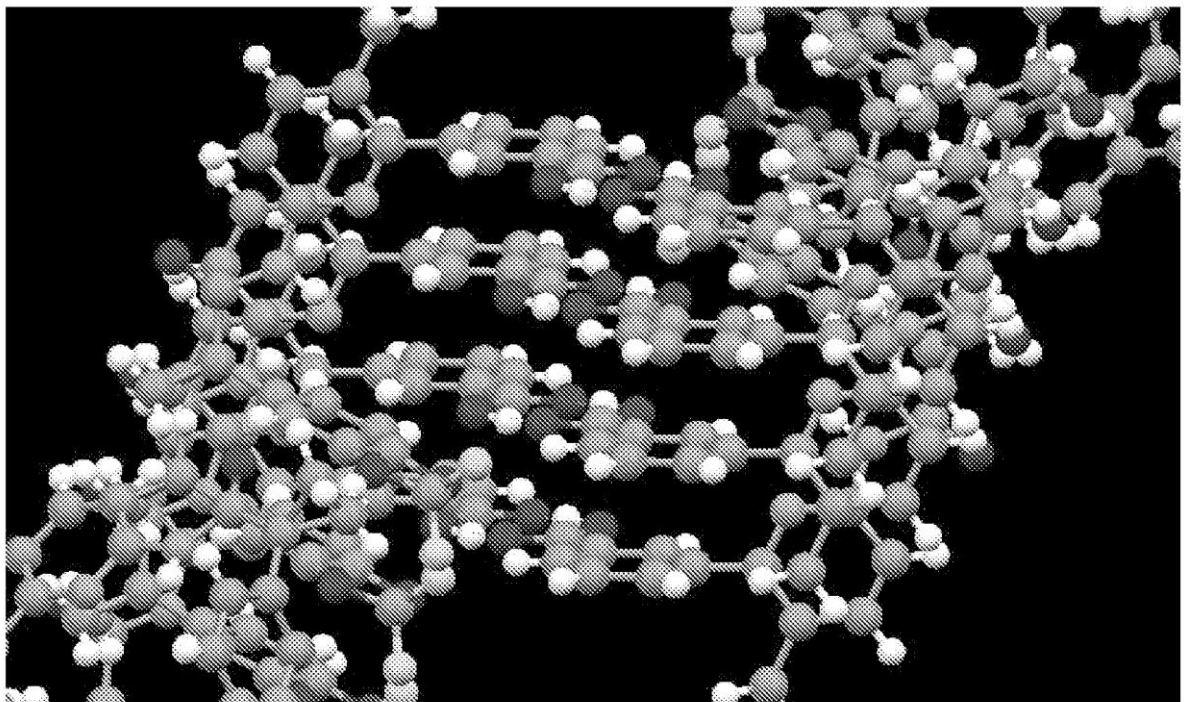


Fig. 7

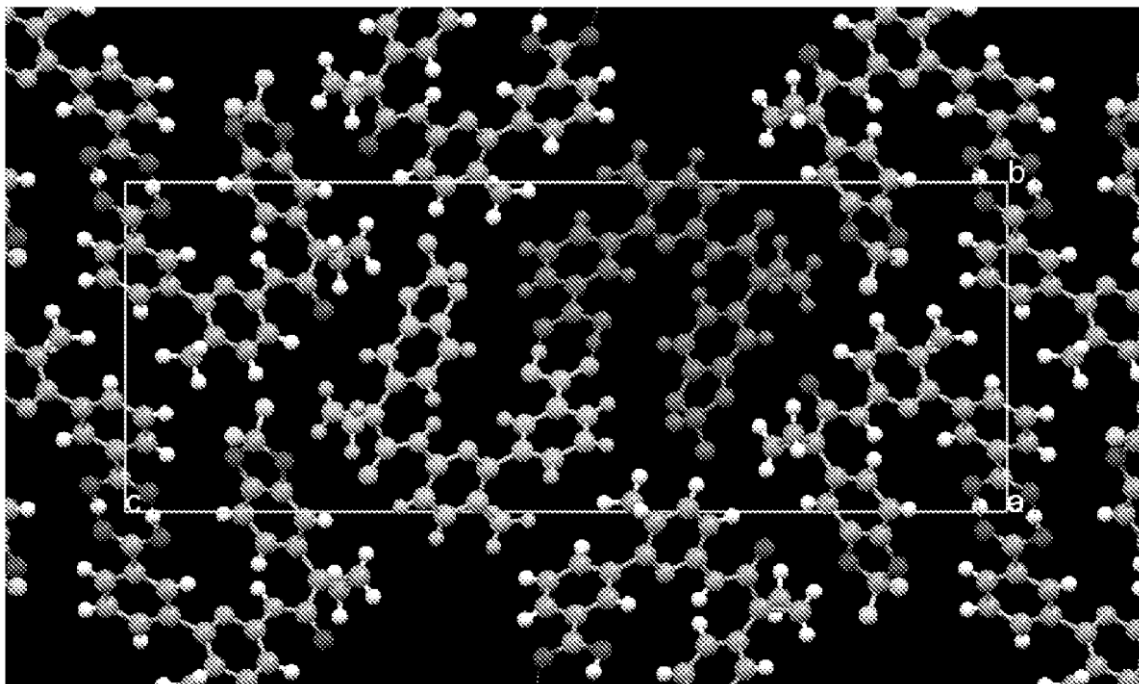


Fig. 8

50 мг/мл, 0,5% метилцеллюлоза / 0,5% Твін 80, Час 0

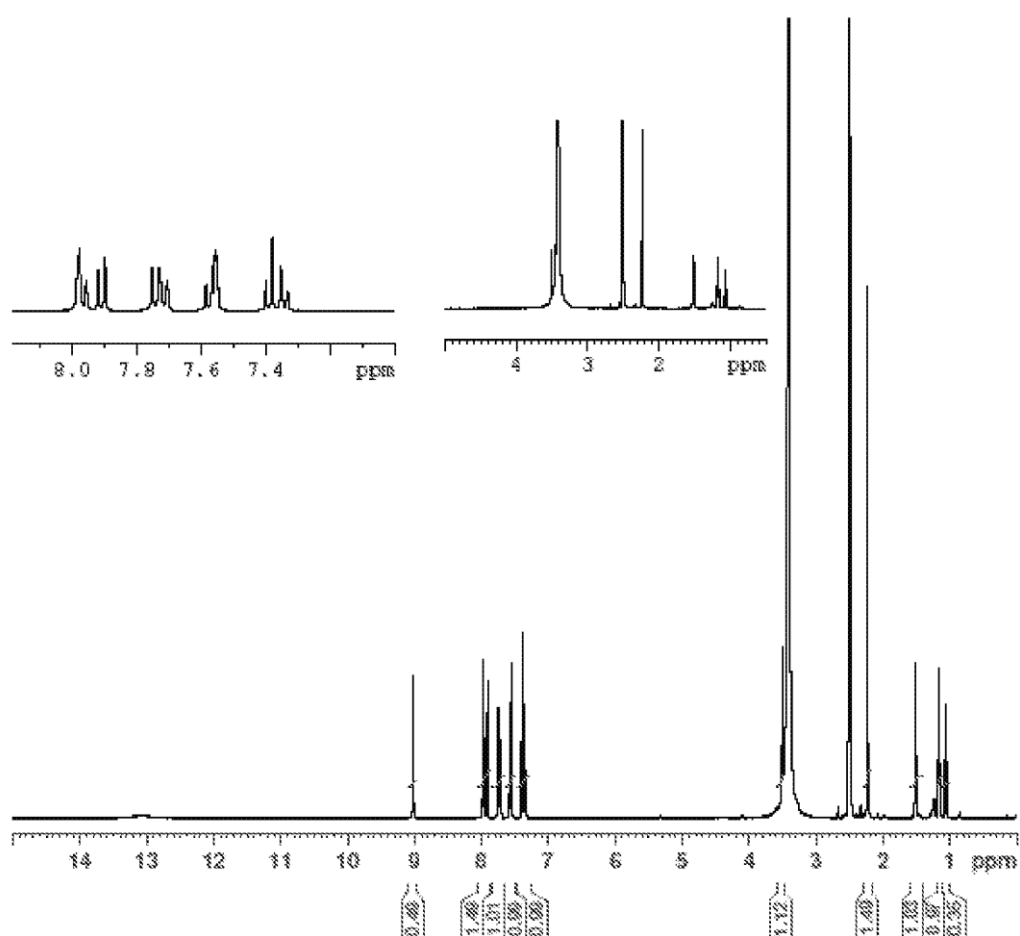
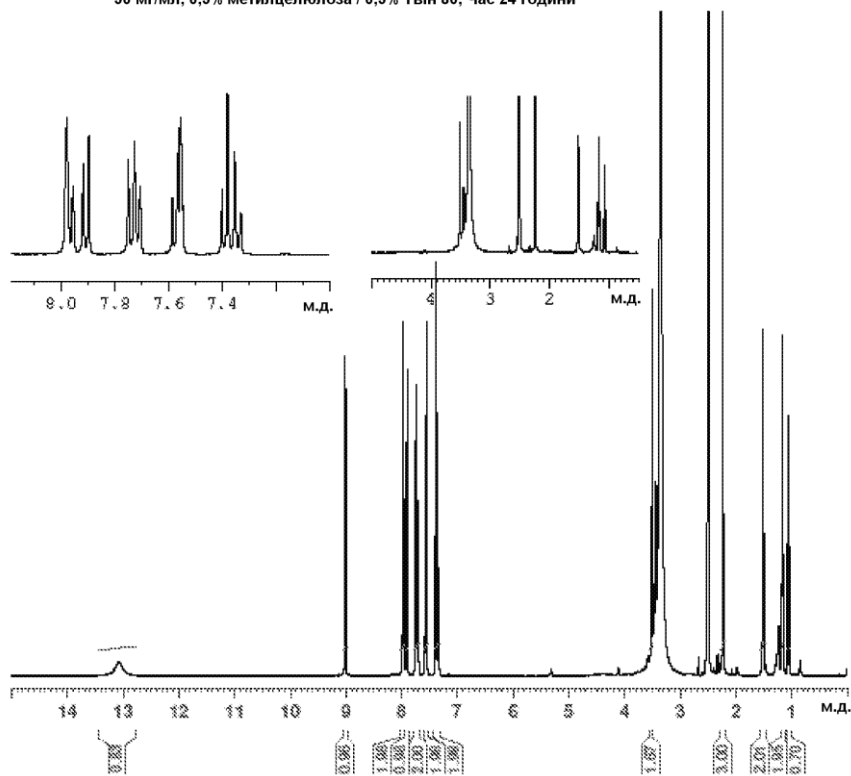


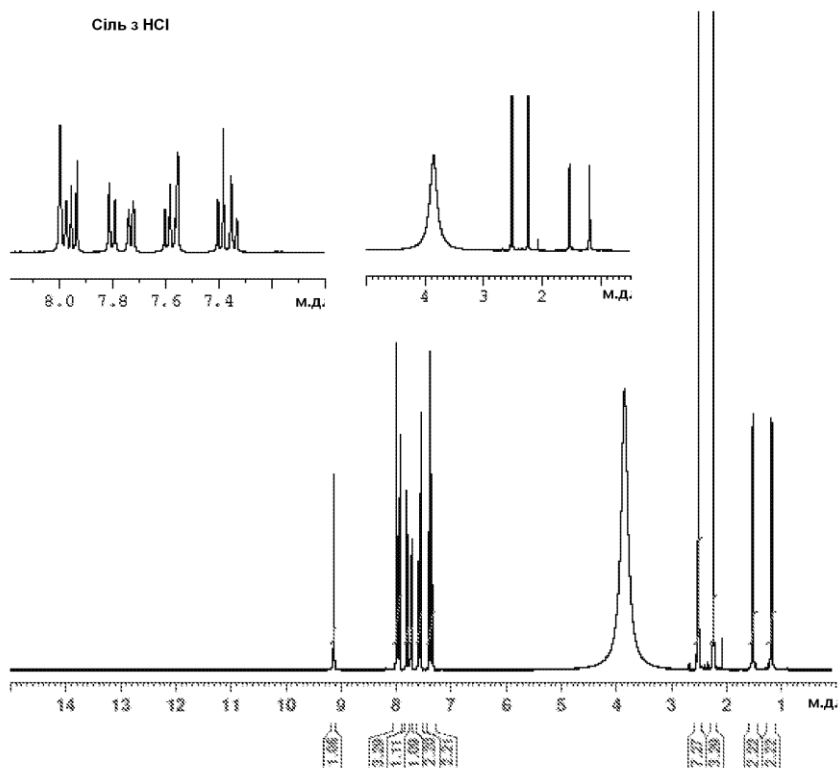
Fig. 9

50 мг/мл, 0,5% метилцелюлоза / 0,5% Твін 80, Час 24 години



Фіг. 10

Сіль з HCl



Фіг. 11

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601