

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11)

014960

(13)

B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: 2011.04.29

(51) Int. Cl. C07D 403/12 (2006.01)
C07D 207/273 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
C07D 317/72 (2006.01)

(21) Номер заявки: 200900244

(22) Дата подачи: 2007.07.26

(54) МОДУЛЯТОРЫ АКТИВНОСТИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ, ИХ КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ ФОРМЫ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 60/834,235; 60/896,026; 11/782,704

(56) WO-A-2005/021500

(32) 2006.07.28; 2007.03.21; 2007.07.25

US-A1-2005/054627

(33) US

(43) 2009.08.28

(86) PCT/US2007/074438

(87) WO 2008/014381 2008.01.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ КОМПАНИ
(US)

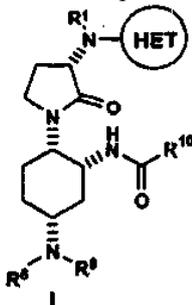
(72) Изобретатель:

Ян Майкл Г., Черни Роберт Дж., Истгейт
Мартин Г., Маслхиддиноглу Джейл, Пра-
сад Шива Джосиула, Сяо Цили (US)

(74) Представитель:

Дементьев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение включает антагонист или частичные агонисты/антагонисты MCP-1 рецепторной активности: N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль либо сольват, проявляющие неожиданное сочетание фармакологических характеристик. Также охватываются кристаллические формы соединений по настоящему изобретению. Изобретение рассматривает фармацевтические композиции, содержащие эти соединения, и способы их применения для лечения воспалительных заболеваний, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний. Рассмотрен способ получения соединений формулы I, включая соединение, указанное выше, где R¹ обозначает водород или аминокатитную группу; R⁸ и R⁹, независимо, выбирают из водорода и C₁₋₆алкила; R¹⁰ обозначает C₁₋₆алкил; HET представляет собой возможно замещенное 3-14-членное гетероциклическое или гетероарильное кольцо, содержащее N, O или S в качестве гетероатомов. Изобретение также относится к соединениям, применимым в способе получения в качестве интермедиатов.



014960

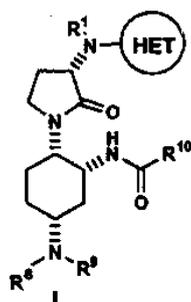
B1

B1

014960

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение включает N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство, проявляющие неожиданное сочетание нужных фармакологических характеристик. Также охватываются кристаллические формы соединений по настоящему изобретению. Также объектами данного изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие эти соединения, и способы их применения в качестве агентов для лечения воспалительных заболеваний, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний. Настоящее изобретение также включает способ получения соединений формулы I, включая N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид



где R¹, R⁸, R⁹, R¹⁰ и **HET** представлены в данном описании.

Также в данное изобретение включаются соединения, применимые в способе получения в качестве интермедиатов.

Предпосылки создания изобретения

Хемокины представляют собой хемотаксические цитокины с молекулярной массой 6-15 кДа, которые высвобождаются большим числом клеток, чтобы привлекать и активировать, наряду с прочими типами клеток, Т- и В-лимфоциты, эозинофилы, базофилы и нейтрофилы (обзор см. в Charo and Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445; Rollins, *Blood* 1997, 90, 909-928). Хемокины делятся на два основных класса, CXC и CC, в зависимости от того, разделены первые два цистеиновых остатка в аминокислотной последовательности отдельной аминокислотой (CXC) или прилегают друг к другу (CC). Хемокины CXC, такие как интерлейкин-8 (IL-8), нейтрофил-активирующий белок-2 (NAP-2) и фактор роста меланомы (MGSA), являются хемотаксическими, прежде всего, по отношению к нейтрофилам и Т-лейкоцитам, тогда как CC хемокины, такие как RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , моноцитарные хемотаксические белки (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 и MCP-5) и эотаксины (-1 и -2), являются хемотаксическими (наряду с прочими типами клеток) по отношению к макрофагам, Т-лимфоцитам, эозинофилам, дендритным клеткам и базофилам. Существуют хемокины лимфотактин-1, лимфотактин-2 (оба являются С хемокинами) и фракталкин (CX₃C хемокин), которые не относятся ни к одному из основных подсемейств хемокинов.

Хемокины связываются со специфическими рецепторами клеточной поверхности, принадлежащими к семейству связанных с G-белком белков с семью трансмембранными доменами (см. обзор в Noguk, *Trends Pharm. Sci.* 1994, 15, 159-165), которые называются "хемокиновыми рецепторами" ("рецепторы хемокинов"). При связывании их родственных лигандов хемокиновые рецепторы трансдуцируют (переносят) внутриклеточный сигнал через ассоциированные G-белки, что приводит, наряду с прочими откликами, к быстрому повышению внутриклеточной концентрации кальция, изменению формы клеток, повышенной экспрессии молекул клеточной адгезии, дегрануляции и стимулированию клеточной миграции. Имеется по меньшей мере десять человеческих хемокиновых рецепторов, которые связываются с CC хемокинами или отвечают на них, со следующими характеристическими паттернами (обзор в Zlotnik and Oshie *Immunity* 2000, 12, 121): CCR1 (или "CKR-1", или "CC-CKR-1") [MIP-1 α , MCP-3, MCP-4, RANTES] (Ben-Barruch, et al., *Cell.* 1993, 72, 415-425, и Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR2A и CCR-B (или "CKR-2A"/"CKR-2B", или "CC-CKR-2A"/"CC-CKR-2B") [MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5] (Charo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 2752-2756, Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR3 (или "CKR-3", или "CC-CKR-3") [эотаксин-1, эотаксин-2, RANTES, MCP-3, MCP-4] (Combadiere, et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 16491-16494, Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR4 (или "CKR-4", или "CC-CKR-4") [TARC, MDC] (Power, et al., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 19495-19500, Luster, *New Eng. J. Med.* 1998, 338, 436-445); CCR5 (или "CKR-5", или "CC-CKR-5") [MIP-1 α , RANTES, MIP-1 β] (Sanson, et al., *Biochemistry* 1996, 35, 3362-3367); CCR6 (или "CKR-6", или "CC-CKR-6") [LARC] (Baba, et al., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 14893-14898); CCR7 (или "CKR-7", или "CC-CKR-7") [ELC] (Yoshie et al., *J. Leukoc. Biol.* 1997, 62, 634-644); CCR8 (или "CKR-8", или "CC-CKR-8") [1-309] (Napolitano et al., *J. Immunol.*, 1996, 157, 2759-2763); CCR10 (или "CKR-10", или "CC-CKR-10") [MCP-1, MCP-3] (Bonini, et al., *DNA and Cell. Biol.* 1997, 16, 1249-1256) и CCR11 [MCP-1, MCP-2 и MCP-4]

(Schweickert, et al., J. Biol. Chem. 2000, 275, 90550).

Было показано, что, помимо хемокиновых рецепторов млекопитающих, цитомегаловирусы млекопитающих, герпесвирусы и поксвирусы экспрессируют в инфицированных клетках белки со связывающими свойствами хемокиновых рецепторов (обзор в Wells and Schwartz, *Curr. Opin. Biotech.* 1997, 8, 741-748). Человеческие СС хемокины, такие как RANTES и MCP-3, могут вызывать быструю мобилизацию кальция при посредстве этих кодированных вирусами рецепторов. Экспрессия рецепторов может быть перmissive для инфекции за счет того, что учитывается субверсия нормального контроля и ответа иммунной системы на инфекцию. Кроме того, человеческие хемокиновые рецепторы, такие как CXCR4, CCR2, CCR3, CCR5 и CCR8, могут вести себя как корецепторы в случае инфицирования клеток млекопитающих микробами, как, например, в случае вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV).

Подразумевается, что хемокины и их родственные (собственные) рецепторы являются важными медиаторами воспалительных, инфекционных и иммунорегуляторных расстройств и заболеваний, включая астму и аллергические заболевания, а также аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит и рассеянный склероз, и метаболических заболеваний, таких как атеросклероз и диабет (обзор в Charo and Rasonhoff, *New Eng. J. Med.* 2006, 354, 610-621; Z. Gao and W.A. Metz, *Chem. Rev.* 2003, 103, 3733; P.H. Carter, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6, 510; Trivedi, et al., *Ann. Reports Med. Chem.* 2000, 35, 191; Saunders and Tarby, *Drug Disc. Today*, 1999, 4, 80; Premack and Schall, *Nature Medicine*, 1996, 2, 1174). Например, хемокин моноцитарный хемоаттрактант-1 (MCP-1) и его рецептор СС хемокиновый рецептор 2 (CCR2) играют главную роль в привлечении лейкоцитов к сайтам воспаления и в последующей активации этих клеток. Когда хемокин MCP-1 связывается с CCR2, он индуцирует быстрое повышение внутриклеточной концентрации калия, повышенную экспрессию молекул клеточной адгезии и стимулирование миграции лейкоцитов. Важность взаимодействия MCP-1/CCR2 была продемонстрирована в экспериментах на генетически модифицированных мышах. Мыши MCP-1^{-/-} были не способны рекрутировать моноциты в очаги воспаления после различного типа иммунизации (Bao Lu, et al., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601). Аналогично, мыши CCR2^{-/-} были не способны рекрутировать моноциты или продуцировать интерферон- γ после стимуляции различными экзогенными агентами; более того, лейкоциты CCR2^{-/-} нуль мышей не мигрировали в ответ на MCP-1 (Landin Boring, et al., *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 2552), тем самым демонстрируя специфичность взаимодействия MCP-1/CCR2. Две другие группы исследователей независимо сообщали об аналогичных результатах, полученных с различными штаммами мышей CCR2^{-/-} (William A. Kuziel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 12053 и Takao Kurihara, et al., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1757). Жизнеспособность и обычно нормальное здоровье животных MCP-1^{-/-} и CCR2^{-/-} примечательны тем, что нарушение взаимодействия MCP-1/CCR2 не вызывает физиологического кризиса. Взятые вместе, эти данные позволяют прийти к единственному выводу, что молекулы, которые блокируют действие MCP-1/CCR2, могут быть полезны при лечении ряда воспалительных и аутоиммунных расстройств (обзор в M. Fera and F. Diaz- González, *Exp. Opin. Ther. Patents* 2006, 16, 49 и J. Dawson, W. Miltz, and C. Wiessner, *C. Exp. Opin. Ther. Targets* 2003, 7, 35). Достоверность этой гипотезы в настоящее время подтверждена на ряде животных моделей различных заболеваний, как описано ниже.

Известно, что MCP-1 активируется (позитивно регулируется) у больных ревматоидным артритом (Alisa Koch, et al., *J. Clin. Invest.* 1992, 90, 772-779). Более того, в некоторых доклинических исследованиях было показано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении ревматоидного артрита. Недавно показано, что ДНК-вакцина, кодирующая MCP-1, уменьшает интенсивность артрита, вызванного полиадьювантами у крыс (Sawsan Youssef, et al., *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 361). Подобным образом можно контролировать симптомы заболевания с помощью непосредственного введения антител к MCP-1 крысам с артритом, вызванным коллагеном (Hiroomi Ogata, et al., *J. Pathol.* 1997, 182, 106), или артритом, вызванным клеточными стенками стрептококков (Ralph C. Schimmer, et al., *J. Immunol.* 1998, 160, 1466). Возможно самым замечательным является то, что было показано, что пептидный антагонист MCP-1, MCP-1 (9-76) и предотвращает начало заболевания, и уменьшает симптомы заболевания (в зависимости от момента введения) на MRL-lpr мышшиной модели артрита (Jiang-Hong Gong, et al., *J. Exp. Med.* 1997, 186, 131). Далее, было показано, что введение низкомолекулярных CCR2 антагонистов снижает клинические показатели при артрите на моделях грызунов (С.М. Brodmerkel, et al., *J. Immunol.* 2005, 175, 5370 и M. Xia, et al. патентная заявка США 0069123, 2006). Введение антитела против CCR2 оказывало различное действие на мышшиные модели CIA в зависимости от момента введения (H. Brahl, et al. *J. Immunol.* 2004, 172, 890). Недавние исследования на мышах CCR2^{-/-} позволяют предположить, что делеция CCR2 может ухудшить болезнь у животных моделей артрита в конкретных обстоятельствах эксперимента (M.P. Quinones, et al. *J. Clin. Invest.* 2004, 113, 856; M.P. Quinones, et al. *J. Mol. Med.* 2006, 84, 503).

Известно, что MCP-1 активируется при атеросклеротическом поражении, и было показано, что уровни циркулирующего MCP-1 снижаются при лечении терапевтическим агентом (Abdolreza Rezaie-Majd, et al., *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 2002, 22, 1194-1199). В нескольких принципиальных исследованиях показано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении атеросклероза. Например, когда мышши MCP-1^{-/-} скрещивают с LDL рецептор-дефицитными мышшами, наблюдают 83% уменьшение липидных отложений в аорте (Long Gu, et al., *Mol. Cell.* 1998, 2,

275). Аналогично, когда MCP-1 генетическими методами удаляют из организма мышей, уже сверхэкспрессирующих человеческий аполипопротеин В, полученные в результате мыши защищены от образования атеросклеротических поражений по сравнению с контрольными MCP-1^{+/+} apoB мышами (Jennifa Gosling, et al., *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 773). Подобным же образом, когда CCR2^{-/-} мышей скрещивают с мышами аполипопротеин E^{-/-}, наблюдается значительное снижение случаев атеросклеротических поражений (Landin Boring, et al., *Nature* 1998, 394, 894; T.C. Dawson, et al. *Atherosclerosis*, 1999, 143, 205). Наконец, если аполипопротеин E^{-/-} мышам вводят ген, кодирующий пептидный антагонист CCR2, то размер поражения уменьшается, а устойчивость к бляшкам повышается (W. Ni, et al. *Circulation*, 2001, 103, 2096-2101). Трансплантация костного мозга от CCR2^{-/-} мышам ApoE3-Leiden ингибирует ранний атерогенез (J. Guo, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003, 23, 447), но оказывает минимальное воздействие на запущенные поражения (J. Guo, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, 25, 1014).

У больных сахарным диабетом типа 2 обычно наблюдается устойчивость к инсулину, как один из отличительных признаков заболевания. Устойчивость к инсулину также ассоциируется с группой расстройств, известных как "метаболический синдром" или "синдром X", который включает ожирение, атеросклероз, гипертензию и дислипидемию (обзор в Eckel, et al. *Lancet*, 2005, 365, 1415). Хорошо известно, что воспаление участвует в развитии заболевания при патологиях диабета типа 2 и "синдрома X" (обзор в Chem, *Pharmacological Research*, 2006, 53, 469; Neels and Olefsky, *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 33; Danadona and Aljada, *Am J. Cardiol.* 2002, 90, 27G-33G; Pickup and Crook, *Diabetologia*, 1998, 41, 1241). Общеизвестно, что MCP-1 играет роль в вызванной ожирением устойчивости к инсулину. В культуре человеческие преадипоциты конститутивно экспрессировали MCP-1 (Gerhardt, *Mol. Cell. Endocrinology*, 2001, 175, 81). CCR2 экспрессируется в адипоцитах. Добавление MCP-1 к дифференцирующимся адипоцитам *in vitro* снижает стимулированное инсулином поглощение глюкозы и экспрессию некоторых адипогенных генов (LpL, адипсина, GLU-4, aP2, P3-адренергического рецептора и PPAR γ) (P. Sartipy and D. Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 6902). У больных диабетом типа 2 наблюдаются более высокие уровни циркулирующего MCP-1, чем у недиабетических контрольных пациентов (S. Nomura, et al. *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 121, 437), а высвобождение MCP-1 из жировой ткани можно уменьшить с помощью антидиабетических лекарственных препаратов, таких как метформин или тиазолидиндионы (J.M. Bruun, et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 2282). Аналогично, MCP-1 также сверхэкспрессируется в мышечных экспериментальных моделях ожирения и продуцируется главным образом в жировой ткани (Sartipy and Loskutoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 7265). У мышей, страдающих ожирением, экспрессия MCP-1 и предшествует возникновению устойчивости к инсулину, и происходит одновременно с ее возникновением (H. Xu, et al. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1821). В другом исследовании показано, что экспрессия MCP-1 позитивно коррелирует с массой жировой ткани мыши около половой железы (Weisberg, et al. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1796). В соответствии с этими данными развитие устойчивости к инсулину у мышей db/db уменьшалось (улучшалось) либо посредством генетической делеции MCP-1, либо посредством индуцированной генно-инженерным способом экспрессии доминантно-негативного пептида (H. Kanda, et al. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 1494). Можно также продемонстрировать закономерное обратное утверждение: сверхэкспрессия MCP-1 в жировой ткани индуцировала устойчивость к инсулину (N. Kamei, et al. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 26602). Описан также один противоречащий результат, а именно показано, что генетическая делеция MCP-1 не влияет на устойчивость к инсулину у мышей db/db (F.Y. Chow, et al. *Diabetologia*, 2007, 50, 471). В соответствии с данными, полученными на MCP-1, непосредственные исследования CCR2 (MCP-1 рецептор) показали, что он участвует в развитии ожирения и индуцированной ожирением устойчивости к инсулину. Соблюдение диеты с высоким содержанием жира повышает число циркулирующих CCR2⁺ воспалительных моноцитов как у мышей дикого типа (C.L. Tsou, et al. *J. Clin. Invest.* 2007, 117, 902), так и у мышей и ApoE^{-/-} (F. Tacke, et al. *J. Clin. Invest.* 2007, 777, 185). Генетическая делеция CCR2 снижает число активированных макрофагов в жировой ткани мышей (C.N. Lumeng, et al. *Diabetes*, 2007, 56, 16), но не влияет на популяцию M2 адипозных макрофагов, которые, как полагают, поддерживают "тощее" состояние (C.N. Lumeng, et al. *J. Clin. Invest.* 2007, 777, 175). Генетическая делеция CCR2 уменьшала вызванное диетой ожирение и увеличивала восприимчивость к инсулину на модели вызванного диетой ожирения (S.P. Weisberg, et al. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 115; P. Cornelius, R.P. Gladue, R.S. Sebastian, патент WO 2006/013427, A2, 2006) в зависимости от условий эксперимента (A. Chen, et al. *Obes. Res.* 2005, 13, 1311). Введение низкомолекулярного антагониста CCR2 также повышает чувствительность к инсулину у тех же самых моделей (S.P. Weisberg, et al. *J. Clin. Invest.* 2006, 776, 115).

В двух работах описана важная роль, которую играет CCR2 в вызванных гипертензией воспалении, ремоделировании и гипертрофии сосудов (E. Bush et al., *Hypertension*, 2000, 36, 360; M. Ishibashi, et al. *Circ. Res.* 2004, 94, 1203).

Известно, что MCP-1 активируется при рассеянном склерозе у человека, и было показано, что эффективная терапия интерфероном β -1b снижает экспрессию MCP-1 в мононуклеарных клетках периферической крови, это наводит на мысль, что MCP-1 принимает участие в прогрессировании заболевания (Carla Iarlori, et al., *J. Neuroimmunol.* 2002, 123, 170-179). В других работах показано потенциальное тера-

пептическое значение взаимодействие MCP-1/CCR2 при лечении рассеянного склероза; все эти исследования были проведены на модели с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелиитом (ЕАЕ), традиционной животной модели рассеянного склероза. Введение антител к MCP-1 животным с ЕАЕ значительно снижает частоту рецидивов заболевания (K.J. Kennedy, et al., *J. Neuroimmunol.* 1998, 92, 98). Далее, в двух работах показано, что CCR2^{-/-} мыши устойчивы к ЕАЕ (B.T. Fife, et al., *J. Exp. Med.* 2000, 192, 899; L. Izikson, et al., *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1075). В следующем сообщении продолжены эти первые наблюдения, а именно изучались эффекты делеции CCR2 у мышей различных линий (S. Gaupp, et al. *Am. J. Pathol.*, 2003, 162, 139). Интересно, что низкомолекулярный антагонист CCR2 также "притупляет" прогрессирование болезни у мышей C57BL/6 (C.M. Brodmerkel, et al. *J. Immunol.* 2005, 175, 5370).

Известно, что MCP-1 активируется у пациентов, у которых после трансплантации легкого появляется синдром облитерирующего бронхиолита (Martine Reynaud-Gaubert, et al., *J. of Heart and Lung Transplant*, 2002, 21, 721-730; John Belperio, et al., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556). У мышшиной модели синдрома облитерирующего бронхиолита введение антитела к MCP-1 привело к уменьшению облитерации дыхательных путей; мыши CCR2^{-/-} также были резистентны к облитерации дыхательных путей на этой же модели (John Belperio, et al., *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 547-556). Эти данные заставляют предположить, что антагонизм MCP-1/CCR2 может быть благотворным при лечении отторжения органов после трансплантации. Кроме того, исследования показали, что нарушение связи MCP-1/CCR2 способно пролонгировать выживаемость трансплантата островков (I. Lee et al. *J. Immunol.* 2003, 171, 6929; R. Abdi et al., *J. Immunol.* 2004, 172, 767). На крысиных моделях трансплантатов было показано, что CCR2 и MCP-1 активируются в трансплантатах и развивается васкулопатия трансплантата (K. Horiguchi et al., *J. Heart Lung Transplant*. 2002, 21, 1090). В другом исследовании генная анти-MCP-1 терапия уменьшает васкулопатию трансплантата (A. Saiura et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24, 1886). В одном сообщении описывается ингибирование образования неинтимы в экспериментальном трансплантате вены с помощью блокады MCP-1 (H. Tatewaki et al., *J. Vasc. Surg.* 2007, 45, 1236).

В других исследованиях продемонстрировано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении астмы. "Изоляция" MCP-1 с помощью нейтрализующего антитела у мышей, иммунизированных овалбумином, приводит к значительному уменьшению гипервосприимчивости и воспаления бронхов (Jose-Angel Gonzalo, et al., *J. Exp. Med.* 1998, 188, 157). Оказалось, что возможно уменьшить аллергическое воспаление дыхательных путей у мышей, иммунизированных яйцами *Schistosoma mansoni* (шистосомы Мансона) с помощью введения антител к MCP-1 (Nicholas W. Lukacs, et al., *J. Immunol.* 1997, 158, 4398). В соответствии с этим у мышей MCP-1^{-/-} наблюдался пониженный отклик на иммунизацию яйцами *Schistosoma mansoni* (Bao Lu, et al., *J. Exp. Med.* 1998, 187, 601).

В других исследованиях продемонстрировано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении заболевания почек. Введение антител к MCP-1 мышшиной модели гломерулонефрита приводит к заметному уменьшению гломерулярного серповидного образования и отложения типа I коллагена (Clare M. Lloyd, et al., *Exp. Med.* 1997, 185, 1371). Кроме того, у мышей MCP-1^{-/-} с индуцированным нефротоксическим сывороточным нефритом наблюдается значительно меньшее поражение канальцев, чем у их MCP-1^{+/+} аналогов (Gregory H. Tesch, et al., *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 73).

В некоторых исследованиях продемонстрировано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении системной красной волчанки. Мыши CCR2^{-/-} проявляют пролонгированную выживаемость и меньшую заболеваемость почек по сравнению с их WT аналогами на мышшиной модели системной красной волчанки (G. Perez de Lema, et al. *J. Am. Soc. Neph.* 2005, 16, 3592). Эти данные согласуются с модифицирующей болезнью активностью, обнаруженной в недавних исследованиях генетической делеции MCP-1 (S. Shimizu, et al. *Rheumatology (Oxford)* 2004, 43, 1121; Gregory H. Tesch, et al., *J. Exp. Med.* 1999, 190, 1813) или введения пептидного антагониста CCR2 (H. Hasegawa, et al. *Arthritis & Rheumatism*, 2003, 48, 2555) на моделях волчанки у грызунов.

Поразительное 30-кратное увеличение CCR2⁺ лимфоцитов собственной пластинки слизистой оболочки наблюдают в тонком кишечнике у пациентов с болезнью Крона по сравнению со здоровой подвздошной кишкой (S.J. Connor, et al. *Gut*, 2004, 53, 1287). Также следует отметить, что наблюдалось расширение субпопуляции циркулирующих CCR2⁺/CD14⁺/CD56⁺ моноцитов у больных активной формой болезни Крона по сравнению с контрольными. Некоторые исследования на грызунах продемонстрировали потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении болезни Крона/колита. Мыши CCR2^{-/-} не были подвержены колиту, индуцируемому введением декстрана сульфата натрия (Pietro G. Andres, et al., *J. Immunol.* 2000, 164, 6303). Введение низкомолекулярного антагониста CCR2, CCR5 и CXCR3 (аффинность связывания у мышей 24, 236 и 369 нМ соответственно) также предупреждает заболевание колитом, индуцируемым декстраном сульфатом натрия (H. Tokuyama, et al. *Int. Immunol.* 2005, 17, 1023). Наконец, у мышей MCP-1^{-/-} наблюдается заметное меньшее поражение толстой кишки (как при макроскопическом, так и при гистологическом исследовании) на модели колита, вызванного гаптенном (W.I. Khan, et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006, 291, G803).

В двух сообщениях описывается сверхэкспрессия MCP-1 в интестинальных эпителиальных клетках

и в слизистой кишечника у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника (H.C. Reinecker, et al., *Gastroenterology* 1995, 108, 40, Michael C. Grimm, et al., *J. Leukoc. Biol.* 1996, 59, 804).

В одной работе описана связь полиморфизма промотора в MCP-1 гене со склеродермией (системный склероз) (S. Karrer et al., *J. Invest Dermatol.* 2005, 124, 92). У родственных моделей фиброза тканей ингибирование взаимодействия (связи) CCR2/MCP-1 снижает фиброз кожи (T. Yamamoto and K. Nishioka, *J. Invest Dermatol.* 2003, 121, 510; A.M. Ferreira et al., *J. Invest Dermatol.* 2006, 126, 1900), легкого (T. Okuma et al., *J. Pathol.* 2004, 204, 594; M. Gharaee-Kermani et al., *Cytokine* 2003, 24, 266), почки (K. Kitagawa et al., *Am J. Pathol.* 2004, 165, 237; T. Wada et al., *J. Am Soc. Nephrol.* 2004, 15, 940), сердца (S. Hayashidani et al., *Circulation*, 2003, 108, 2134) и печени (S. Tsurata et al., *Int J. Mol. Med.* 2004, 74, 837).

В одном исследовании продемонстрировано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении альвеолита. Когда крысам с поражением легких, вызванных иммунным комплексом, содержащим IgA, вводят внутривенно антитела, специфические к крысиному MCP-1 (JE), симптомы альвеолита частично смягчаются (Michael L. Jones, et al., *J. Immunol.* 1992, 149, 2147).

В некоторых исследованиях продемонстрировано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении рака (обзор в M.J. Craig and R.D. Loberg, *Cancer Metastasis Rev.* 2006, 25, 611; I. Conti and B. Rollins, *Seminars in Cancer Biology* 2004, 14, 149; R. Giles and R.D. Loberg, *Curr. Cancer Drug Targets*, 2006, 6, 659). Когда иммунодефицитным мышам, несущим человеческие клетки карциномы молочной железы, вводят антитело против MCP-1, то наблюдают ингибирование микрометастазов в легких и повышение выживаемости (Rosalba Salcedo, et al., *Blood*, 2000, 96, 34-40). Используя клинические пробы опухоли, экспрессию CCR2 ассоциировали с прогрессированием рака простаты (Y. Lu, et al. *J. Cell. Biochem.* 2007, 101, 676). Показано, что экспрессия MCP-1 *in vitro* опосредует рост и инвазию раковых клеток простаты (Y. Lu, et al. *Prostate*, 2006, 66, 1311); кроме того, MCP-1, экспрессированный раковыми клетками простаты, индуцировал клетки-предшественники костного мозга человека для резорбции кости (Y. Lu, et al., *Cancer Res.* 2007, 67, 3646).

В многочисленных работах описано потенциальное терапевтическое значение антагонизма взаимодействия MCP-1/CCR2 при лечении рестеноза. У людей уровни MCP-1 прямо коррелируют с риском возникновения рестеноза (F. Cipollone, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001, 21, 327). У мышей, дефицитных по CCR2 или MCP-1, наблюдается уменьшение площади интимы и соотношение интима/среда (по сравнению с одноплетными животными) после артериального поражения (Mercede Roque, et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 554; A. Schober, et al. *Circ. Res.* 2004, 95, 1125; W.J. Kim, et al. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2003, 310, 936). У мышей трансфекция доминантно-негативного ингибитора MCP-1 в скелетной мышце (K. Egashira, et al. *Circ. Res.* 2002, 90, 1167) также снижает гиперплазию интимы после артериального поражения. Блокада CCR2 с помощью нейтрализующего антитела снижает гиперплазию неоинтимы после стентирования (C. Horvath, et al. *Circ. Res.* 2002, 90, 488).

В двух сообщениях описывается сверхэкспрессия MCP-1 крыс с индуцированной травмой головного мозга (J.S. King, et al., *J. Neuroimmunol.* 1994, 56, 127 и Joan W. Berman, et al., *J. Immunol.* 1996, 156, 3017). Кроме того, исследования показали, что как мыши CCR2^{-/-} (O.B. Dimitrijevic, et al. *Stroke* 2007, 38, 1345), так и мыши MCP-1^{-/-} (P.M. Hughes, et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, 22, 308) частично защищены от ишемического/реперфузионного поражения.

Известно, что моноциты/макрофаги играют важную роль в появлении невропатической боли (Liu T., van Rooijen N., Tracey D.J., *Pain*, 2000, 86, 25). Недавно была описана потенциальная роль CCR2 в лечении как боли при воспалении, так и невропатической боли, согласующаяся с этой точкой зрения. У мышей CCR2^{-/-} наблюдаются измененные реакции на боль при воспалении по сравнению с их WT аналогами, включая пониженные характеристики боли после интраплантарной (в подошву) инъекции формалина и немного уменьшенную механическую аллодинию после интраплантарной инъекции CFA (C. Abbadie, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 7947). Кроме того, у мышей CCR2^{-/-} не наблюдается значительной механической аллодинии после поражения седалищного нерва. Также низкомолекулярный антагонист CCR2 после перорального введения уменьшает механическую аллодинию до ~80% от уровней перед поражением (C. Abbadie, J.A. Lindia, and H. Wang, *Международная заявка PCT WO 110376*, 2004).

В одной работе описана решающая роль MCP-1 при ишемической кардиомиопатии (N.G. Frangogiannis, et al., *Circulation* 2007, 115, 584). В другом исследовании описано ослабление экспериментальной сердечной недостаточности после ингибирования MCP-1 (S. Hayashidani et al., *Circulation* 2003, 108, 2134).

В других работах приводится доказательство того, что MCP-1 сверхэкспрессируется при различных болезненных состояниях, не указанных выше. В этих сообщениях приводятся коррелятивные свидетельства того, что антагонисты MCP-1 могут применяться в качестве лекарственных препаратов при таких заболеваниях. В другом исследовании показана сверхэкспрессия MCP-1 в аллотрансплантатах сердца у грызунов, что наводит на мысль о роли MCP-1 в патогенезе атеросклероза трансплантата (Mary E. Russell, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 6086). Сверхэкспрессия MCP-1 отмечена в эндотелиальных клетках легких больных идиопатическим легочным фиброзом (Harry N. Antoniades, et al., *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 1992, 89, 5371). Аналогично, сверхэкспрессию MCP-1 отмечают в коже больных псориазом (M. Deleuran, et al., J. Dermatol. Sci. 1996, 13, 228 и R. Gillitzer, et al., J. Invest. Dermatol. 1993, 101, 127); также сообщались коррелятивные данные о доминировании CCR2⁺ клеток (C. Vestergaard, et al. Acta Derm. Venerol. 2004, 84, 353). Наконец, в недавнем сообщении показано, что MCP-1 сверхэкспрессируется в мозге и цереброспинальной жидкости (ликворе) больных деменцией, обусловленной ВИЧ-1 (Alfredo Garzino-Demo, Международная патентная заявка WO 99/46991).

Кроме того, было показано, что CCR2 полиморфизм ассоциируется с саркоидозом по меньшей мере в одной субпопуляции пациентов (P. Spagnolo, et al. Am J. Respir Crit Care Med, 168, 1162).

Следует также отметить, что CCR2 причастен как корецептор к некоторым штаммам ВИЧ (HIV) (B.J. Doranz, et al., Cell. 1996, 85, 1149). Также было определено, что применение CCR2 в качестве ВИЧ корецептором может коррелировать с прогрессированием заболевания (Ruth I. Connor, et al., J. Exp. Med. 1997, 185, 621). Это наблюдение согласуется с последними данными, что присутствие мутанта CCR2, CCR2-641, позитивно коррелирует с задержанным началом ВИЧ в человеческой популяции (Michael W. Smith, et al., Science, 1997, 277, 959). Хотя MCP-1 не участвует в этих процессах, может быть именно антагонисты MCP-1, которые действуют посредством связывания с CCR2, могут оказывать благотворное действие на замедление развития СПИДа у ВИЧ-инфицированных больных.

Следует отметить, что CCR2 также является рецептором для человеческих хемокинов MCP-2, MCP-3 и MCP-4 (Luster, New Eng. J. Med. 1998, 338, 436-445). Так как соединения формулы I по данному описанию сопротивляются (антагонизируют) MCP-1, связываясь с CCR2 рецептором, вполне возможно, что эти соединения формулы I являются также антагонистами эффектов MCP-2, MCP-3 и MCP-4, которые опосредуются CCR2. Соответственно, когда дается ссылка на "антагонизм MCP-1", следует предположить, что это выражение эквивалентно "антагонизму стимуляции CCR2 хемокинами".

Таким образом, показаны широкие возможности применения соединений, которые модулируют активность хемокинов, при лечении воспалительных, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний. В опубликованной патентной заявке США WO 2005021500 A1 (вводимой в данное описание в качестве ссылки и принадлежащей заявителю данной патентной заявки) раскрываются соединения, которые модулируют активность MCP-1, MCP-2, MCP-3 и MCP-4 посредством CCR2. В этом ссылочном материале также раскрываются различные способы получения этих соединений, включая многостадийные синтезы, которые включают введение и последующее снятие защитных групп.

Необходимо найти новые соединения с улучшенными фармакологическими характеристиками по сравнению с известными модуляторами хемокинов. Например, желательно найти новые соединения с повышенной CCR2 ингибирующей активностью и селективностью к CCR2 по сравнению с другими сопряженными (связанными) с G-белком рецепторами (т.е. 5HT_{2A} рецептором). Желательно также найти соединения с полезными и улучшенными характеристиками из одной или более из следующих групп:

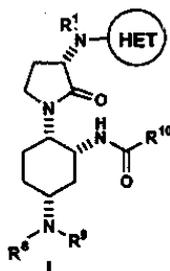
- (а) фармацевтические свойства (т.е. растворимость, проницаемость, "податливость", пригодность для приготовления препаратов пролонгированного действия);
- (б) требования к дозировкам (например, пониженные дозировки и/или одноразовая дозировка);
- (в) факторы, которые понижают характеристики концентрации в крови от максимума до минимума (например, клиренс и/или объем распределения);
- (г) факторы, которые повышают концентрацию активного лекарственного вещества в рецепторе (т.е. связывание с белком, объем распределения);
- (д) факторы, которые понижают предрасположенность к клиническим взаимодействиям лекарство-лекарство (ингибирование или индукция фермента цитохром P450, такое как ингибирование CYP 2D6, см. статью G.K. Dresser, J.D. Spence, D.G. Bailey, Clin. Pharmacokinet. 2000, 38, 41-57, которая вводится в данное описание в качестве ссылки);
- (е) факторы, которые уменьшают возможность побочных эффектов (например, фармакологическая селективность вне связанных с G-белком рецепторов, потенциальная химическая или метаболическая реактивность, ограниченное проникновение в ЦНС (CNS), селективность в отношении ионных каналов).

Особенно желательно найти соединения с нужной комбинацией вышеуказанных фармакологических характеристик.

Также желательно включить в уровень техники новые и/или усовершенствованные способы получения таких соединений. Эти процессы можно охарактеризовать такими признаками, как, без ограничения, а) простая адаптация к более крупномасштабному производству, например на пилотном заводе или в промышленном масштабе; (б) стадии и/или методы процесса, позволяющие повысить чистоту (включая хиральную чистоту), стабильность и/или простоту обработки промежуточных (интермедиатов) и/или конечных соединений; и/или в) меньшее число стадий процесса.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение включает новый антагонист или частичный агонист/антагонист МСР-1 рецепторной активности N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство, проявляющие неожиданное сочетание желательных фармакологических характеристик. Также охватываются кристаллические формы (соединений) по настоящему изобретению. Также целью данного изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие эти соединения, и способы их применения в качестве агентов для лечения воспалительных заболеваний, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний. Настоящее раскрытие также включает способ получения соединений формулы I, включая N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид



где R¹, R⁸, R⁹, R¹⁰ и  представлены в данном описании.

Также в данное описание включаются соединения, применимые в способе получения в качестве интермедиатов.

Настоящее раскрытие включает также применение N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или пролекарства для получения лекарственного препарата для лечения воспалительных заболеваний, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены экспериментально полученные и моделированные порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, соли дибензолсульфоуксиды, форма N-1.

На фиг. 2 представлены экспериментально полученные и моделированные порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2.

На фиг. 3 представлены экспериментально полученные и моделированные порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма E-1 (моноэтанолат).

На фиг. 4 представлены экспериментально полученные и моделированные порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, соли HCl, форма H4-1 (тетрагидрат).

На фиг. 5 представлены экспериментально полученные и моделированные порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма A-1 (ацетон моносольват).

На фиг. 6 представлены экспериментально полученные и моделированные порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма DC-1 (дихлорметан моносольват).

На фиг. 7 представлены экспериментально полученные и моделированные порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма AN-3 (ацетонитрил моносольват).

На фиг. 8 представлены результаты анализа методом дифференциальной сканирующей калориметрии N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, дибезилата, форма N-1.

На фиг. 9 представлены результаты термогравиметрического анализа N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, дибезилата, форма N-1.

На фиг. 10 представлены результаты анализа методом дифференциальной сканирующей калори-

метрии N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2.

На фиг. 11 представлены результаты термогравиметрического анализа N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2.

На фиг. 12 представлена изотерма сорбции влаги N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2.

На фиг. 13 изображена кристаллическая структура трет-бутил-(1R,2R,4S)-3-ацетамида-4-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)циклогексил)карбамата.

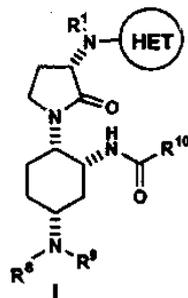
Фиг. 14 - модель 48-часового TG перитонита у мышей hCCR2 KI: ингибирование соединением из примера 1 инфильтрации моноцитами/макрофагами брюшной полости (дифференциальный подсчет клеток).

Фиг. 15 - модель 48-часового TG перитонита у мышей hCCR2 KI: ингибирование соединением из примера 1 инфильтрации моноцитами/макрофагами брюшной полости (FACS анализ).

Фиг. 16 - ЕАЕ у мышей hCCR2 KI: клинические показатели лечения соединением из примера 1.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение включает новый антагонист или частичный агонист/антагонист MCP-1 рецепторной активности N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство, проявляющие неожиданное сочетание нужных фармакологических характеристик. Также охватываются кристаллические формы (соединений) по настоящему изобретению. Также целью данного изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие эти соединения, и способы их применения в качестве агентов для лечения воспалительных заболеваний, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний. Настоящее раскрытие также включает способ получения соединений формулы I, включая N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид



где R¹, R⁸, R⁹, R¹⁰ и $\textcircled{\text{HET}}$ представлены в данном описании.

Также в данное описание включаются соединения, применимые в способе получения в качестве интермедиатов.

N-((1R,2S,5R)-5-(Изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид неожиданно демонстрирует нужную комбинацию фармакологических характеристик, включая поразительно высокую степень биодоступности при пероральном введении в сочетании с показаниями, которые являются высокоэффективными и имеют прекрасные критерии безопасности.

Известные модуляторы CCR2 рецепторов, такие как модуляторы, раскрываемые в патентной заявке WO 2005021500 A1, опубликованной 10 марта 2005 г. (патент США № 7163937, выданный 16 января 2007 г., принадлежащий настоящему заявителю), которые показывают достаточную (отвечающую требованиям) мембранную проницаемость (решающий фактор биодоступности при оральном приеме), недостаточно эффективны, как показывает определение их CCR2-связывающей способности (меры эффективности), и/или у них отсутствуют подходящие критерии безопасности, на что указывает селективность ионных каналов, определяемая в исследованиях на hERG и Na⁺ ионных каналах.

Напротив, как иллюстрируется данными, представленными в данном описании в разделе, озаглавленном "Сравнительные фармакологические характеристики", см. далее, относительно полярная молекула N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид демонстрирует поразительно высокую степень проницаемости мембран и в то же время сохраняет высокую CCR2 связывающую способность наряду с прекрасной селективностью ионных каналов.

Соответственно настоящее изобретение включает новый модулятор хемокинов, имеющий улучшенные фармакологические характеристики, которые, как предполагают, должны быть пригодны при

лечении воспалительных, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний.

Варианты изобретения

В одном варианте изобретения раскрытие относится к N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамиду и его фармацевтически приемлемым солям.

В другом варианте изобретения раскрывается N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид, свободное основание.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободное основание, причем кристаллическая форма представляет собой N-2 форму.

Другой вариант изобретения включает N-2 форму, характеризующуюся параметрами элементарной ячейки (или имеющую параметры элементарной ячейки), практически равными следующим.

Размеры ячейки:

$a=11,8427(3)$,

$b=18,1503(7)$,

$c=12,7923(4)$,

$\alpha=90$,

$\beta=105,362(2)$,

$\gamma=90$.

Пространственная группа $P2_1$.

Молекулы/элементарная ячейка 2,

причем указанный кристалл находится при температуре примерно 22°C (RT).

Другой вариант изобретения включает N-2 форму, характеризующуюся порошковой рентгенограммой (или имеющую порошковую рентгенограмму), содержащей три или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из 7,2; 8,7; 9,7; 12,5; 12,8; 13,3; 16,0; 16,6; 18,2 и 18,8, при температуре примерно 22°C .

Другой вариант изобретения включает N-2 форму, характеризующуюся порошковой рентгенограммой (или имеющую порошковую рентгенограмму), дополнительно содержащей четыре или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из 7,2; 8,7; 9,7; 12,5; 12,8; 13,3; 16,0; 16,6; 18,2 и 18,8, при температуре примерно 22°C .

Другой вариант изобретения включает N-2 форму, характеризующуюся относительными координатами атомов (или имеющую относительные координаты атомов), практически такими, которые приводятся в табл. 7.

Другой вариант изобретения включает N-2 форму, характеризующуюся порошковой рентгенограммой (или имеющую порошковую рентгенограмму) практически в соответствии с фиг. 2.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, соль дибензолсульфокислоты, представляющую собой форму N-1, характеризующуюся тем, что имеет параметры элементарной ячейки, приведенные в табл. 1; 3, или 4, или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из табл. 10; относительные координаты атомов практически такие, как приведенные в табл. 2, и/или порошковую рентгенограмму, практически соответствующую фиг. 1.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободное основание, представляющую собой форму E-1 (моноэтанолат), характеризующуюся тем, что имеет параметры элементарной ячейки, приведенные в табл. 1; 3, или 4, или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из табл. 10; относительные координаты атомов практически такие, как приведенные в табл. 5, и/или порошковую рентгенограмму, практически соответствующую фиг. 3.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, HCl соль, представляющую собой форму H4-1 (тетрагидрат), характеризующуюся тем, что имеет параметры элементарной ячейки, приведенные в табл. 1; 3, или 4, или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из табл. 10; относительные координаты атомов практически такие, как приведенные в табл. 9, и/или порошковую рентгенограмму, практически соответствующую фиг. 4.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободное основание, представляющую собой форму A-1 (ацетон моносоль-

ват), характеризующуюся тем, что имеет параметры элементарной ячейки, приведенные в табл. 1; 3, или 4, или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из табл. 10; относительные координаты атомов практически такие, как приведенные в табл. 6, и/или порошковую рентгенограмму практически соответствующую фиг. 5.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободное основание, представляющую собой форму DC-1 (дихлорметан моносолеват), характеризующуюся тем, что имеет параметры элементарной ячейки, приведенные в табл. 1; 3, или 4, или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из табл. 10; относительные координаты атомов практически такие, как приведенные в табл. 3, и/или порошковую рентгенограмму практически соответствующую фиг. 6.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободное основание, представляющую собой форму AN-3 (ацетонитрил моносолеват), характеризующуюся тем, что имеет параметры элементарной ячейки, приведенные в табл. 1; 3, или 4, или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из табл. 10; относительные координаты атомов практически такие, как приведенные в табл. 8, и/или порошковую рентгенограмму, практически соответствующую фиг. 7.

Другой вариант изобретения включает кристаллическую форму N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободное основание, представляющую собой форму THOO-1 (тетрагидрофуран моносолеват), характеризующуюся тем, что имеет параметры элементарной ячейки, приведенные в табл. 1; 3, или 4, или более значений 2θ ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda=1,541 \text{ \AA}$), выбранных из табл. 10; и/или относительные координаты атомов практически такие, как приведенные в табл. 4.

Другой вариант изобретения включает фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель и соединение из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ модуляции активности хемокиновых рецепторов, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ модуляции CCR2 рецепторной активности, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ модуляции активности MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 и MCP-5, которая опосредуется CCR2 рецептором, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ модуляции MCP-1 активности, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ лечения расстройств (нарушений), заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры", причем указанные расстройства (нарушения) выбирают из диабета, ожирения, метаболического синдрома, удара, невропатической боли, ишемической кардиомиопатии, псориаза, гипертензии, склеродермии, остеоартрита, аневризмы, лихорадки, сердечно-сосудистого заболевания, болезни Крона, застойной сердечной недостаточности, аутоиммунных заболеваний, ВИЧ-инфекции, ассоциированной с ВИЧ деменции, идиопатического легочного фиброза, артериосклероза трансплантата, вызванной физическими или химическими причинами травмы головного мозга, воспалительного заболевания кишечника, альвеолита, колита, системной красной волчанки, нефротоксического сывороточного нефрита, гломерулонефрита, астмы, рассеянного склероза, атеросклероза, васкулита, нестабильных атероматозных бляшек, ревматоидного артрита, рестеноза, венозной неоинтимальной гиперплазии, гиперплазии неоинтимы трансплантата при диализе, гиперплазии интимы артериовенозного шунта, трансплантации органов, хронической нефропатии трансплантата и рака.

Другой вариант изобретения включает способ лечения расстройств (нарушений), заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры", причем указанные расстройства (нарушения) выбирают из диабета, ожирения, болезни Крона, псориаза, идиопатического легочного фиброза, артериосклероза трансплантата, вызванной физическими или химическими причинами травмы головного мозга, воспалительного заболевания кишечника, альвеолита, колита, системной красной волчанки, нефротоксического сывороточного нефрита, гломерулонефрита, астмы, рассеянного склероза, атеросклероза и ревматоидного артрита, рестеноза, трансплантации органов и рака.

Другой вариант изобретения включает способ лечения расстройств (нарушений), заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из

раздела "Примеры", причем указанные расстройства (нарушения) выбирают из диабета, ожирения, болезни Крона, системной красной волчанки, гломерулонефрита, рассеянного склероза, атеросклероза, рестеноза и трансплантации органов.

Другой вариант изобретения включает способ лечения расстройств (нарушений), заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры", причем указанные расстройства (нарушения) выбирают из рассеянного склероза, болезни Крона и диабета.

Другой вариант изобретения включает способ лечения расстройств (нарушений), заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры", причем указанные расстройства (нарушения) выбирают из рестеноза, трансплантации органов и рака.

Другой вариант изобретения включает способ лечения диабета, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ лечения болезни Крона, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ лечения рассеянного склероза, причем способ заключается во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ атеросклероза, причем способ заключается во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ лечения рестеноза, причем способ заключается во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из раздела "Примеры".

Другой вариант изобретения включает способ лечения при трансплантации органов, причем способ заключается во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из примера 1.

Другой вариант изобретения включает способ лечения рака, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из примера 1.

Другой вариант изобретения включает способ лечения рака, причем рак выбирают из рака молочной железы, рака печени, рака простаты и меланомы.

Другой вариант изобретения включает способ лечения воспалительных заболеваний, аллергических, аутоиммунных, метаболических, раковых и/или сердечно-сосудистых заболеваний, заключающийся во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из примера 1.

Другой вариант изобретения включает способ лечения заболеваний, которые, по меньшей мере, частично опосредуются CCR2, причем этот способ заключается во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из примера 1.

Другой вариант изобретения включает способ модуляции активности CCR2, причем этот способ заключается во введении нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества соединения из примера 1.

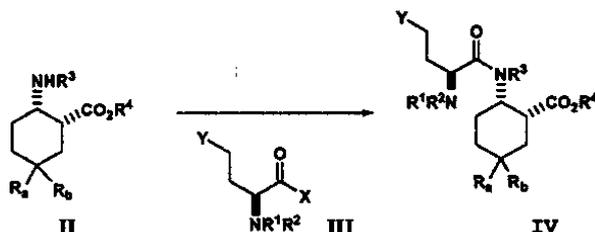
Другой вариант изобретения включает соединение из примера 1 для приготовления лекарственного препарата для лечения диабета, ожирения, метаболического синдрома, удара, невропатической боли, ишемической кардиомиопатии, псориаза, гипертензии, склеродермии, остеоартрита, аневризмы, лихорадки, сердечно-сосудистого заболевания, болезни Крона, застойной сердечной недостаточности, аутоиммунных заболеваний, ВИЧ-инфекции, ассоциированной с ВИЧ деменции, идиопатического легочного фиброза, артериосклероза трансплантата, вызванной физическими или химическими причинами травмы головного мозга, воспалительного заболевания кишечника, альвеолита, колита, системной красной волчанки, нефротоксического сывороточного нефрита, гломерулонефрита, астмы, рассеянного склероза, атеросклероза, васкулита, нестабильных атероматозных бляшек, ревматоидного артрита, рестеноза, венозной неоинтимальной гиперплазии, гиперплазии неоинтимы трансплантата при диализе, гиперплазии интимы артерио-венозного шунта, трансплантации органов, хронической нефропатии трансплантата и рака.

Другой вариант изобретения включает соединение из примеров для применения в терапии.

Данное изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отступления от его сущности и существенных особенностей. Данное изобретение также охватывает все комбинации альтернативных аспектов и вариантов изобретения, отмеченных в данном описании. Понятно, что все без исключения варианты изобретения могут применяться в сочетании с любым другим изобретением для описания дополнительных вариантов настоящего изобретения. Кроме того, предполагается, что любые элементы варианта изобретения можно объединять с любыми другими элементами из любых вариантов изобретения для описания дополнительных вариантов изобретения.

Варианты способов изобретения

В 1-м варианте изобретения раскрытие включает способ получения соединения формулы IV или его соли

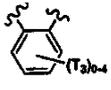


причем этот способ включает стадии:

конденсацию β -аминоэфира формулы II или его соли с защищенной соответствующим образом хиральной α -аминокислотой формулы III с образованием амида IV (см. международную патентную заявку WO 2005021500);

где R_a и R_b , независимо, обозначают C_{1-6} алкокси;

или R_a и R_b вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют карбонил, тиокарбонил, циклический ацеталь или циклический тиоацеталь, причем циклический ацеталь или циклический тио-

ацеталь выбирают из -O-Z-O- и -S-Z-S-, Z обозначает $-(CT_1T_2)_2-$, $-(CT_1T_2)_3-$ или , а T_1 , T_2 и T_3 , в каждом случае независимо, выбирают из водорода, C_{1-4} алкила, C_{2-4} алкенила, галогена, гидроксид, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкила, OCF_3 , $C(=O)C_{1-4}$ алкила и CO_2C_{1-4} алкила (предпочтительно T_1 , T_2 и T_3 , каждый, обозначают водород);

R^1 , R^2 и R^3 , независимо, обозначают водород или аминоксигруппу, выбранную из карбобензилоксигруппы (Cbz), трет-бутилоксикарбонильной (BOC) группы, флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группы, бензильной (Bn) группы и *p*-метоксибензильной (PMB) группы (предпочтительно аминоксигруппа представляет собой Cbz, Bn или BOC, в особенности Cbz или Bn);

R^4 обозначает низший C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксид, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $C(=O)C_{1-4}$ алкил;

Y обозначает галоген, SR^{12} или OSO_2R^{13} ;

X обозначает OH, галоген или $OCOR^{14}$;

R^{12} обозначает C_{1-6} алкил, $-(CH_2)C(O)OR^{13}$ или $-(CH_2)C(O)R^{13}$;

R^{13} в каждом случае обозначает C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксид, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $C(=O)C_{1-4}$ алкил; и

R^{14} в каждом случае обозначает водород, C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксид, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $C(=O)C_{1-4}$ алкил.

Необязательно замещенный бензил по данному описанию обозначает бензильную группу, которая связана через свою метиленовую группу ($-CH_2-$) и необязательно имеет заместитель в своем фенильном кольце, связанном с метиленовой группой.

Во 2-м варианте изобретения раскрытие включает способ получения продукта формулы IV или его соли, где

R_a и R_b вместе с атомом углерода, с которым они оба связаны, образуют карбонильную группу или 1,3-диоксолановую группу (предпочтительно R_a и R_b вместе с атомом углерода, с которым они оба связаны, образуют 1,3-диоксолановую группу);

R^1 обозначает водород;

R^2 обозначает Cbz;

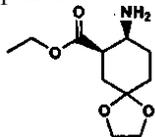
R^3 обозначает водород;

R^4 обозначает C_{1-6} алкокси;

Y обозначает S(Me) и

X обозначает OH.

В 3-м варианте изобретения раскрытие включает способ, отличающийся тем, что β -аминоэфир формулы II представляет собой соль толуолсульфоната или гидробромид. Предпочтительной солью β -аминоэфира формулы II является толуолсульфонат



В 4-м варианте изобретения раскрытие включает способ получения соединения формулы IV или его соли, от-

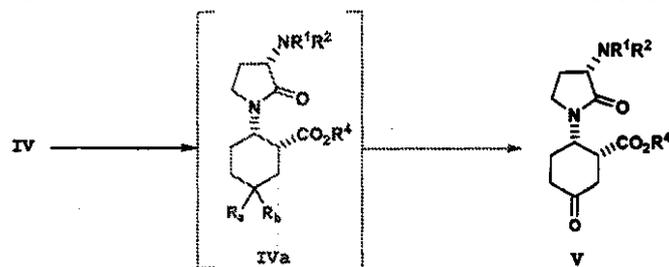
личающийся тем, что конденсацию проводят в атмосфере инертного газа, такого как азот или аргон (предпочтительно азот), в апротонном растворителе, таком как пропионитрил, изопропилацетат, н-бутилацетат, трет-бутилацетат или ацетонитрил (в особенности ацетонитрил и/или этилацетат).

В 5-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы IV или его соли, отличающийся тем, что конденсацию проводят с помощью контактирования β-аминоэфира формулы II с конденсирующим агентом диимидом в присутствии активатора, защищенного β-аминоэфира формулы II и третичного амина основания. Конденсирующий агент диимид включает, например, такой реагент, как EDAC. Примеры активаторов (активирующих агентов) включают 1-гидроксибензотриазол (HOBT; указанный термин включает его гидраты) и N',N'-4-диметиламинопиридин. Третичный амин, основание, включает, например, триалкиламы, такие как триэтиламин, N-N-диизопропил-N-этиламин и три-n-пропиламин.

В 6-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы IV или его соли, отличающийся тем, что конденсирующий диимидный реагент представляет собой EDAC, активатор представляет собой HOBT, а третичный амин основание представляет собой триэтиламин или N-N-диизопропил-N-этиламин.

В 7-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы IV или его соли, отличающийся тем, что молярные отношения аминоэфир формулы II:диимидный конденсирующий агент:активатор:третичный амин составляют 1:примерно 0,90-1,50:примерно 0,95-1,50:примерно 2,00-3,00 соответственно. Предпочтительные указанные молярные отношения равны 1:примерно 0,95-1,05:примерно 0,95-1,10:примерно 2,10-2,30 соответственно.

В 8-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы V или его соли



причем способ включает стадии:

а) алкилирование соединения формулы IV алкилирующим агентом с образованием активированного соединения и

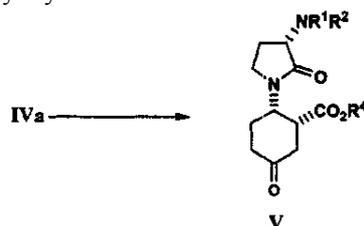
б) циклизация активированного соединения *in situ* с образованием соединения формулы IVa.

В 9-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы V или его соли, отличающийся тем, что алкилирующий агент на стадии а) является агентом, алкилирующим атом серы, таким как C₁₋₆алкилгалогенид, а активированным соединением является сульфониевая соль соединения IV, где Y обозначает S[⊕](C₁₋₆алкил)R¹². Предпочтительно алкилирующий агент представляет собой метилиодид, а Y обозначает S[⊕](CH₃)₂.

В 10-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы V или его соли, отличающийся тем, что стадия циклизации включает смешение активированного агента или его соли с основанием в присутствии растворителя. Основание выбирают из карбоната цезия, бикарбоната цезия, карбоната калия, трет-бутилата натрия или гексаметилдисилазида натрия (предпочтительно основание представляет собой бикарбонат цезия).

В 11-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы V или его соли, отличающийся тем, что стадию циклизации проводят в атмосфере инертного газа, такого как азот или аргон, в растворителе, выбранном из ДМСО, ДМФА, ДМАА (DMA), N-метилпирролидон и сульфолан. Предпочтительно инертным газом является азот, а растворитель выбирают из ДМСО и/или ДМФА.

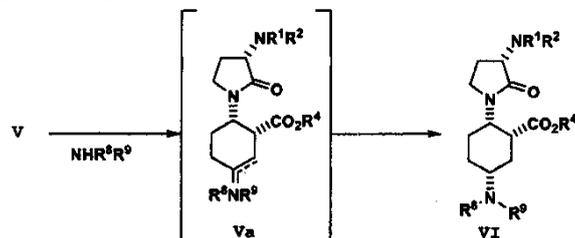
В 12-м варианте изобретение, в котором соединение формулы IV содержит ацетальную группу, а именно R_a и R_b, независимо, обозначают C₁₋₆алкокси или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, R_a и R_b образуют циклический ацеталь или циклический тиацеталь, включает способ получения соединения формулы V или его соли, дополнительно содержащий стадию гидролиза соединения формулы IVa, содержащего ацетальную группу



с образованием соединения формулы V.

Стадию гидролиза можно проводить методами гидролиза ацетальных групп, известными специалистам в данной области техники. Например, стадия гидролиза может включать обработку соединения формулы IVa в растворителе, таком как ацетон, бутанон, ацетонитрил или изопропанол или их водных растворах, кислотой. Предпочтительно стадия гидролиза содержит обработку соединения формулы IVa в растворе водного ацетона соляной кислотой.

В 13-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы VI, содержащего сложноэфирную группу, или его соли



причем этот способ включает стадии:

восстановительного аминирования соединения формулы V амином формулы, $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ с образованием ими́на/енамина формулы Va, где R^8 и R^9 , независимо, выбирают из водорода и C_{1-6} алкила. Предпочтительно R^8 и R^9 , независимо, выбирают из C_{1-6} алкила. Более предпочтительно амин представляет собой N-метил-N-изопропиламин.

В 14-м варианте изобретение включает способ получения продукта формулы VI, содержащий стадии восстановительного аминирования:

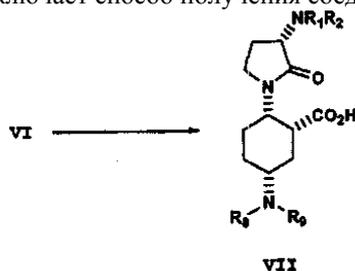
(а) прибавление амина формулы $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ и дегидратирующего агента к соединению формулы V в апротонном растворителе при температуре примерно от -20 до примерно 50°C с образованием ими́на/енамина формулы Va;

(б) реакция ими́на/енамина формулы Va в присутствии платинового катализатора, 5% Pt/S/C, с водородом под давлением с образованием соединения VI.

В 15-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы VI или его соли, отличающийся тем, что дегидратирующий агент на стадии а) представляет собой кислоту Льюиса/кислоту Бренстеда (предпочтительно тетраизопророксид титана), а апротонный растворитель выбирают из дихлорэтана, дихлорметана (хлористого метилена), ацетонитрила, ДМСО, ДМФА и N-метилпирролидона (предпочтительно дихлорметана).

В 16-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы VI или его соли, отличающийся тем, что на стадии б) катализатор, 5% Pt/S/C, присутствует в количестве примерно от 0,5 до 50% (вес./вес.) от веса соединения Va. Предпочтительно давление газообразного водорода равно 15-35 psig (103,4-241,3 кПа).

В 17-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы VII или его соли

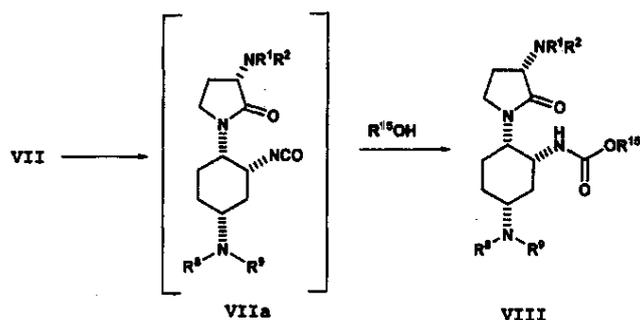


причем способ включает стадию гидролиза сложного эфира формулы VI с образованием кислоты формулы VII.

Интервал температур составляет примерно от 40 до примерно 100°C (наиболее предпочтителен температурный интервал примерно $50-70^\circ\text{C}$). Кислоты выбирают из серной кислоты, толуолсульфокислоты, азотной кислоты, метансульфоновой кислоты, бромисто-водородной кислоты и хлористо-водородной кислоты. Наиболее предпочтительна хлористо-водородная кислота. Предпочтительно стадию гидролиза проводят в водном растворе соляной (хлористо-водородной) кислоты, получая соединения формулы VII.

В 18-м варианте изобретение включает способ получения соединения формулы VII, дополнительно содержащий стадию смешивания основания с раствором кислоты формулы VII, необязательно *in situ*. Предпочтительно основание представляет собой гидроксид щелочного металла, например гидроксид натрия.

В 19-м варианте изобретение включает способ получения карбамата формулы VIII или его соли



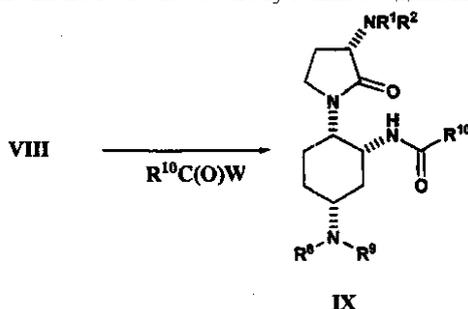
причем способ включает стадии:

- превращение кислоты формулы VII в изоцианат формулы VIIa и
- реакция изоцианата формулы VIIa со спиртом формулы $R^{15}OH$ с образованием карбамата формулы VIII;

где R^{15} обозначает C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксигруппу, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $C(=O)C_{1-4}$ алкил. Предпочтительно R^{15} обозначает трет-бутил или незамещенный бензил.

В 20-м варианте изобретения включает способ получения соединения формулы VIII или его соли перегруппировкой Курциуса, заключающийся в контактировании натриевой соли соединения формулы VII с азидом (предпочтительно дифенилфосфорилазидом) в растворителе (предпочтительно трет-бутиловом спирте), содержащем толуол, при температуре выше температуры инициации термической перегруппировки. Предпочтительно температура выше $50^\circ C$.

В 21-м варианте изобретения включает способ получения соединения формулы IX или его соли



причем данный способ включает стадии:

- превращение карбамата формулы VIII в промежуточный свободный амин и
- ацилирование промежуточного свободного амина *in situ* реагентом $R^{10}C(O)W$ с образованием соединения формулы IX;

где R^{10} , независимо, обозначает C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксигруппу, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $C(=O)C_{1-4}$ алкил; и

W обозначает галоген или $R^{10}C(O)$.

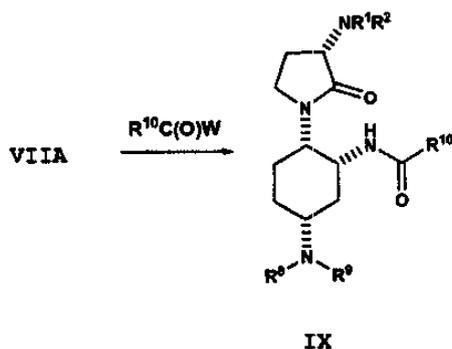
Предпочтительно $R^{10}C(O)W$ представляет собой уксусный ангидрид.

В 22-м варианте изобретения включает способ получения соединения формулы IX или его соли, отличающийся тем, что процесс (стадия) превращения включает стадии:

- обработка раствора соединения VIII кислотой и
- добавление основания к раствору с образованием промежуточного свободного амина.

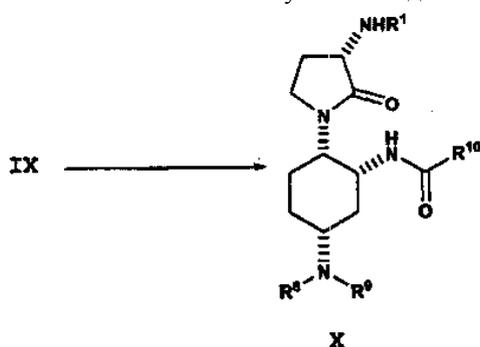
Предпочтительно кислоту выбирают из серной кислоты, толуолсульфокислоты, азотной кислоты, метансульфокислоты, бромисто-водородной кислоты и хлористо-водородной кислоты, более предпочтительно метансульфоновой кислоты. Предпочтительно основание представляет собой триалкиламин, предпочтительно триэтиламин.

В 23-м варианте изобретения включает способ получения соединения формулы IX или его соли



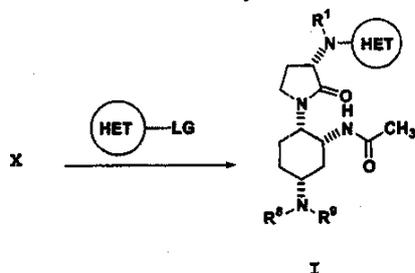
причем этот процесс включает стадию прибавления изоцианата формулы VIIa, необязательно *in situ*, к ацилирующему агенту, $(R^{10}C(O))_2O$, в присутствии его соответствующей кислоты, $R^{10}C(O)OH$, где R^{10} , независимо, обозначает C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксигруппу, циано-, нитро-, CF_3 -, OC_{1-4} алкил-, OCF_3 - и $C(=O)C_{1-4}$ алкил-группы. Предпочтительно R^{10} обозначает C_{1-6} алкил, в особенности метил.

В 24-м варианте изобретения включается способ получения соединения формулы X или его соли



причем этот способ включает депротекцию (снятие защитной группы) защищенного амина формулы IX с образованием соединения формулы X. Предпочтительно, если R^2 обозначает Cbz, депротекцию осуществляют гидрированием в присутствии палладиевого катализатора. Палладиевый катализатор предпочтительно представляет собой 10% Pd/C.

В 25-м варианте изобретения включается способ получения соединения формулы I



причем этот способ включает конденсацию соединения формулы X с соединением формулы

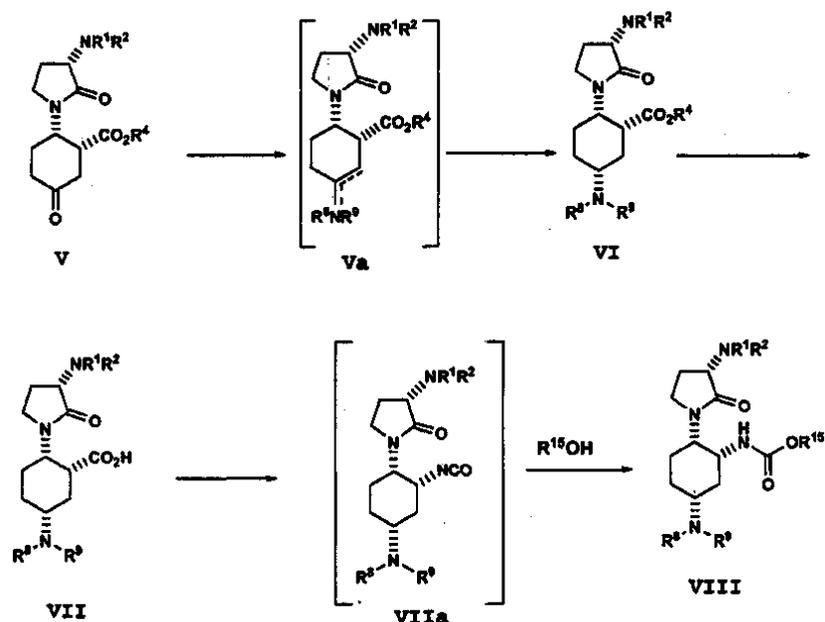


получение соединения формулы I,

где HET обозначает необязательно замещенный 3-14-членный гетероцикл или гетероарильный цикл, содержащий от одного до четырех гетероатомов, выбранных из N, O или S (предпочтительно от одного до трех гетероатомов, в частности от одного до двух атомов азота), по меньшей мере в одном из циклов (HET предпочтительно обозначает 6-замещенный хиназолин-4-ил, более предпочтительно 6-трифторметилхиназолин-4-ил);

LG обозначает уходящую группу, выбранную из галогена или OSO_2R^{16} (LG предпочтительно обозначает галоген, более предпочтительно хлор), где R^{16} обозначает C_{1-6} алкил, фенил, 5-7-членный гетероарил, содержащий один или более атомов, выбранных из N, S или O, или 3-7-членный циклоалкил, каждый из которых необязательно является замещенным (предпочтительно необязательные заместители в R^{16} представляют собой от одной до трех групп, выбранных из галогена, CF_3 и C_{1-6} алкила).

В 26-м варианте настоящего изобретения включается новый способ получения соединения формулы VIII или его соли



причем этот способ включает стадии:

восстановительное аминирование соединения формулы V амином формулы $\text{NH}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ с образованием соединения формулы VI, включающее стадии:

(а) прибавление амина и дегидратирующего агента к соединению формулы V в апротонном растворителе при температуре примерно от -20 до примерно 50°C с образованием имина/енамина формулы Va;

(б) реакция раствора имина/енамина формулы Va в присутствии платинового катализатора, 5% Pt/S/C, с водородом под давлением с образованием сложного эфира формулы VI;

гидролиз сложного эфира формулы VI с образованием кислоты формулы VII;

превращение кислоты формулы VII в изоцианат формулы VIIa;

реакция изоцианата формулы VIIa со спиртом формулы R^{15}OH с образованием карбамата формулы VIII;

где R^1 и R^2 , независимо, обозначают водород или аминозащитную группу, выбранную из карбобензилоксигруппы (Cbz), трет-бутилоксикарбонильной (BOC) группы, флуоренилметилоксикарбонильной (FMOC) группы, бензильной (Bn) группы и п-метоксibenзильной (PMB) группы (предпочтительно аминозащитная группа представляет собой Cbz, Bn или BOC, в особенности Cbz или Bn);

R^4 обозначает низший C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксиль, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкил;

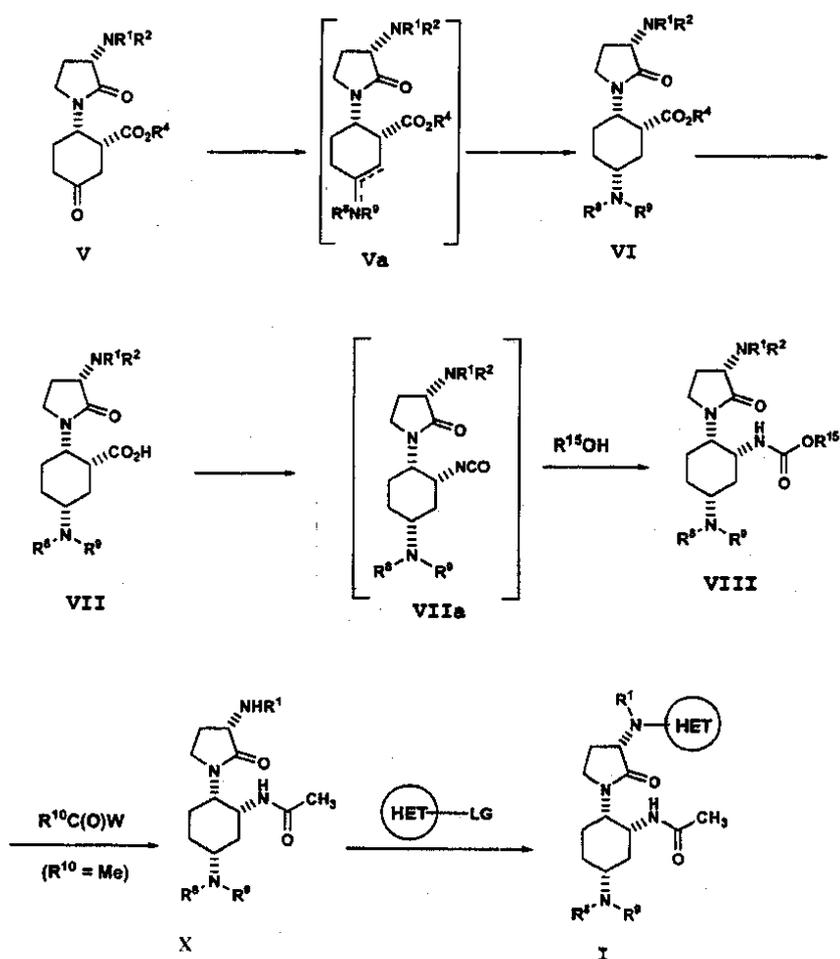
R^8 и R^9 , независимо, обозначают водород или C_{1-6} алкил;

R^{15} обозначает C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксиль, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкил (предпочтительно R^{15} обозначает трет-бутил или незамещенный бензил, более предпочтительно трет-бутил);

HET обозначает необязательно замещенный 3-14-членный гетероцикл или гетероарильный цикл, содержащий от одного до четырех гетероатомов, выбранных из N, O или S (предпочтительно от одного до трех гетероатомов, в частности от одного до двух атомов азота), по меньшей мере в одном из циклов (HET предпочтительно обозначает 6-замещенный хиназолин-4-ил, более предпочтительно 6-трифторметилхиназолин-4-ил);

LG обозначает уходящую группу, выбранную из галогена или $\text{OSO}_2\text{R}^{16}$ (LG предпочтительно обозначает галоген, более предпочтительно хлор), где R^{16} обозначает C_{1-6} алкил, фенил, 5-7-членный гетероарил, содержащий один или более атомов, выбранных из N, S или O, или 3-7-членный циклоалкил, каждый из которых необязательно является замещенным (предпочтительно необязательные заместители в R^1 представляют собой от одной до трех групп, выбранных из галогена, CF_3 и C_{1-6} алкила).

В 27-м варианте настоящего изобретение включает новый способ получения соединения формулы I или его соли



причем этот способ включает стадии:

восстановительное аминирование соединения формулы V амином формулы NH(R⁸)(R⁹) с образованием соединения формулы VI, при этом восстановительное аминирование включает стадии:

(а) прибавление амина и дегидратирующего агента к соединению формулы V в апротонном растворителе при температуре примерно от -20 до примерно 50°C с образованием имина/енамина формулы Va;

(б) реакция раствора имина/енамина формулы Va в присутствии платинового катализатора, 5% Pt/S/C, с водородом под давлением с образованием сложного эфира формулы VI;

гидролиз сложного эфира формулы VI с образованием кислоты формулы VII;

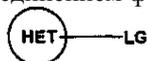
превращение кислоты формулы VII в изоцианат формулы VIIa;

реакция изоцианата формулы VIIa со спиртом формулы R¹⁵OH с образованием карбамата формулы VIII;

превращение карбамата формулы VIII в промежуточный свободный амин;

ацилирование промежуточного свободного амина *in situ* реагентом R¹⁰C(O)W с последующей депротекцией защищенного амина и образованием соединения формулы X;

конденсация соединения формулы X с соединением формулы



с образованием соединения формулы I;

где R¹ и R², независимо, обозначают водород или аминокрающую группу, выбранную из карбобензилоксигруппы (Cbz), трет-бутилоксикарбонильной (BOC) группы, флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) группы, бензильной (Bn) группы и п-метоксибензильной (PMB) группы (предпочтительно аминокрающая группа представляет собой Cbz, Bn или BOC, в особенности Cbz или Bn);

R⁴ обозначает низший C₁₋₆алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C₁₋₄алкил, C₂₋₄алкенил, галоген, гидрокси, циано, нитро, CF₃, OC₁₋₄алкил, OCF₃ и C(=O)C₁₋₄алкил;

R⁸ и R⁹, независимо, обозначают водород или C₁₋₆алкил;

R¹⁰, независимо, обозначает C₁₋₆алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C₁₋₄алкил, C₂₋₄алкенил, галоген, гидрокси, циано, нитро, CF₃, OC₁₋₄алкил, OCF₃ и C(=O)C₁₋₄алкил (предпочтительно C₁₋₆алкил, более предпочтительно метил);

W обозначает галоген или R¹⁰C(O)-.

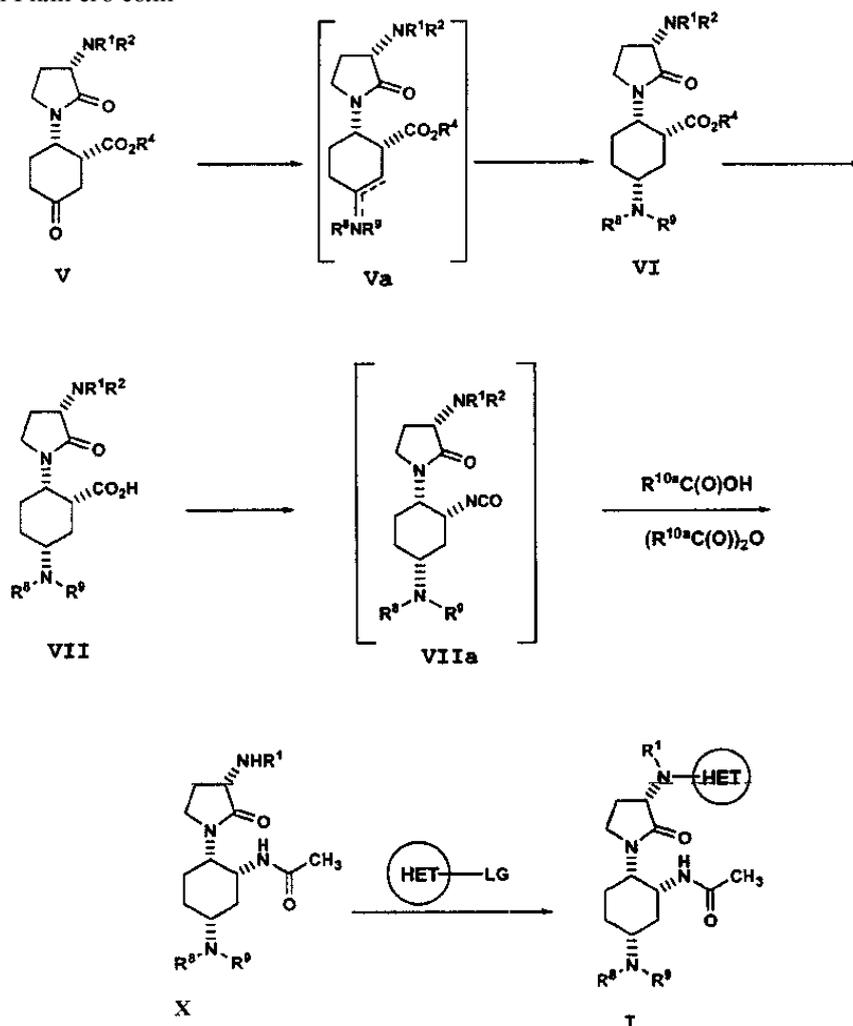
R¹⁵ обозначает C₁₋₆алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C₁₋₄алкил,

C_{2-4} алкил, галоген, гидроксигруппа, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $C(=O)C_{1-4}$ алкил (предпочтительно R^{15} обозначает трет-бутил или незамещенный бензил, более предпочтительно трет-бутил);

НЕТ обозначает необязательно замещенный 3-14-членный гетероцикл или гетероарильный цикл, содержащий от одного до четырех гетероатомов, выбранных из N, O или S (предпочтительно от одного до трех гетероатомов, в частности от одного до двух атомов азота), по меньшей мере в одном из циклов (НЕТ предпочтительно обозначает 6-замещенный хиназолин-4-ил, более предпочтительно 6-трифторметилхиназолин-4-ил);

LG обозначает уходящую группу, выбранную из галогена или OSO_2R^{16} (LG предпочтительно обозначает галоген, более предпочтительно хлор), где R^{16} обозначает C_{1-6} алкил, фенил, 5-7-членный гетероарил, содержащий один или более атомов, выбранных из N, S или O, или 3-7-членный циклоалкил, каждый из которых необязательно является замещенным (предпочтительно необязательные заместители в R^{16} представляют собой от одной до трех групп, выбранных из галогена, CF_3 и C_{1-6} алкила).

В 28-м варианте настоящего изобретения включается альтернативный новый способ получения соединения формулы I или его соли



причем этот способ включает стадии:

восстановительное аминирование соединения формулы V амином формулы $NH(R^8)(R^9)$ с образованием соединения формулы VI, при этом восстановительное аминирование включает стадии:

(а) прибавление амина и дегидратирующего агента к соединению формулы V в апротонном растворителе при температуре примерно от -20 до примерно $50^\circ C$ с образованием имина/енамина формулы Va;

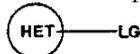
(б) реакция раствора имина/енамина формулы Va в присутствии платинового катализатора, 5% Pt/S/C, с газообразным водородом под давлением с образованием сложного эфира формулы VI;

гидролиз сложного эфира формулы VI с образованием кислоты формулы VII;

превращение кислоты формулы VII в изоцианат формулы VIIa;

прибавление изоцианата формулы VIIa, необязательно *in situ*, к ацилирующему агенту $(R^{10a}C(O)_2)$ в присутствии соответствующей кислоты, $R^{10a}C(O)OH$, с последующей депротекцией защищенного амина и образованием соединения формулы X;

конденсация соединения формулы X с соединением формулы



с образованием соединения формулы I;

где R^1 и R^2 , независимо, обозначают водород или аминоксигруппу, выбранную из карбобензилоксигруппы (Cbz), трет-бутилоксикарбонильной (BOC) группы, флуоренилметилоксикарбонильной (FMOC) группы, бензильной (Bn) группы и п-метоксибензильной (PMB) группы (предпочтительно аминоксигруппа представляет собой Cbz, Bn или BOC, в особенности Cbz или Bn);

R^4 обозначает низший C_{1-6} алкил или бензил, необязательно имеющий в качестве заместителя C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил, галоген, гидроксигруппу, циано, нитро, CF_3 , OC_{1-4} алкил, OCF_3 и $C(=O)C_{1-4}$ алкил;

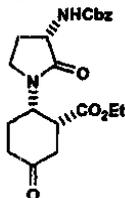
R^8 и R^9 , независимо, обозначают водород или C_{1-6} алкил;

причем R^{10a} , независимо, обозначает C_{1-6} алкил или необязательно замещенный бензил (предпочтительно R^{10a} обозначает метил);

HET обозначает необязательно замещенный 3-14-членный гетероцикл или гетероарильный цикл, содержащий от одного до четырех гетероатомов, выбранных из N, O или S (предпочтительно от одного до трех гетероатомов, в частности от одного до двух атомов азота), по меньшей мере в одном из циклов (HET предпочтительно обозначает 6-замещенный хиназолин-4-ил, более предпочтительно 6-трифторметилхиназолин-4-ил);

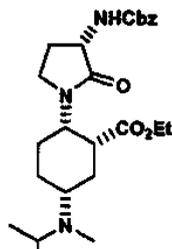
LG обозначает уходящую группу, выбранную из галогена или OSO_2R^{16} (LG предпочтительно обозначает галоген, более предпочтительно хлор), где R^{16} обозначает C_{1-6} алкил, фенил, 5-7-членный гетероарил, содержащий один или более атомов, выбранных из N, S или O, или 3-7-членный циклоалкил, каждый из которых необязательно является замещенным (предпочтительно необязательные заместители в R^{16} представляют собой от одной до трех групп, выбранных из галогена, CF_3 и C_{1-6} алкила).

В 29-м варианте настоящее изобретение включает способ получения по любому из предыдущих вариантов изобретения, отличающийся тем, что соединение формулы V представляет собой



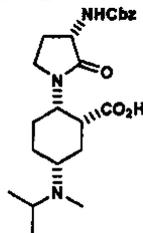
или его соль;

соединение формулы VI представляет собой



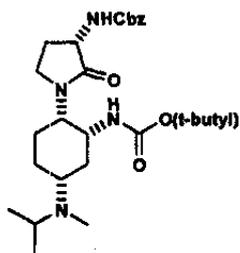
или его соль;

соединение формулы VII представляет собой

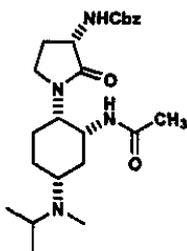


или его соль (предпочтительно натриевую соль);

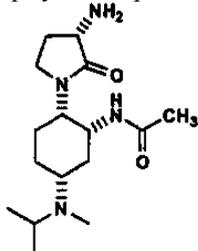
карбамат формулы VIII представляет собой



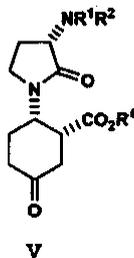
или соль;
защищенный амин формулы IX представляет собой



или соль;
депротекционированное соединение формулы X представляет собой

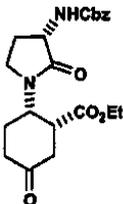


или его соль;
и соединение формулы I представляет собой N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид или его соль.
В 30-м варианте настоящее изобретение включает соединение формулы V или его соль



где R¹ и R² обозначают водород или аминокзащитную группу, выбранную из Boc, Cbz или бензила;
R⁴ обозначает низший C₁₋₆алкил.

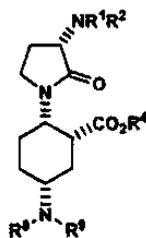
Предпочтительным соединением формулы V является



или его соль.

В 31-м варианте настоящее изобретение включает соединение формулы VI или его соль

014960



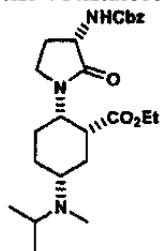
VI

где R¹ и R², независимо, обозначают водород или аминокзащитную группу, выбранную из BOC, Cbz или бензила;

R⁴ обозначает низший C₁₋₆алкил;

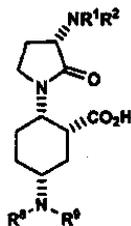
R⁸ и R⁹, независимо, выбирают из водорода или C₁₋₆алкила.

Предпочтительным соединением формулы VI является



или его соль.

В 32-м варианте настоящее изобретение включает соединение формулы VII или его соль

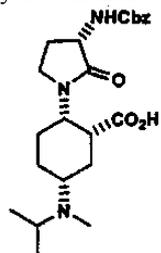


VII

где R¹ и R², независимо, обозначают водород или аминокзащитную группу, выбранную из BOC, Cbz или бензила;

R⁸ и R⁹, независимо, выбирают из водорода или C₁₋₆алкила.

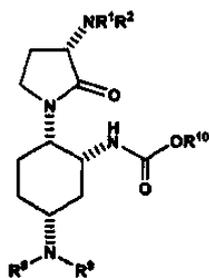
Предпочтительным соединением формулы VII является



или его соль.

Предпочтительные соли включают соли щелочных металлов, такие как натриевая соль соединения формулы VII.

В 33-м варианте настоящее изобретение включает соединение формулы VIII или его соль



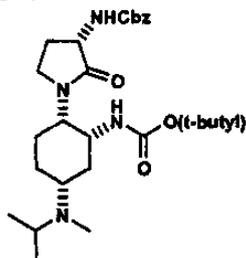
VIII

где R^1 и R^2 , независимо, обозначают водород или аминокзащитную группу, выбранную из BOC, Cbz или бензила;

R^8 и R^9 , независимо, выбирают из водорода или C_{1-6} алкила;

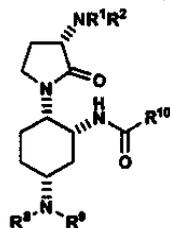
R^{10} обозначает C_{1-6} алкил или бензил.

Предпочтительным соединением формулы VIII является



или его соль.

В 34-м варианте настоящее изобретение включает соединение формулы IX или его соль



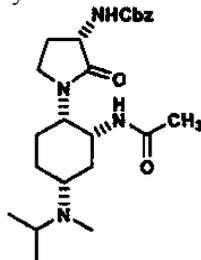
IX

где R^1 и R^2 , независимо, обозначают водород или аминокзащитную группу, выбранную из BOC, Cbz или бензила;

R^8 и R^9 , независимо, выбирают из водорода или C_{1-6} алкила;

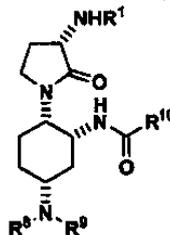
R^{10} обозначает C_{1-6} алкил или необязательно замещенный бензил.

Предпочтительным соединением формулы IX является



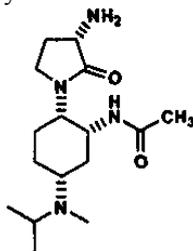
или его соль.

В 35-м варианте настоящее изобретение включает соединение формулы X или его соль



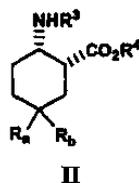
X

где R^1 обозначает водород или аминозащитную группу, выбранную из BOC, Cbz или бензила;
 R^8 и R^9 , независимо, выбирают из водорода или C_{1-6} алкила;
 R^{10} обозначает C_{1-6} алкил или необязательно замещенный бензил.
 Предпочтительным соединением формулы X является



или его соль.

В 36-м варианте настоящее изобретение включает соединение формулы II или его соль



где R_a и R_b вместе с атомом углерода, с которым они оба связаны, образуют карбонильную группу или 1,3-диоксолановую группу (предпочтительно R_a и R_b вместе с атомом углерода, с которым они оба связаны, образуют 1,3-диоксолановую группу);

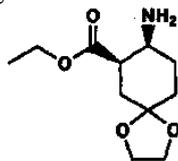
R^1 обозначает водород;

R^2 обозначает Cbz;

R^3 обозначает водород;

R^4 обозначает C_{1-6} алкокси.

Предпочтительным соединением формулы II является



или его соль.

Предпочтительными солями являются толуолсульфонат или гидробромид, в особенности толуолсульфонат.

В 46-м варианте настоящее изобретение включает способ получения соединения формулы I N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида или его соли.

Настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных особенностей. Таким образом, вышеприведенные варианты изобретения не следует рассматривать как ограничивающие. Все без исключения варианты изобретения могут применяться в сочетании с любым другим вариантом или любыми другими вариантами изобретения для описания дополнительных вариантов настоящего изобретения. Каждый отдельный элемент (например, предпочтительные или специальные аспекты) вариантов изобретения является его собственным независимым вариантом изобретения. Кроме того, предполагается, что любые элементы варианта изобретения следует объединять с любыми другими элементами из любых вариантов изобретения для описания дополнительного варианта изобретения. Кроме того, настоящее изобретение охватывает комбинации различных вариантов изобретения, частей вариантов изобретения, определений, описаний и примеров изобретения, отмеченных в данном описании.

Определения

Ниже приводятся определения терминов, употребляемых в данном описании и прилагаемой формуле изобретения. Если не указано иначе, первое определение, приведенное для группы или термина в данном описании, относится к этой группе в описании в целом и в терминах, индивидуально или как к части другой группы.

Термин "алкил" относится к линейным или разветвленным углеводородным группам, содержащим 1-12 углеродных атомов, предпочтительно 1-6 углеродных атомов. Если цифра стоит после символа "C" в виде нижнего индекса, этот нижний индекс более конкретно определяет число углеродных атомов, которое может содержать конкретная группа. Например, " C_{1-6} алкил" относится к линейным или разветвленным алкильным группам, содержащим от одного до шести углеродных атомов, таким как метил, этил,

н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, н-пентил и т.д. Нижний индекс "0" относится к связи. Так, название гидроксис- $C_{0,2}$ алкил или $C_{0,2}$ гидроксиалкил включает гидроксис, гидроксиметил и гидроксипропил. Алкильные группы могут быть замещенными, т.е. включать от одной до трех групп, выбранных из C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, гидроксис, галогена, циано, нитро, CF_3 , $O(C_{1-6}$ алкила), OCF_3 , $C(=O)H$, $C(=O)(C_{1-6}$ алкила), CO_2H , $CO_2(C_{1-6}$ алкила), $NHCO_2(C_{1-6}$ алкила), $-S(C_{1-6}$ алкила), NH_2 , $NH(C_{1-6}$ алкила), $N(C_{1-6}$ алкила) $_2$, $N(CH_3)_3^+$, $SO_2(C_{1-6}$ алкила), $C(=O)(C_{1-4}$ алкилен) NH_2 , $C(=O)(C_{1-4}$ алкилен) NH (алкила), $C(=O)(C_{1-4}$ алкилен) $N(C_{1-4}$ алкила) $_2$, C_{3-7} циклоалкила, фенила, бензила, фенилэтила, фенокси, бензилокси, нафтила, 4-7-членного гетероцикла и/или 5-6-членного гетероарила. Если замещенный алкил имеет в качестве заместителя арильную, гетероциклическую, циклоалкильную или гетероарильную группу, указанные циклические системы являются системами по определению ниже и, таким образом, могут иметь ноль, один, два или три заместителя, также по определению ниже.

Если термин "алкил" применяется вместе с другой группой, например "арилалкил", это сочетание более конкретно определяет по меньшей мере один из заместителей, который содержит замещенный алкил. Например, "арилалкил" относится к замещенной алкильной группе по определению выше, в которой по меньшей мере один из заместителей представляет собой арил, такой как бензил. Так, термин "арил- $C_{0,4}$ алкил" включает замещенный низший алкил, содержащий по меньшей мере один арильный заместитель, а также включает арил, непосредственно связанный с другой группой, а именно арил- C_0 алкил.

Термин "алкенил" относится к линейной или разветвленной углеводородным группам, содержащим от 2 до 12 углеродных атомов и по меньшей мере одну двойную связь. Наиболее предпочтительными являются алкенильные группы из 2-6 углеродных атомов и имеющие одну двойную связь. Алкенильные группы могут быть замещенными, как описано выше для алкильных групп.

Термин "алкинил" относится к линейной или разветвленной углеводородным группам, содержащим от 2 до 12 углеродных атомов и по меньшей мере одну тройную связь. Наиболее предпочтительными являются алкинильные группы из 2-6 углеродных атомов и имеющие одну тройную связь. Алкинильные группы могут быть замещенными, как описано выше для алкильных групп.

Термин "алкилен" относится к двухвалентным линейным или разветвленным углеводородным группам, содержащим 1-12 атомов углерода, предпочтительно 1-8 углеродных атомов, например $\{-CH_2-\}_n$, где n обозначает 1-12, предпочтительно 1-8. Наиболее предпочтительными являются алкиленовые группы из 1-2 углеродных атомов.

Термины "алкенилен" и "алкинилен" относятся к двухвалентным радикалам алкенильной и алкинильной групп соответственно по определению выше. Алкениленовые группы могут быть замещенными, как определено выше для алкильных групп.

Термин "алкокси" относится к атому кислорода, замещенному алкилом, по определению выше. Например, термин "алкокси" включает группу $-O-C_{1-6}$ алкил.

Когда нижний индекс применяется в отношении алкокси, тиаалкильной или аминоалкильной групп, нижний индекс показывает число углеродных атомов, которые может содержать группа, помимо гетероатомов.

Следует понимать, что специалист в данной области техники выбирает все группы, включая, например, алкокси, алкильную и аминоалкильную группу, таким образом, чтобы получить устойчивые соединения.

Термин "карбонил" относится к двухвалентной карбонильной группе $-C(=O)-$.

Термин "ацил" относится к карбонильной группе, связанной с органическим радикалом, более конкретно к группе $C(=O)R_c$, а также к двухвалентной группе $-C(=O)R_c-$, которые связаны с органическими радикалами. Группу R_c можно выбрать из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероцикло или гетероарила по данному описанию или, когда это целесообразно, из соответствующей двухвалентной группы, например алкилена.

Термин "циклоалкил" относится к полностью насыщенным и частично ненасыщенным углеводородным циклам (и, следовательно, включает "циклоалкенильные кольца") 3-9, предпочтительно 3-7 углеродных атомов. Термин "циклоалкил" включает такие циклы, имеющие ноль, один, два или три заместителя, выбранных из C_{1-4} алкила, C_{2-4} алкенила, гидроксис, галогена, циано, нитро, CF_3 , $O(C_{1-4}$ алкила), OCF_3 , $C(=O)H$, $C(=O)(C_{1-4}$ алкила), CO_2H , $CO_2(C_{1-4}$ алкила), $NHCO_2(C_{1-4}$ алкила), $S(C_{1-4}$ алкила), NH_2 , $NH(C_{1-4}$ алкила), $N(C_{1-4}$ алкил) $_2$, $N(C_{1-4}$ алкил) $_3^+$, $SO_2(C_{1-4}$ алкила), $C(=O)(C_{1-4}$ алкилен) NH_2 , $C(=O)(C_{1-4}$ алкилен) NH (алкила) и/или $C(=O)(C_{1-4}$ алкилен) $N(C_{1-4}$ алкила) $_2$. Термин "циклоалкил" также включает такие циклы, с которыми конденсирован второй цикл (например, включая бензольный, гетероцикло или гетероарильные циклы), или содержащие углерод-углеродный мостик, включающий 3-4 углеродных атома.

Термин "галоид" или "галоген" относится к хлору, бром, фтору и йоду.

Термин "галогеналкил" ("галоидалкил") означает замещенный алкил, имеющий один или более галоидных заместителей.

Термин "галоидалкокси" или "галогеналкокси" означает алкоксигруппу, имеющую один или более галоидных заместителей. Например, "галоидалкокси" включает OCF_3 .

Термин "гетероатомы" включает атомы кислорода, серы и азота.

Термин "арил" относится к фенилу, бифенилу, флуоренилу, 1-нафтилу и 2-нафтилу.

Термин "арил" включает такие циклы, имеющие ноль, один, два или три заместителя, выбранных из C₁₋₄алкила, C₂₋₄алкенила, галогена, гидрокси, циано, нитро, CF₃, O(C₁₋₄алкила), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄алкила), CO₂H, CO₂(C₁₋₄алкила), NHCO₂(C₁₋₄алкила), S(C₁₋₄алкила), NH₂, NH(C₁₋₄алкила), N(C₁₋₄алкила)₂, N(C₁₋₄алкила)₃⁺, SO₂(C₁₋₄алкила), C(=O)(C₁₋₄алкилен)NH₂, C(=O)(C₁₋₄алкилен)NH(алкила) и/или C(=O)(C₁₋₄алкилен)N(C₁₋₄алкила)₂.

Термины "гетероцикло" или "гетероциклический" относятся к замещенным и незамещенным неароматическим (которые могут быть полностью или частично насыщенными) 3-15-членным циклам, содержащим от одного до четырех гетероатомов. Такие циклы могут представлять собой 3-7-членные моноциклические группы, 7-11-членные бициклические группы и 10-15-членные трициклические группы. Каждый цикл гетероциклической группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или от одного до четырех атомов азота при условии, что общее число гетероатомов в каждом цикле равно четырем или менее и что каждый цикл содержит по меньшей мере один углеродный атом. Конденсированные циклы, завершающие бициклическую или трициклическую группы, могут содержать только углеродные атомы и могут быть насыщенными, частично насыщенными или ненасыщенными. Атомы азота и серы могут, необязательно, быть окисленными, а атом азота может, необязательно, быть кватернизован. Гетероциклогруппы могут быть присоединены по любому подходящему азотному или углеродному атому. Гетероциклическое кольцо может содержать ноль, один, два или три заместителя, выбранных из C₁₋₄алкила, C₂₋₄алкенила, галогена, гидрокси, циано, нитро, CF₃, O(C₁₋₄алкила), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄алкила), CO₂H, CO₂(C₁₋₄алкила), NHCO₂(C₁₋₄алкила), S(C₁₋₄алкила), NH₂, NH(C₁₋₄алкила), N(C₁₋₄алкила)₂, N(C₁₋₄алкила)₃⁺, SO₂(C₁₋₄алкила), C(=O)(C₁₋₄алкилен)NH₂, C(=O)(C₁₋₄алкилен)NH(алкила) и/или C(=O)(C₁₋₄алкилен)N(C₁₋₄алкила)₂. Примеры гетероциклических групп включают азетинидил, пирролидинил, оксетанил, имидазолинил, оксазолидинил, изоксазолинил, диазолидинил, изотиазолидинил, тетрагидрофуранил, пиперидил, пиперазинил, 2-оксопиперазинил, 2-оксопиперидил, 2-оксопирролидинил, 2-оксоазепинил, азепинил, 4-пиперидонил, тетрагидропиранил, морфолинил, тиаморфолинил, тиаморфолинил сульфоксид, тиаморфолинил сульффон, 1,3-диоксолан, хинуклидинил и тетрагидро-1,1-диоксотенил и т.п.

Термин "гетероарил" относится к замещенным и незамещенным 3-14-членным циклам, имеющим от одного до четырех гетероатомов, выбранных из O, S и N, по меньшей мере в одном цикле. Указанные циклы могут представлять собой 5- или 6-членные моноциклические группы, 9- или 10-членные бициклические группы и 11-14-членные трициклические группы. Каждый цикл гетероарильной группы, содержащей гетероатом, может содержать один или два атома кислорода или серы и/или от одного до четырех атомов азота при условии, что общее число гетероатомов в каждом цикле равно четырем или менее и что каждый цикл содержит по меньшей мере один углеродный атом. Конденсированные циклы, завершающие бициклическую или трициклическую группы, могут содержать только углеродные атомы и могут быть насыщенными, частично насыщенными или ненасыщенными. Атомы азота и серы могут, необязательно, быть окисленными, а атом азота может, необязательно, быть кватернизован. Гетероарильные группы, которые являются бициклическими или трициклическими, должны включать по меньшей мере один полностью ароматический цикл, но другой конденсированный цикл может быть ароматическим или неароматическим. Гетероарильная группа может быть присоединена по любому подходящему азотному или углеродному атому любого цикла. Гетероарильная циклическая система может содержать ноль, один, два или три заместителя, выбранных из C₁₋₄алкила, C₂₋₄алкенила, галогена, гидрокси, циано, нитро, CF₃, O(C₁₋₄алкила), OCF₃, C(=O)H, C(=O)(C₁₋₄алкила), CO₂H, CO₂(C₁₋₄алкила), NHCO₂(C₁₋₄алкила), S(C₁₋₄алкила), NH₂, NH(C₁₋₄алкила), N(C₁₋₄алкила)₂, N(C₁₋₄алкила)₃⁺, SO₂(C₁₋₄алкила), C(=O)(C₁₋₄алкилен)NH₂, C(=O)(C₁₋₄алкилен)NH(алкила) и/или C(=O)(C₁₋₄алкилен)N(C₁₋₄алкила)₂.

Примеры гетероарильных групп включают пирролил, пиразолил, пиразолинил, имидазолил, оксахолил, изоксазолил, тиазолил, тиadiaзолил, изотиазолил, фуранил, тиенил, оксадиазолил, пиридил, пиразинил, пиримидинил, пирадазинил, триазинил, индолил, бензотиазолил, бензодиоксолил, бензоксазолил, бензотиенил, хинолинил, тетрагидроизохинолинил изохинолинил, бензимидазолил, бензопиранил, индолзинил, бензофуранил, хромонил, кумаринил, бензопиранил, цинналинил, хиноксалинил, индазолил, пирролопиридил, фуropyридил, дигидроизоиндолил, тетрагидрохинолинил и т.п. Особые гетероарильные группы включают, например, 6-замещенный хиназолин-4-ил и 6-трифторметилхиназолин-4-ил.

Если группа является необязательно замещенной, она включает замещенные и незамещенные группы.

Соединения по данному описанию могут иметь асимметрические центры. Соединения по настоящему изобретению, содержащие асимметрически замещенный атом, можно выделять в оптически активной или в рацемической формах. В уровне техники хорошо известно, как получать оптически активные формы, например, разделением (разрешением) рацемических форм или синтезом из оптически активных исходных. Многие геометрические (пространственные) изомеры олефинов, соединений с C=N двойными связями и т.п. также могут присутствовать в соединениях по данному описанию, и все такие изомеры рассматриваются в данном изобретении. Описаны цис- и трансгеометрические изомеры соединений по

настоящему изобретению, и они могут быть выделены в виде смеси изомеров или в виде отдельных изомерных форм. Предполагаются все хиральные, диастереомерные, рацемические формы и все геометрические изомерные формы, если особо не указывается конкретная стереохимия или изомерная форма.

Один энантиомер соединений по данному описанию может проявлять повышенную активность по сравнению с другими. Таким образом, рассматривается, что все стереоизомеры являются частью настоящего изобретения. При необходимости разделение рацемата можно проводить методом ВЭЖХ с применением хиральной колонки или разделять с применением агента для разделения, такого как хлорангидрид камфоновой кислоты (камфонилхлорид) в статье Steven D. Young et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 2602-2605.

Выражение "фармацевтически приемлемый" употребляется по данному описанию в отношении тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, по мнению компетентного медика, пригодны для применения в контакте с тканями человека и животных, не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другого затруднения или осложнения, сопоставимых с соотношением польза/риск.

Выражение "фармацевтически приемлемые соли" по данному описанию относится к производным раскрытых соединений, причем исходное соединение модифицируется превращением в его кислотную или основную соль. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но без ограничения, соли минеральных или органических солей основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, такие как карбоновые кислоты, и т.п. Фармацевтически приемлемые соли включают традиционные нетоксические соли или четвертичные аммониевые соли исходного соединения, образующиеся, например, из нетоксических неорганических или органических кислот. Например, такие традиционные (обычные) нетоксические соли включают соли, образующиеся из неорганических кислот, таких как хлористо-водородная, бензолсульфоновая, бромисто-водородная, серная, сульфаминовая, фосфорная, азотная и т.п.; и соли, получающиеся из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, палмитиновая, гидроксиолеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изетионовая и т.п.

Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, обычными химическими методами. Обычно такие соли можно получать реакцией свободной кислоты или основной форм этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе или в их смеси; обычно предпочтительными являются неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Перечень подходящих солей представлен в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, раскрытие этой монографии вводится в данное описание в качестве ссылки.

Так как известно, что пролекарство повышает различные нужные свойства фармацевтических препаратов (например, растворимость, биодоступность, производство), соединения по настоящему изобретению можно доставлять в виде пролекарства. Поэтому предполагается, что настоящее изобретение охватывает пролекарства заявляемых в данном изобретении соединений, способы их доставки и содержащие их композиции. Предполагается, что "пролекарства" включают любые ковалентно связанные носители, которые высвобождают активное исходное пролекарство по настоящему изобретению *in vivo*, когда такое пролекарство вводят млекопитающему. Пролекарства в настоящем изобретении получают, модифицируя функциональные группы соединения таким образом, что модификации расщепляются либо при обычной обработке, либо *in vivo* до исходного соединения. Пролекарства включают соединения по настоящему изобретению, в которых гидроксильная, амино или сульфгидрильная группа связана с любой группой, когда пролекарство по настоящему изобретению вводят млекопитающему, оно расщепляется с образованием свободной гидроксильной, свободной амино или свободной сульфгидрильной группы соответственно. Примеры пролекарств включают, но без ограничения, ацетат, формиат и бензоат спирта и соединения по изобретению с функциональными аминогруппами.

"Стабильное соединение" и "стабильная структура" обозначают соединение, которое является достаточно объемным для того, чтобы его можно было подвергать выделению из реакционной смеси с достаточной степенью чистоты и получать на его основе эффективный терапевтический агент. Данное изобретение охватывает стабильные соединения.

"Терапевтически эффективное количество" обозначает такое количество соединения по изобретению, или такое количество комбинаций заявленных соединений, или такое количество соединения по изобретению в комбинации с другими активными соединениями, которые эффективны для ингибирования МСР-1 или эффективны для лечения или профилактики расстройств, указанных в данном патенте.

Используемые в данном изобретении термины "лечение" или "излечение" охватывают лечение болезненного состояния у млекопитающего, особенно у человека, и включают: (а) профилактику болезненного состояния у млекопитающего, в частности, когда такое млекопитающее предрасположено к возникновению такого болезненного состояния, но диагноз еще не был установлен; (б) ингибирование болез-

ненного состояния, т.е. остановку его развития; и/или (в) облегчение болезненного состояния, т.е. регрессию болезненного состояния.

Названия, используемые в данном изобретении для указания конкретной формы, например "N-2", не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение по отношению к любому другому веществу, имеющему похожие или идентичные физические и химические свойства, их скорее следует понимать как простое указание соединения, которое следует интерпретировать в соответствии с информацией о его характеристике, также данной в описании.

Данное изобретение предусматривает кристаллические формы свободного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида в качестве нового соединения, в особенности в виде фармацевтически приемлемой формы. Согласно некоторым предпочтительным вариантам кристаллические формы свободного основания находятся практически в чистом виде. Предпочтительные варианты свободного основания описаны в примерах как N-2, DC-1, THOO-1, E-1, A-1 и AN-3.

Данное изобретение предусматривает также кристаллические формы солей N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида в качестве нового соединения, в особенности в виде фармацевтически приемлемой формы. Согласно некоторым предпочтительным вариантам кристаллические формы солей находятся практически в чистом виде. Предпочтительные варианты солей описаны в примерах как N-1 форма соли дибензосульфокислоты и H4-1 форма гидрохлорида.

Используемый в данном патенте термин "полиморф" относится к кристаллическим формам, имеющим один и тот же химический состав, но разное пространственное расположение молекул, атомов и/или ионов, образующих кристалл.

Термин "сольват" относится к кристаллической форме молекулы, атома и/или ионов, которая дополнительно содержит молекулы растворителя или растворителей, включенных в кристаллическую структуру. Молекулы растворителя в сольвате могут располагаться упорядоченно и/или хаотично. Сольват может содержать стехиометрическое или нестехиометрическое количество молекул растворителя. Например, сольват с нестехиометрическим количеством молекул растворителя может образоваться в результате частичной потери растворителя сольватом.

Используемый термин "аморфная" относится к твердой форме молекулы, атома и/или ионов, которая не является кристаллической. Аморфное твердое вещество не характеризуется определенной рентгеновской дифрактограммой.

Термин "практически чистая", когда он используется по отношению к кристаллической форме, означает соединение, имеющее степень чистоты более 90 вес.%, включая степень чистоты более 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 и 99 вес.%, а также степень чистоты, равную примерно 100 вес.% (соединения 1) в расчете на вес соединения. Остаток представляет собой другую(ие) форму(ы) соединения и/или примеси, образовавшиеся в процессе реакции, и/или примеси, добавленные в процессе получения соединения. Например, кристаллическая форма N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания или соли может считаться практически чистой, если степень чистоты составляет более 90 вес.%, при этом она измерена средствами, которые в настоящее время являются известными и общепринятыми, а остаток, составляющий менее 10 вес.%, представляет собой другую(ие) форму(ы) N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания или соли и/или примеси, образовавшиеся в процессе реакции, и/или примеси, добавленные в процессе получения соединения.

Образцы кристаллических форм могут быть получены с практически чистой гомогенной фазой, что указывает на наличие преобладающего количества одной кристаллической формы и, возможно, небольших количеств одной или более других кристаллических форм. Наличие более чем одной кристаллической формы в образце может быть определено такими методами, как порошковая рентгеновская дифракция (PXRD) или ядерно-магнитная резонансная спектроскопия (SSNMR). Например, наличие экстраников при сравнении экспериментально полученной PXRD дифрактограммы с моделью PXRD дифрактограммы может показывать на наличие более чем одной кристаллической формы в образце. Имитированная PXRD может быть рассчитана, исходя из данных рентгенограммы единичного кристалла, см. Smith, D.K., "A FORTRAN Program for Calculating X-Ray Powder Diffraction Patterns", Lawrence Radiation Laboratory, Livermore, California, UCRL-7196 (April 1963).

Предпочтительно, когда кристаллическая форма обладает практически чистой гомогенной фазой, о чем свидетельствует величина, составляющая менее 10%, предпочтительно менее 5% и более предпочтительно менее 2%, от общей площади пиков на экспериментально полученной PXRD дифрактограмме, получаемая для экстраников, которые отсутствуют на модели PXRD дифрактограммы. Более предпочтительной является кристаллическая форма, у которой практически чистая гомогенная фаза составляет менее 1% от общей площади пика на экспериментально полученной PXRD дифрактограмме, рассчитанная для экстраников, которые отсутствуют на модели PXRD дифрактограммы.

Способы получения кристаллических форм известны из уровня техники. Кристаллические формы

могут быть получены различными методами, включая кристаллизацию или перекристаллизацию из подходящего растворителя, возгонку, выращивание из расплава, получение твердой фазы из другой фазы, кристаллизацию из сверхкритической жидкости и струйное распыление. Методы кристаллизации или перекристаллизации кристаллических форм из смеси растворителей включают, например, выпаривание растворителя, уменьшение температуры смеси растворителей, затравку кристаллами соединения и/или его соли в сверхнасыщенной смеси растворителей, сушку при замораживании смеси растворителей и добавление антирастворителей (противорастворителей) к смеси растворителей.

Полученные формы могут быть охарактеризованы и определены методом рентгеновской дифракции единичного кристалла, который основан на измерении кристаллической решетки единичного кристалла формы при фиксированной температуре определения. Подробное описание элементарных ячеек приведено в руководстве Stout & Jensen, *X-Ray Structure Determination: A Practical Guide*, Macmillan Co., New York (1968), Chapter 3, которое включено в данное изобретение в качестве ссылки. Альтернативно уникальное расположение атомов в пространстве кристаллической решетки может быть охарактеризовано фракционными атомными координатами. Другим средством характеристики кристаллической структуры является порошковая рентгеновская дифракция, когда экспериментальный или наблюдаемый профиль дифракции сравнивается с имитированным профилем, характеризующим чистый порошковый материал, причем оба профиля получают при одной и той же температуре и данные для кристаллической формы по изобретению получают в виде ряда величин θ .

Можно также использовать другие средства характеристики формы, такие как ядерно-магнитный резонанс в твердом состоянии (SSNMR), дифференциальная сканирующая калориметрия и термогравиметрический анализ. Эти параметры могут быть также использованы в комбинации для того, чтобы охарактеризовать форму по изобретению.

Термин "незначительная потеря веса", применяемый в данном описании при осуществлении TGA, означает наличие чистой (несольватированной) кристаллической формы.

Термин "незначительное поглощение воды в %", используемый в данном описании, при описании изотермы влага-сорбция показывает, что испытываемая форма не является гигроскопичной.

Согласно одному варианту изобретения кристаллическая форма N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания или соли получается практически в чистом виде. Эта кристаллическая форма может быть использована в фармацевтических композициях, которые могут включать один или более других компонентов, выбранных, например, из группы, состоящей из эксципиев, носителей, и одного из других активных фармацевтических ингредиентов или активных химических соединений с другими молекулярными структурами.

Предпочтительно, когда кристаллическая форма обладает практически чистой гомогенной фазой, о чем свидетельствует величина, составляющая менее 10%, предпочтительно менее 5% и более предпочтительно менее 2% от общей площади пиков на экспериментально полученной PXRD дифрактограмме, получаемая для экстрапиков, которые отсутствуют на модели PXRD дифрактограммы. Более предпочтительно является кристаллическая форма, у которой практически чистая гомогенная фаза составляет менее 1% от общей площади пика на экспериментально полученной PXRD дифрактограмме, рассчитанная для экстрапиков, которые отсутствуют на модели PXRD дифрактограммы.

Согласно другому варианту предусмотрена композиция, практически состоящая из кристаллических форм N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания или соли. Композиция согласно этому варианту может содержать по меньшей мере 90 вес.% формы в расчете на вес композиции.

Наличие примесей, образовавшихся в ходе реакции, и/или примесей, добавляемых в процессе получения, может быть определено известными аналитическими методами, такими как, например, хроматография, ядерно-магнитная резонансная спектроскопия, масс-спектрометрия или инфракрасная спектроскопия.

Кристаллические формы могут быть получены различными способами, включая кристаллизацию или перекристаллизацию из подходящего растворителя, возгонку, выращивание из расплава, получение твердой фазы из другой фазы, кристаллизацию из сверхкритической жидкости и струйное распыление. Методы кристаллизации или перекристаллизации кристаллических форм из смеси растворителей включают, например, выпаривание растворителя, уменьшение температуры смеси растворителей, затравку кристаллами соединения и/или его соли в сверхнасыщенной смеси растворителей, сушку при замораживании смеси растворителей и добавление антирастворителей (противорастворителей) к смеси растворителей. Для получения кристаллических форм, включая полиморфы, можно применять методы кристаллизации с высоким выходом.

Кристаллическая форма лекарств, включая полиморфы, способы получения и характеристика кристаллов обсуждаются в *Solid-State Chemistry of Drugs*, S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, and J.G. Stowell, 2nd Edition, SSCI, West Lafayette, Indiana (1999).

В случае методов кристаллизации, которые используют растворители, выбор растворителя или растворителей обычно зависит от одного или более факторов, таких как растворимость соединения, метод

кристаллизации и давление паров растворителя. Можно использовать комбинации растворителей, например соединение может быть солюбилизировано в первом растворителе с получением раствора с последующим добавлением противорастворителя для уменьшения растворимости соединения в растворе и для образования кристаллов. "Противорастворитель" представляет собой растворитель, в котором соединение плохо растворяется. Подходящие растворители для получения кристаллов включают полярные и неполярные растворители.

В одном из методов получения кристаллов N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид, свободное основание или его соль суспендируют и/или перемешивают в подходящем растворителе с получением суспензии, которую можно нагреть для ускорения растворения. Термин "суспензия", используемый в данном описании, означает насыщенный раствор, который может также содержать дополнительное количество твердого вещества с получением гетерогенной смеси при данной температуре. Подходящие для этого растворители включают, например, полярные апротонные растворители и полярные протонные растворители, а также смеси двух или более указанных растворителей, которые описаны в данном патенте.

К любой смеси для проведения кристаллизации могут быть добавлены затравочные кристаллы с целью ускорения кристаллизации. Специалисту в данной области известно, что затравка используется как средство контролирования роста конкретной кристаллической формы или как средство контролирования распределения частиц кристаллического продукта по размерам. Соответственно количество затравочных кристаллов, которые необходимы, зависит от размера имеющихся затравочных кристаллов, а также от желаемого среднего размера частиц продукта, как описано, например, в "Programmed cooling of batch crystallizers", J.W. Mullin and J. Nyvlt, *Chemical Engineering Science* (1971), 26: 369-377. В общем, для эффективного контролирования роста кристаллов необходимы затравочные кристаллы небольшого размера. Затравочные кристаллы небольшого размера можно получать путем пропускания через сита, размалывания или микронизации кристаллов большего размера или путем микрокристаллизации растворов. Следует обращать внимание на то, что измельчение или микронизация кристаллов не должны приводить к любому изменению кристалличности желательной кристаллической формы (т.е. к превращению в аморфное вещество или в другой полиморф).

Охлажденная смесь может быть подвергнута фильтрации под вакуумом и выделенные твердые вещества могут быть промыты подходящим растворителем, таким как растворитель для перекристаллизации на холоде, и высушены в токе азота с получением желательной кристаллической формы. Выделенное твердое вещество можно анализировать подходящими спектроскопическими или аналитическими методами, такими как SSNMR, DSC, PXRD и т.п., для того, чтобы убедиться в образовании предпочтительной кристаллической формы продукта. Полученная кристаллическая форма обычно получается с выходом более примерно 70 вес.%, предпочтительно более 90 вес.% в расчете на вес N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания или соли, первоначально использованных при осуществлении кристаллизации. Полученный продукт может быть размолот или пропущен через сито для того, чтобы измельчить комки, если это необходимо.

Кристаллические формы могут быть получены непосредственно из реакционной среды, образовавшейся на последней стадии процесса получения N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания или соли. Это может быть достигнуто, например, при применении на последней стадии процесса получения растворителя или смеси растворителей, из которых может кристаллизоваться это соединение. Или же кристаллические формы можно получить методами перегонки или добавления растворителя. Подходящие растворители для этой цели включают любой из растворителей, описанных в данном изобретении, включая протонные полярные растворители, такие как спирты, и апротонные полярные растворители, такие как кетоны.

Как это общеизвестно, реакционная смесь может быть отфильтрована для удаления любых нежелательных примесей, неорганических солей и т.п. с последующей промывкой растворителем, применяемым при проведении реакции или кристаллизации. Полученный раствор можно концентрировать для удаления избытка растворителя или газообразных компонентов. Если используется перегонка, конечное количество собранного дистиллята может меняться в зависимости от параметров процесса, включая, например, размер сосуда перемешивания и т.п. Общеизвестно, что реакционный раствор можно перегнать до получения примерно 1/10 первоначального объема до проведения замещения растворителя. Можно отбирать образцы реакционной смеси и анализировать их для определения степени завершения реакции и выхода продукта в вес.% в соответствии со стандартными методами. Если желательно, можно добавить дополнительное количество растворителя или удалить его для оптимизации концентрации реакционной смеси. Предпочтительно конечную концентрацию регулируют таким образом, чтобы она составляла примерно 50 вес.%, когда обычно образуется суспензия.

Может быть предпочтительным добавлять растворители непосредственно в реакционный сосуд без отгонки реакционной смеси. Для этой цели предпочтительны растворители, которые могут участвовать в образовании кристаллической решетки, как это обсуждалось выше в связи с замещением растворителя.

Хотя конечная концентрация может меняться в зависимости от желаемых чистоты, выхода и т.п., предпочтительно, чтобы конечная концентрация свободного основания в растворе составляла примерно от 4 до 7%. Реакционную смесь после добавления растворителя можно перемешивать и одновременно нагревать. Например, реакционную смесь можно перемешивать в течение примерно 1 ч при нагревании до примерно 70°C. Реакционную смесь предпочтительно фильтровать в горячем виде и промывать или растворителем, используемым при проведении реакции, добавленным растворителем или комбинацией этих растворителей. Затравочные кристаллы можно добавлять в любой раствор для кристаллизации для иницирования кристаллизации.

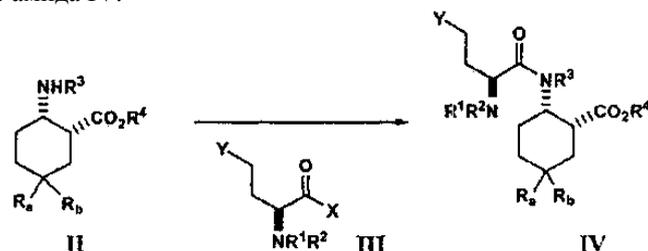
Различные формы, описанные в данном изобретении, можно отличить друг от друга при использовании различных аналитических методов, которые известны специалисту в данной области. Такие методы включают, но без ограничения, рентгеновскую порошковую дифракцию (PXRD), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) и/или термогравиметрический анализ (TGA). Или же эти формы могут характеризоваться и различаться при использовании рентгеновской дифракции единичного кристалла, которая основана на измерении параметров элементарной ячейки единичного кристалла при фиксированной температуре опыта. Подробное описание элементарных ячеек приведено в книге Stout & Jensen, X-Ray Structure Determination: A Practical Guide, Macmillan Co., New York (1968), Chapter 3, которая включена в данный патент в качестве ссылки. Конкретно уникальное расположение атомов в пространстве кристаллической решетки может быть охарактеризовано фракционными атомными координатами. Другим средством характеристики кристаллической структуры является порошковая рентгеновская дифракция, когда экспериментальный или наблюдаемый профиль дифракции сравнивается с имитированным профилем, характеризующим чистый порошковый материал. Параметры порошковой рентгеновской дифрактограммы для формы по изобретению приводятся в виде ряда величин 2θ (обычно четыре или более).

Можно также использовать другие средства характеристики формы, такие как ядерно-магнитный резонанс в твердом состоянии (SSNMR), дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC), термография и подробное изучение кристаллической или аморфной морфологии. Эти параметры можно также использовать для характеристики формы по изобретению в комбинации.

Специалисту в данной области известно, что параметры рентгеновской дифрактограммы могут получаться с ошибкой измерения, которая зависит от применяемых условий измерения. В частности, известно, что интенсивности на рентгеновской дифрактограмме могут колебаться в зависимости от применяемых условий измерения и формы или морфологии кристалла. Далее, понятно, что величины относительной интенсивности также могут зависеть от условий опыта и соответственно точная величина интенсивности не должна приниматься во внимание. Кроме того, ошибка измерения угла дифракции для обычной рентгеновской дифрактограммы обычно составляет примерно $0,2^\circ$ от величины 2θ или менее, предпочтительно примерно $0,1^\circ$ 2θ (как будет обсуждено ниже), и такая ошибка измерения должна приниматься во внимание при рассмотрении упомянутых выше углов дифракции. Далее, следует иметь в виду, что кристаллические формы по настоящему изобретению не ограничиваются кристаллическими формами, которые характеризуются рентгеновскими дифрактограммами, полностью идентичными рентгенограммам, изображенным на прилагаемых фигурах. Любая кристаллическая форма, которая характеризуется рентгеновской дифрактограммой, практически идентичной изображенным на прилагаемых фигурах, входит в объем данного изобретения. Специалист в данной области способен установить практическую идентичность рентгеновских дифрактограмм.

Синтез

Схема 1. Получение амида IV.



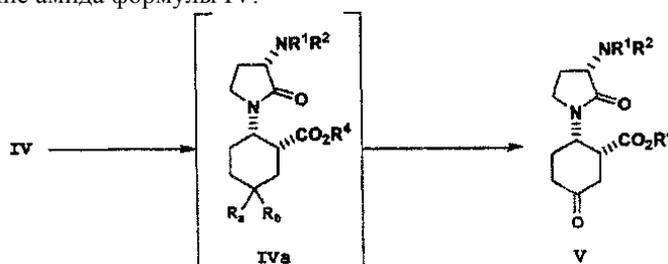
β -аминоэфир формулы II или его соль, включая толуолсульфонат или гидробромидную соль, сочетается с защищенной хиральной α -аминокислотой формулы III с получением амида IV по известной методике. См., например, получение этого соединения в WO 2005/021500. Реакцию сочетания можно осуществлять с диимидным реагентом в присутствии активатора и третичного амина в инертной атмосфере, такой как азот или аргон (предпочтительно азот) в среде апротонного растворителя, такого как пропонирил, изопропилацетат, н-бутилацетат, трет-бутилацетат, ацетонитрил (особенно или ацетонитрил, и/или этилацетат). Диимидный реагент сочетания включает, например, такие реагенты, как EDAC. Примеры активаторов включают 1-гидроксисбензотриазол (HOBT; этот термин охватывает также его гидраты) и N',N'-4-диметиламинопиридин. Основание, третичный амин, включает, например, триэтиламин, N,N-

диизопропил-N-этиламин и три-n-пропиламин. Мольное отношение аминоксифира формулы II к диимидному реагенту сочетания, к активатору и к третичному амину составляет примерно 0,90-1,50 к примерно 0,95-1,50 к примерно 2,00 и к 3,00 соответственно. Указанное мольное соотношение предпочтительно равно 1 к примерно 0,95-1,05 к примерно 0,95-1,10 и к примерно 2,10-2,30 соответственно.

β -аминоксифир выбирают таким образом, чтобы R_a и R_b обозначали алкокси или алкилтиолятные группы или вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образовывали карбонил или образовывали циклический или ациклический ацеталь, предпочтительно 1,3-диоксолан. R^4 обозначает C_{1-6} алкил, предпочтительно этил.

Хиральная аминокислота формулы III привносит способный к функционализации концевой остаток Y, который представляет собой или может превращаться в алкилирующую группу, пригодную для дальнейшей циклизации периферического атома углерода в боковой цепи, к которому присоединен остаток Y, у атома азота амида. Соответственно Y может быть выбран из таких групп, как галоид, SMe или OSO_2R^{12} , где R^{12} обозначает C_{1-6} алкил, $-(CH_2)C(O)OR^{13}$ или $-(CH_2)C(O)R^{13}$ и R^{13} везде обозначает C_{1-6} алкил. X обозначает OH, галоген или $OCOR^{14}$, где R^{14} обозначает C_{1-6} алкил. Подходящие защитные группы R^1 и R^2 для хиральной аминокислоты формулы III, независимо, выбирают из групп для защиты водорода или аминогруппы, которые могут быть удалены путем гидролиза или гидрогенолиза в обычных условиях. Такие группы без ограничения включают карбобензилоксигруппу (Cbz), трет-бутилоксикарбонил (BOC), флуоренилметилоксикарбонил (FMOC), бензильную (Bn) группу или п-метоксибензильную (PMB) группу. Предпочтительными группами являются Cbz, BOC или Bn. Наиболее предпочтительна группа Cbz.

Схема 2. Получение амида формулы IV.



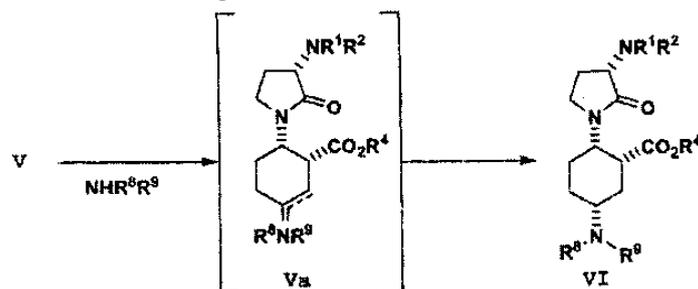
Соединение формулы V получают циклизацией алкилирующей группы Y у атома азота амида с образованием пирролидинового кольца, когда при таком превращении Y действует как удаляемая группа.

Согласно предпочтительному варианту изобретения алкилирующая группа представляет собой сульфониевую соль ($Y=S^+(Me)R^{13}$, где R^{13} обозначает C_{1-6} алкил, бензил или замещенный бензил, при этом предпочтительным является метил), полученную активацией производного метионина, амида IV ($Y=SMe$) с применением сероалкилирующих агентов, хорошо известных из уровня техники, например C_{1-6} алкилгалогенида или бензилгалогенида, предпочтительно метилиодида. См., например, Fredinger et al., J. Org. Chem., 1982, 47, 10.

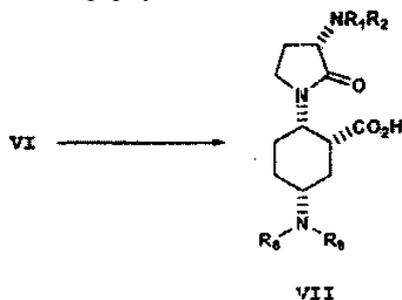
Циклизацию проводят в инертной атмосфере, такой как азот или аргон (предпочтительно азот), в растворителе путем контактирования соединения IV или его соли с основанием в присутствии апротонного растворителя. Такие основания могут представлять собой, без ограничения, карбонат цезия, бикарбонат цезия, карбонат калия, трет-бутилат натрия или гексаметилдисилазид натрия, особенно карбонат цезия. Апротонные растворители включают, без ограничения, например, DMSO, DMF, DMA, N-метилпирролидинон (NMP) и сульфолан, предпочтительно DMSO и/или DMF. Когда R_a и R_b , независимо, обозначают C_{1-6} алкокси или вместе с атомом, к которому они присоединены, объединяются с образованием циклического или ациклического ацетала или тиацетала, ацетальные группы удаляют путем снятия защиты методами, известными из уровня техники, с образованием карбонильного соединения. В случае ацеталей снятие защиты можно осуществить путем гидролиза, предпочтительно проводимого в среде растворителя, такого как ацетон, бутанон, ацетонитрил и изопропанол, или их водных растворов, предпочтительно проводить этот процесс в среде водного ацетона.

Когда такое снятие защиты осуществляют в ацеталах, требуется наличие протонных кислот, например серной кислоты, толуолсульфокислоты, азотной кислоты, метансульфокислоты, бромистоводородной кислоты, соляной кислоты, при этом предпочтительной является соляная кислота.

Схема 3. Восстановительное аминирование соединения V.

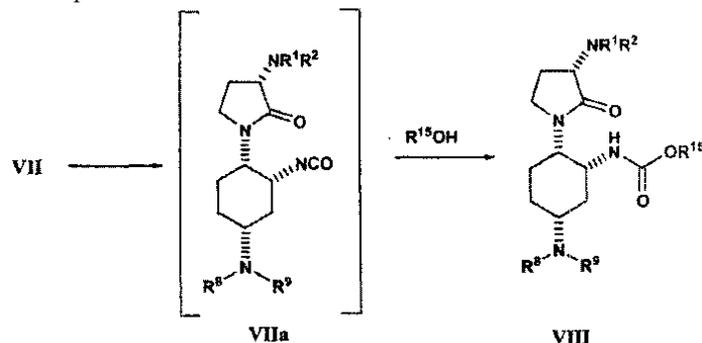


Соединение VI получают восстановительным аминированием соединения формулы V в две стадии путем: (а) добавления амина, N-H(R⁸)(R⁹) и дегидратирующего агента к раствору соединения формулы V в апротонном растворителе и смешения при температуре от -20 до 50°C с образованием ими́на/енамина формулы Va и (б) обработки раствора ими́на/енамина формулы Va платиновым катализатором, предпочтительно содержащим дезактиватор, такой как сера, предпочтительно 5% Pt/C/S при давлении газообразного водорода. Заместители в амине, R⁸ и R⁹, независимо, выбираются из водорода и C₁₋₆алкила. Амин N-H(R⁸)(R⁹) предпочтительно представляет собой N-метил-N-изопропиламин. Дегидратирующим агентом является кислота Льюиса/промотор дегидратации кислота Бренстеда, который включает, без ограничения, реагенты на основе титана, предпочтительно тетрагидрид титана или тетраизопророксид титана или их смесь (особенно тетраизопророксид титана). См. R. Mattson et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 2552-2554. Апротонный растворитель может быть выбран, без ограничения, из таких растворителей, как дихлорэтан, дихлорметан, ацетонитрил, DMSO, DMF и N-метилпирролидинон (предпочтительно дихлорметан). Предпочтительно обрабатывать раствор промежуточного ими́но/енамина формулы Va в дихлорметане газообразным водородом под давлением 15-35 ф/кв.дюйм и в присутствии 5% Pt/C/S в количестве примерно от 0,5 до 50% (вес./вес.) по отношению к соединению V. Наиболее предпочтительно использовать в количестве 5-10% (вес./вес.).

Схема 4. Получение γ -аминокислоты формулы VII или ее соли.

Сложный эфир соединения формулы VI гидролизуется с получением соответствующей кислоты формулы VII или ее соли. Гидролиз может быть щелочным и проводится известными методами или, альтернативно, его можно осуществлять в присутствии водных кислот при повышенных температурах с получением соответствующей γ -аминокислоты формулы VII. Наиболее предпочтительным является кислотный гидролиз. Температура составляет от примерно 40 до примерно 100°C (наиболее предпочтителен температурный интервал от примерно 50 до примерно 70°C). Кислоты выбирают, без ограничения, из серной кислоты, толуолсульфокислоты, азотной кислоты, метансульфокислоты, бромисто-водородной кислоты или соляной кислоты. Наиболее предпочтительной является соляная кислота. Соединения формулы VII могут быть превращены в их карбоксилатные соли. Предпочтительно соединение VII превращать в его натриевую соль.

Схема 5. Получение карбамата VIII.

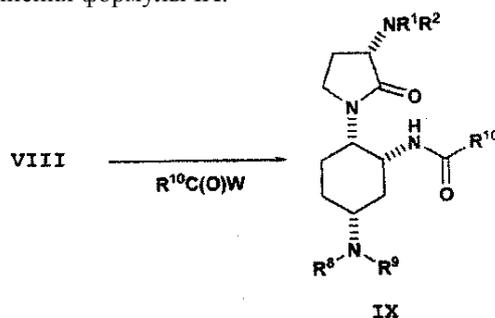


Карбаматы формулы VIII получают превращением γ -аминокислоты формулы VII в изоцианат фор-

мулы VIIa и реакцией изоцианата со спиртом формулы $R^{15}OH$ с получением карбамата формулы VIII. Радикал R^{15} выбирают таким образом, что карбамат образует группу, защищающую аминогруппу, которая удаляется в обычных условиях гидролиза или гидрогенолиза. Такими группами, защищающими аминогруппы, предпочтительно являются N-CO₂-трет-бутил (R^{15} =трет-бутил) или N-CO₂-бензил (R^{15} =бензил) или N-CO₂-замещенный бензил (R^{15} =замещенный бензил). Предпочтительным спиртом является трет-бутиловый спирт.

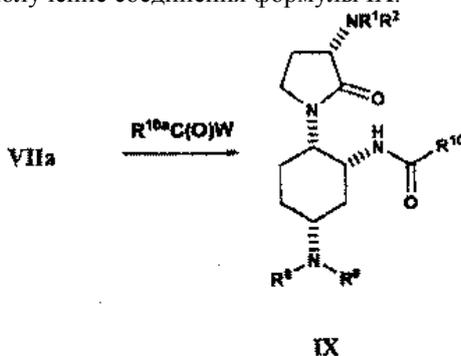
Превращения соединения формулы VII в изоцианат формулы VIIa можно осуществлять по одному из нескольких методов, а именно путем перегруппировки Курциуса, Хофманна или Шмидта-Лоссена. Предпочтительно осуществлять перегруппировку Курциуса при контактировании γ -аминокислоты VII (или ее соли) с дифенилфосфорилазидом в спиртовом растворителе (предпочтительно в трет-бутиловом спирте), предпочтительно, без ограничения, содержащем толуол и другие подходящие непротонные растворители при температуре выше температуры запуска термической перегруппировки с получением изоцианата (предпочтительно при температуре 50°C или выше).

Схема 6. Получение соединения формулы IX.



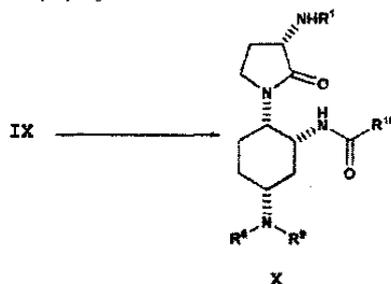
Соединения формулы IX получают путем снятия защиты карбаматной группы в соединении формулы VIII с последующим ацилированием свободного амина при помощи реагента формулы $R^{10}C(O)W$, где W обозначает галоген или $R^{10}C(O)$ с получением соединения формулы IX. Снятие защиты с карбаматной группы проводят общеизвестными методами (например, в случае R^{10} =трет-бутил, можно проводить кислотное снятие защиты с помощью серной кислоты, толуолсульфокислоты, азотной кислоты, метансульфокислоты, бромисто-водородной кислоты или соляной кислоты, наиболее предпочтительной является метансульфокислота). Затем добавляют основания (предпочтительно триэтиламин) и свободный амин обрабатывают соединением формулы $R^{10}C(O)W$, где W обозначает галоген или $R^{10}C(O)$ с получением соединения формулы IX.

Схема 7. Альтернативное получение соединения формулы IX.



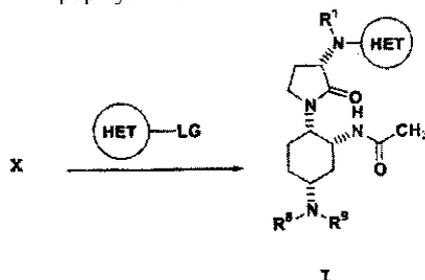
Альтернативное получение соединений формулы IX состоит из прямого ацилирования промежуточного изоцианата VIIa (см. приведенную выше схему 5) путем добавления *in situ* ацилирующего агента $R^{10a}C(O)W$, где W обозначает галоген или $R^{10a}C(O)$ в присутствии его соответствующей кислоты (W=водород). Предпочтительно проводить ацилирование при введении изоцианата в смесь уксусной кислоты и уксусного ангидрида (где R^{10a} обозначает метил и W обозначает водород) к изоцианату формулы VIIa с получением соединения формулы IX.

Схема 8. Получение соединений формулы X.



Группа R^2 в соединении формулы IX удаляется путем снятия защиты с получением соединения формулы X. Предпочтительно, если R^2 обозначает Cbz, осуществлять снятие защиты путем гидрирования в присутствии палладиевого катализатора, предпочтительно 10% Pd/C.

Схема 9. Получение соединений формулы I.



Соединения формулы I получают путем сочетания амина формулы X, который был подвергнут операции снятия защиты, с соединением формулы



с получением соединения формулы I.

Такие реакции сочетания и условия, при которых они проводятся, известны специалистам в данной области. HET представляет собой возможно замещенное 3-14-членное гетероциклическое или гетероарильное кольцо, содержащее один или более гетероатомов, выбранных из N, O или S (предпочтительно 1-3 гетероатома, особенно 1-2 атома азота). Предпочтительные гетероарильные группы включают, без ограничения, 6-замещенный хиназолин-4-ил, более предпочтительно 6-трифторметилхиназолин-4-ил. Удаляемые группы (LG), используемые в данной реакции, включают, без ограничения, такие группы, как галоген, C_{1-6} алкокси, мезилатная группа, нафтазные группы, сульфонатные группы, тозилатные группы и трифлатные группы. Предпочтительно LG представляет собой удаляемую группу, выбранную из галогена или OSO_2R^{16} , где R^{16} обозначает фенил, 5-7-членный гетероарил, содержащий один или более гетероатомов, выбранных из N, O или S, C_{1-6} алкил или 3-7-членный циклоалкил, все из которых могут быть замещены одной-тремя группами, выбранными из галогена, CF_3 и C_{1-6} алкила. Предпочтительной удаляемой группой является галоид, особенно хлор.

Для целей данного изобретения исходные материалы являются коммерчески доступными или могут быть легко получены специалистом в данной области. Такой специалист легко может сделать надлежащий выбор растворителей, величин температур, давления, исходных материалов желаемой группы и других условий реакции. Процесс может быть осуществлен в промышленном масштабе для того, чтобы получить большие количества соединения формулы I, например на промышленной установке.

Примеры

Следующие ниже примеры иллюстрируют варианты соединений по изобретению и исходных веществ и не ограничивают объем данного изобретения.

Реакции проводят в атмосфере сухого азота (или аргона). В случае реакций, проводимых в безводных условиях, применяли растворители Dri-Solv от EM. В случае других реакций использовали растворители для проведения реакций или растворители сорта HPLC. Если иное не указано, все коммерческие реагенты применяли как таковые.

LC/MS осуществляли на гибридной системе с квадрупольным масс-спектрометром Shimadzu HPLC/Waters ZQ.

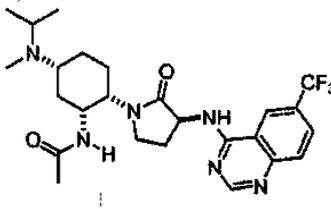
Интересующие данные о пиках получали с применением ионизации при электрораспылении положительного типа. Спектры NMR (ядерный магнитный резонанс) обычно получали на приборах Bruker или JEOL 400 МГц и 500 МГц с применением указанных растворителей. Все химические сдвиги приведены в м.д. (миллионные доли) относительно тетраметилсилана с растворителем в качестве внутреннего стандарта. Спектральные данные 1H -NMR обычно указываются следующим образом: химический сдвиг, мультиплетность (s=синглет, br.s=уширенный синглет, d=дублет, dd=дублет дублетов, t=триплет, q=квартет, sep=септет, m=мультиплет, app=кажущийся), константы взаимодействия (Hz) и интегрирование.

Стандартные сокращения, применяемые в примерах, известны специалистам в данной области. Так, эти сокращения включают, но без ограничения: sat=насыщенный, HPLC=высокоэффективная жидкостная хроматография, AP=площадь в %, KF=Карл-Фишер, RT=комнатная температура (если не указано иное, RT обозначает температуру около 22°C), HRMS=высокоэффективная масс-спектрометрия, TBTU=О-бензотриазол-2-ил-N,N,N',N'-тетраметилурия тетрафторборат, MTBE=TBME=трет-бутилметилэтер, EDAC=N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид гидрохлорид, EDC=N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид, TEA=триэтиламин, DPPA=дифенилфосфорилазид, IPA=изопропиловый спирт, TFA=трифторуксусная кислота, DCM=дихлорметан, THF=тетрагидрофуран, DME=N,N-диметилформамид, BOP=(бензотриазол-1-илокси)-трис-(диметиламино)фосфония гексафторфосфат, EtOAc=этилацетат, DMSO=диметилсульфоксид, °C=градусы Цельсия, экв.=эквивалент(ы), г (g)=грамм(ы), мг=миллиграмм(ы), мл=миллилитр(ы), ч=час(ы), М=моль, N=нормальный, мин=минута(ы), МГц=мегагерцы, tlc=тонкослойная хроматография, v/v=отношение объема к объему.

"α", "β", "R" и "S" указывают на стереохимию, эти обозначения известны специалистам.

Пример 1.

N-((1R,2S,5R)-5-(Изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)-хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид.



Пример 1, стадия 1.

(1R,2S,5R)-трет-бутил-2-бензилоксикарбониламино-7-оксо-6-азабицикло[3.2.1]октан-6-карбоксилат (89,6 г, 0,24 моль, см. Р.Н. Carter et al. заявка WO 2005/021500) растворяли в этилацетате (1,5 л) и полученный раствор промывали насыщенным NaHCO_3 (2×0,45 л) и насыщенным NaCl (1×0,45 л). Раствор высушивали (Na_2SO_4) и затем отфильтровывали сразу же в трехгорлую круглодонную колбу объемом 3 л. Раствор промывали путем введения азота и затем в атмосфере азота загружали 10% Pd/C (13,65 г). Колбу вакуумировали и заполняли водородом; эту процедуру повторяли еще два раза. Водород барботировали через раствор в течение 30 мин и затем реакционную смесь перемешивали под давлением 1 атм H_2 в течение 18 ч. Колбу вакуумировали, снова заполняли азотом и загружали свежий катализатор (6 г 10% Pd/C). Затем через раствор в течение 30 мин пропускали водород и затем реакционную смесь перемешивали под давлением 1 атм H_2 в течение 18 ч. Колбу вакуумировали, снова заполняли азотом. Смесь фильтровали через целит, остаток на фильтре промывали этилацетатом. Фильтрат (объем ~1,6 л EtOAc) разбавляли ацетонитрилом (0,3 л) и затем последовательно загружали L-N-Cbz-метионин (0,68 г, 0,24 моль), TBU (77 г, 0,24 моль) и N,N-диизопропилэтиламин (42 мл, 0,24 моль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, при этом она из суспензии превратилась в прозрачный раствор. Реакционную смесь резко охлаждали добавлением насыщенного NH_4Cl (0,75 л) и воды (0,15 л); смесь далее разбавляли EtOAc (0,75 л). Полученные фазы смешивали и разделяли, органическую фазу промывали насыщенным Na_2CO_3 (2×0,9 л) и насыщенным NaCl (1×0,75 л). Раствор сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением (1R,2S,5R)-трет-бутил-2-бензилоксикарбониламино-7-оксо-6-азабицикло[3.2.1]октан-6-карбоксилата в виде масла, которое применяли на следующей стадии без дальнейшей очистки.

LC-MS для основного пика: $[\text{M}-\text{Hoc}+\text{H}]^+=406,3$; $[\text{M}+\text{Na}]^+=528,3$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,36 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,2 (m, 1H), 4,0 (m, 1H), 2,5-2,7 (m, 3H), 2,25 (m, 1H), 2,11 (s, 3H), 2,05 (m, 4H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 2H), 1,54 (s, 9H).

Содержатся также EtOAc [1,26 (t), 2,03 (s), 4,12 (q)] и N,N,N,N-тетраметилмочевина [2,83 (s)].

Пример 1, стадия 2.

Образец (1R,2S,5R)-трет-бутил-2-бензилоксикарбониламино-7-оксо-6-азабицикло[3.2.1]октан-6-карбоксилата (предположительно 0,24 моль, см. предыдущую статью) растворяли в иодметане (1,250 г) и перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток растворяли в дихлорметане и концентрировали под вакуумом. Эту процедуру повторяли еще два раза. Полученный продукт растворяли в дихлорметане (0,4 л) и выливали в быстро перемешиваемый раствор MTBE (4,0 л). Полученный твердый продукт желтого цвета отфильтровывали и высушивали в условиях высокого вакуума с получением сульфониевой соли (179 г). Это вещество применяли на следующей стадии без дальнейшей очистки.

LC-MS для основного пика: $[\text{M}-\text{Me}_2\text{S}+\text{H}]^+=458,4$; $[\text{M}]^+=520,4$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 4,33 (m, 1H), 4,28 (m, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,3-3,45 (m, 2H), 2,97 (s, 3H), 2,94 (s, 3H), 2,78 (m, 1H), 2,0-2,3 (m, 4H), 1,7 (m, 2H), 1,52 (s, 9H).

Содержатся также MTBE [1,18 (s), 3,2 (s)] и следы N,N,N,N-тетраметилмочевины [2,81 (s)].

Пример 1, стадия 3.

Все количество сульфониевой соли, полученной на предыдущей стадии (0,24 моль), растворяли в DMSO (2,0 л). Полученный раствор перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре и добавляли по частям карбонат цезия (216 г). Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч и затем отфильтровывали для удаления твердых веществ. Раствор разделяли на порции объемом ~0,22 л и обрабатывали следующим образом: реакционную смесь (~0,22 л) разбавляли этилацетатом (1,5 л) и промывали последовательно водой (3×0,5 л) и рассолом (1×0,3 л). Органическую фазу высушивали (Na_2SO_4), отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Желательный (1R,2S,5R)-трет-бутил-2-(S)-3-(бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил)-7-оксо-6-азабицикло[3.2.1]октан-6-карбоксилат (90,8 г, 83%) получали в виде микрокристаллической пены, не содержащей примеси тетраметилмочевины.

LC-MS для основного пика: $[\text{M}-\text{Hoc}+\text{H}]^+=358,4$; $[\text{M}+\text{Na}]^+=480,4$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,2 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,3 (m, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,28-2,42 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 1,7-2,0 (m, 5H), 1,55 (s, 9H).

Если желательно, этот продукт может быть выделен в виде твердого вещества при растворении в МТВЕ (1 об.), добавлении к гептану (3,3 об.) и сборе полученного осадка.

Пример 1, стадия 4.

К раствору (1R,2S,5R)-трет-бутил-2-(S)-3-(бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил)-7-оксо-6-азабицикло[3.2.1]октан-6-карбоксилата (108 г, 0,236 моль) в THF (1 л) добавляли моногидрат гидрокси лития (21,74 г, 0,519 моль). Затем медленно добавляли воду (0,3 л) так, чтобы температура не превышала 20°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и удаляли под вакуумом летучие. pH довели до величины ~4 добавлением 1N HCl (450 мл) и NaH_2PO_4 . Полученный белый осадок собирали путем фильтрования и промывали водой (2×1 л). Твердый продукт растворяли в дихлорметане (1,5 л) и воде (~1 л). Органический слой высушивали (Na_2SO_4), отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Остаток растворяли в EtOAc (0,7 л) и полученный раствор нагревали 1 ч с обратным холодильником. После охлаждения до RT отделяли твердые вещества и отфильтровывали их. Этот твердый продукт очищали методом перекристаллизации в изопропанол, получая (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексанкарбоновую кислоту в виде белого вещества (104,5 г, 93%).

LC-MS для основного пика: $[\text{M}-\text{tBu}+\text{H}]^+=420,2$; $[\text{M}-\text{Hoc}+\text{H}]^+=376,2$; $[\text{M}+\text{H}]^+=476,2$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 2H), 3,71 (m, 1H), 3,45-3,6 (m, 2H), 2,99 (m, 1H), 2,14 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,6-1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

Пример 1, стадия 5.

В круглодонную колбу объемом 3 л загружали (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексанкарбоновую кислоту (75,5 г, 0,158 моль), EDC-HCl (33,5 г, 0,175 моль), 1-гидроксибензотриазол (23,6 г, 0,175 моль) и дихлорметан (1 л). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, при этом она превращалась из суспензии белого цвета в прозрачный раствор. Через раствор пропускали аммиак (газ) до достижения сильнощелочного (на бумаге) pH, реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин; добавление аммиака повторяли и реакционную смесь перемешивали еще 10 мин. Затем добавляли воду. Органическую фазу промывали насыщенным NaHCO_3 , NaH_2PO_4 и рассолом перед концентрацией под вакуумом. Остаток обрабатывали ацетонитрилом (0,5 л) и затем концентрировали с получением (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексанкарбоксамид в виде белого продукта (75,9 г, ~100%), который применяли на следующей стадии без дальнейшей очистки.

LC-MS для основного пика: $[\text{M}-\text{Hoc}+\text{H}]^+=375,3$; $[\text{M}+\text{H}]^+=475,4$; $[\text{M}-\text{tBu}+\text{H}]^+=419,3$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_4 -MeOH): δ 7,35 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,25 (m, 2H), 3,70 (m, 1H), 3,6 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 2,91 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,9-2,05 (m, 2H), 1,65-1,9 (m, 4H), 1,46 (s, 9H).

Пример 1, стадия 6.

Реакцию проводили для трех равных порций и реакционные смеси соединяли для обработки водой. В трехгорлую круглодонную колбу объемом 5 л загружали (1R,2S,5R)-2-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(трет-бутоксикарбониламино)циклогексанкарбоксамид (25,3 г, 53 ммоль), ацетонитрил (1,9 л) и 2,6 л смеси вода/лед. Смесь перемешивали и охлаждали до 0°C. Добавляли диацетат йодбензола (25,77 г, 80 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 2 ч; добавляли еще 0,5 экв. диацетата йодбензола. Смесь перемешивали в течение 9 ч (температура реакции <10°C). Затем в смесь добавляли 8 экв. N,N-диизопропилэтиламина и 2 экв. уксусного ангидрида. В течение следующих 30 мин каждые 10 мин добавляли 4 экв. N,N-диизопропилэтиламина и 2 экв. уксусного ангидрида до тех пор, пока не завершится реакция (HPLC). Ацетонитрил удаляли под вакуумом, выделяли из осадка некоторое количество твердого вещества и отфильтровывали. Остаток экстрагировали дихлорметаном (3 л, затем 1 л). Органическую фазу промывали последовательно водой, насыщенным NaHCO_3 и рассолом. Собранный твердый продукт добавляли к органической фазе вместе с активирован-

ным углем (15 г). Смесь перемешивали в течение 30 мин при температуре 40°C, затем отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Остаток растворяли в EtOAc (1 л) и полученный раствор перемешивали при температуре 75°C в течение 1 ч, затем давали ему охладиться до комнатной температуры. Отделяли твердый продукт путем фильтрации. Затем этот продукт очищали путем перекристаллизации: сначала его растворяли в 0,5 л CH₂Cl₂, затем концентрировали под вакуумом и перекристаллизовывали из 1 л EtOAc; эту процедуру повторяли три раза. Твердый продукт, полученный из маточника, перекристаллизовывали три раза, применяя тот же метод. Объединенные твердые продукты дважды перекристаллизовывали из ацетонитрила (0,7 л) с получением 66 г (84%) трет-бутил-(1R,3R,4S)-3-ацетиамидо-4-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)циклогексилкарбамата (степень чистоты >99,5%, HPLC).

LC-MS для основного пика: [M+H]⁺=489,4; [M-tBu+H]⁺=433,3.

¹H-MNR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3-7,4 (m, 5H), 5,11 (s, 2H), 4,35 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,8 (m, 1H), 3,6 (m, 2H), 2,44 (m, 1H), 2,12 (m, 1H), 1,87-2,05 (m, 4H), 1,87 (s, 3H), 1,55-1,7 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

Стереохимическая достоверность перегруппировки Хофмана (Hofmann) была подтверждена рентгеноструктурным анализом структуры кристаллов этого соединения, что показано на фиг. 1.

Пример 1, стадия 7.

К перемешиваемому раствору трет-бутил-(1R,3R,4S)-3-ацетиамидо-4-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)циклогексилкарбамата (66 г, 0,135 моль) в дихлорметане (216 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (216 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре и концентрировали под вакуумом. Остаток растворяли в метаноле и полученный раствор концентрировали под вакуумом; это повторяли один раз. Получали бензил-(S)-1-((1S,2R,4R)-2-ацетиамидо-4-аминоциклогексил)-2-оксопирролидин-3-илкарбамат в виде масла и использовали его непосредственно на стадии 8 ниже.

LC-MS: найдено [M+H]⁺=389,4.

¹H-MNR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3-7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,41 (br.s, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,00 (t, J=9,3 Hz, 1H), 3,81 (t, J=9,1 Hz, 1H), 3,65 (q, J=8,4 Hz, 1H), 3,3-3,4 (m, 1H), 2,45 (m, 1H), 1,95-2,24 (m, 5H), 2,00 (s, 3H), 1,6-1,8 (m, 2H).

Пример 1, стадия 8.

К перемешиваемому раствору бензил-(S)-1-((1S,2R,4R)-2-ацетиамидо-4-аминоциклогексил)-2-оксопирролидин-3-илкарбамата (~0,135 моль) в метаноле (675 мл) последовательно добавляли ацетон (37,8 г, 4 экв.), ацетат натрия (33,2 г, 3 экв.) и цианборгидрид натрия (16,9 г, 2 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч и отфильтровывали. Фильтрат растворяли в дихлорметане (1 л); этот раствор промывали 1N NaOH (1 л). Твердый продукт отфильтровывали и растворяли в 1N NaOH (1 л) при температуре 0°C и затем экстрагировали дихлорметаном (1 л). Органические экстракты соединяли и обрабатывали водной HCl (200 мл 1N HCl+800 мл воды). Водную фазу подщелачивали насыщенным NaHCO₃ (500 мл) и затем 1N NaOH (100 мл) до pH, равного 11. Водную фазу экстрагировали дихлорметаном (2 л). Органические экстракты соединяли, высушивали (Na₂SO₄), отфильтровывали и концентрировали под вакуумом, получая бензил-(S)-1-((1S,2R,4R)-2-ацетиамидо-4-(изопропиламино)циклогексил)-2-оксопирролидин-3-илкарбамат в виде масла. LC-MS показали: [M+H]⁺=431,45.

¹H-MNR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3-7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,31 (m, 1H), 4,24 (t, J=9,4 Hz, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,61 (t, J=9,1 Hz, 1H), 3,52 (q, J=8,6 Hz, 1H), 3,04 (br.s, 1H), 2,96 (sep, J=6,3 Hz, 1H), 2,40 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,92 (s, 3H), 1,7-1,9 (m, 5H), 1,65 (m, 1H), 1,12 (app. dd, J=6,3, 1,1 Hz, 6H).

Пример 1, стадия 9 (см. альтернативную стадию 9 ниже).

Перемешиваемый раствор бензил-(S)-1-((1S,2R,4R)-2-ацетиамидо-4-(изопропиламино)циклогексил)-2-оксопирролидин-3-илкарбамата (~115 мл) в дихлорметане (600 мл) охлаждали до температуры 0°C и последовательно добавляли к нему формальдегид (18,6 г, 37 вес.% раствор), триэтиламин (23 мл) и триацетоксиборгидрид (28,7 г). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин и разбавляли дихлорметаном (до объема, равного 1,2 л). Этот раствор трижды промывали 500 мл насыщенного NaHCO₃+NaOH (насыщ. NaHCO₃ pH 11/1N NaOH). Органический слой экстрагировали водной HCl (200 мл 1N HCl+600 мл воды). Водную фазу подщелачивали насыщенным NaHCO₃ (500 мл) и затем 1N HCl (100 мл) до pH 11. Водную фазу экстрагировали дихлорметаном (1,2 л). Органические экстракты соединяли, высушивали (Na₂SO₄), отфильтровывали и концентрировали под вакуумом, получая бензил-(S)-1-((1S,2R,4R)-2-ацетиамидо-4-(изопропил(метил)амино)циклогексил)-2-оксопирролидин-3-илкарбамат в виде масла, который применяли непосредственно на стадии 10 ниже.

Данные LC/MS показали: [M+H]⁺=445,4.

¹H-MNR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 7,3-7,4 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 4,33 (br.s, 1H), 4,25 (t, J=9,2 Hz, 1H), 4,11 (br.s, 1H), 3,5-3,6 (m, 2H), 2,77 (v br.s, 2H), 2,41 (m, 1H), 2,26 (s, 3H), 2,0-2,1 (m, 2H), 1,92 (s, 3H), 1,7-1,9 (m, 5H), 1,10 (app. dd, J=17, 6,4 Hz, 6H).

Пример 1, стадия 10.

К раствору бензил-(S)-1-((1S,2R,4R)-2-ацетиамидо-4-(изопропил(метил)амино)циклогексил)-2-

оксопирролидин-3-илкарбамата (~0,115 моль) в метаноле (600 мл) добавляли 10% Pd/C (6 г 50%-ного влажного катализатора).

Колбу вакуумировали и заполняли водородом. Смесь перемешивали под давлением, равным 1 атм H₂, в течение 2 ч и удаляли катализатор путем фильтрования через целит. Фильтрат концентрировали под вакуумом, получая N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-амино-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(изопропил(метил)-амино)циклогексил)ацетамид в виде масла, которое применяли на следующей стадии без дальнейшей очистки.

Данные LC/MS показали: [M+H]⁺=311,47.

¹H-MNR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 4,39 (br. s, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,3-3,6 (m, 4H), 2,73 (m, 1H), 2,38 (m, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,0-2,2 (m, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,6-1,75 (m, 4H), 1,07 (app. dd, J=21, 6,4 Hz, 6H).

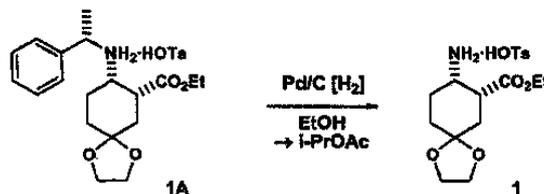
Пример 1, стадия 11.

К раствору N-((1R,2S,5R)-2-((S)-3-амино-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(изопропил(метил)амино)-циклогексил)ацетамида (~35 г, 0,115 моль) в изопропанол (600 мл) добавляли 4-хлор-6-(трифторметил)хиназолин (32 г, 0,138 моль, 1,1 экв., см. P.H. Carter et al. заявка WO 2005/021500). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи перед добавлением триэтиламина (46 г, 0,46 моль, 4 экв.). Реакционную смесь затем перемешивали при температуре 60°C в течение 10 ч. Удаляли растворитель при пониженном давлении и получали масло. Дважды проводили азеотропную перегонку с изопропанолом. Остаток растворяли в дихлорметане (600 мл) и экстрагировали водой (250 мл, содержит 4 экв. уксусной кислоты). К объединенным водным фазам при перемешивании добавляли дихлорметан (600 мл) и охлаждали смесь до 0°C. При перемешивании добавляли водную NaOH (50 вес.%) до достижения pH, равного 11. Водный слой экстрагировали дихлорметаном два раза (2×600 мл). Соединенные органические экстракты высушивали (Na₂SO₄), отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением аморфного свободного основания целевого соединения (степень чистоты 99% по данным HPLC).

Данные LC/MS показали: [M+H]⁺=507,3.

¹H-MNR (400 MHz, d₄-MeOH): δ 8,82 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,05 (dd, J=8,8, 1,8 Hz, 1H), 7,9 (d, J=8,7 Hz, 1H), 5,28 (t, J=8,6 Hz, 1H), 4,58 (br. s, 1H), 4,06 (m, 1H), 3,52-3,68 (m, 2H), 3,43 (m, 1H), 2,76 (br. s., 1H), 2,55 (m, 1H), 2,28 (s, 3H), 2,1-2,3 (m, 3H), 2,0 (s, 3H), 2,0 (m, 1H), 1,65-1,8 (m, 3H), 1,09 (app. dd, J=24, 6,4 Hz, 6H).

Пример 1, альтернативная стадия 9.

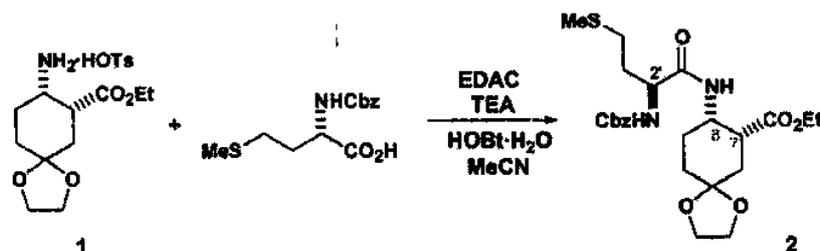


Пример 1, альтернативная стадия 9a¹.

В гидrogenатор загружали этил-(7R,8S)-8-((S)-1-фенилэтиламино)-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-7-карбоксилат-4-толуолсульфонат 1A (1417 г, 2,8 моль, см. WO 2004/098516, полученный по патенту США № 6835841), этанол (крепость 200, 11,4 л) и 10% катализатора Pd/C (влажность 50%, 284 г). Смесь обрабатывали азотом, затем под давлением подавали водород (45 ф/дюйм², 310,26 кПа) и энергично перемешивали смесь при примерно 40°C до тех пор, пока не исчерпается исходный материал (HPLC). Суспензию охлаждали, промывали газообразным азотом и удаляли катализатор путем фильтрации в инертной атмосфере. Израсходованный катализатор промывали этанолом (4,3 л). Фильтрат и промывочные воды объединяли и концентрировали под вакуумом до объема, равного 2-3 л, поддерживая температуру между 40 и 60°C. Добавляли изопропилацетат (5 л) и концентрировали смесь до объема ~2 л, когда большая часть этанола удалась (<0,5%) и остаточное содержание влаги не стало равным <1000 м.д. Доводили объем смеси до ~7,5 л, добавляя изопропилацетат. Смесь нагревали до 80°C, пока она не станет прозрачной, и затем охлаждали до 65-70°C. Добавляли затравочные кристаллы соединения 1 (5 г) и охлаждали смесь до 50°C в течение 2 ч, затем охлаждали далее до 20°C в течение 4 ч и выдерживали ~10 ч. Полученную суспензию отфильтровывали и осадок промывали изопропилацетатом (2 л). Полученный продукт сушили под вакуумом при температуре ~35°C до содержания летучих менее ~1% (LOD). Соль этил-(7R,8S)-8-амино-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-7-карбоксилат-4-толуолсульфонат 1 получали в виде кристаллов белого цвета (936 г, выход 83%, степень чистоты 99,8% по данным HPLC).

¹H-MNR (300 MHz, CDCl₃): δ 8,14-7,89 (br. s, 3H), 7,75 (d, J=9,0 Hz, 2H), 7,15 (d, J=8,0 Hz, 2H), 4,22-4,04 (m, 2H), 4,01-3,77 (m, 4H), 3,55-3,43 (m, 1H), 3,20-3,13 (m, 1H), 2,40-2,27 (m, 4H), 2,21-1,94 (m, 2H), 1,81-1,51 (m, 3H), 1,23 (t, J=7,0 Hz, 3H).

HPLC: колонка Waters Xterra MS C18, 4,6 мм×150 мм (вн. диам.), размер частиц 3,5 мкм, 0,05% NH₄OH (5% ACN, 95% H₂O, растворитель A) до 0,05% NH₄OH (95% ACN, 5% H₂O, растворитель B), 5% B до 20% B в течение 10 мин, затем 95% B в течение 25 мин, затем 5% B в течение 1 мин; 11,1 мин (аминоэфир 1).

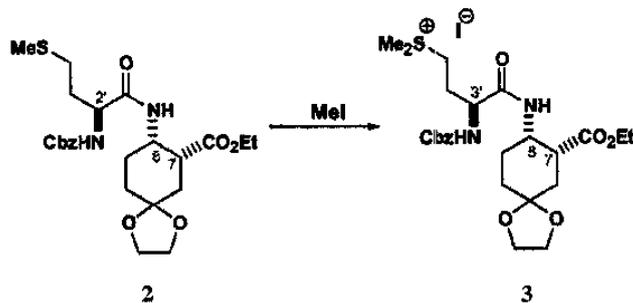


Пример 1, альтернативная стадия 9aⁱⁱ.

Аминоэфир 1 (63 г, 0,16 М, 1 экв.) продукт восстановительного снятия защиты известного соединения; см., например, R.J. Cherney, WO 2004/098516 и G.V. Delucca and S.S. Ko, WO 2004/110993) помещали в круглодонную колбу и добавляли MeCN (500 мл). Затем добавляли EDAC (33,1 г, 0,17 М, 1,1 экв.), HOBT-H₂O (21,2 г, 0,16 М, 1,0 экв.) и N-Cbz-L-литоинин (46,7 г, 0,17 М, 1,05 экв.) и затем TEA (48,0 мл, 0,35 М, 2,2 экв.). Наблюдалась экзотерма до 38°C. Реакционную массу перемешивали при RT. Через 30 мин HPLC показала полную конверсию исходного продукта. Реакционную массу разбавляли EtOAc (2,5 л) и промывали KHCO₃ (4×500 мл, 20 вес.%-ный водный раствор) и рассолом (500 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над MgSO₄ и концентрировали. Остаток растворяли в ТВМЕ и вновь концентрировали, получая этил-(7R,8S)-8-[(2S)-2-бензилоксикарбониламино-4-метилсульфанилбутирил-амино]-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-7-карбоксилат 2 в виде липкого полутвердого продукта (76,2 г, выход 98%, степень чистоты 93 AP).

¹H-MNR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,36-7,30 (m, 5H), 7,03 (d, J=9,0 Hz, 1H), 5,66 (d, J=8,0 Hz, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,35-4,25 (m, 2H), 4,19-4,04 (m, 2H), 3,98-3,86 (m, 4H), 2,87-2,80 (m, 1H), 2,55-2,45 (m, 2H), 2,18 (dd, J=14,0 Hz, 7,0 Hz, 1H), 2,08 (s, 3H), 2,05-1,67 (m, 6H), 1,26 (t, J=7,0 Hz, 3H).

HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 мкм, 4,6×150 мм, 0,05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O) до 0,05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), градиент 0-100% 10 мин, 10,01 мин (соединение 2, 93.1 AP). HRMS: m/z 495,2166 (рассчитано C₂₄H₃₅N₂O₇S 495,2165).



Пример 1, альтернативная стадия 9b.

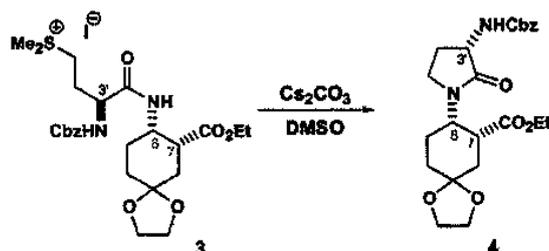
Амид метионина 2 (75,0 г, 0,15 М) растворяли в MeI (225 мл, 3 мл/г), было замечено выделение некоторого количества газа, но без экзотермы. Реакционную массу оставляли при перемешивании в темноте в течение 16,5 ч. Через 16,5 ч образовался толстый слой светло-желтого осадка. Затем колбу вакуумировали до давления, равного 200 мм Hg, некоторое количество MeI при этом удалялось. Оставшийся продукт суспендировали в ТВМЕ (500 мл), через 30 мин перемешивания суспензию отфильтровывали, остаток промывали ТВМЕ (500 мл).

Анализ этого продукта методом NMR показал, что в нем осталось небольшое количество MeI. Остаток суспендировали в ТВМЕ (500 мл), отфильтровывали, промывали ТВМЕ (500 мл) и сушили под вакуумом с получением [(S)-3-бензилоксикарбониламино-3-[(7R,8S)-7-этоксикарбонил-1,4-диоксаспиро[4.5]дец-8-илкарбамоил]пропил]диметилсульфоний йодид 3 в виде свободно текучего твердого вещества неправильного белого цвета (93,5 г, 97%, степень чистоты 99%).

¹H-MNR (300 MHz, CDCl₃): δ 7,75 (d, J=9,0 Hz, 1H), 7,38-7,27 (m, 5H), 6,40 (d, J=7,0 Hz, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,76-4,65 (m, 1H), 4,48-4,39 (m, 1H), 4,14-3,85 (m, 6H), 3,84-7,73 (m, 1H), 3,68-3,55 (m, 1H), 3,21 (s, 3H), 3,12 (s, 3H), 2,90-2,83 (s, 1H), 2,52-1,55 (m, 8H), 1,24 (t, J=7,0 Hz, 3H).

HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 мкм, 4,6×150 мм, 0,05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O) до 0,05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), градиент 0-100% 10 мин, 2,45 мин.

(I-) 8,14 мин (соединение 3, 43,6 AP, I 54,6 AP). HRMS: m/z 509,2341 (рассчитано C₂₅H₃₇N₂O₇ 509,2321).

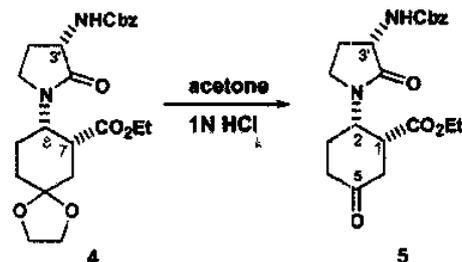


Пример 1, альтернативная стадия 9с.

Cs_2CO_3 (61,5 г, 0,19 М, 1,5 экв.) помещали в круглодонную колбу и добавляли безводный DMSO (2,4 л). Затем частями добавляли сульфониевую соль 3 (80,0 г, 0,13 М, 1,0 экв.). Сразу же после окончания добавления соли реакционную массу выдерживали в темноте при перемешивании. Затем реакционную массу делили пополам и каждую половину обрабатывали отдельно: реакционную массу разбавляли EtOAc (2,0 л) и промывали рассолом (2 л), органическую фазу промывали рассолом (500 мл). Объединенные водные слои промывали EtOAc (500 мл). Объединенные органические фазы промывали рассолом (3×750 мл). Вторую половину реакционной массы обрабатывали так же, объединенные органические слои высушивали над MgSO_4 и концентрировали с получением этил-(7R,8S)-8-((3S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил)-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-7-карбоксилата 4 в виде светлого окрашенного масла (56,5 г, 0,13 М, степень чистоты ~100% по данным NMR, AP).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7,38-7,30 (m, 5H), 5,37 (br d, $J=4,0$ Hz, 1H), 5,11 (s, 2H), 4,27-4,18 (m, 1H), 4,17-3,82 (m, 8H), 3,32 (td, $J=10,0$ Hz, 60,0 Hz, 1H), 3,23 (q, $J=5,0$ Hz, 1H), 2,63-2,57 (m, 1H), 2,42-2,25 (m, 2H), 1,94-1,68 (m, 5H), 1,25 (t, $J=7,0$ Hz, 3H).

HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 мкм 4,6×150 мм, 0,05% TFA (20% MeOH, 80% H_2O) до 0,05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), градиент 0-100% 10 мин, 8,99 мин (соединение 5, полученное в колонке 4,2 AP), 9,48 (соединение 4, 74,3 AP). HRMS: m/z 447,2127 (рассчитано $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7$ 447,2131).

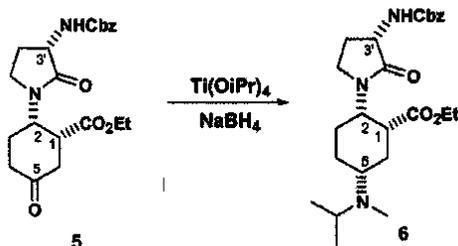


Пример 1, альтернативная стадия 9d.

Пирролидинон 4 (50,0 г, 0,11 М) растворяли в ацетоне (500 мл) и добавляли 1N HCl (500 мл). Затем реакционную массу нагревали до 65°C. Через 20 мин реакция по данным HPLC была завершена. Реакционной массе дали охладиться до RT и в роторном испарителе удаляли ацетон. Во время этой перегонки полученный продукт осаждался из раствора в виде твердого продукта белого цвета. Он выделялся путем фильтрования, осадок промывали водой. Затем осадок подвергали азеотропной сушке с толуолом (3×300 мл), получали (1R,2S)-2-((3S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил)-5-оксоциклогексанкарбоксилат 5 в виде твердого продукта белого цвета (39,8 г, выход 88%, AP 97%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7,37-7,32 (m, 5H), 6,65 (br d, $J=4,0$ Hz, 1H), 5,12 (s, 2H), 4,54-4,47 (m, 1H), 4,34-4,26 (m, 1H), 4,18 (dq, $J=11,0$ Hz, 7,0 Hz, 1H), 4,09 (dq, $J=11,0$ Hz, 7,0 Hz, 1H), 3,36-3,20 (m, 3H), 2,70-2,35 (m, 6H), 2,05-1,96 (m, 1H), 1,81 (quin., $J=11,0$ Hz, 1H), 1,24 (t, $J=7,0$ Hz, 3H).

HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 мкм 4,6×150 мм, 0,05% TFA (20% MeOH, 80% H_2O) до 0,05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), градиент 0-100% 10 мин, 8,95 мин (соединение 5). HRMS: m/z 403,1864 (рассчитано $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$ 403,1869).



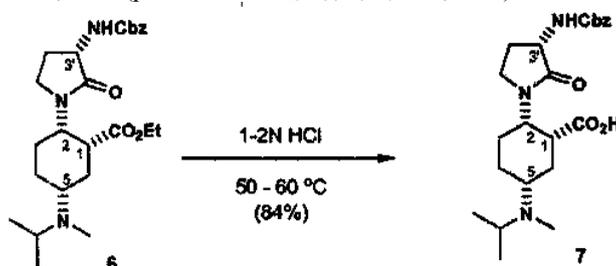
Пример 1, альтернативная стадия 9е.

Циклогексанон 5 (22,5 г, 0,06 М, 2,04 экв.), DMSO (30 мл) и $\text{Ti}(\text{O-}i\text{Pr})_4$ (33,7 мл, 0,11 М, 2,04 экв.) помещали в круглодонную колбу. Затем одной порцией добавляли N-изопропил-N-метиламин (11,6 мл,

0,11 М, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем охлаждали до температуры $<3^{\circ}\text{C}$ в смеси лед/вода. Затем добавляли MeOH (30 мл) и частями вводили NaBH_4 (4,33 г, 0,11 М, 2,04 экв.), после окончания добавления при температуре $<8^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин реакционную массу разбавляли метилхлоридом (300 мл) и затем NaOH (1N, 40 мл). Полученную суспензию отфильтровывали через целит, остаток промывали метилхлоридом (100 мл). Полученный маточник концентрировали при пониженном давлении и растворяли остаток в EtOAc (500 мл). Этот раствор обрабатывали 1N HCl (2×400 мл), объединенные водные слои затем подщелачивали Na_2CO_3 . После экстракции при помощи EtOAc (4×250 мл) получали бесцветную органическую фазу, которую высушивали (Na_2SO_4) и концентрировали с получением белого порошка (24,6 г, 96%, 7:1 сухой ост.). Затем этот продукт суспендировали в течение ночи в гексане (670 мл). Твердый продукт выделяли путем фильтрования и высушивали при пониженном давлении, получали этил-(1R,2S,5R)-2-((3S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(изопропилметиламино)циклогексанкарбоксилат **6** в виде твердого продукта белого цвета (20,9 г, выход 81%, 24:1, сухой ост.).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7,37-7,28 (m, 5H), 5,55 (d, $J=4,5$ Hz, 1H), 5,10 (s, 2H), 4,42 (q, $J=4,5$ Hz, 1H), 4,23-4,12 (m, 1H), 4,08 (dq, $J=10,5$ Hz, 7,0 Hz, 1H), 4,02 (dq, $J=10,5$ Hz, 7,0 Hz, 1H), 3,84 (t, $J=9,0$ Hz, 1H), 3,46-3,36 (m, 1H), 3,04 (septet, $J=6,5$ Hz, 1H), 2,86-2,80 (m, 1H), 2,63-2,48 (m, 2H), 2,17 (s, 3H, Me), 2,10-1,63 (m, 7H), 1,22 (t, $J=7,0$ Hz, 3H), 1,00 (d, $J=6,5$ Hz, 3H), 0,97 (d, $J=6,5$ Hz, 3H).

HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 мкм $4,6 \times 150$ мм, 0,01 М NH_4OAc (MeOH:вода, 20:80) до 0,01 М NH_4OAc (MeOH:вода:MeCN, 20:5:75), градиент 10 до 100% 15 мин, 8,23 мин (соединение **6**), 8,88 (5-эпи-соединение **6**). HRMS: m/z 460,2798 (рассчитано $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_5$ 460,2811).

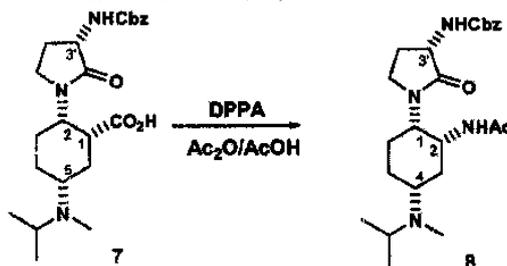


Пример 1, альтернативная стадия 9f.

Аминоэфир формулы **6** (9,76 г, 2,12 ммоль) растворяли в 2N HCl (80 мл), затем нагревали до температуры $\sim 55^{\circ}\text{C}$ в инертной атмосфере. Перемешивали реакционную массу в течение 20 ч, затем охлаждали до комнатной температуры. Реакционный раствор дважды промывали толуолом (порциями по 25 мл), нейтрализовали до pH 6-7 путем добавления гранул KOH, затем 8 раз экстрагировали метилхлоридом (порциями по 100 мл). Соединенные экстракты высушивали (Na_2SO_4), отфильтровывали и концентрировали при пониженном давлении до достижения общего объема, равного 50 мл. Затем концентрированный раствор медленно из воронки добавляли к метил-трет-бутиловому эфиру (300 мл) в течение 15 мин при энергичном перемешивании. Полученную белую суспензию перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч, затем охлаждали до 0°C и перемешивали в течение 1 ч. Полученный продукт отфильтровывали и дважды промывали метил-трет-бутиловым эфиром (порциями по 25 мл). Воду из сырого осадка удаляли путем азеотропной перегонки с ацетонитролом (300 мл). Полученный продукт высушивали при пониженном давлении с получением (1R,2S,5R)-2-((3S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(изопропилметиламино)циклогексанкарбоновой кислоты **7** (7,69 г, выход 84%) в виде белой пены.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 50°C , CDCl_3): δ 7,44-7,32 (m, 5H), 6,10 (broad s, 1H), 5,19 (app s, 3H), 4,42 (dd, $J=15,6$ Hz, 7,8 Hz, 1H), 4,29-4,23 (m, 1H), 3,68-3,60 (m, 2H), 3,33-3,27 (m, 2H), 3,20 (broad s, 1H), 2,99 (broad s, 1H), 2,51 (s, 3H), 2,49-2,45 (m, 3H), 2,33-2,31 (m, 1H), 2,00 (ddd, $J=9,0$, 8,6, 3,9 Hz, 1H), 1,95-1,78 (m, 2H), 1,36-1,21 (m, 6H).

LCMS: m/z 432,20 (рассчитано $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$ 432,25).



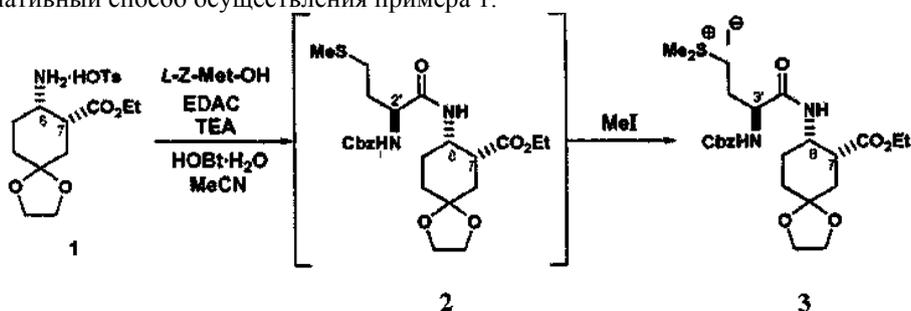
Пример 1, альтернативная стадия 9g.

Аминокислоту **7** (6,3 г, 14,7 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в THF (80 мл) в атмосфере азота и частями

добавляли дисперсию NaH (584 мг, 14,7 ммоль, 1,0 экв, 60 вес.% дисперсия в минеральном масле). После окончания добавления и прекращения выделения газа реакционную массу концентрировали при пониженном давлении и полученный твердый продукт подвергали азеотропной перегонке с толуолом (50 мл), получая продукт белого цвета (KF 0,59 вес.%). Этот продукт суспендировали в толуоле (100 мл) в атмосфере азота и нагревали до температуры 90°C. Добавляли по каплям в течение ~2 мин DPPA (3,32 мл, 15,3 ммоль, 1,05 экв.). Через 5 мин все твердые вещества растворились, через 10 мин наблюдалось образование осадка белого твердого продукта. Через 30 мин по данным HPLC реакция была завершена. Реакционной смеси давали охладиться до RT, затем отфильтровывали смесь, остаток промывали толуолом. Маточный раствор добавляли к раствору AcOH/Ac₂O (80/20, 168 мл) при температуре 90°C. Через 45 мин оставалось еще некоторое количество изоцианата (по данным HPLC). Через 1,15 ч реакционную массу охлаждали до RT и разбавляли толуолом (100 мл) и водой (100 мл). Органический слой удаляли и промывали толуол 1N HCl (100 мл). Объединенные водные фазы затем подщелачивали K₂CO₃ и устанавливали pH, равный 12, при помощи NaOH (10N), поддерживая температуру ниже 20°C. Затем водный слой экстрагировали метилхлоридом (4×150 мл), объединенные органические слои высушивали над K₂CO₃ и концентрировали, получая бензил-(S)-1-((1S,2R,4R)-2-ацетиамидо-4-(изопропил(метил)амино)-циклогексил)-2-оксопириролидин-3-илкарбамат 8 в виде белой пены. По данным ¹H-NMR продукт был идентичен веществу, полученному способом, описанным выше (пример 1, стадия 9).

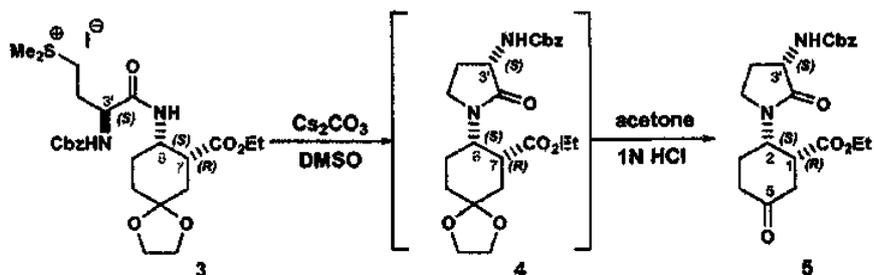
HPLC: YMC-Pack Pro C18 5 мкм 4,6×150 мм, 0,05% TFA (20% MeOH, 80% H₂O) до 0,05% TFA (20% MeOH, 80% MeCN), градиент 0-100% 10 мин, 7,20 мин (соединение 8), 7,85 мин (димер мочевины). HRMS: 445,2809 (рассчитано C₂₄H₃₇N₄O₄ 445,2815).

Альтернативный способ осуществления примера 1.



Пример 1, альтернативный способ, стадия 1.

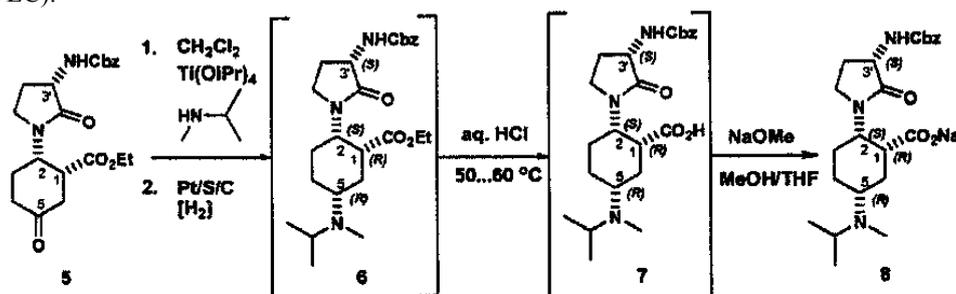
Этил-(7R,8S)-8-амино-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-7-карбоксилат-4-толуолсульфонат 1 (450,1 г) соединяли с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлоридом (236,3 г), 1-гидроксibenзотриазола гидратом (171,9 г), N-карбобензилокси-L-метионином (333,4 г) и ацетонитрилом (3,1 л). К перемешиваемой смеси при температуре ниже 30°C добавляли триэтиламин (249,5 г). По завершении реакции (по данным HPLC) смесь разбавляли этилацетатом (8,2 л) и промывали сначала водным 25%-ным раствором бикарбоната калия (2×4,5 л) и затем водой (4,5 л). Органическую фазу отделяли и концентрировали при пониженном давлении, получая раствор (7R,8S)-8-((S)-2-бензилоксикарбониламино-4-метилсульфанилбутириламино)-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-7-карбоксилат 2 (1,4 л). Добавляли метилйодид (2,39 кг), сосуд защищали от света и выдерживали смесь при медленном перемешивании в течение примерно 24 ч. К плотному осадку желтого цвета добавляли метил-трет-бутиловый эфир (2,7 л) и выдерживали смесь в течение примерно 1 ч. Полученный продукт выделяли путем фильтрации и промывали остаток на фильтре метил-трет-бутиловым эфиром (2×1,4 л), затем высушивали под вакуумом, получая [(S)-3-бензилоксикарбониламино-3-((7R,8S)-7-этоксикарбонил-1,4-диоксаспиро[4.5]декан-8-илкарбамоил)пропил]диметилсульфония йодид 3 (671,4 г, выход ~94%) в виде твердого вещества неправильного белого цвета (чистота 99,9%, HPLC).



Пример 1, альтернативный способ, стадия 2.

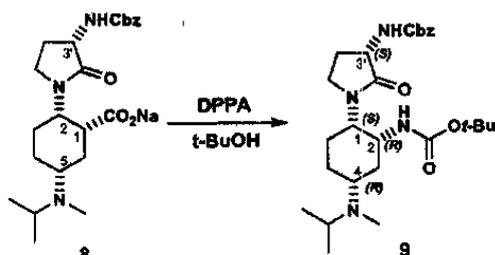
Сульфониевую соль 3 (619,4 г), карбонат цезия (416,8 г) и безводный диметилсульфоксид (6,2 л) соединяли в реакторе, снабженном скруббером, для нейтрализации летучих сульфидов. Поддерживали энергичное перемешивание до достижения полной конверсии (HPLC). Добавляли этилацетат (12,4 л) и затем 20%-ный рассол (3 л). Органическую фазу отделяли, дважды промывали рассолом (2×3 л) и выпа-

ривали, получая раствор этил-(7R,8S)-8-{{(S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил}}-1,4-диоксапири[4.5]декан-7-карбоксилата 4 в этилацетате (~0,8 л). Добавляли ацетон (2,55 л) с последующим введением водного 0,5 М раствора соляной кислоты (2,3 л). При интенсивном перемешивании нагревали раствор до температуры 50-60°C до полного превращения 4 этил-(1R,2S)-2-{{(S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил}}-5-оксоциклогексанкарбоксилат 5 (по данным HPLC). Смесь концентрировали при пониженном давлении при температуре ниже 40°C, охлаждали до температуры, равной ~30°C, и добавляли воду (4,1 л). Полученную суспензию охлаждали до 5-10°C и перемешивали в течение ~1 ч. Полученный продукт отфильтровывали и остаток промывали водой (2×2,5 л). После отделения жидкости остаток высушивали при температуре ниже 40°C до постоянного веса в вакуумной печи. Был получен циклогексанон 5 (272 г, выход 70%) (степень чистоты 98,7% по данным HPLC).



Пример 1, альтернативный способ, стадия 3.

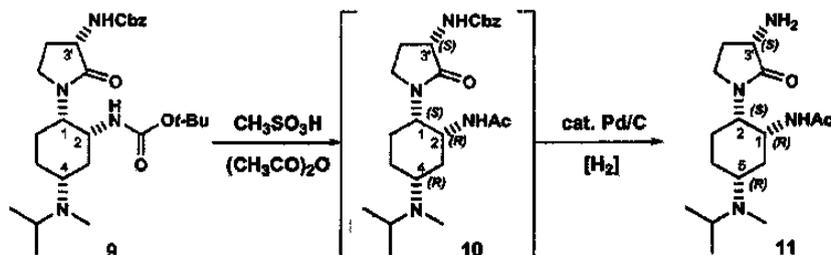
Циклогексан 5 (206 г) растворяли в дихлорметане (1,1 л) и загружали в гидрогенатор. Добавляли тетраизопропоксид титана (218,2 г) и N-изопропил-N-метиламин (63,64 г) и перемешивали смесь при температуре окружающей среды (23-25°C) в течение по меньшей мере 5 ч. Добавляли катализатор на основе платины (5% Pt/S/C, 15 г, примерно 7,5% по отношению к 5) и проводили гидрирование при давлении ~30 ф/дюйм² (206,8 кПа) в течение по меньшей мере 6 ч, получали смесь этил-(1R,2S,5R)-2-{{(S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил}}-5-(изопропилметиламино)циклогексанкарбоксилата 6 и его 5-эпи-изомера (~7%). Катализатор удаляли фильтрованием, фильтрат концентрировали при пониженном давлении до объема, равного ~600 мл. При энергичном перемешивании в течение по меньшей мере 1,5 ч добавляли влажный этилацетат (~3% воды, 2,0 л). Перемешивание продолжали по меньшей мере еще в течение 6 ч. Суспензию отфильтровывали. Остаток на фильтре промывали этилацетатом (1,0 л) и выгружали. Объединенные фильтрат и промывочные воды концентрировали до ~400 мл. Добавляли толуол (2,0 л) и промывали раствор 2 М водным раствором соляной кислоты (2×400 мл). Водный слой нагревали до 50-60°C в течение примерно 20 ч, гидролиз 6 завершился (по данным HPLC). Добавляли водный раствор гидроксида натрия до достижения pH, равного ~10, и экстрагировали смесь толуолом (3×600 мл). Органическую фазу выгружали и устанавливали pH ~6 путем добавления водного раствора соляной кислоты. Водную фазу концентрировали при пониженном давлении до объема, равного ~600 мл, и обрабатывали метилхлоридом (по меньшей мере 3×2,0 л). Объединенные метилхлоридные слои выпаривали при пониженном давлении и непрерывно заменяли растворитель THF для получения раствора (1R,2S,5R)-2-{{(S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил}}-5-(изопропилметиламино)циклогексанкарбоновой кислоты 7 в THF (~4 л). Добавляли затравочные кристаллы 8 с последующим введением 25%-ного раствора метоксида натрия в метаноле (81,24 г) при температуре ниже 25°C. Суспензию выдерживали по меньшей мере еще 16 ч при перемешивании. Полученный продукт выделяли путем фильтрования, остаток на фильтре промывали THF (4×200 мл) и высушивали под вакуумом и при температуре ниже 30°C до постоянного веса. Получали сухую натриевую соль (1R,2S,5R)-2-((S)-3-бензилоксикарбониламино-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(изопропилметиламино)циклогексанкарбоксилата 8 (139 г, выход ~60% в расчете на соединение 5).



Пример 1, альтернативный способ, стадия 4.

Натриевую соль аминоэфира 8 (100 г), дифенилфосфат (3,86 г), трет-БуОН (1275 мл) и толуол (225 мл) соединяли и нагревали с обратным холодильником при пониженном давлении. Собирали около 500 мл дистиллята и выгружали его при непрерывном замещении раствором толуола в трет-БуОН. Вакуум снимали, а дистиллят процеживали через колонку, заполненную молекулярными ситами, и затем он

возвращался в сосуд. После окончания сушки к суспензии при температуре 80°C медленно добавляли DPPA (52,4 мл; раствор в 60 мл толуола). После достижения полной конверсии (HPLC) удаляли трет-БуОН путем перегонки под вакуумом и непрерывно заменяли его толуолом. Смесь охлаждали до комнатной температуры и дважды промывали 10%-ным водным раствором K_2HPO_4 (1×800 мл, 1×400 мл) и водой (400 мл). Органическую фазу нагревали и концентрировали под вакуумом до объема около 270 мл. Снимали вакуум и при температуре примерно 80°C медленно добавляли гептан (1,1 л) и затем вводили затравочные кристаллы соединения 9 (~1 г). Суспензию медленно охлаждали до комнатной температуры и выделяли в виде белого твердого вещества бензил-{(S)-1-[(1S,2R,4R)-2-трет-бутоксикарбониламино-4-(изопропилметиламино)циклогексил]-2-оксопирролидин-3-ил} карбамат 9 (86,7 г, 78%-ный выход).

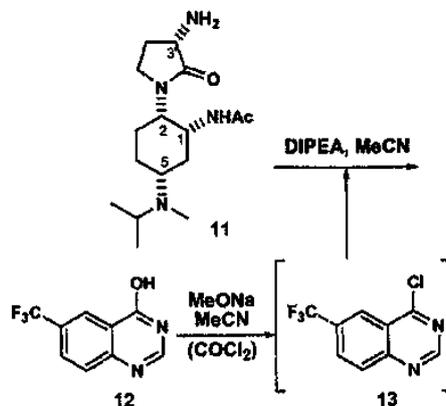


Пример 1, альтернативный способ, стадия 5.

трет-Бутилкарбамат 9 (50 г) растворяли в толуоле (500 мл) и изо-PrOH (150 мл). Затем полученный раствор нагревали до 60°C. При температуре ниже 65°C добавляли метансульфокислоту (19,6 мл). По завершении реакции (по данным HPLC) смесь охлаждали до RT и медленно при температуре ниже 25°C добавляли триэтиламин (69,4 мл). Затем при температуре ниже 25°C добавляли уксусный ангидрид. Через 1 ч при температуре ниже 25°C добавляли уксусную кислоту (250 мл). Выгружали толуольную фазу и к водной фазе добавляли 2-метил-THF (500 мл). Смесь энергично перемешивали и подщелачивали NaOH (25%-ный водный раствор) до pH, равного 12. Выгружали водную фазу и промывали органический слой рассолом (250 мл). При пониженном давлении концентрировали органический слой и непрерывно замещали изо-PrOH. Полученный раствор охлаждали и отфильтровывали, получали раствор бензил-{(S)-1-[(1S,2R,4R)-2-ацетиламино-4-(изопропилметиламино)циклогексил]-2-оксопирролидин-3-ил} карбамата 10 в изо-PrOH, который применяли непосредственно при дальнейшем гидрировании.

Пример 1, альтернативный способ, стадия 6.

К раствору, содержащему ацетамид 10 (~61 г), в изо-PrOH (~625 мл) добавляли 10% Pd/C (влажный, 2,5 г) и гидрировали полученную суспензию при давлении 30 ф/дюйм² и при температуре около 25°C в течение по меньшей мере 2 ч. После завершения (HPLC) этой стадии катализатор удаляли путем фильтрации, а фильтрат концентрировали до объема, равного примерно 550 мл. Добавляли воду (8,8 мл) и затем 5,6 N соляную кислоту в изо-PrOH (69,5 мл). Полученную суспензию выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Образовавшийся продукт выделяли путем фильтрации и остаток на фильтре промывали изо-PrOH (2×100 мл) и высушивали под вакуумом при температуре ~50°C до постоянного веса с получением N-[(1R,2S,5R)-2-((S)-3-амино-2-оксопирролидин-1-ил)-5-(изопропилметиламино)циклогексил]ацетамида 11 (55,6 г, выход 97%) в виде его гидрохлоридной соли (73,6% свободного основания, HPLC).



Пример 1, альтернативный способ, стадия 7.

К 6-трифторметилхиназолин-4-олу 12 (20,1 г) в MeCN (400 мл) добавляли 5,5 M раствор метоксида натрия в метаноле (17,0 мл). Полученную суспензию перегоняли при пониженном давлении и непрерывно замещали метанол MeCN. Затем к суспензии добавляли DMF (1,4 г) и затем оксалилхлорид (13,0 мл) при температуре ниже 50°C. По завершении реакции (HPLC) избыток реагента удаляли при пониженном давлении с получением ~400 мл суспензии. Смесь охлаждали до комнатной температуры и промывали 10% водным раствором K_2HPO_4 (1×1,0 л, 1×0,5 л), получая 4-хлор-6-трифторметилхиназолин 13 (~21,2 г

в примерно 450 мл влажного раствора MeCN, это соединение применяли непосредственно при проведении последующей реакции сочетания (степень чистоты 99,8%, по данным HPLC).

Пример 1, альтернативный способ, стадия 8.

К смеси ацетамида 11 (28,5 г, гидрохлоридная соль, 73,6% свободного основания), ацетонитрила (100 мл), N,N-диизопропил-N-этиламина (61 мл) при комнатной температуре добавляли раствор соединения 13 (~21,2 г) в MeCN (~450 мл). Гомогенную смесь выдерживали в течение ночи. После завершения реакции (по данным HPLC) смесь концентрировали под вакуумом до объема, равного примерно 125 мл. Добавляли 9,5% водный раствор уксусной кислоты (240 мл) и экстрагировали водную фазу метиленхлоридом. Водную фазу отделяли, добавляли метил-трет-бутиловый эфир (450 мл) и затем добавляли 2N водный раствор гидроокиси лития до pH>11,5. Органический слой отделяли, промывали водой и отфильтровывали. Примерно половину эфирной фазы разбавляли метил-трет-бутиловым эфиром (~250 мл) и концентрировали в условиях вакуума. При температуре ниже 60°C медленно добавляли гептан (45 мл) с последующим введением затравочных кристаллов соединения по примеру 1 (0,4 г). Добавляли снова гептан (125 мл) и медленно охлаждали смесь до комнатной температуры, полученную суспензию выдерживали в течение ночи. Полученный продукт выделяли путем фильтрации.

Остаток на фильтре промывали гептаном и высушивали под вакуумом до постоянного веса, получая N-((1R,2S,5R)-5-(изопропиламино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)-пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид 14 (15,0 г, выход 85%).

Методы кристаллизации соединения по примеру 1.

Пример 1, получение бис-BSA-соли и ее очистка.

Все количество аморфного свободного основания, полученного в примере 1, стадия 11, растворяли в метаноле (600 мл). Полученный раствор нагревали до температуры, равной 60°C, и добавляли в сосуд вместе с бензолсульфокислотой (2,5 экв.). Смесь охлаждали до комнатной температуры и полученный твердый продукт белого цвета собирали путем фильтрации, получая соль бис-бензолсульфокислоты соединения по примеру 1. Этот продукт имел степень чистоты, равную >99% по данным HPLC. Это вещество далее очищали перекристаллизацией из 80/20 EtOAc/H₂O, что приводило к получению соли, не содержащей остаточного метанола. Степень чистоты этого вещества была равна 99,8% по данным HPLC.

¹H-MNR (500 MHz, DO₂): δ ppm 8,75 (1H, s), 8,66 (1H, s), 8,25 (1H, d, J=8,80 Hz), 7,90 (1H, d, J=8,80 Hz), 7,75 (4H, d, J=8,25 Hz), 7,43-7,57 (6H, m), 5,42 (1H, t), 4,33-4,44 (1H, m), 4,09-4,19 (1H, m), 3,83-3,91 (1H, m), 3,74-3,83 (2H, m), 3,61 (1H, t, J=11,55 Hz), 2,75 (3H, d, J=6,60 Hz), 2,61-2,70 (1H, m), 2,31-2,44 (1H, m), 2,20-2,27 (1H, m), 2,17 (2H, d, J=12,10 Hz), 1,94-2,04 (1H, m, J=12,65 Hz), 1,90-1,95 (3H, m), 1,72-1,91 (2H, m), 1,37 (3H, d, J=6,05 Hz), 1,29 (3H, d, J=6,60 Hz).

Дифференциальная сканирующая калориметрия, проведенная со скоростью нагрева, равной 10°/мин, показала наличие эндотермы плавления/разложения с начальной температурой, равной 297,6°C, и температурой появления пика, равной 299,1°C.

Пример 1, кристаллизация свободного аморфного основания.

Образец свободного аморфного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропиламино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида (1 г) растворяли в дихлорметане (5 мл). В раствор загружали гептан (30 мл) и затем нагревали для отгонки дихлорметана. Раствор охлаждали до 40°C, что вызывало осаждение белого твердого вещества. Суспензию нагревали до 90°C и перемешивали в течение 2 ч. Затем суспензию охлаждали до комнатной температуры и отфильтровывали с получением чистого свободного основания целевого соединения. Остаточного растворителя не содержалось (по данным HPLC).

Пример 2.

Кристаллические формы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида.

Различные кристаллические формы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, включая его свободное основание и солевые формы и сольваты, были получены и охарактеризованы, как описано ниже.

Методы характеристики форм.

Данные для монокристалла.

Характеристики получали на дифрактометре Bruker-Nonius (BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison WI 53711 USA) CAD4. Параметры элементарной ячейки получали методом анализа значений наименьших квадратов экспериментальных данных, полученных при помощи дифрактометра под углом отражения 25°. Величины интенсивности измеряли с применением рентгеновского излучения CuKα (λ=1,5418 Å) при постоянной температуре при сканировании с переменными Θ-2Θ и корректировались только для факторов поляризации Лоренца. Показатели фона получали при экстремальных значениях отражений в течение половины времени сканирования. Альтернативно, данные для монокристалла можно получать с применением системы Bruker-Nonius Каппа CCD 2000 и рентгеновского излучения CuKα (λ=1,5418 Å). Обработку полученных величин интенсивности осуществляли с применением программы HKL 2000 (Otwinowski, Z. And Minor W. (1997) в Macromolecular Crystallography, eds. Carter W.C.

Jr. and Sweet R.M. (Academic, NY), vol. 276, p. 307-326) в наборе программ Collect (Collect Date collection and processing user interface: Collect: Date collection software, R. Hoofst, Nonius B.V., 1998). Или же данные для монокристалла получали на системе Bruker-AXS APEX2 CCD с применением рентгеновского излучения $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$). Обработку полученных величин интенсивности проводили с применением программы APEX2 (APEX2 Date collection and processing user interface: APEX2 User Manual, vol. 27; BRUKER AXS, Inc., 5465 East Cheryl Parkway Madison, WI 53711, USA).

Там, где указано, кристаллы во время сбора данных охлаждали в холодном потоке криосистемы (Oxford Cryosystems Cryostream cooler: J. Cosier and A.M. Glazer, J. Appl. Cryst, 1986, 19, 105).

Структуры были решены прямыми методами и уточнены на основании наблюдаемых величин отражения с применением программы SDP (SDP, Structure Determination Package, Enraf-Nonius, Bohemia NY 11716). Факторы рассеяния, включая f' и f'' , в программе SDP, были взяты из "International Tables for Crystallography", Kynoch Press, Birmingham, England, 1974; Vol. IV, Tables 2.2A и 2.31) с небольшими локальными модификациями параметров или набора программ MAXUS (maXus solution and refinement software suite: S. Mackay, C.J. Gilmore, C. Edwards, M. Tremayne, N. Stewart, K. Shankland. maXus: a computer program for the solution and refinement of crystal structures date or SHELXTL⁴). Производные атомные параметры (координаты и температурные факторы) были уточнены при помощи системы полная матрица - наименьшие квадраты. Минимизированная функция при уточнении представляла собой $\sum_w(|F_o|-|F_c|)^2$. R обозначает $\sum(|F_o|-|F_c|)/\sum|F_o|$, где $R_w=[\sum_w(|F_o|-|F_c|)^2/\sum_w|F_o|^2]^{1/2}$, где w означает соответствующую весовую функцию на основе ошибок в значениях интенсивности. Карты разности изучали на всех стадиях уточнения.

Метод порошковой рентгеновской дифракции (PXRD).

Этот метод PXRD осуществляли с применением прибора Bruker C2 GADDS. Использовали излучение $\text{CuK}\alpha$ (40 кВ, 50 мА). Расстояние от образца до детектора составляло 15 см. Образцы порошка помещали в герметичные стеклянные капилляры диаметром 1 мм или менее, которые вращались при проведении измерений. Измерения проводили при $3^\circ < 2\theta < 35^\circ$ при времени экспозиции образца, равном по меньшей мере 2000 с.

Получены были двухмерные дифракционные дуги, которые интегрировали для построения обычной одномерной PXRD решетки с размером шага, равным $0,02^\circ 2\theta$, в интервале $3-35^\circ 2\theta$. Примерно 200 мг помещали в контейнер для порошков Philips Powder PXRD. Образец перемещали в установку Philips MPD (45 кВ, 40 мА, $\text{CuK}\alpha$). Измерения проводили при комнатной температуре в интервале $2-32^\circ 2\theta$ (метод непрерывного сканирования, скорость сканирования $0,03^\circ/\text{с}$, автоматическая расходимость и антирассеивающие щели, принимающая полоса: $0,2 \text{ мм}$, спиннер образца: ON).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC).

DSC осуществляли с применением прибора TA Instruments™ модель Q 1000 или 2920. Образец (около 2-6 мг) взвешивали в алюминиевом приемнике с точностью до сотой доли миллиграмма и затем помещали в прибор. Прибор промывали газообразным азотом со скоростью 50 мл/мин. Данные определяли при температуре между комнатной и 300°C при скорости нагрева, равной $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Затем строили график, на котором эндотермические пики были направлены вниз.

Термический гравитационный анализ (TGA).

Этот анализ проводили с использованием прибора TA Instruments™ модель Q 500 или 2950. Образец (весом $\sim 10-30 \text{ мг}$) помещали в предварительно взвешенную платиновую емкость. Вес образца измеряли точно до тысячной доли миллиграмма. Печку промывали азотом со скоростью 100 мл/мин. Данные определяли при температуре между комнатной и 300°C при скорости нагрева, равной $10^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Получение и анализ форм.

Параметры элементарной ячейки кристалла и другие свойства по примерам представлены в табл. 1. Параметры элементарной ячейки получали для монокристалла, используя метод порошковой рентгеновской дифракции. Подробное описание элементарных ячеек можно найти в главе 3 Stout and Jensen, X-ray Structure Determination: a Practical Guide (Mac-Millan, 1968).

Фракционные атомные координаты для соединений по примерам 2a, b, c, d, e, f, g и h представлены в табл. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 соответственно.

Кроме того, характерные положения пиков на дифрактограммах ($\text{градусы } 2\theta \pm 0,1$) @ RT для соединений по примерам 2a, b, d, e, f, g и h представлены в табл. 10, все эти данные основаны на дифрактограммах высокого качества, полученных с помощью дифрактометра ($\text{CuK}\alpha$) с капиллярами при 2θ , они были калиброваны с другим подходящим стандартом NIST.

Наконец, на фиг. 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 представлены дифрактограммы PXRD для соединений по примерам 2a, b, d, e, f, g и h соответственно. На фиг. 8 и 9 представлены данные DSC и TGA соответственно для соединения по примеру 2a, на фиг. 10, 11 и 12 представлены данные DSC и TGA и спектры изотермы сорбции влаги для соединения по примеру 2f соответственно.

Получение форм, параметры XRD, DSC и TGA.

Пример 2a, форма N-1, дибесилат.

Соль бензолсульфокислоты N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-

(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид кристаллизовали из этилацетата, этанола, метанола и ацетона. Форма N-1, дибесилат, является чистой формой (без молекул воды или растворителя) N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, солью дибензолсульфокислоты. Форма N-1, дибесилат, характеризуется дифрактограммой XRD, которая соответствует моделированной дифрактограмме, полученной для монокристалла. Дибесилатная форма N-1 характеризуется DSC термограммой с эндотермой плавление/разложение с началом при температуре около 296°C. Форма N-1 дибесилата характеризуется кривой TGA, показывающей незначительную потерю веса (соотносится с несольватированной формой), до температуры около 280°C.

Пример 2b, форма DC-1.

Образец маслянистого гелеобразного (аморфного) основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида (около 0,5 г) после экстракции из образца соли BSA растворяли в дихлорметане (примерно 3 мл). К раствору добавляли около 5 мл гептана и полученную маслянистую смесь энергично перемешивали при помощи магнитной мешалки в открытом стакане при температуре 20-25°C. После испарения растворителей получали белый твердый продукт. Этот продукт вновь суспендировали в смеси примерно 5 мл гептана и 0,2 мл дихлорметана и перемешивали при температуре 25°C в течение 7 дней. Полученную суспензию отфильтровывали и сушили на воздухе, получали свободное основание N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, форма DC-1. Эта форма DC-1 характеризуется содержанием 1 моль дихлорметана на моль свободного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида. Форма DC-1 характеризуется дифракционной решеткой, которая соответствует моделированной дифрактограмме, полученной для монокристалла.

Пример 2c, форма THO-1.

Свободное основание N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида (1 мг) растворяли в 80 мкл THF. Растворитель удаляли при помощи SpeedVac (SpeedVac Plus, SC 250 DDA, Savant/ThermoElectron Corp.) в условиях высокого вакуума при температуре, равной 22°C, в течение 16 ч. В ячейку прибора загружали всего 100 мкл смеси MIBK/гептан (1/2 по объему). После выдержки в течение 2 недель при комнатной температуре (20-25°C) в ячейке наблюдалось образование кристаллов. Форма THO характеризуется 1 моль THF на моль свободного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида.

Пример 2d, форма E-1.

Свободное основание N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида кристаллизовали из раствора, содержащего этанол и гептан. Форма E-1 характеризуется содержанием 1 моля этанола на моль свободного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида. Форма E-1 характеризовалась дифрактограммой, соответствующей моделированной дифрактограмме, полученной для монокристалла.

Пример 2e, форма A-1.

Свободное основание N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида суспендировали при концентрации более 150 мг/мл в ацетоне. Суспензии давали уравновеситься при комнатной температуре с получением разбавленной суспензии. Часть суспензии отфильтровывали, затем и фильтрат и суспензию выдерживали в холодильнике при температуре 5°C, получали кристаллы моносолевата с ацетоном (A-1). Форма A-1 характеризуется содержанием 1 моль ацетона на моль свободного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида. Форма A-1 свободного основания характеризовалась дифрактограммой, соответствующей моделированной дифрактограмме, полученной для монокристалла.

Пример 2f, форма N-2.

Образец маслянистого гелеобразного (аморфного) основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида (примерно 0,5 г) экстрагированного из образца соли BSA, суспендировали в гептане (около 5 мл). Стенки колбы очищали металлическим шпателем, суспензию энергично перемешивали магнитной мешалкой при температуре 25°C. После перемешивания в течение 24 ч получают белую суспензию кристаллических частиц. Суспензию отфильтровывали, влажный остаток высушивали под вакуумом (40°C), получая чистую форму N-2 (подтверждено PXRD) свободного основания. Форма N-2 характеризовалась дифрактограммой PXRD, соответствующей моделированной дифрактограмме, полученной для монокристалла. Форма N-2 является чистой (без молекул сольвата или молекул воды или растворителя) формой свободного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)-

хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида. Форма N-2 характеризовалась термограммой DSC, имеющей начало эндотермы плавления при температуре от примерно 158 до примерно 162°C. Форма N-2 характеризовалась кривой TGA, показывающей незначительную потерю веса при температуре до примерно 145°C, что согласуется с данными для монокристалла. Потеря веса соответствовала потере случайного растворителя. Изотерма влага-сорбция характеризовалась увеличением веса на 0,15% в интервале относительной влажности от примерно 25 до примерно 75% при температуре 25°C, что указывает на то, что форма N-2 является слабо гигроскопичной (гигроскопичной в очень незначительной степени или не гигроскопичной).

Пример 2g, форма AN-3.

Суспензию N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, с концентрацией ~200 мг/мл готовят в ацетонитриле и оставляют уравниваться при комнатной температуре с образованием достаточно тонкой суспензии. Часть суспензии фильтруют и как фильтрат, так и суспензию охлаждают при 5°C, получают кристаллы ацетонитрила сольвата (AN-3). Форма AN-3 характеризуется тем, что на 1 моль ацетонитрила приходится 1 моль N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания. Форму AN-3 характеризуют данными XRD диаграммы, которые соответствуют структурным данным, полученным для смоделированного монокристалла.

Пример 2h, форма H4-1, HCl.

Образец свободного основания N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида (около 0,2 г) растворяют в этаноле (около 1 мл). К раствору свободного основания прибавляют около 310 мкл раствора HCl в этаноле (примерная концентрация 1,25 М). В раствор помещают небольшое количество кристаллической суспензии соли HCl (зародыши). К полученному мутному раствору прибавляют 3 мл гептана. Постепенно в течение 1-2 ч при перемешивании при 20-25°C образуется белая суспензия. Суспензию перемешивают при 20°C еще в течение 12 ч, фильтруют и промывают гептаном. Сырой осадок на фильтре сушат в вакууме (40°C), получают тетрагидрат HCl соли, форма H4-1, HCl. Форма H4-1, HCl характеризуется тем, что на моль N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида гидрохлорида приходится 4 моль воды. Форму H4-1, HCl соль тетрагидрат характеризуют данными SRD диаграммы, которые соответствуют структурным данным, полученным для смоделированного монокристалла.

Таблица 1

Параметры элементарной ячейки

Соединение	Соль	Форма	T	a(Å)	b(Å)	c(Å)	α°	β°	γ°	V(Å ³)
Эксп 2a	ди- BSA	N-1	RT	15.1737(8)	7.6544(4)	16.7722(9)	90	93.758(2)	90	1943.8(2)
Эксп 2b	Основание	DC-1	RT	8.7496(5)	10.729(2)	31.029(3)	90	90	90	2912.8(6)
Эксп 2c	Основание	THOO-1	-50	8.7909(6)	11.1527(5)	30.862(2)	90	90	90	3025.8(3)
Эксп 2d	Основание	E-1	RT	8.2050(5)	11.2186(5)	32.041(2)	90	90	90	2949.3(3)
Эксп 2e	Основание	A-1	RT	8.8773(7)	10.5735(8)	31.319(2)	90	90	90	2939.8(4)
Эксп 2f	Основание	N-2	RT	11.8427(3)	18.1503(7)	12.7923(4)	90	105.362(2)	90	2651.4(2)
Эксп 2g	Основание	AN-3	RT	7.5341(9)	13.514(2)	14.342(2)	90	91.671(8)	90	1459.6(4)
Эксп 2h	HCl	H4-1	RT	11.8391(2)	11.8391(2)	78.158(2)	90	90	90	9487.2(4)

Соединение	Z'	Vm	sg	dcalc
Эксп 2a	1	972	P2i	1.406
Эксп 2b	1	728	P2i2i2i	1.349
Эксп 2c	1	756	P212A	1.340
Эксп 2d	1	737	P2,2,2	1.245
Эксп 2e	1	735	P2i2,2i	1.276
Эксп 2f	2	663	P2i	1.269
Эксп 2g	1	730	P2i	1.246
Эксп 2h	1	791	P6i22	1.292

Ниже даются определения переменных в табл. 1:

T=температура в градусах Цельсия для рентгеноструктурного анализа (RT обозначает комнатную температуру, которая равна примерно 22°C);

V=объем элементарной ячейки;

Z'=число молекул лекарства в асимметрической ячейке;

Vm=V(элементарной ячейки)/(Z молекул лекарства в ячейке);

sg=пространственная группа;

dcalc=вычисленная плотность кристалла.

Таблица 2

Координаты атомов для примера 2а, форма N-1, дибензилат

АТОМ	X	Y	Z	АТОМ	X	Y	Z
S1	0.4296	0.3405	0.1278	H57	0.5146	0.6132	0.0473
O2	0.3848	0.2640	0.1944	H58	0.4218	0.5168	0.2790
O3	0.5075	0.2480	0.1097	H59	0.5591	0.9137	0.0886
O4	0.3692	0.3687	0.0581	H60	0.5305	1.0179	0.2235
C5	0.4631	0.5514	0.1598	H61	0.4602	0.8229	0.3179
C6	0.5031	0.6610	0.1068	H62	-0.0921	0.0872	0.5134
C7	0.4500	0.6066	0.2360	H63	-0.0975	0.3507	0.7393
C8	0.5279	0.8279	0.1298	H64	-0.2621	0.3609	0.7274
C9	0.5113	0.8867	0.2054	H65	-0.2589	0.0940	0.5014
C10	0.4744	0.7756	0.2590	H66	-0.3412	0.2321	0.6040
S11	0.0304	0.2103	0.6431	H67	0.2813	0.2966	0.2330
O12	0.0580	0.0675	0.5918	H68	0.3163	0.2103	-0.0149
O13	0.0507	0.1758	0.7265	H69	0.0931	0.1273	0.5084
O14	0.0615	0.3788	0.6162	H70	0.0812	0.1334	-0.0296
C15	-0.0863	0.2166	0.6296	H71	0.2494	0.4855	-0.0720
C16	-0.1295	0.1458	0.5613	H72	0.2837	0.3700	-0.1556
C17	-0.1335	0.2944	0.6877	H73	0.3692	0.2507	0.3208
C18	-0.2249	0.3021	0.6795	H74	0.1718	0.1588	-0.1410
C19	-0.2234	0.1541	0.5537	H75	0.1760	0.5937	0.0122
C20	-0.2690	0.2305	0.6124	H76	0.0713	0.5818	0.0518
N21	0.1351	0.3402	0.0394	H77	0.2388	0.1059	0.5751
N22	0.2122	0.3075	0.2421	H78	0.0144	0.2704	-0.1359
N23	0.2612	0.1387	-0.0417	H79	-0.0107	0.3948	-0.0519
N24	0.0979	0.2591	0.3211	H80	0.0877	0.3884	0.1993
O25	0.1429	0.0840	0.1114	H81	0.1400	0.4103	-0.2251
N26	0.1222	0.1701	0.4545	H82	0.1443	0.8789	-0.2785
O27	0.2029	-0.1265	-0.0688	H83	0.1063	0.6705	-0.3097
N28	0.1897	0.6703	-0.2034	H84	0.0611	0.7736	-0.2276
C29	0.1114	0.2601	-0.0390	H85	0.3994	0.1229	0.5687
C30	0.2281	0.4006	-0.1212	H86	0.0212	0.5681	-0.1742
C31	0.3926	0.1870	0.4435	H87	0.0851	0.6247	-0.0863
C32	0.2482	0.2192	0.3790	H88	-0.0003	0.2113	0.3972
C33	0.1850	0.2609	0.3119	H89	0.2528	0.5466	0.1402
C34	0.3395	0.2220	0.3762	H90	0.1580	0.6514	0.1725
C35	0.1915	0.2339	-0.0878	H91	0.3253	0.5947	-0.1972
C36	0.2131	0.1749	0.4516	H92	0.3197	-0.2538	0.0275
C37	0.1374	0.5280	0.0550	H93	0.3937	-0.0865	0.0040
C38	0.1447	0.2421	0.1065	H94	0.3249	-0.0591	0.0839
C39	0.2678	0.1409	0.5195	H95	0.3767	0.8481	-0.2754
C40	0.0410	0.3593	-0.0898	H96	0.2667	0.9209	-0.2913
C41	0.2593	-0.0327	-0.0318	H97	0.3183	0.9202	-0.1940
C42	0.1523	0.3701	0.1769	H98	0.3388	0.5477	-0.3381
C43	0.1572	0.4920	-0.1737	H99	0.2541	0.4208	-0.3000
C44	0.1203	0.7566	-0.2584	H100	0.2273	0.6084	-0.3576
C45	0.3559	0.1483	0.5161	H101	0.2047	0.7544	-0.1523
C46	0.0730	0.5239	-0.1311				
C47	0.0706	0.2135	0.3909				
C48	0.1814	0.5399	0.1402				
C49	0.2788	0.6660	-0.2381				
C50	0.4909	0.1922	0.4387				
C51	0.3294	-0.1139	0.0239				
F52	0.5219	0.0514	0.4093				
F53	0.5340	0.2113	0.5073				
F54	0.5176	0.3178	0.3953				
C55	0.3112	0.8512	-0.2507				
C56	0.2765	0.5513	-0.3130				

Таблица 3

Координаты атомов для примера 2b, форма DC-1

Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
O1	0.3874	0.5713	0.1042	H41	-0.1294	0.3465	0.2606
N2	0.6277	0.6481	0.1041	H42	-0.2461	0.1574	0.1324
C3	0.3731	0.6931	0.1987	H43	-0.1481	0.1749	0.0586
O4	0.3088	0.7902	0.1889	H44	0.1951	0.4379	0.0994
N5	0.5234	0.6709	0.1945	H45	0.2635	0.5336	0.1473
C6	0.0370	0.3707	0.1487	H46	0.4541	0.5194	0.2668
N7	0.9171	0.7535	0.0862	H47	0.4188	0.4033	0.2278
C8	0.5884	0.7673	0.1246	H48	0.5887	0.4873	0.1799
N9	0.2197	0.5147	0.1799	H49	0.6714	0.5483	0.2272
C10	0.6819	0.8733	0.1041	H50	0.5969	0.8538	0.1868
C11	0.0994	0.4380	0.1852	H51	0.8120	0.7421	0.2149
C12	0.5232	0.5593	0.0958	H52	0.8245	0.6564	0.1665
C13	0.0339	0.3042	0.0748	H53	0.4689	0.7873	0.1195
C14	0.0966	0.3752	0.1068	H54	0.7443	0.6307	0.0952
N15	0.0413	0.4260	0.2242	H55	0.6606	0.8737	0.0699
C16	-0.0879	0.2935	0.1577	H56	0.6450	0.9598	0.1181
N17	-0.1495	0.2843	0.1988	H57	0.9128	0.9427	0.1024
C18	0.6213	0.7635	0.1729	H58	0.9994	0.8349	0.1664
C19	0.2969	0.5749	0.2162	H59	0.8434	0.9363	0.1746
C20	0.8547	0.8596	0.1114	H60	1.1241	0.6556	0.0774
C21	-0.0807	0.3504	0.2284	H61	1.1465	0.8155	0.0889
C22	0.8829	0.8492	0.1601	H62	1.0949	0.7111	0.1303
C23	0.0961	0.3041	0.0303	H63	0.9541	0.8697	-0.0162
C24	0.7904	0.7443	0.1815	H64	0.9409	0.9581	0.0316
C25	-0.1519	0.2227	0.1243	H65	1.0997	0.8600	0.0230
C26	0.5854	0.4415	0.0762	H66	0.9136	0.6679	-0.0189
C27	0.4325	0.5005	0.2333	H67	1.0529	0.6293	0.0199
F28	0.2100	0.3820	0.0251	H68	0.8640	0.5745	0.0257
C29	0.5694	0.5442	0.2072	H69	0.7752	0.7851	0.0338
C30	0.8956	0.7650	0.0399	H70	0.7087	0.4513	0.0715
F31	-0.0040	0.3354	0.0005	H71	0.5635	0.3648	0.0972
C32	-0.0935	0.2269	0.0831	H72	0.5326	0.4265	0.0453
F33	0.1425	0.1946	0.0181	H73	0.2091	0.6032	0.2400
C34	1.0774	0.7297	0.0973	H75	-0.7132	-0.0216	0.1657
C35	0.9360	0.6480	0.0149				
C36	0.9736	0.8757	0.0185				
CL37	-0.6723	0.0636	0.0976				
CL38	-0.6200	0.1776	0.1776				
C39	-0.7292	0.0689	0.1511				
CL40	-0.8261	0.1021	0.1984				
CL41	-0.5719	0.1649	0.1533				

Таблица 4

Координаты атомов для примера 2с, форма ТНОО-1

Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
N1	0.6241	0.6511	0.1036	H44	0.8469	0.6491	-0.0084
N2	0.5165	0.6586	0.1938	H45	1.0426	0.6769	-0.0009
N3	0.0409	0.4138	0.2209	H46	0.9420	0.5884	0.0369
N4	0.9119	0.7577	0.0893	H47	0.9710	0.8879	-0.0108
N5	0.2188	0.5080	0.1767	H48	0.9644	0.9636	0.0393
N6	-0.1428	0.2821	0.1910	H49	1.1113	0.8600	0.0288
F7	0.2088	0.4068	0.0184	H50	1.1138	0.6612	0.0823
F8	0.1464	0.2269	0.0085	H51	1.1368	0.8124	0.0977
F9	-0.0051	0.3616	-0.0061	H52	1.0715	0.7062	0.1357
O10	0.3873	0.5694	0.1019	H53	0.8967	0.9395	0.1069
O11	0.2971	0.7711	0.1928	H54	0.8364	0.9249	0.1799
C12	-0.0831	0.2960	0.1506	H55	0.9892	0.8264	0.1696
C13	0.0371	0.3738	0.1430	H56	0.6557	0.8698	0.0727
C14	0.5812	0.7621	0.1256	H57	0.6337	0.9476	0.1221
C15	0.0986	0.4345	0.1815	H58	0.7936	0.7360	0.2193
C16	-0.0886	0.2415	0.0746	H59	0.8150	0.6527	0.1711
C17	0.6739	0.8655	0.1071	H60	0.5860	0.8385	0.1901
C18	0.0331	0.3225	0.0673	H61	0.4619	0.7796	0.1196
C19	0.6111	0.7539	0.1748	H62	0.7430	0.6376	0.0952
C20	0.7789	0.7380	0.1846	H63	0.5034	0.3895	0.0665
C21	0.0953	0.3862	0.1014	H64	0.6466	0.4797	0.0433
C22	-0.1446	0.2303	0.1158	H65	0.6742	0.4155	0.0950
C23	0.8438	0.8556	0.1148	H66	0.5931	0.4838	0.1746
C24	0.3673	0.6754	0.2001	H67	0.6760	0.5373	0.2229
C25	-0.0810	0.3420	0.2233	H68	0.4199	0.3911	0.2235
C26	0.8681	0.8418	0.1645	H69	0.4543	0.4982	0.2644
C27	0.5709	0.5348	0.2038	H70	0.2110	0.5756	0.2404
C28	0.8975	0.7762	0.0422	H71	0.2578	0.5312	0.1447
C29	0.2923	0.5573	0.2150	H72	-0.1392	0.3344	0.2555
C30	0.4345	0.4867	0.2295	H73	0.1922	0.4468	0.0960
C31	0.0958	0.3306	0.0236	H74	-0.2394	0.1689	0.1216
C32	0.9346	0.6664	0.0161	H75	-0.1341	0.1904	0.0479
C33	0.9942	0.8828	0.0245	H76	0.7798	0.8064	0.0354
C34	1.0667	0.7324	0.1019	H77	-0.5859	0.2979	0.1468
C35	0.5239	0.5633	0.0937	H78	-0.6934	0.1865	0.0883
C36	0.5916	0.4548	0.0733	H79	-0.5532	0.0802	0.1023
O37	-0.4684	0.1388	0.1701	H80	-0.7442	-0.0491	0.1228
O38	-0.4289	0.2122	0.2075	H81	-0.8828	0.0626	0.1139
O39	-0.7214	0.1782	0.1852	H82	-0.7168	0.0010	0.1956
C40	-0.6079	0.2004	0.1513	H83	-0.8983	0.0662	0.1893
C41	-0.7805	0.0664	0.1760	H84	-0.3123	0.2450	0.2037
C42	-0.6561	0.1265	0.1151				
C43	-0.7758	0.0381	0.1281				

Таблица 5

Координаты атомов для примера 2d, форма E-1

АТОМ	X	Y	Z	АТОМ	X	Y	Z
N1	0.5556	0.6575	0.1971	H40	0.2903	0.5250	0.1486
N2	0.9580	0.7945	0.0952	H41	0.7902	0.6695	0.0980
N3	0.0504	0.4000	0.2167	H42	0.6121	0.8376	0.1960
N4	0.2466	0.4969	0.1788	H43	0.4802	0.7853	0.1289
N5	0.6640	0.6706	0.1083	H44	-0.1345	0.3091	0.2471
O6	0.4235	0.5727	0.1071	H45	0.2219	0.4518	0.0971
O7	0.3141	0.7585	0.2020	H46	0.8518	0.7434	0.2205
C8	0.0563	0.3683	0.1425	H47	0.8769	0.6703	0.1722
C9	0.3945	0.6665	0.2051	H48	-0.2356	0.1657	0.1154
N10	-0.1464	0.2693	0.1855	H49	0.2468	0.5491	0.2421
C11	0.1179	0.4244	0.1805	H50	-0.1137	0.1969	0.0471
C12	-0.0757	0.2900	0.1475	H51	0.9339	0.9678	0.1186
C13	0.5699	0.5796	0.0976	H52	0.6715	0.8931	0.0836
C14	0.6460	0.7574	0.1795	H53	0.6450	0.9623	0.1326
C15	0.6096	0.7741	0.1332	H54	0.5054	0.4773	0.2603
C16	-0.0804	0.3256	0.2169	H55	0.4724	0.3825	0.2172
C17	0.1256	0.3867	0.1021	H56	0.8706	0.9373	0.1867
C18	0.8278	0.7497	0.1874	H57	1.0434	0.8510	0.1741
C19	-0.1350	0.2278	0.1118	H58	0.6429	0.4941	0.1737
C20	0.3307	0.5423	0.2161	H59	0.7309	0.5392	0.2214
C21	-0.0669	0.2438	0.0739	H60	0.5606	0.4154	0.0654
C22	0.8827	0.8818	0.1241	H61	0.6932	0.5215	0.0431
АТОМ	X	Y	Z	АТОМ	X	Y	Z
C23	0.6945	0.8866	0.1168	H62	0.7497	0.4462	0.0892
C24	0.4824	0.4737	0.2271	H63	1.1678	0.6903	0.0868
C25	0.0642	0.3239	0.0689	H64	1.2002	0.8299	0.1107
C26	0.9139	0.8598	0.1701	H65	1.1111	0.7125	0.1393
C27	0.6193	0.5376	0.2034	H66	0.8527	0.8919	0.0459
C28	0.1332	0.3426	0.0264	H67	0.9828	0.7726	-0.0103
C29	0.6490	0.4838	0.0720	H68	1.0893	0.6894	0.0276
F30	0.1426	0.2490	0.0048	H69	0.8751	0.6798	0.0245
F31	0.2603	0.4035	0.0246	H70	1.1045	0.9693	0.0155
C32	1.1203	0.7545	0.1087	H71	1.0868	1.0079	0.0687
C33	0.9653	0.8421	0.0525	H72	1.2197	0.8923	0.0534
C34	0.9802	0.7362	0.0215	H73	-0.3356	0.1901	0.1827
C35	1.1042	0.9365	0.0471	H74	-0.6100	0.2427	0.1853
F36	0.0282	0.4017	0.0020	H75	-0.5435	0.1919	0.1361
O37	-0.4308	0.1231	0.1846	H76	-0.8101	0.1237	0.1519
C38	-0.5696	0.1669	0.1671	H77	-0.6709	0.0043	0.1485
C39	-0.7016	0.0870	0.1643	H78	-0.7374	0.0551	0.1977

Таблица 6

Координаты атомов для примера 2e, форма A-1

Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
O1	0.3737	0.5677	0.1038	H34	-0.1640	0.1792	0.0657
N2	0.6127	0.6388	0.1027	H16	0.1740	0.4180	0.1027
O3	0.3132	0.7830	0.1897	H32	-0.2563	0.1746	0.1343
C4	0.5064	0.5520	0.0949	H24	-0.1168	0.3282	0.2594
N5	0.2190	0.5059	0.1814	H5	0.2557	0.5241	0.1532
C6	0.1016	0.4290	0.1870	H28A	0.4510	0.5073	0.2614
N7	0.9018	0.7409	0.0835	H28B	0.4099	0.3978	0.2297
N8	0.5246	0.6588	0.1932	H30A	0.5706	0.4800	0.1779
C9	0.3746	0.6827	0.1988	H30B	0.6614	0.5265	0.2179
N10	0.0495	0.4145	0.2272	H15	0.2312	0.5873	0.2385
C11	0.5829	0.7591	0.1239	H17	0.5966	0.8294	0.1852
C12	0.0312	0.3644	0.1517	H2	0.7132	0.6191	0.0935
C13	-0.0936	0.2901	0.1617	H18A	0.6668	0.4348	0.0693
N14	-0.1492	0.2774	0.2023	H18B	0.5096	0.4227	0.0469
C15	0.3004	0.5650	0.2162	H18C	0.5363	0.3599	0.0916
C16	0.0858	0.3691	0.1092	H22A	0.8097	0.7261	0.2084
C17	0.6197	0.7499	0.1719	H22B	0.8144	0.6500	0.1655
C18	0.5600	0.4313	0.0739	H11	0.4780	0.7781	0.1200
C19	0.6747	0.8657	0.1038	H19A	0.6550	0.8673	0.0737
F20	0.1808	0.3831	0.0261	H19B	0.6472	0.9456	0.1161
C21	0.0143	0.3015	0.0775	H27A	0.8511	0.9136	0.1702
C22	0.7871	0.7290	0.1785	H27B	0.9840	0.8202	0.1605

Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
C23	0.8454	0.8483	0.1091	H23	0.8972	0.9223	0.0991
C24	-0.0739	0.3401	0.2315	H33A	1.0920	0.6435	0.0741
F25	0.1345	0.1856	0.0238	H33B	1.0747	0.6924	0.1211
C26	0.0743	0.2971	0.0335	H33C	1.1211	0.7863	0.0846
C27	0.8780	0.8348	0.1570	H31	0.7694	0.7749	0.0364
C28	0.4326	0.4864	0.2320	H37A	0.9230	0.8700	-0.0130
F29	-0.0287	0.3175	0.0040	H37B	1.0541	0.8649	0.0205
C30	0.5653	0.5283	0.2038	H37C	0.9089	0.9442	0.0302
C31	0.8750	0.7554	0.0374	H36A	0.8874	0.6527	-0.0172
C32	-0.1674	0.2229	0.1280	H36B	0.8419	0.5709	0.0225
C33	1.0612	0.7135	0.0915	H36C	1.0100	0.6124	0.0161
C34	-0.1156	0.2277	0.0877	H40A	-0.7132	0.1528	0.2120
C35	-0.6607	0.1145	0.1509	H40B	-0.7533	0.0132	0.1994
C36	0.9067	0.6372	0.0125	H40C	-0.8560	0.1249	0.1840
C37	0.9468	0.8688	0.0169	H38A	-0.7948	0.0004	0.1242
C38	-0.7123	0.0511	0.1141	H38B	-0.6331	-0.0032	0.1041
O39	-0.5629	0.1869	0.1523	H38C	-0.7461	0.1041	0.0912
C40	-0.7542	0.0996	0.1900				

Таблица 7

Координаты атомов для примера 2f, форма N-2

Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
C1	-0.1614	0.2577	0.0383	F7	0.6225	0.2634	0.5011
C2	0.0133	0.3873	0.0895	F8	0.7150	0.2806	0.6609
C3	-0.0055	0.3310	-0.0010	F9	0.5345	0.2749	0.6173
C4	-0.0893	0.3603	-0.1048	F10	0.6186	0.2737	0.7242
C5	-0.0096	0.1977	-0.0307	F11	0.7090	0.2767	0.6039
C6	0.1226	0.1850	-0.0004	F12	0.5230	0.2690	0.5624
C7	-0.0693	0.1244	-0.0205	H10A	-0.0413	0.1190	0.1459
C8	0.1708	0.1498	0.1106	H10B	-0.0615	0.0409	0.0911
C9	0.1075	0.0771	0.1147	H11	0.0996	0.2283	0.1837
C10	-0.0234	0.0881	0.0905	H12	0.3217	-0.0767	0.3481
C11	0.2617	0.0045	0.2339	H13A	0.1891	-0.0144	0.4538
C12	0.2925	-0.0262	0.3476	H13B	0.1378	-0.0726	0.3618
C13	0.1771	-0.0254	0.3775	H14A	0.0237	0.0225	0.2848
C14	0.1062	0.0350	0.3075	H14B	0.1156	0.0818	0.3457
C15	0.2367	0.2052	0.2942	H16A	0.1608	0.2374	0.4116
C16	0.2078	0.2604	0.3702	H16B	0.1652	0.3007	0.3293
C17	0.5499	-0.0989	0.6085	H16C	0.2789	0.2786	0.4183
C18	0.4630	-0.0041	0.5011	H17	0.5477	-0.1488	0.6244
C19	0.5492	0.0453	0.5666	H1A	-0.1774	0.3007	0.0757
C20	0.6362	0.0119	0.6505	H1B	-0.1761	0.2143	0.0756
C21	0.5475	0.1213	0.5540	H1C	-0.2111	0.2575	-0.0344

ATOM	X	Y	Z	ATOM	X	Y	Z
C22	0.7226	0.0568	0.7150	H21	0.4899	0.1433	0.4990
C23	0.7201	0.1309	0.7026	H22	0.7832	0.0354	0.7676
C24	0.6306	0.1640	0.6225	H23	0.7779	0.1599	0.7473
C25	0.6233	0.2457	0.6114	H26A	0.3405	0.0047	-0.3327
C26	0.3178	0.0508	-0.3076	H26B	0.3247	0.0893	-0.3570
C27	0.3677	0.1429	-0.1554	H26C	0.2382	0.0477	-0.3035
C28	0.2847	-0.0135	-0.1112	H27A	0.2885	0.1420	-0.1496
C29	0.3985	0.0680	-0.1941	H27B	0.3753	0.1801	-0.2063
C30	0.4839	-0.0499	-0.1192	H27C	0.4198	0.1537	-0.0857
C31	0.4689	-0.1207	-0.0596	H28A	0.2347	0.0287	-0.1160
C32	0.6120	-0.0241	-0.0769	H28B	0.2875	-0.0400	-0.0457
C33	0.6492	-0.0164	0.0464	H28C	0.2545	-0.0451	-0.1725
C34	0.6335	-0.0892	0.1001	H29	0.4782	0.0723	-0.2025
C35	0.5063	-0.1148	0.0626	H2A	-0.0589	0.3951	0.1087
C36	0.6313	0.0922	0.1569	H2B	0.0389	0.4330	0.0656
C37	0.5494	0.1489	0.1804	H2C	0.0717	0.3696	0.1516
C38	0.7946	-0.0826	0.2650	H3	0.0704	0.3241	-0.0167
C39	0.6078	-0.0715	0.2941	H30	0.4704	-0.0619	-0.1962
C40	0.6937	-0.0843	0.4027	H31A	0.3871	-0.1351	-0.0819
C41	0.8124	-0.0650	0.3838	H31B	0.5139	-0.1595	-0.0817
C42	0.8969	0.0402	0.4994	H32A	0.6629	-0.0594	-0.0989
C43	0.9918	0.0223	0.6769	H32B	0.6212	0.0230	-0.1096
C44	0.9164	0.1178	0.5156	H33	0.7326	-0.0036	0.0683
C45	1.0010	0.2152	0.6420	H34	0.6810	-0.1261	0.0750
C46	0.9795	0.1403	0.6212	H35A	0.4983	-0.1624	0.0944
C47	0.9601	0.2664	0.5640	H35B	0.4564	-0.0799	0.0866
C48	0.8959	0.2447	0.4599	H37A	0.5607	0.1528	0.2573
C49	0.8756	0.1715	0.4360	H37B	0.4700	0.1346	0.1467
C50	0.8489	0.3015	0.3761	H37C	0.5650	0.1957	0.1521
N1	1.0171	0.0906	0.7037	H39A	0.5425	-0.1055	0.2823
N2	0.6368	-0.0622	0.6704	H39B	0.5781	-0.0214	0.2880
N3	0.9331	-0.0075	0.5810	H40A	0.6920	-0.1353	0.4251
N4	0.4627	-0.0749	0.5246	H40B	0.6765	-0.0527	0.4577
N5	0.8420	0.0126	0.4015	H41	0.8743	-0.0960	0.4288
N6	0.6777	-0.0849	0.2178	H43	1.0183	-0.0115	0.7327
N7	0.5849	0.0426	0.0803	H45	1.0440	0.2303	0.7105
N8	0.4025	0.0106	-0.1105	H47	0.9746	0.3161	0.5795
N9	0.3818	0.0211	0.4149	H49	0.8344	0.1575	0.3664
N10	0.1561	0.0378	0.2158	H4A	-0.1020	0.3231	-0.1600
N11	0.1599	0.2000	0.1967	H4B	-0.0560	0.4033	-0.1288
N12	-0.0389	0.2585	0.0355	H4C	-0.1627	0.3731	-0.0908
O1	0.8718	-0.0902	0.2185	H5	0.8235	0.0422	0.3470
O2	0.7359	0.0910	0.2072	H5A	-0.0340	0.2128	-0.1069
O3	0.3220	0.0019	0.1698	H6A	0.1414	0.1536	-0.0548
O4	0.3257	0.1671	0.3217	H6B	0.1615	0.2319	-0.0017
F1	0.7539	0.2815	0.3030	H7	0.5113	0.0460	0.0488
F2	0.9209	0.3190	0.3146	H7A	-0.1528	0.1327	-0.0337
F3	0.8233	0.3648	0.4151	H7B	-0.0576	0.0910	-0.0759
F4	0.8500	0.2791	0.2840	H8	0.2540	0.1393	0.1202
F5	0.9132	0.3571	0.3931	H9	0.3825	0.0671	0.3986
F6	0.7377	0.3127	0.3710	H9A	0.1212	0.0462	0.0565

Таблица 8

Координаты атомов для примера 2g, форма AN-1

Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
N1	0.3835	0.0757	0.0375	H21	-0.1570	0.4019	0.0806
N2	0.7286	-0.0185	0.1260	H6	0.2566	0.2184	0.1457
N3	0.2667	0.0953	-0.1106	H15	-0.1768	0.3372	-0.0677
O4	0.4406	0.1041	0.2348	H20	0.1322	0.1240	-0.2309
C6	0.1693	0.2426	0.1013	H1	0.3709	0.0824	0.1036
N7	0.6875	0.0647	0.3206	H17	0.4819	-0.0292	-0.0463
C8	0.0362	0.2388	-0.0548	H28A	0.7603	0.0328	-0.0600
O9	0.5030	-0.1317	0.1098	H28B	0.6637	0.1325	-0.0383
C10	0.5797	-0.0561	0.0855	H24A	0.7555	0.1274	0.1175
N11	0.9744	0.0244	0.4480	H24B	0.9167	0.0696	0.0774
C12	0.0569	0.3162	0.1260	H19	0.8001	-0.1313	0.2000
C5	0.1605	0.2026	0.0109	H22A	1.0680	-0.0427	0.1790
C13	0.2745	0.1240	-0.0211	H22B	1.0006	0.0401	0.2458
N14	0.0255	0.2060	-0.1450	H29A	1.0737	-0.1556	0.3001
C15	-0.0858	0.3132	-0.0252	H29B	1.1889	-0.0637	0.3299
C16	0.5624	0.1278	0.2890	H27	1.0060	-0.1224	0.4487
C17	0.5237	0.0103	0.0054	H23A	0.6964	-0.0882	0.4334
C18	1.1544	0.0668	0.4534	H23B	0.7596	-0.1700	0.3643
C19	0.8045	-0.0612	0.2107	H25	0.5708	-0.0620	0.2829
C20	0.1422	0.1402	-0.1658	H7	0.7807	0.0874	0.3623
C21	-0.0752	0.3517	0.0617	H34A	0.6865	0.2365	0.3642
C22	0.9970	-0.0294	0.2320	H34B	0.4795	0.2484	0.3581
C23	0.7649	-0.1008	0.3793	H34C	0.5937	0.2759	0.2722
C24	0.7898	0.0709	0.0816	H36A	0.7774	-0.0065	0.5345
C25	0.6909	-0.0417	0.2964	H36B	0.8886	0.0871	0.5638
C26	0.6097	0.2153	0.6473	H36C	0.9671	-0.0190	0.5809
C27	0.9604	-0.0758	0.4035	H18	1.1968	0.0630	0.3910
C28	0.6935	0.0679	-0.0147	H35A	1.4009	0.0440	0.5102
C29	1.0708	-0.0864	0.3149	H35B	1.3030	-0.0555	0.4859
F30	0.1149	0.3018	0.2839	H35C	1.2530	0.0042	0.5751
C31	1.1447	0.1747	0.4843	H31A	1.2617	0.2028	0.4883
C32	0.0681	0.3603	0.2194	H31B	1.0911	0.1790	0.5441
F33	-0.0775	0.3987	0.2482	H31C	1.0736	0.2106	0.4391
Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
C34	0.5829	0.2314	0.3240	H37A	0.5614	0.1191	0.7457
C35	1.2896	0.0095	0.5118	H37B	0.5364	0.2293	0.7767
C36	0.8948	0.0210	0.5396	H37C	0.7279	0.1858	0.7670
C37	0.6085	0.1849	0.7418				
N38	0.6123	0.2421	0.5722				
F39	0.1781	0.4283	0.2274				

Таблица 9

Координаты атомов для примера 2h, форма H4-1, HCl

Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
N1	-0.1488	0.2098	-0.0343	H42	0.3077	0.3275	0.1257
O2	0.3490	0.4972	0.0272	H43	0.1538	0.2201	0.0743
N3	0.2326	0.3477	0.0060	H44	0.5279	0.4347	0.1149
N4	0.2975	0.2676	0.0466	H45	0.7124	0.4674	0.0613
N5	0.0807	0.4627	0.0181	H46	0.4192	0.2973	0.0255
N6	0.5197	0.3793	0.0531	H47	0.2578	0.0900	0.0153
F7	-0.0010	0.2280	0.0989	H48	0.1288	0.1011	0.0254
O8	0.1939	0.6851	0.0181	H49	0.0936	0.1554	-0.0028
C9	0.2189	0.4432	-0.0048	H50	0.2571	0.2098	-0.0092
C10	0.3038	0.3881	0.0205	H51	0.3036	0.5397	-0.0022
N11	0.5990	0.4425	0.0823	H52	0.2392	0.5114	-0.0309
C12	0.0927	0.4487	-0.0003	H53	0.2974	0.4009	-0.0274
C13	-0.0342	0.3317	-0.0074	H54	0.0792	0.2199	-0.0265
C14	0.3955	0.3262	0.0584	H55	0.1025	0.3114	-0.0456
C15	0.4700	0.3861	0.0880	H56	-0.0076	0.4161	-0.0330
C16	0.3630	0.3248	0.0764	H57	-0.0551	0.2416	-0.0013
C17	0.1395	0.5810	0.0261	H58	-0.1201	0.3469	-0.0044
C18	0.3194	0.2774	0.0280	H59	0.0964	0.5331	-0.0071
C19	-0.1511	0.2151	-0.0542	H60	0.1837	0.6722	0.0512
C20	0.1983	0.2123	0.0011	H61	0.0338	0.5217	0.0502
C21	0.0952	0.3112	-0.0319	H62	0.1844	0.5224	0.0503
C22	-0.0230	0.3271	-0.0270	H63	-0.2772	0.1614	-0.0127
C23	0.2130	0.2691	0.1003	H64	-0.2760	0.2805	-0.0267
C24	0.2222	0.4228	-0.0243	H65	-0.3579	0.1133	-0.0329
C25	0.2358	0.2673	0.0829	H66	-0.0504	0.2577	-0.0592
C26	0.4468	0.3881	0.1058	H67	-0.1794	0.3278	-0.0737
C27	0.3218	0.3305	0.1117	H68	-0.3053	0.2578	-0.0581
C28	0.1344	0.5769	0.0455	H69	-0.1526	0.3966	-0.0528
C29	-0.2730	0.1906	-0.0263	H70	-0.2410	0.0701	-0.0746
F30	0.0717	0.2300	0.1235	H71	-0.1946	0.0132	-0.0562
C31	0.2191	0.1567	0.0180	H72	-0.3347	0.0316	-0.0554
C32	0.6135	0.4326	0.0655	H73	-0.1530	0.1183	-0.0305
F33	0.0240	0.0760	0.1070	H74	0.0220	0.3750	0.0260
Атом	X	Y	Z	Атом	X	Y	Z
C34	0.0782	0.2012	0.1072	H75	0.1982	0.2109	0.0512
C35	-0.2346	0.0735	-0.0609	H76	0.2980	0.8016	0.0030
C36	-0.1999	0.3066	-0.0603	H77	0.4177	0.8365	-0.0131
CL37	0.0168	0.2311	0.0469	H78	-0.2680	0.2326	0.0385
O38	-0.1364	0.0296	0.0183	H79	-0.2444	0.1328	0.0235
O39	0.3598	0.8724	-0.0063	H80	-0.2485	0.2185	0.0683
O40	-0.2980	0.1857	0.0261	H81	-0.1126	0.2683	0.0544
O41	-0.1879	0.2915	0.0585	H82	-0.0947	0.0714	0.0059
				H83	-0.0825	0.1005	0.0284

Характеристические положения пиков в порошковой рентгенограмме (градусы $2\theta \pm 0,1$)@ RT для примеров 2a, b, d, e, f, g и h, получены из высокоточной диаграммы, полученной на дифрактометре (CuK α) с вращающимся капилляром с 2θ , калиброванным с NIST другим подходящим стандартом.

Таблица 10

Эксп. 2a	Эксп. 2b	Эксп. 2d	Эксп. 2e	Эксп. 2f	Эксп. 2g	Эксп. 2h
8.1	10.0	5.5	10.1	7.2	6.3	6.9
11.7	11.4	9.6	11.3	8.7	9.0	8.7
13.0	11.9	11.4	11.9	9.7	11.7	9.8
13.9	14.3	14.5	13.3	12.5	15.0	10.3
16.6	15.6	15.8	14.2	12.8	17.6	11.8
17.0	16.5	16.6	15.6	13.3	18.6	13.5
17.6	19.1	18.4	16.8	16.0	19.7	15.0
21.1	19.4	19.2	19.0	16.6	20.7	18.8
23.2	20.2	20.0	19.5	18.2	21.4	21.4
23.9	21.2	23.6	20.4	18.8	23.8	22.9

Сравнительные фармакологические характеристики

Анализы и данные сравнения фармакологических характеристик соединений из примера 1 и соединений из Международной патентной заявки WO 2005021500 (соответствующей патенту США № 7163937, принадлежащему настоящему заявителю) представлены ниже.

Связывание человеческих мононуклеарных клеток периферической крови ("CCR2 связывание").

См. также Yoshimura et al., J. Immunol. 1990, 145, 292. Анализ связывания человеческих CCR2 проводят на человеческих мононуклеарных клетках периферической крови (hPBMCs) с применением ¹²⁵I-человеческого MCP-1 в качестве меченого лиганда. hPBMCs выделяют из человеческого лейкопака (обогащенной лейкоцитами цельной человеческой крови) (Biological Specialty Inc.) по стандартному протоколу с фиколлоном-хипаком (Ficoll-Нураке, Mediatech Cellgro). Выделенные hPBMCs отмывают и разводят до концентрации 1×10^7 /мл в связывающем буфере (RPMI-1640, 0,1% BSA, 20 mM ХЕПЕС (Hepes), pH 7,4). ¹²⁵I-MCP-1 (NEN/Perk Elmer) разводят до концентрации 0,45 нМ в связывающем буфере. Соединение разводят в связывающем буфере в 3 раза по сравнению с конечными концентрациями, используемыми в анализе связывания. Анализ связывания проводят, используя 96-луночный фильтрационный (фильтрующий) планшет (Millipore). Связывание тотального ¹²⁵I-MCP-1 оценивают следующим образом: для каждой реакции общим объемом 150 мкл прибавляют 5×10^5 клеток, 0,15 нМ ¹²⁵I-MCP-1 и соединение таким образом, чтобы конечная концентрация была в интервале от 0 до 100 нМ. Планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем трижды отмывают с помощью RPMI-1640, 0,1% BSA, 0,4 M NaCl, 20 mM Hepes, pH 7,4, используя фильтрацию в вакууме через манифолд (Millipore). После отмывки планшет сушат на воздухе в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляют 25 мкл Microscint 20. Планшет герметизируют и считывают на Trilux в течение 1 мин. Неспецифическое связывание определяют в присутствии 300 нМ холодного MCP-1 (PeptoTech Inc.). Специфически связанный ¹²⁵I-MCP-1 рассчитывают как разность между тотальным и неспецифическим связыванием. IC₅₀ определяют как концентрацию конкурентного соединения, необходимую для снижения специфического связывания на 50%.

Перенос hERG.

Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие hERG каналы, выращивают (37°C, 5% CO₂) в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла, дополненной 10% Sigma фетальной бычьей сывороткой, заменимых аминокислот, 2 mM L-глутамин и 500 мкг/мл G418, в инкубаторе. Для извлечения клеток из склянок (колб) используют буфер для диссоциации клеток, затем клетки помещают в 384-луночные черные/прозрачные плашки Корнинга с иммобилизованным на них поли-D-лизином при плотности 2×10^4 клеток на лунку (20 мкл) в 10% сывороточной среде и инкубируют в течение 15-24 ч при 37°C в 5% CO₂ до образования монослоя.

2 mM исходного раствора красителя ВТС-АМ (Molecular Probes, Eugene, OR) готовят в 100% ДМСО (DMSO), а затем добавляют в соотношении 1:1 к 10% (вес./об.) плуроновой кислоты в день анализа. Затем краситель разводят в hERG внешнем EP буфере (140 mM NaCl, 4,0 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,0 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,3 и 10 mM глюкозы; все компоненты буфера получены от Sigma Chemical). Эту смесь красителя ВТС (30 мкл) добавляют к клеткам и получают конечную нагрузочную концентрацию 2,5 мкМ. Клетки инкубируют при 21°C в течение 45 мин.

Тестируемые соединения разводят в 60 мкл ДМСО до концентрации 10 mM. Затем готовят серийные разведения этих соединений в ДМСО в соотношении 1:2 в рядах 1-10 и 11-20 384-луночной плашки. Аналитические плашки получают, отбирая 2,5 мкл из плашки с серийным разведением в ДМСО, которую готовят на Velocity 11 BioCel. Водные плашки создают, добавляя 48 мкл EP буфера, а затем разводят за 30-45 до того, как аналитический образец считывают на FLIPR. После внесения красителя разведенные в воде соединения добавляют к клеткам планшетов в тройном повторе (10 мкл), получают десять точек в интервале концентраций от 80 мкМ до 0,156 нМ. Конечная концентрация ДМСО в пробе составляет 1%. Готовят и разводят аналитические плашки с водным раствором с помощью устройства для жидкостей Cybio.

Клетки, нагруженные красителем, считывают на FLIPR384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), который возбуждает краситель с помощью полосы 488 нм аргонового лазера. Эмиссию отфильтровывают, используя фильтр с полосой пропускания 540 ± 30 нм. Открытие hERG каналов стимулируют, добавляя 20 мкл/лунка EP буфера, содержащего 66 mM K₂SO₄ и 1,3 mM Ti₂SO₄ (Sigma/Aldrich). Для каждой плашки данные собирают за период 12 секунд, в этот момент добавляют Ti⁺-содержащий стимулирующий буфер. Сбор данных проводят каждую секунду в течение 48 с, а затем в течение 2 мин собирают данные каждые 3 секунды.

Динамический интервал анализа определяют, используя контрольные и суммарные (общие, тотальные) лунки. Суммарные лунки (ряды 21 и 22) определяют максимальную активацию hERG для плашки (отсутствует тестируемое соединение), а контрольные лунки (ряды 23 и 24) определяют 100% ингибирование hERG. Контрольные лунки содержат 400 нМ любого стандартного ингибитора hERG дофетилида (Ficker et al., 1998) или E-4031. Приблизительные опорные точки в каждой лунке для образца сначала корректируют по переменной клетка/сигнал, фону негативного контроля (контроль) и нормализуют по

позитивному контролю (суммарному, totals), используя программу FLIPR он-лайн. Затем строят кривые концентрация тестируемых соединений - отклик для данных переноса hERG Ti^+ , используя Excel Fit (ID Business Solutions Limited, Surrey, UK), с помощью логистического уравнения для одной точки $Y=A+((B-A)/1+((C/X)^D))$, где A=максимальное ингибирование. Данные анализируют, устанавливая максимальную амплитуду изменения флуоресценции для Ti^+ переноса для данного условия тестируемого соединения. Активность (значения IC_{50}) соединений рассчитывают как среднее тройного повтора лунок.

Анализ связывания натриевого канала по сайту 2.

См. также W.A. Catterall, et al. J. Biol. Chem. 1981, 256, 8922. Стандартный буфер для связывания содержит 50 мМ HEPES, 50 мМ Трис-НСl, pH 7,4, 130 мМ холинхлорида, 5,4 мМ KCl, 0,8 мМ MgCl_2 , 5,5 мМ глюкозы, 40 нг/мл LqT. Реакции связывания иницируют, добавляя синапсомы (приготовленные из головного мозга крыс Wistar) к реакционной смеси, содержащей 5 нМ [^3H]-батрахотоксина в стандартном связывающем буфере и тестируемое соединение в заданной концентрации. Затем образцы смешивают и инкубируют при 37°C в течение 60 мин. Реакции прекращают, добавляя охлажденный льдом буфер для отмывки, содержащий 50 мМ HEPES, 50 мМ Трис-НСl, pH 7,4, 1,8 мМ CaCl_2 , 0,8 мМ MgCl_2 и 1 мг/мл альбумина бычьей сыворотки. Синапсомы сразу же собирают на фильтрах из стекловолокна и 3 раза отмывают буфером для отмывки. Радиоактивность [^3H]-батрахотоксина на фильтре считают, используя жидкостной сцинтилляционный спектрометр.

Параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны (РАМРА).

Параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны (РАМРА) включает специально приготовленную комбинацию липида группы лецитина, относящегося к липиду желудочно-кишечного тракта (ЖКТ, GIT). ЖКТ (GIT) липид применяют для получения мембраны при сборке слоистой пластины, аналогично той, которую используют в анализах Ca_{50} -2. ЖКТ липид очень похож на *in vivo* мембраны по своему составу и поведению, как определено на стандартных соединениях, о которых известно, что они пассивно всасываются в организме человека, known to be. РАМРА широко применяется в качестве *in vitro* модели для скрининга проницаемости открытых соединений. Скорость прохождения соединений через мембрану РАМРА используют для определения коэффициента проницаемости (P_c), который может быть связан с *in vivo* пассивной проницаемостью соединения.

Коэффициент проницаемости (P_c) конкретного соединения изучают в pH-зависимых условиях при pH апикального и базолатерального доменов 7,4. Все определения в экспериментах делают в тройном повторе.

Соединения (10 мМ исходные растворы в 100% ДМСО) разводят 1:100 в pH 7,4 буфере для донорных лунок (pION CAT № 110151), получая 100 мкл аналитического раствора в 1% ДМСО (DMSO). Соединение разводят в буфере для донорских лунок и переносят на планшет Whatman Unifilter и фильтруют перед тем, как распределить 200 мкл в донорную лунку аналитического планшета (pION CAT № 110163). Мембрана РАМРА образуется при нанесении пипеткой 4 мкл раствора липида (pION CAT № 110169) на фильтрационный планшет (VWR CAT № 13503). Затем мембрану покрывают 200 мкл буфера для акцепторных лунок при pH 7,4 (pION CAT № 110139). Аналитический планшет РАМРА (донорная сторона и акцепторная сторона) объединяют и оставляют инкубироваться при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем планшет разбирают и заполняют спектрофотометрические планшеты (VWR CAT № 655801) (150 мкл/лунка). Донорные, акцепторные, эталонные и контрольные планшеты читают на планшет-ридере SpectraMax UV. Данные регистрируют с помощью программного обеспечения pION, которое позволяет анализировать спектры и дает значения P_c .

Хемотаксис CCR2.

Анализ хемотаксиса человеческих CCR2 проводят при использовании клеток моноцитарной линии человека, THP-1. Сначала клетки THP-1 метят флуоресцентным красителем Calcein-AM в не содержащей фенол красной и BSA среде RPMI-1640 (pH 7,4) при 37°C в течение 30 мин при слабом перемешивании в течение 15 мин. Затем меченые клетки отмывают и ресуспендируют при плотности 1×10^5 /мл в буфере для хемотаксиса (среда RPMI-1640 без фенола красного, 0,1% BSA, pH 7,4). Тестируемое соединение разводят в буфере для реакции хемотаксиса таким образом, что концентрация при конечном анализе составляет интервал от 0,01 нМ до 1 мкМ. Лиганд MCP-1 (PergoTech Inc.) разводят до концентрации 20 нМ в буфере для проведения хемотаксиса. Для проведения анализа определенный (равный) объем разведенный тестируемого соединения смешивают с равным объемом меченых THP-1 клеток (смесь 1) и равный объем разведенный тестируемого соединения смешивают с равным объемом разведенного лиганда MCP-1 (смесь 2). Обе смеси независимо инкубируют при 37°C в течение 10 мин с последующим слабым перемешиванием. Индуцированный MCP-1 хемотаксис затем измеряют в плашке для хемотаксиса (Veston Dickinson), помещая 50 мкл смеси 1 в верхнюю камеру и 225 мкл смеси 2 в нижнюю камеру. Плашку накрывают крышкой и инкубируют при 37°C в течение 30 мин. Спустя 30 мин планшет считывают на планшет-ридере Cytofluor. Все условия воспроизводят в двойном повторе. Для определения отношения сигнал/шум 50 мкл одних меченых клеток THP-1 (5×10^4 /лунка) помещают в верхнюю камеру и 225 мкл одного лиганда MCP-1 помещают в нижнюю камеру (конечная концентрация 10 нМ). Ингибирование, достигаемое при постепенно изменяющихся концентрациях тестируемого соединения, рассчитывают как

процентное содержание свободного от соединения контрольного МСР-1. IC_{50} определяют как концентрацию тестируемого соединения, необходимую для достижения 50% ингибирования хемотаксиса клеток.

Открытие/закрытие hERG (пэтч-кламп).

Метод пэтч-кламп цельных клеток применяют для непосредственного измерения токов hERG в клетках HEK-293, стабильно экспрессирующих субъединицу α калиевого канала hERG. Соединение проверяют в водном буфере с pH 7,4 при комнатной температуре. Применяют циклические тестовые импульсы (0,05 Гц) от исходного потенциала -80 до 20 мВ в течение 2 с и хвостовые токи вызывают после тестовых импульсов, последовательно изменяя напряжение до -65 мВ. Эффекты соединений рассчитывают, измеряя ингибирование пикового (максимального) хвостового тока.

Открытие/закрытие (пэтч-кламп) натриевого канала.

Метод пэтч-кламп цельных клеток применяют для непосредственного измерения внутренних натриевых токов в клетках HEK-293, экспрессирующих ген SCN5A, кодирующий сердечный натриевый канал человека. Соединение тестируют в безбелковом водном буфере. Для определения равновесного ингибирования натриевые токи вызывают каждые 5 секунд, используя следующий протокол разности потенциалов: клетки выдерживают при напряжении -90 мВ и постепенно за 60 мс доводят до -20 мВ. Эффекты рассчитывают, измеряя ингибирование пикового (максимального) тока во время тестового импульса до -20 мВ. Зависимость ингибирования от частоты определяют, стимулируя при частотах 1 и 4 Гц.

Фармакокинетика однократной дозы у крыс.

Для фармакокинетических исследований берут самцов крыс Спрага-Довули (Sprague-Dawley) (250-300 г). Крыс не кормят в течение ночи перед ПО (пероральным, PO) введением дозы и кормят через 4 ч после введения дозы. Образцы крови (~0,3 мл) берут из яремной вены в пробирки, содержащие K_2EDTA , а затем центрифугируют при 4°C (1500-2000×g), получая плазму. В исследовании биодоступности при пероральном введении 2 группы животных (N=2-3 в группе) получают тестируемое соединение либо внутривенной (BV, IV) инфузией (в течение 10 мин) в яремную вену, либо с помощью зонда через рот. Серийные образцы крови отбирают через 0,17 (только для BV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы. Образцы плазмы, полученные в результате центрифугирования при 4°C (1500-2000×g), хранят при -20°C до момента анализа с помощью LC/MS/MS.

Фармакокинетика однократной дозы у обезьян.

Фармакокинетику различных тестируемых соединений проверяют на самцах обезьян циномоглус в перекрестном (кроссовер) исследовании. Обезьян не кормят в течение ночи перед ПО (пероральным, PO) введением дозы (натощак) и кормят через 4 ч после введения дозы. Группа из 1-3 животных (3-5 кг) получает тестируемое соединение внутривенной (BV, IV) инфузией (в течение 10 мин) в бедренную вену либо с помощью зонда через рот с недельным вымыванием между введениями соединения. Серийные образцы крови (~0,3 мл) отбирают из бедренной артерии через 0,17 (только для BV), 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч после введения дозы и центрифугируют при 4°C (1500-2000×g), получают плазму. Образцы хранят при -20°C до момента анализа с помощью LC/MS/MS.

Анализ результатов фармакокинетических анализов.

Фармакокинетические параметры получают некомпаратментным модельно-независимым анализом данных концентрации в плазме во времени (программное обеспечение KINETICA™, Версия 4.2, Inna-Phase Corporation, Philadelphia, PA). Максимальную концентрацию (C_{max}) и время C_{max} регистрируют непосредственно во время экспериментальных наблюдений. Площадь под кривой от времени ноль до времени отбора последнего образца ($AUC(0-T)$) рассчитывают, используя комбинацию линейного и \log (логарифмического) трапецеидального суммирования. Тотальный плазматический клиренс (CL_{Tr}), стационарный объем распределения (V_{ss}), средний (кажущийся) полупериод выведения ($T_{1/2}$) и среднее резидентное время (MRT) определяют после BV (IV) введения. Определение $T_{1/2}$ проводят, используя минимум 3 временные точки с количественно измеримыми концентрациями. Абсолютную биодоступность (F) при пероральном введении определяют как отношение нормализованных по дозе значений AUC после пероральной и внутривенной доз.

Ниже приводятся данные для каждого соединения, полученные в описанных выше анализах.

Таблица 11

Сравнительные данные in vitro

Соединение	CCR2 связывание IC ₅₀ (нМ)	Перенос hERG (FLUX) IC ₅₀ (нМ)	Связывание Na ⁺ канала (% ингибирования)	РАМРА проницаемость (нМ/сек)
Пример 12as, WO2005021500	0.27 (1)	2800	Отсутствует	Отсутствует
Пример 12aj, WO2005021500	0.43 ± 0.06 (2)	770	Отсутствует	Отсутствует
Пример 2k, WO2005021500	0.88 ± 0.60 (23)	51000	97%, 10000 нМ	529 ± 157 (9)
Пример 12bd, WO2005021500	1.15 ± 0.07 (2)	>80000	54%, 10000 нМ	392
Пример 8a, WO2005021500	1.83 ± 0.80 (12)	>80000	3%, 10000 нМ 33%, 30000 нМ	94 ± 58 (10)
Пример 8e, WO2005021500	2.20 ± 0.03 (2)	>80000	6% 10000 нМ	2 ± 2 (2)
Пример 9c, WO2005021500	0.96 ± 0.26 (19)	>80000	48%, 10000 нМ 75%, 30000 нМ	145 ± 71 (8)
Пример 1 Настоящее изобретение	1.14 ± 0.69 (18)	>80000	0%, 10000 нМ; 21%, 30000 нМ	443 ± 114 (4)

Таблица 12a

Дополнительные сравнительные данные in vitro

Соединение	CCR2 Хемотаксис IC ₅₀ (нМ)	hERG пэтч кламп (% ингиб.)	пэтч-кламп Na ⁺ канала (% ингиб.)
Пример 2k, US Pat. 7163937	0.24 ± 0.16 (12)	83%, 10000 нМ	52%, 10000 нМ 90%, 30000 нМ
Пример 8a, WO2005021500	2.63 ± 1.24 (4)	4%, 10,000 нМ	22%, 10000 нМ 49%, 30000 нМ
Пример 9c, WO2005021500	0.21	4%, 10,000 нМ	19%, 10000 нМ 39%, 30000 нМ
Пример 1 Настоящее изобретение	0.67 ± 0.42 (22)	33%, 10,000 нМ 61%, 30,000 нМ	17%, 10,000 нМ 19%, 30000 нМ

Таблица 12b

Сравнительные in vivo фармакокинетические данные на крысах

Соединение	Доза IV/PO (мг/кг)	С1 (мл/мин/кг)	F%	Пероральн. AUC (нМ*час)
Пример 2k, WO2005021500	2.5 / 25	40	68	9294
Пример 8a, WO2005021500	6/72	42	1.4	690
Пример 9c, WO2005021500	4/43	54	14	1855
Пример 1, Настоящее изобретение	2/10	43	51	3794

Таблица 12c

Сравнительные in vivo фармакокинетические данные на обезьянах

Соединение	Доза IV/PO (мг/кг)	С1 (мл/мин/кг)	F%	Пероральн. AUC (нМ*час)
Пример 2k, WO2005021500	1/1.4	25	46	862
Пример 8a, WO2005021500	1/11	14	9.4	1896
Пример 9c, WO2005021500	1/10	12	26	6763
Пример 1, Настоящее изобретение	1/1.3	23	47	836

Полезность

С помощью анализов, известных специалистам в данной области техники, показано, что репрезентативные соединения из примеров являются модуляторами активности хемокиновых рецепторов. В данном разделе описываем такие анализы и даем ссылки на литературу. Другие анализы представлены в данном описании в разделе "Сравнительные фармакологические характеристики", см. выше. Обнаруживаемая активность в этих анализах антагонизма МСР-1, ожидают, что соединения из примеров будут полезны при лечении заболеваний, ассоциированных с хемокинами и их родственными (когнатными, узнаваемыми) рецепторами. Активность в этих анализах определяют как активность соединения, демонстрирующего IC₅₀ при концентрации 30 мкМ или ниже при измерении в конкретном анализе.

Антагонизм МСР-1 связывания с человеческими РВМС.

(Yoshimura et al., *J. Immunol.* 1990, 145, 292).

По меньшей мере одно из соединений, описанных в примерах, проявляет активность в антагонизме МСР-1 связывания с человеческими РВМС (человеческими мононуклеарными клетками периферической крови), представленную в данном описании.

Фильтрационные планшеты Millipore (№ МАВВN1250) обрабатывают 100 мкл связывающего буфера (0,5% альбумина бычьей сыворотки, 20 мМ буфера НЕРЕС и 5 мМ хлористого магния в среде RPMI 1640) в течение 30 мин при комнатной температуре. Для измерения связывания 50 мкл связывающего буфера, в присутствии или в отсутствие соединения в известной концентрации, смешивают с 50 мкл меченного с помощью ¹²⁵I человеческого МСР-1 (до получения конечной концентрации "радиолиганда" (лиганда с радиоактивной меткой) 150 пМ) и 50 мкл связывающего буфера, содержащего 5×10⁵ клеток. Клетки, применяемые в таких анализах связывания, могут включать человеческие мононуклеарные клетки периферической крови, выделенные центрифугированием в градиенте: фиколла-хипака, человеческие моноциты (Weiner et al., *J. Immunol. Methods.* 1980, 36, 89) или клетки линии ТНР-1, которые экспрессируют эндогенный рецептор. Смесь соединения, клеток и радиолиганда инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшеты помещают на вакуумный манифолд, подают вакуум и планшеты трижды промывают связывающим буфером, содержащим 0,5 М NaCl. Пластиковую крышку снимают с планшета, планшет оставляют сохнуть на воздухе, лунки выбивают и считают. Процент ингибирования связывания рассчитывают, используя общее число, полученное в отсутствие какого-либо конкурентного соединения, и фоновое связывание, определяемое при добавлении 100 нМ МСР-1 вместо тестируемого соединения.

Антагонизм вызванного МСР-1-инфлюкса кальция.

(Sullivan, et al. *Methods Mol. Biol.*, 114, 125-133 (1999)).

По меньшей мере, какое-нибудь из соединений, описанных в примерах, обладает активностью при антагонизме в анализе вызванного МСР-1-инфлюкса кальция по данному описанию.

Мобилизацию кальция определяют, используя флуоресцентный краситель индикатор Ca²⁺, Fluo-3. Клетки инкубируют при плотности 8×10⁵ клеток/мл в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,1% альбумина бычьей сыворотки, 20 мМ буфера НЕРЕС, 5 мМ глюкозы, 1% фетальной бычьей сыворотки, 4 мкМ Fluo-3 АМ и 2,5 мМ пробенецида в течение 60 мин при 37°C. Клетки, используемые для таких анализов кальция, могут включать человеческие моноциты, выделенные, как описано Weiner et al., *J. Immunol. Methods*, 36, 89-97 (1980), или линии клеток, которые экспрессируют эндогенный ССR2 рецептор, такие как ТНР-1 и МоноМас-6. Затем клетки трижды отмывают в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,1% альбумина бычьей сыворотки, 20 мМ НЕРЕС, 5 мМ глюкозы и 2,5 мМ пробенецида. Клетки ресуспендируют в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,5% альбумина бычьей сыворотки, 20 мМ НЕРЕС и 2,5 мМ пробенецида, в конечной концентрации 2-4×10⁶ клеток/мл. Клетки помещают в 96-луночные с черными стенками микропланшеты (100 мкл/лунка) и планшеты центрифугируют при 200×g в течение 5 мин. В лунки добавляют соединение в различных концентрациях (50 мкл/лунка) и через 5 мин добавляют 50 мкл/лунка МСР-1 до достижения конечной концентрации 10 нМ. Мобилизацию кальция детектируют с помощью флуоресцентного планшет-ридера. Клеточный монослой возбуждают аргонным лазером (488 нМ) и ассоциированную с клетками флуоресценцию измеряют в течение 3 мин (каждую секунду первые 90 секунд и каждые 10 секунд следующие 90 секунд). Данные регистрируют в произвольных единицах флуоресценции, а изменение флуоресценции для каждой лунки определяют как разницу максимум/минимум. Зависимое от соединения ингибирование рассчитывают относительно отклика одного МСР-1.

Антагонизм МСР-1-индуцированного хемотаксиса человеческих РВМС.

(Bacon et al., *Brit. J. Pharmacol.* 1988, 95, 966).

По меньшей мере, какое-нибудь из соединений, описанных в примерах, обладает активностью при антагонизме вызванного МСР-1 хемотаксиса РВМС по данному описанию.

МВА96 - 96-луночная камера для хемотаксиса (Neuroprobe), 96-луночный планшет (Polyfiltronics МРС) и не содержащие поливинилпирролидона PFD5 8-микронные фильтры фирмы Neuroprobe нагревают в инкубаторе при 37°C. Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) (Boyum et al., *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968, 97, 31), свежевыведенные стандартным методом раз-

деления в градиенте плотности фиколла, суспендируют в DMEM при 1×10^7 клеток/мл и нагревают при 37°C. Раствор человеческого MCP-1 с концентрацией 60 нМ также нагревают при 37°C. Необходимые концентрации тестируемых соединений готовят 2× разведением в DMEM. Суспензию PBMC и 60 нМ раствор MCP-1 смешивают 1:1 в пробирках из полипропилена с предварительно нагретым DMEM в присутствии или в отсутствие разведения тестируемых соединений. Эти смеси нагревают в нагревателе для пробирок при 37°C. Для начала анализа добавляют смесь MCP-1/соединение в лунки Polyfiltronics MPC 96-луночного планшета, который помещают в нижнюю часть камеры для хемотаксиса Neugorprobe. Примерный объем в каждой лунке составляет 400 мкл, и после заполнения мениск должен быть положительным (выпуклым). Фильтр 8 мкм осторожно помещают наверх 96-луночного планшета, резиновую прокладку подсоединяют к дну верхней камеры и камеру собирают. В соответствующие лунки верхней камеры добавляют смесь суспензии клеток/соединения в объеме 200. Верхнюю камеру покрывают герметизирующим покрытием (заклеивают) и собранный блок помещают в инкубатор при 37°C на 45 мин. После инкубации снимают герметическое покрытие и всю оставшуюся суспензию клеток отсасывают. Камеру разбирают и фильтр осторожно удаляют. Держа фильтр под углом 90°, немигрировавшие клетки отмывают слабым током фосфатно-солевого буферного раствора и верх фильтра снимают кончиком резинового скребка. Эту отмывку повторяют еще дважды. Фильтр сушат на воздухе, а затем полностью погружают в краситель Райт-Гимза на 45 с. Затем фильтр промывают, замачивая в дистиллированной воде в течение 7 мин, а затем еще в течение 15 с в свежей дистиллированной воде. Фильтр снова сушат на воздухе. Мигрировавшие клетки на фильтре количественно определяют визуально под микроскопом.

Хемокиновые рецепторы млекопитающих представляют собой цель для вмешательства в или для промотирования функции иммунных клеток, таких как человеческие. Соединения, которые ингибируют или промотируют функцию хемокиновых рецепторов, особенно применимы для модуляции функции иммунных клеток для терапевтических целей. Соответственно настоящее изобретение относится к соединениям, которые применимы для предупреждения и/или лечения широкого ряда воспалительных, инфекционных и иммунорегуляторных нарушений и заболеваний, включая астму и аллергические заболевания, инфекцию патогенными микробами (которые, по определению, включают вирусы), а также аутоиммунные патологии, такие как ревматоидный артрит и атеросклероз.

Например, соединение по настоящему изобретению, которое ингибирует одну или более функций хемокинового рецептора млекопитающего (например, человеческого хемокинового рецептора), можно вводить для ингибирования (т.е. уменьшения или предупреждения) воспалительного или инфекционного заболевания. В результате ингибируются один или более воспалительных процессов, таких как эмиграция, адгезия, хемотаксис лейкоцитов, экзоцитоз (например, ферментов, гистамина) или высвобождение медиатора воспаления.

Аналогично, соединение по настоящему изобретению, которое промотирует одну или более функций рецептора хемокина млекопитающего (например, человеческого хемокина) при введении для стимуляции (индукции или усиления) иммунного или воспалительного ответа, такого как эмиграция, адгезия, хемотаксис лейкоцитов, экзоцитоз (например, ферментов, гистамина) или высвобождение медиатора воспаления, приводит к благотворной стимуляции воспалительных процессов. Например, эозинофилы могут рекрутироваться для борьбы с паразитическими инфекциями. Кроме того, лечение вышеуказанных воспалительных, аллергических и аутоиммунных заболеваний может также рассматриваться для соединения по настоящему изобретению, которое промотирует одну или более функций рецептора хемокинов млекопитающего, если рассматривается доставка адекватного соединения с целью вызвать потерю экспрессии рецептора на клетках за счет индукции интернализации хемокинового рецептора или доставка таким образом, который приводит к неправильному направлению миграции клеток.

Помимо приматов, таких как человек, различных других млекопитающих можно лечить способом по настоящему изобретению. Например, можно лечить млекопитающих, включая, но без ограничения, коров, овец, лошадей, собак, кошек, морских свинок, крыс или другие виды бычьих, овечьих, лошадиных, кошачьих, грызунов или мышинных. Однако способ можно применять на практике также на других видах, таких как птицы. Субъект, которого лечат вышеуказанными способами, представляет собой млекопитающее, мужского или женского рода, которому нужна модуляция активности хемокинового рецептора. Предполагается, что "модуляция" по данному описанию охватывает антагонизм, агонизм, частичный антагонизм и/или частичный агонизм.

Связывание CCR5 и функциональный анализ.

Получение клеток и клеточная культура.

Пул клеток HT1080, стабильно экспрессирующих эндогенный CC хемокиновый рецептор 5 (CCR5), расширяют, используя методы, описанные Harrington, Sherf and Rundlett (см. патенты США 6361972 и 6410266). Самые высокоэкспрессирующие клоны выделяют, используя многократную проточную цитометрию с последующим субклонированием. Затем эти клетки культивируют в 6-луночных планшетах при плотности 3×10^5 клеток/лунка и трансфецируют при использовании ДНК вектора, содержащего химерный меченый HA G белок Gqi5 (Molecular Devices; для трансфекции используют 5 мкг линейаризованного ДНК вектора в 15 мкл Ex-Gen от Fermentes). Через два дня после трансфекции лунки объединяют и

засевают в планшеты P100. Через семь дней после засева колонии собирают, размножают и анализируют содержание Gq15 Вестерн-блоттингом. Выбирают клон (обозначенный как 3559.1.6) с высокой экспрессией Gq15 (при использовании трансфекции) и CCR5 (эндогенного) и используют для описанных ниже экспериментов. Клетки HT1080 (клон 3559.1.6) культивируют в альфа-МЕМ, дополненной 10% диализованной фетальной бычьей сывороткой, 2% смесью пенициллин/стрептомицин/глутамин и 500 мкг/мл гигромицина В (конечная концентрация) при 37°C с 5% CO₂ в увлажненной атмосфере.

Препарат мембраны.

Клеточный осадок, содержащий 1×10^8 клеток HT1080 (клон 3559.1.6), ресуспендируют в 5 мл холодного буфера для приготовления (препарата) мембран (Membrane Prep) (50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) и гомогенизируют на высокой скорости на гомогенизаторе Polytron в течение 20 с на льду. Гомогенат разводят в 25 мл буфера Membrane Prep и центрифугируют в течение 12 мин (48000×g при 4°C). Клеточный осадок ресуспендируют в 5 мл буфера для приготовления мембран (Membrane Prep), как описано ранее. Гомогенат разводят в 5 мл буфера для приготовления мембран и определяют концентрацию белка CCR5.

Анализ связывания.

Свежеприготовленный гомогенат препарата мембраны, описанный выше, разводят в связывающем буфере (50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,1% BSA; перед анализом добавляют одну целую таблетку ингибитора протеаз) до конечной концентрации 10 мкг/лунка (цельные белые 96-луночные планшеты от Corning, Inc.). Этот препарат мембраны смешивают с гранулами WGA-SPA (Amersham; предварительно выдержанные в связывающем буфере), получают концентрацию 200 мкг/лунка. Затем смесь мембрана/SPA гранулы (100 мкл/лунка) добавляют в планшет, в который предварительно прикапывают 2 мкл ДМСО, содержащего различные концентрации тестируемых изделий (чистый ДМСО для негативного контроля; различные концентрации соединений по данному изобретению для тестируемых изделий; 500 нМ MIP-1 бета в качестве позитивного контроля). Анализ связывания иницируют, добавляя 50 мкл [¹²⁵I]-MIP-1 бета (Perkin Elmer; берут такое разведение материала, что добавление 50 мкл/лунка дает конечную концентрацию 0,1 нМ [¹²⁵I]-MIP-1 бета). Планшет герметизируют (заклеивают) и оставляют стоять при комнатной температуре в течение 4-6 ч, а затем считают на устройстве Packard TopCount. Рассчитывают процентное содержание для тестируемого соединения с применением негативного и позитивного контролей для определения окна для каждого эксперимента.

Функциональный анализ с помощью флуорометрического визуализирующего планшет-ридера (FLIPR).

Клетки HT1080 (клон 3559.1.6) засевают при плотности 10000 клеток/лунка (30 мкл) в 384-луночные плашки (с черным/прозрачным дном Bioscoat PDL, Beckton Dickinson) и вносят (30 мкл/лунка) флуоресцентный краситель Fluo-4 AM (приготовленный растворением 1 мг Fluo-4 AM в 440 мкл ДМСО и разведенный в 100 мкл плуроновой кислоты перед дальнейшим разбавлением в 10 мл буфера Хэнкса). Клетки инкубируют при 37°C с 5% CO₂ в течение 30 мин, трижды отмывают и суспендируют в аналитическом буфере (20 mM HEPES, 1,2 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM пробенецида, 0,5% BSA, 1× раствора Хэнкса). Готовят серийные разведения тестируемого изделия в ДМСО, а затем разбавляют 1:10 в аналитическом буфере и прибавляют к клеткам (10 мкл/лунка). Используя FLIPR, считывают плашки (10-70 с), определяя индукцию переноса (потока, тока) (т.е. агонистическую активность). Затем к клеткам дополнительно прибавляют раствор агониста (30 мкл/лунка; приготовлен разведением 30 мкл 100-микромольного раствора MIP-1 бета в 100 мл аналитического буфера; по этому протоколу в этом анализе доставляют MIP-1 бета в конечной концентрации 5 нМ) и плашки считывают, используя FLIPR, в течение 1 мин. Антагонистическую активность тестируемого изделия определяют относительно негативного контроля 0,4% ДМСО/Буфер.

Заболевания или патологические состояния человека или представителя другого вида, которые можно лечить ингибиторами функции хемокиновых рецепторов, включают, но без ограничения, воспалительные или аллергические заболевания и патологические состояния, включая респираторные аллергические заболевания, такие как астма, аллергический ринит, легочный аллергоз, гиперчувствительный пневмонит, эозинофильный целлюлит (например, синдром Уэллса), эозинофильные пневмонии (например, синдром Леффлера, хроническая эозинофильная пневмония), эозинофильный фасциит (например, синдром Шульмана), аллергическую реакцию замедленного типа, интерстициальные заболевания легких (ILD) (например, идиопатический легочный фиброз или ILD, ассоциированные с ревматоидным артритом, системная красная волчанка, анкилозирующий спондилоартрит, системный склероз, синдром Шегрена, полимиозит или дерматомиозит); системную анафилаксию или аллергические реакции, аллергии на лекарства (например, на пенициллин, цефалоспорины), синдром эозинофилии-миалгии, вызванный приемом триптофана, содержащего токсичные примеси, аллергии на укусы насекомых; аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, псориаз, рассеянный склероз, системная красная волчанка, тяжелая псевдопаралитическая миастения, юношеский диабет; гломерулонефрит, аутоиммунный тиреоидит, болезнь Бехчета; отторжение трансплантата (например, при трансплантации), включая отторжение аллотрансплантата или болезнь трансплантат против хозяина; воспалительное забо-

ление кишечника, такое как болезнь Крона и язвенный колит; спондилоартропатии; склеродермию (включая псориаз, опосредованный Т-клетками) и воспалительные дерматозы, такие как дерматит, экзема, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, крапивница; васкулит (например, некрозирующий, кожный и аллергический васкулит); эозинофильный фасцит; раковые заболевания с инфильтрацией лейкоцитами кожи или органов. Можно лечить другие заболевания или патологические состояния, в которых требуется ингибировать нежелательные воспалительные реакции, включая, но без ограничения, васкулит, нестабильные атероматозные бляшки, венозную неоинтимальную гиперплазию при поражении после реперфузии, гиперплазию неоинтимы трансплантата при диализе, гиперплазию интимы артериовенозного шунта, атеросклероз, некоторые гематологические злокачественные заболевания, цитокин-индуцированную токсичность, (например, септический шок, эндотоксический шок), полимиозит, дерматомиозит. Инфекционные заболевания или патологические состояния человека или представителя другого вида, которые можно лечить ингибиторами функции хемокиновых рецепторов, включают, но без ограничения, ВИЧ.

Заболевания или состояния человека или представителя другого вида, которые можно лечить ингибиторами функции хемокиновых рецепторов, включают, но без ограничения, иммуносупрессию, такую как у индивидуумов с синдромами иммунодефицита, такими как СПИД или другие вирусные инфекции, индивидуумов, проходящих лечение лучевой терапией, химиотерапией, терапией аутоиммунных заболеваний или лекарственной терапией (например, терапией кортикостероидами), которая вызывает иммуносупрессию; иммуносупрессию вследствие врожденной недостаточности функции рецепторов или другими причинами; и инфекционные заболевания, такие как паразитарные заболевания, включая, но без ограничения, инфекции гельминтов, таких как нематоды (круглые черви) (трихуроз, энтеробиоз, аскаридоз, анкилостома, стронгилоидоз, трихинеллез, филяриатоз); трематоды (сосальщики) (шистосомоз, клонорхоз), цестоды (ленточные черви) (эхинококкоз, тениаринхоз, цистицеркоз); висцеральные черви, висцеральные "блуждающие личинки" (например, Тохосага, эозинофильный гастроэнтерит (например, *Anisaki sp.*, *Phocanema sp.*), синдром "блуждающие личинки", кожный (*Ancylostoma braziliense*, *Ancylostoma caninum*). Поэтому соединения по настоящему изобретению применимы для предупреждения и лечения широкого ряда воспалительных, инфекционных и иммунорегуляторных расстройств и заболеваний.

Помимо этого, при лечении вышеуказанных воспалительных, аллергических и аутоиммунных заболеваний можно также рассматривать функцию промоторов и хемокиновых рецепторов, если рассматривают доставку адекватного соединения с целью вызвать недостаточность экспрессии рецепторов на клетках с помощью индукции интернализации хемокинового рецептора или доставки соединения таким образом, который приведет к неправильному направлению миграции клеток.

В другом аспекте настоящее изобретение можно использовать для оценки предполагаемых специфических агонистов или антагонистов сопряженного (связанного) с G-белком рецептора. Настоящее изобретение относится к применению этих соединений для подготовки и проведения скрининга на соединения, которые модулируют активность хемокиновых рецепторов. Кроме того, соединения по данному изобретению применимы для установления или определения сайта связывания других соединений с хемокиновыми рецепторами, например, через конкурентное ингибирование или в качестве эталона в анализе сравнения его известной активности с активностью соединения с неизвестной активностью. При разработке новых анализов или протоколов соединения по настоящему изобретению можно использовать для проверки их эффективности. Конкретно, такие соединения можно поставлять в виде продажного набора, например, для применения в фармацевтическом исследовании, включающем вышеприведенные заболевания. Соединения по настоящему изобретению применимы также для оценки предполагаемых специфических модуляторов хемокиновых рецепторов. Кроме того, можно использовать соединения по данному изобретению для изучения специфичности сопряженных с G-белком рецепторов, которые, предположительно, не являются хемокиновыми рецепторами, либо в качестве примеров соединений, которые не связываются, либо в качестве структурных вариантов соединений, активных в отношении этих рецепторов, которые могут помочь определить специфические сайты взаимодействия.

Соединения, раскрываемые в данном описании, применимы для лечения или предупреждения расстройств, выбранных из ревматоидного артрита, остеоартрита, септического шока, атеросклероза, аневризмы, лихорадки, сердечно-сосудистых эффектов, гемодинамического шока, септического синдрома, повреждения (миокарда) при постишемической реперфузии, малярии, болезни Крона, воспалительных заболеваний кишечника, микобактериальной инфекции, менингита, псориаза, застойной сердечной недостаточности, фиброзных заболеваний, кахексии, отторжения трансплантата, аутоиммунных заболеваний, кожных воспалительных заболеваний, рассеянного склероза, лучевого поражения, гипероксидного повреждения легких, ВИЧ, деменции, обусловленной ВИЧ, инсулиннезависимого сахарного диабета, астмы, аллергического ринита, атопического дерматита, идиопатического фиброза легких, буллезного пемфигоида, паразитарных инфекций, вызванных гельминтами, аллергического колита, экземы, конъюнктивита, трансплантации, семейной эозинофилии, эозинофильного целлюлита, эозинофильных пневмоний, эозинофильного фасциита, эозинофильного гастроэнтерита, вызванной лекарствами эозинофилии, муковисцидоза, синдрома Черга-Штрауса, лимфомы, болезни Ходжкина, рака толстой кишки, синдрома Фелти, саркоидоза, увеита, болезни Альцгеймера, гломерулонефрита и системной красной вол-

чанки, плоскоклеточного рака пищевода, невропатической боли и ожирения.

В другом аспекте соединения применимы для лечения или предупреждения воспалительных заболеваний, выбранных из ревматоидного артрита, остеоартрита, атеросклероза, аневризмы, лихорадки, сердечно-сосудистых эффектов, болезни Крона, воспалительных заболеваний кишечника, псориаза, застойной сердечной недостаточности, рассеянного склероза, аутоиммунных заболеваний, кожных воспалительных заболеваний.

В другом аспекте соединения применимы для лечения или предупреждения воспалительных заболеваний, выбранных из ревматоидного артрита, остеоартрита, атеросклероза, болезни Крона, воспалительных заболеваний кишечника и рассеянного склероза.

В другом аспекте соединения из примеров, раскрываемые в данном описании, могут применяться для лечения различных раковых заболеваний, включая, но без ограничения, следующие:

карциному, включая карциному мочевого пузыря (в том числе прогрессирующий и метастатический рак мочевого пузыря), молочной железы, толстой кишки (в том числе колоректальный рак), почки, печени, легкого (в том числе мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого и аденокарцинома легкого), яичника, простаты, яичек, мочеполовых путей, лимфатической системы, прямой кишки, поджелудочной железы (в том числе экзокринный рак поджелудочной железы), пищевода, желудка, желчного пузыря, шейки матки, щитовидной железы и кожи (в том числе плоскоклеточная карцинома);

опухоли гемопоэтического происхождения лимфоидной ткани, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, волосково-клеточную лимфому, гистиоцитарную лимфому и лимфому Беркитта;

гемопоэтические опухоли миелоидного происхождения, включая острый и хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром, миелоидный лейкоз и промиелоцитарный лейкоз;

опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванномы;

опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому;

и

другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоактантому, семиному, тиреоидный фолликулярный рак и тератокарциному.

В другом варианте изобретения в данном описании раскрываются способы лечения рака, причем рак выбирают из рака молочной железы, рака печени, рака простаты и меланомы. Кроме того, соединения, раскрываемые в данном описании, могут применяться при лечении рака яичников и множественной меланомы.

Настоящее изобретение включает способы лечения различных нераковых пролиферативных заболеваний.

Комбинированная терапия для предупреждения и лечения воспалительных, инфекционных и иммунорегуляторных расстройств и заболеваний, включая астму и аллергические заболевания, а также аутоиммунные патологии, такие как ревматоидный артрит и атеросклероз, и патологии, отмеченные выше, иллюстрируется с помощью комбинации соединений по данному изобретению и других соединений, принятых для такого применения. Например, при лечении или предупреждении воспаления соединения по данному изобретению могут применяться в сочетании с противовоспалительным агентом или анальгетиком, таким как агонист опиатов, ингибитор липоксигеназ, ингибитор циклооксигеназы-2, ингибитор интерлейкинов, такой как ингибитор интерлейкина-1, ингибитор фактора некроза опухолей, антагонист NMDA, ингибитор оксида азота или ингибитор синтеза оксида азота, нестероидный противовоспалительный агент, ингибитор фосфодиэстеразы, или с цитокин-супрессирующим противовоспалительным агентом, например, таким как ацетаминофен, аспирин, кодеин, фентанил, ибупрофен, индометацин, кеторолак, морфин, напроксен, фенацетин, пироксикам, стероидный анальгетик, суфентанил, сулиндак, интерферон альфа и т.п. Аналогично, соединения по данному изобретению можно вводить с болеутоляющим средством; потенцирующим средством, таким как кофеин, H₂-антагонист, симетикон, гидроксид алюминия или магния; противоотечным средством, таким как фенилэфрин, фенилпропаноламин, псевдоэфедрин, оксиметазолин, эпинефрин, нафтазолин, ксилометазолин или леводезоксифедрин; и противокашлевым средством, таким как кодеин, гидрокодон, карамифен, карбетапентан или декстраметорфан; с диуретиком и седативным или неседативным антигистаминным средством. Аналогично, соединения, раскрываемые в данном описании, можно использовать в комбинации с другими лекарствами, которые применяются для лечения/предупреждения/подавления или уменьшения интенсивности заболеваний или патологических состояний, для которых применяется соединение по данному изобретению. Таким образом, другие такие лекарства можно вводить способами или в количестве, которые применяются обычно, одновременно или последовательно с соединением по данному изобретению. Когда соединение применяется одновременно с одним или более других лекарств, можно использовать фармацевтическую композицию, содержащую, помимо соединения по настоящему изобретению, другие такие лекарства. Следовательно, фармацевтические композиции включают такие композиции, которые также содержат один или более других активных ингредиентов, помимо соединения по данному раскрытию.

Примеры других активных ингредиентов, которые можно объединять с соединением по настоящему изобретению, вводя либо отдельно, либо в тех же самых фармацевтических композициях, включают, но без ограничения:

- (а) антагонисты интегрин, такие как антагонисты селектина, ICAM и VLA-4;
- (б) стероиды, такие как беклометазон, метилпреднизолон, бетаметазон, преднизон, дексаметазон и гидрокортизон;
- (в) иммуносупрессоры, такие как циклоспорин, такролимус, рапамицин и другие иммуносупрессоры FK-506 типа;
- (г) антигистаминные вещества (антагонисты H1-гистамина), такие как бромфенирамин, хлорфенирамин, дексхлорфенирамин, трипролидин, клемастин, дифенилгидрамин, дифенилпиралин, трипеленнамин, гидроксизин, метдилазин, прометазин, тримепразин, азатадин, циклогептадин, антазолин, фенирамин, периламин, астемизол, терфенадин, лоратадин, цетиризин, фексофенадин, декарбоэтоксилоратадин и т.п.;
- (д) нестероидные противовоспалительные средства, такие как b2-агонисты (тербуталин, метапротеренол, фенотерол, изоэтарин, альбутерал, битолтерол и пирбутерол), теофиллин, кромоллин натрия, атропин, ипратропий бромид, антагонисты лейкотриенов (зафирлукаст, монтелукаст, пранлукаст, иралукаст, побилукаст, SKB-102203), ингибиторы биосинтеза лейкотриенов (зилейтон, BAY-1005);
- (е) нестероидные противовоспалительные агенты (НСПВС), такие как производные пропионовой кислоты (алминопрофен, бенксапрофен, буклоксиновая кислота, карпрофен, фенбуфен, фенпрофен, флупрофен, ибупрофен, индопрофен, кетопрофен, миропрофен, напроксен, оксапрозин, пирпрофен, прано-профен, супрофен, тиaproфеновая кислота и тиоксапрофен), производные уксусной кислоты (индометацин, ацеметацин, алклофенак, клиданак, диклофенак, фенклофенак, фенклозиновая кислота, фентиазак, фурофенак, изоксепак, окспинак, сулиндак, тиопинак, толметин, зидометацин и зомепирак), производные фенаминовой кислоты (флуфенаминовая кислота, меклофенаминовая кислота, нифлуминовая кислота и толфенаминовая кислота), производные бифенилкарбоновой кислоты (дифлунизал и флуфенизал), оксикамы (изоксикам, пироксикам, судоксикам и теноксикам), салицилаты (ацетилсалициловая кислота, сульфасалазин) и пиразолон (апозон, бизпиперилон, фепразон, мофебутазон, оксифенбутазон, фенилбутазон);
- (ж) ингибиторы циклооксигеназы-2 (COX-2);
- (з) ингибиторы фосфодиэстеразы типа IV (PDE-IV);
- (и) другие антагонисты рецепторов хемокинов;
- (к) агенты, снижающие уровень холестерина, такие как ингибиторы HMG-COA редуктазы (ловастатин, симвастатин и правастатин, флувастатин, аторвастатин и другие статины), секвестранты (холестирамин и колестипол), никотиновая кислота, производные фенофибриновой кислоты (гемфиброзил, клофибрат, фенофибрат и бензафибрат) и пробукол;
- (л) антидиабетические агенты, такие как инсулин, сульфонилмочевины, бигуаниды (метформин), ингибиторы α -глюкозидазы (акарбоза) и глитазоны (троглитазон и пиоглитазон);
- (м) препараты интерферонов (интерферон альфа-2а, интерферон-2В, интерферон альфа-N3, интерферон бета-1а, интерферон бета-1b, интерферон гамма-1b);
- (н) противовирусные соединения, такие как эфавиренз, индинавир, ганцикловир, ламивудин, фамцикловир и залцитабин;
- (о) другое соединение, такое как 5-аминосалициловая кислота, ее пролекарства, антимаболиты, такие как азатиоприн и 6-меркаптопурин, и цитотоксические в отношении раковых опухолей химиотерапевтические агенты.

Весовое отношение соединения по изобретению ко второму активному агенту может меняться и зависит от эффективных доз каждого ингредиента.

Обычно применяют эффективную дозу каждого ингредиента. Так, например, когда соединение комбинируют с НСПВС, весовое отношение соединения по настоящему изобретению к НСПВС обычно находится в интервале примерно от 1000:1 до примерно 1:1000 или же примерно от 200:1 до примерно 1:200. Комбинации соединения по настоящему изобретению и других активных соединений обычно также находятся в вышеуказанном интервале, следует применять эффективную дозу каждого активного ингредиента.

При лечении рака часто предпочтительной является комбинация химиотерапевтических агентов и/или другой терапии (например, лучевой терапии). Второй (или третий) агент может иметь такой же или различный механизм действия, что и основной (первичный) терапевтический агент. Особенно полезно применять комбинации цитотоксических лекарств, в которых два или более вводимых лекарств действуют различным образом или в различных фазах клеточного цикла, и/или в которых два или более лекарств имеют перекрывающиеся токсичности или побочные эффекты, и/или в которых комбинируемые лекарства проявляют эффективность при лечении конкретного заболевания, имеющегося у больного.

Таким образом, соединения, раскрываемые в данном описании (или другие составы, раскрываемые в данном описании), можно вводить в комбинации с противораковыми и цитотоксическими агентами и с терапией, применимой для лечения рака или других пролиферативных заболеваний. Изобретение по

данному описанию включает далее применение соединений по данному описанию (или других составов, раскрываемых в данном описании) для получения лекарственных препаратов для лечения рака и/или оно включает упаковку соединений по данному описанию вместе с инструкциями, указывающими, что данные соединения должны применяться в комбинации с другими противораковыми или цитотоксическими агентами для лечения рака. Далее настоящее изобретение включает комбинации соединений и один или более дополнительных агентов в виде набора, например, в котором они упакованы вместе или помещаются в отдельных упаковках для совместной продажи в виде набора или в котором они упакованы в виде совместного препарата.

Вторые (или более) противораковые агенты можно выбирать из любого агента из приведенных ниже:

алкилирующие агенты (включая мустины, алкилсульфонаты, нитрозомочевины, производные этиленмина и триазины); антиангиогенные средства (включая ингибиторы матриксных металлопротеиназ); антимиетаболиты (включая ингибиторы аденозиндеаминазы, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пурина и аналоги пиримидина); антибиотики или антители (включая моноклональные антители, CTLA-4 антители, антрациклины); ингибиторы ароматаз;

модификаторы отклика в фазах клеточного цикла; ферменты; ингибиторы фарнезилпротеин трансферазы;

гормональные и антигормональные агенты и стероиды (включая синтетические аналоги, глюкокортикоиды, эстрогены/антиэстрогены [например, SERM], андрогены/антиандрогены, прогестины, агонисты рецепторов прогестерона и агонисты и антагонисты релизинг-фактора лютеинизирующего гормона [ЛГРГ, LHRH]; модуляторы системы инсулиноподобный фактор роста (ИФР, IGF)/рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGFR) (включая ингибиторы IGFR1); ингибиторы передачи сигнала от интегринов; ингибиторы киназ (включая ингибиторы мультикиназы и/или ингибиторы Src киназы или Src/abl, ингибиторы циклин-зависимых киназ [CDK], антители к пан-Her, Her-1 и Her-2, ингибиторы VEGF, включая антители против VEGF, ингибиторы EGFR, ингибиторы митоген-активированного белка [MAP], ингибиторы MEK, ингибиторы аврора киназы, ингибиторы PDGF и ингибиторы других тирозинкиназ или ингибиторы серин/треонин киназ;

агенты для разрушения микротрубочек, такие как эктеинаседины или их аналоги и производные; агенты для стабилизации микротрубочек, такие как таксаны, и природные эпотилоны и их синтетические и полусинтетические аналоги;

агенты, дестабилизирующие связывание с микротрубочками (включая алкалоиды винка); и ингибиторы топоизомераз; ингибиторы пренилпротеин трансферазы; координационные комплексы платины; ингибиторы сигнальной трансдукции и другие агенты, используемые в качестве противораковых и цитотоксических агентов, такие как модификаторы биологического отклика, факторы роста и иммунные модуляторы.

Кроме того, соединения по настоящему изобретению можно приготовить или вводить совместно с другими терапевтическими агентами, которые выбирают в зависимости от их конкретной полезности против побочных эффектов, ассоциированных с вышеописанными состояниями. Например, соединения по изобретению можно приготовить в виде препарата с агентами, предупреждающими тошноту, аллергию (гиперчувствительность) и раздражение желудка, такими как противорвотные агенты и H₁ и H₂ антигистаминные агенты.

Вышеприведенные другие терапевтические агенты, при их использовании в комбинации с соединениями по настоящему изобретению, можно использовать, например, в количествах, указанных в "Настольном справочнике врача" (PDR) или иным способом определенных рядовым специалистом в данной области техники.

Соединения вводят млекопитающему в терапевтически эффективном количестве. Под "терапевтически эффективным количеством" понимают количество соединения по настоящему изобретению, которое при введении его млекопитающему, самостоятельно или в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, эффективно предупреждает или уменьшает болезненное состояние или прогрессирование заболевания.

Дозировка и приготовление препарата

Соединения по данному раскрытию можно вводить в таких пероральных лекарственных формах, как таблетки, капсулы (каждая из которых включает препараты пролонгированного действия или с контролируемым во времени высвобождением), пилюли, порошки, гранулы, эликсиры, настойки, суспензии, сиропы и эмульсии. Их можно также вводить в виде внутривенной (болюс или инфузия), интраперитонеальной, подкожной или внутримышечной формы, причем все используемые лекарственные формы хорошо известны специалистам в области фармации. Их можно вводить самостоятельно, но обычно их вводят с фармацевтическим носителем, подобранным с учетом выбранного способа введения и на основании стандартной фармацевтической практики.

Естественно, лекарственная схема для соединений по настоящему изобретению варьируется в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного агента и способ и места его введения; вид, возраст, пол, самочувствие, медицинские показания и вес реципиента;

характер и степень симптомов; характер одновременного лечения; периодичность введения лекарства, деятельность почек и печени пациента и нужный эффект. Врач или ветеринар может определить и прописать эффективное количество лекарства, требующегося для предупреждения прогрессирования расстройства, противодействия ему или его прекращения.

В качестве общей рекомендации суточная пероральная доза каждого активного ингредиента, для достижения показанного эффекта, находится в примерном интервале 0,001-1000 мг/кг веса тела, или примерно 0,01-100 мг/кг веса тела в день, или же примерно 1,0-20 мг/кг/день. Дозы для внутривенного введения составляют около 1-10 мг/кг/мин при инфузии с постоянной скоростью. Соединения по изобретению можно вводить в виде однократной суточной дозы или суммарная суточная доза может быть разделена на небольшие дозы, вводимые ежедневно два, три или четыре раза. В одном варианте изобретения суточная пероральная доза активного ингредиента составляет 3-600 мг, их вводят либо один раз в день или в виде разделенных доз дважды в день. Или же активный ингредиент можно вводить в виде доз по 10-20 мг дважды в день или по 40-100 мг один раз в день. Или же активный ингредиент можно вводить в виде дозы 12,5 мг дважды в день или 75 мг один раз в день. Или же активный ингредиент можно вводить в виде доз 3, 10, 30, 100, 300 и 600 мг один или два раза в день.

Соединения по данному изобретению можно вводить через нос с помощью подходящих интраназальных носителей или трансдермально, используя трансдермальные пэтки. При введении с помощью трансназальной системы доставки введение лекарства по лекарственной схеме будет скорее постоянным, нежели меняющимся.

Соединения обычно вводят в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, эксципиентами или носителями (все вместе в данном описании они называются фармацевтическими носителями), выбранными соответствующим образом с учетом предполагаемой формы введения, которая представляет собой пероральные таблетки, капсулы, эликсиры, сиропы и т.п., и в соответствии с обычной фармацевтической практикой.

Например, для перорального введения в виде таблетки или капсулы активный компонент лекарства можно смешивать с пероральным нетоксическим фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как лактоза, крахмал, глюкоза, метилцеллюлоза, стеарат магния, дикальцийфосфат, сульфат кальция, маннит, сорбит и т.п.; для перорального введения в жидкой форме компоненты перорального лекарства можно смешивать с любым пероральным нетоксическим фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как этанол, глицерин, вода и т.п. Кроме того, по желанию или при необходимости в смесь можно также вводить подходящие связующие, смазки, агенты, способствующие расщеплению, и красители. Подходящие связующие включают крахмал, желатин, природные углеводы (сахара), такие как глюкоза или бета-лактоза, кукурузный подсластитель, натуральные и синтетические камеди, такие как аравийская камедь, трагакант, или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, воски и т.п. Смазки, применяемые в этих лекарственных формах, включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Агенты, способствующие расщеплению, включают, без ограничения, крахмал, метилцеллюлозу, агар-агар, бентонит, ксантановую камедь и т.п.

Соединения по настоящему изобретению можно также вводить в липосомных системах доставки, таких как небольшие моноламеллярные везикулы, большие моноламеллярные везикулы и мультиламеллярные везикулы. Липосомы можно готовить из различных фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины.

Соединения по настоящему изобретению можно также связывать с растворимыми полимерами в качестве представляющих выгодную мишень носителей лекарственных веществ. Такие полимеры могут включать поливинилпирролидон, сополимер пирана, полигидроксипропилметакриламидфенол, полигидроксиэтиленаспартамидфенол или полиэтиленоксидполилизин с пальмитоильными остатками в качестве заместителей. Кроме того, соединения по настоящему изобретению могут связываться с полимерами класса биоразрушаемых полимеров, применимыми для контролируемого высвобождения лекарства, например, такими как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, сополимеры полимолочной и полигликолевой кислот, поли(эпсилон-капролактон), полигидроксималяная кислота, полиортоэферы, полиацетали, полигидропираны, полицианоацетали и сшитые или амфипатические блок-сополимеры гидрогелей.

Лекарственные формы (фармацевтические композиции), пригодные для введения, могут содержать примерно от 1 до примерно 100 мг активного ингредиента на стандартную дозу. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент присутствует обычно в количестве 0,5-95 вес.% от общего веса композиции.

Желатиновые капсулы могут содержать активный ингредиент и порошкообразные носители, такие как лактоза, крахмал, производные целлюлозы, стеарат магния, стеариновая кислота и т.п. Аналогичные разбавители можно использовать для приготовления прессованных таблеток. Как таблетки, так и капсулы можно приготовить в виде продуктов пролонгированного действия для обеспечения непрерывного высвобождения лекарственного вещества в течение нескольких часов. Прессованные таблетки могут быть покрыты сахарной оболочкой или пленочной оболочкой с целью замаскировать какой-либо неприятный вкус и защитить таблетку от атмосферного воздействия или могут быть покрыты энтеросолю-

бильной оболочкой для селективного расщепления в желудочно-кишечном тракте.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут содержать красители и вещества, придающие вкус и запах, чтобы быть более приемлемыми для пациента.

Обычно вода, соответствующее масло, физиологический солевой раствор, водный раствор декстрозы (глюкозы) и растворы родственных сахаров и гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоли, являются подходящими носителями для парентеральных растворов. Растворы для парентерального введения могут содержать водорастворимую соль активного ингредиента, подходящие стабилизаторы и, при необходимости, буферные вещества. Антиоксиданты, такие как бисульфит натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота, либо самостоятельно, либо в смеси являются подходящими стабилизаторами. Применяются также лимонная кислота и EDTA натрия. Кроме того, растворы для парентерального введения могут содержать консерванты, такие как бензалкония хлорид, метил- или пропилпарабен и хлорбутанол.

Применимые фармацевтические носители описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, стандартном руководстве в этой области.

Репрезентативные применимые фармацевтические лекарственные формы для введения соединений по данному изобретению можно проиллюстрировать, как указано ниже.

Капсулы.

Большое количество унифицированных капсул можно приготовить, насыпая в стандартные твердые желатиновые капсулы из двух частей по 100 мг порошка активного ингредиента, 150 мг лактозы, 50 мг целлюлозы и 6 мг стеарата магния.

Мягкие желатиновые капсулы.

Можно приготовить смесь активного ингредиента в масле, которое хорошо усваивается, таком как соевое масло, хлопковое масло и оливковое масло, и вводить в виде инъекции с помощью позитивного вытесняющего насоса в желатин, получая мягкие желатиновые капсулы, содержащие 100 мг активного ингредиента. Капсулы следует отмыть и высушить.

Таблетки.

Можно приготовить таблетки обычными методами, так чтобы каждая стандартная (унифицированная) доза содержала 100 мг активного ингредиента, 0,2 мг коллоидного диоксида кремния, 5 мг стеарата магния, 275 мг микрокристаллической целлюлозы, 11 мг крахмала и 98,8 мг лактозы. Для улучшения вкуса или замедления всасывания можно нанести подходящее покрытие.

Форма для инъекций.

Композицию для парентерального введения в виде инъекций можно приготовить, перемешивая 1,5 вес.% активного ингредиента в смеси 10 об.% пропиленгликоля и воды. Раствор следует сделать изотоническим с помощью хлористого натрия и стерилизовать.

Суспензия.

Водную суспензию для перорального введения можно приготовить таким образом, чтобы в каждом 5 мл этой суспензии содержалось 100 мг тонкоизмельченного активного ингредиента, 200 мг натрий-карбоксиметилцеллюлозы, 5 мг бензоата натрия, 1,0 г раствора сорбита, U.S.P. и 0,025 мл ванилина.

Соединения по изобретению смешивают с другими антикоагулянтами, например, суточная доза может составлять около 0,1-100 мг соединения формулы I и около 1-7,5 мг второго антикоагулянта на килограмм веса тела пациента. В лекарственной форме в виде таблетки соединения по данному изобретению могут находиться в количестве примерно 5-10 мг на стандартную дозу, а второй антикоагулянт может присутствовать в количестве около 1-5 мг на стандартную дозу.

Если с соединением из примеров вводят два или более вышеуказанных вторых терапевтических агента, обычно количество каждого компонента в типичной суточной дозе и типичной лекарственной дозе может быть понижено по сравнению с обычной дозой агента в случае, когда вводится один агент, с учетом аддитивного или синергического эффекта терапевтических агентов при введении в комбинации.

В частности, при выпуске в виде однократной (разовой) лекарственной формы существует возможность химического взаимодействия смешанных активных ингредиентов. По этой причине, когда соединение из примеров и второй терапевтический агент объединяют в виде разовой лекарственной дозы, их готовят таким образом, что, хотя активные ингредиенты смешаны в единой (разовой) лекарственной форме, физический контакт между активными ингредиентами сведен к минимуму (т.е. уменьшен). Например, один активный ингредиент может быть покрыт энтеросолюбильной оболочкой. С помощью энтеросолюбильного покрытия одного из активных ингредиентов можно не только минимизировать контакт между объединенными активными ингредиентами, но также можно контролировать высвобождение одного из этих компонентов в желудочно-кишечном тракте, так чтобы один из этих компонентов высвобождался скорее не в желудке, а в кишечнике. Один из активных ингредиентов может быть также покрыт материалом, который влияет на пролонгированное высвобождение по всему желудочно-кишечному тракту, а также позволяет свести к минимуму контакт между объединенными (смешанными) активными ингредиентами. Далее, компонент с пролонгированным высвобождением можно дополнительно покрывать энтеросолюбильной оболочкой с тем, чтобы высвобождение этого компонента происходило только в кишечнике. Еще один метод включает приготовление комбинированного продукта, в котором один

компонент покрыт энтеросолюбильным полимером для пролонгированного высвобождения и/или высвобождения в кишечнике, а другой компонент также покрыт полимером, таким как гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМС, НРМС) низкой вязкости, или другими подходящими материалами, чтобы дополнительно отделить активные компоненты. Полимерное покрытие служит для создания дополнительного препятствия взаимодействию с другим компонентом.

Эти методы, так же как другие методы минимизации контакта между компонентами комбинированных продуктов по настоящему изобретению, вводятся ли они в виде единой лекарственной формы или в виде отдельных форм, но одновременно и одинаковым способом, будут легко понятны специалистам в данной области техники, вооруженным настоящим раскрытием.

Кроме того, некоторые соединения по данному описанию могут быть применимы в качестве метаболитов других соединений. Поэтому в одном варианте изобретения соединения могут применяться либо в виде практически чистого соединения, которое затем можно также включить в фармацевтическую композицию, либо могут применяться в качестве метаболита, который образуется после введения пролекарства этого соединения. В одном варианте изобретения соединение может применяться в качестве метаболита, будучи полезно для лечения расстройств по данному описанию.

Предполагается, что выражение "практически чистый" по данному описанию включает соединение с чистотой, превышающей примерно 90%, включая примерно 91, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99 и 100%.

Например, соединение по данному описанию может быть практически чистым, если его чистота превышает примерно 90 вес.%, где остальные 10% материала содержат другой метаболит этого соединения, пролекарство этого соединения, и/или реакционные примеси и/или примеси при обработке, образующиеся в результате приготовления.

Очевидно, что в свете вышеприведенных указаний возможны многочисленные модификации и варианты настоящего изобретения. Поэтому следует понимать, что в объеме прилагаемой формулы изобретения изобретение на практике может применяться иначе, чем конкретно представлено в данном описании.

Анализы *in vivo* и эффективность

N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-(((S)-2-оксо-3-(6-трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид (также называемый в данном описании "Пример 1" ("соединение из примера 1")) оценивают в следующих анализах *in vivo*, как описано ниже.

Раздел 1. Модель интрадермальной (ID) MCP-1 индукции у обезьян циномоглус.

Методы.

Интрадермальная инъекция MCP-1 вызывает инфильтрацию мононуклеарными клетками места инъекции. Эта модель первоначально была разработана для оценки ингибирующего действия CCR2 антагонистов на инфильтрацию мононуклеарными клетками кожной ткани, в которую инъецирован человеческий MCP-1.

Как описано ниже, каждой обезьяне вводят дозу с примером 1 (соединением из примера 1) или его носителя (контроль, 0,5% [вес./об.] карбоксиметилцеллюлозы) один раз в день в течение трех дней. Сразу же после введения дозы на 3 день всем обезьянам вводят по меньшей мере 2 интрадермальные инъекции по 10 мкг (50 мкл/инъекция) человеческого MCP-1 (R&D Systems) и по меньшей мере 2 интрадермальные инъекции его контроля DPBS (50 мкл/инъекция) в разные места на спине на уровне грудной клетки. Проводят забор биоптатов кожи из всех мест примерно через 18 ч после инъекции MCP-1 (или DPBS). Проводят полуколичественную гистологическую оценку биоптатов. Характерные срезы образцов кожи изучают световой микроскопией, отмечают микроскопические повреждения и клеточную инфильтрацию и их количество вносят в таблицу.

В исследовании 1, пример 1 (соединение из примера 1) вводят перорально в дозах 0, 6,5, 13 или 26 мг/кг группам из 3 обезьян циномоглус (по 1 или по 2 обезьяны одного пола в группе). В исследовании 2 "наивных" животных используют для оценки примера 1 (соединения из примера 1) в дозах 0, 10 или 30 мг/кг в группах из 2 или 4 животных (1/пол в группе, получающей дозу носителя; 2/пол в группе, получающей дозу примера 1).

В обоих исследованиях помимо биопсии отбирают пробы крови и проводят клинический анализ крови и определение лейкоцитарной формулы. Также в образцах плазмы проверяют концентрации соединений, а в сывороточных образцах проверяют уровни медиатора системного воспаления.

Результаты.

В первом исследовании индуцированный MCP-1 рекрутинг мононуклеарных клеток в кожу получавших носитель контрольных животных составляет $2,7 \pm 0,3$ (по шкале от 0 до 4, табл. 13). В дозе 26 мг/кг соединение из примера 1 (пример 1) ингибирует инфильтрацию (56%). В случае двух более низких доз, 13 и 6,5 мг/кг, наблюдаются более низкие уровни ингибирования. Соединение также ингибирует инфильтрацию клетками других типов, такими как эозинофилы и нейтрофилы. Концентрации соединения в плазме через 18 ч и их связь с уровнями ингибирования и величинами IC_{90} при хемотаксисе у обезьян циномоглус суммированы в табл. 13.

Для определения эффективности ингибирования соединения из примера 1 в *in vitro* анализах хемотаксиса применяют два метода. В первом используют РВМС обезьян, тогда как во втором используют

клетки L1.2, стабильно трансфицированные с помощью CCR2 обезьян циномоглус. Найдено, что первые являются высоковариабельными ($IC_{50}=5,5\pm 10$ нМ), вторые дают более высокую среднюю величину, но являются более постоянными ($IC_{50}=11,4\pm 8$ нМ). С учетом этой второй величины доза 26 мг/кг дает свободную плазменную концентрацию через 18 ч после введения дозы 2X хемотаксис IC_{90} (табл. 13).

Таблица 13

Результаты действия соединения из примера 1 на инфильтрацию мононуклеарными клетками и клетками других типов в ответ на иммунизацию MCP-1 у обезьян циномоглус

Дозы (мг/кг)	Своб. плазматич. конц. (нМ)	Кратн. СТХ IC_{90}^a	Кратн. СТХ IC_{90}^b	MNC показатель (инг%)	PMN показатель	Эоз. показатель	Все клетки показатель
0	0	0	0	2.7±0.3 (0%)	0.8±0.3	1.83±0.3	5.3±0.6
6.5	53	1.8	0.5	2.2±0.6 (19%)	0.8±0.3	1.3±0.8	4.3±1.6
13	101	3.4	0.9	2.2±0.3 (19%)	0.7±0.3	1.2±0.6	4.0±0.5
26	238	7.9	2.2	1.2±0.6 (56%)	0.2±0.3	0.5±0	1.8±0.8

^a Хемотаксис на основании РВМС обезьян циномоглус.

^b Хемотаксис при использовании L1.2 клеток, стабильно экспрессирующих CCR2 обезьян циномоглус.

Второе исследование проводят на "наивных" обезьянах. По сравнению с первым исследованием соединение из примера 1 ингибирует инфильтрацию мононуклеарными клетками в большей степени (91%) при дозе 30 мг/кг (высокая доза) и ингибирует на 87% при дозе 10 мг/кг (табл. 14).

Таблица 14

Результаты действия соединения из примера 1 на инфильтрацию мононуклеарными клетками и клетками других типов в ответ на иммунизацию MCP-1 у обезьян циномоглус

Дозы (мг/кг)	Своб. плазматич. конц. (нМ)	Кратн. СТХ IC_{90}^a	Кратн. СТХ IC_{90}^b	MNC показатель (инг%)	PMN показатель	Эоз. показатель	Все клетки показатель
0	0	0	0	1.5 (0%)	1.3	0.4	3.2
10	34	1.1	0.37	0.2 ±0.2 (87%)	0	0.3 ±0.1	0.5±0.2
30	83	2.8	0.91	0.1 ±0.3 (91%)	0.1 ±0.3	0.6 ±0.7	0.8±0.8

^a Хемотаксис на основании РВМС обезьян циномоглус.

^b Хемотаксис при использовании L1.2 клеток, стабильно экспрессирующих CCR2 обезьян циномоглус.

В обоих исследованиях оценка изменений сывороточных концентраций медиаторов воспаления показывает увеличение (~3-кратное) уровня MCP-1 в группах, получавших соединение из примера 1 по сравнению с контрольными группами, получавшими носитель. Помимо этого, клинический анализ крови (СВС) показывает увеличение (~3-кратное) числа нейтрофилов в группах, получавших соединение из примера 1 по сравнению с контрольными группами, получавшими носитель.

Исследование на мышах hCCR2 KI проводят с целью проверки действия соединения из примера 1 на моноцитарную/макрофагальную инфильтрацию на модели перитонита, вызванного тиогликолятом (TG), методами дифференциального подсчета клеток и проточной цитометрии.

Раздел 2. Характеристика мыши (hCCR2 KI), полученной введением (knockin) человеческого CCR2. Методы.

Мышь hCCR2 KI получают генетической инженерией, заменяя мышинный ген CCR2 последовательностью, кодирующей человеческий CCR2. Мышей получают из Института сердечно-сосудистых заболеваний Гладстона при Калифорнийском университете, Сан-Франциско.

Для того чтобы отличить аллели дикого типа (мышинный CCR2 ген) от целевых аллелей (человеческий CCR2 ген) и для определения числа копий человеческого CCR2 гена и числа копий мышинового CCR2 гена в образцах из ушей и хвостов, применяют стандартные методы ПЦР (ген-специфической и количественной). Также проводят RT-ПЦР (PCR) анализ для определения уровня экспрессии мРНК человеческого и мышинового CCR2. Для определения поверхностной экспрессии человеческих или мышинных CCR2 белков на моноцитах крови анализируют методом проточной цитометрии. FACS анализ аккумуляции моноцитов/макрофагов в брюшной полости на моделях TG-индуцированного перитонита (см. раздел 3) проводят для определения функциональности человеческого CCR2 у этих мышей.

Результаты.

Мышь hCCR2 KI получают генетической инженерией, заменяя мышинный ген CCR2 последовательностью, кодирующей человеческий CCR2. Перед тем как применять этих мышей для *in vivo* оценки соединения из примера 1, проводят определение как генотипических, так и фенотипических характеристик этих мышей. Используя ПЦР-исследования генотипических характеристик (ген-специфические и количественные) образцов из уха и хвоста, обнаруживают две копии человеческого CCR2 гена и варьирующиеся количества ПЦР-продукта, позволяющего предположить присутствие от 0 до 2 копий мышинного CCR2 гена. При использовании тотальной клеточной РНК, выделенной из лейкоцитов крови этих KI мышей, относительный RT-PCR анализ позволяет обнаружить мРНК человеческого CCR2 и минимальные уровни ПЦР продукта с набором праймеров, сконструированных для обнаружения мРНК мышинного CCR2. Если для обнаружения экспрессии белка в мышах CCR2 KI применяют проточную цитометрию, обнаруживают человеческий CCR2, но не мышинный CCR2, поверхностный белок, окрашивая изоляты цельной крови специфическими антителами против человеческого CCR2 и против мышинного CCR2 соответственно.

hCCR2-селективные антагонисты блокируют моноцитарную инфильтрацию у этих hCCR2 KI мышей, но не у мышей дикого типа, когда плазматические равновесные уровни обеспечивают IC₉₀ хемотаксиса человеческого CCR2, но они ниже уровней, необходимых для ингибирования хемотаксиса мышинного CCR2. Кроме того, в анализах *in vitro*, в которых имитируются параметры hCCR2 KI (мышинный MCP-1/человеческий CCR2), соединение из примера 1 ингибирует связывание мышинного MCP-1 с экспрессирующими человеческий CCR2 hPBMC (IC₅₀=2,2±1,2 нМ) опосредованный индуцированным мышинным MCP-1/человеческим CCR2 хемотаксис ТНР-1 клеток (IC₅₀=0,6±0,3 нМ).

Раздел 3. Модель 48-часового индуцированного тиогликолятом (TG) перитонита у мышей hCCR2 KI.

Методы.

Мышам hCCR2 KI (C57BL/6-SVJ129) интраперитонеально (внутрибрюшинно) инъецируют 1 мл тиогликолята (TG) (Hardy Diagnostics). В каждом исследовании берут по восемь мышей в группе. Дозу соединения из примера 1 вводят перорально за 1 ч до инъекции TG. В качестве носителя используют 0,01N HCl в воде. Через 48 ч после инъекции TG проводят перитонеальный лаваж, инъецируя 5 мл PBS/10 mM EDTA/10% BSA в брюшную полость.

Для изучения 48-часового TG перитонита дозу соединения из примера 1 вводят дважды в день, причем первую дозу вводят за 1 ч до инъекции TG. Общее число клеток в брюшной (перитонеальной) полости определяют на выделенных клетках с помощью счетчика клеток. Получают цитоспины для дифференциального подсчета лейкоцитов. Клетки окрашивают в течение 3 мин красителем Райт-Гимза (Sigma-Aldrich), а затем отмывают деионизированной водой в течение 5 мин. Дифференциальный подсчет проводят исходя из общего числа 200 подсчитанных клеток на образец. Концентрация EDTA для определения соответствует ее концентрации в лекарстве.

Для проточной цитометрии клетки перитонеального экссудата (1×10⁶) отмывают один раз буфером FACS (PBS/0,5% BSA) и ресуспендируют в буфере FACS. Клетки инкубируют с Fc-блокирующим антителом (BD Pharmingen) на льду в течение 15 мин, а затем добавляют следующие антитела (BD Pharmingen): конъюгированное с PE антитело против F4/80, конъюгированное с FITC антитело против Ly6C и конъюгированное с Alexa 647 антитело против hCCR2. Клетки выдерживают на льду 45 мин, фиксируют с помощью BD Cytofix в течение 15 мин на льду, дважды отмывают буфером FACS и ресуспендируют в 200 мкл буфера FACS. Регистрируют события в клетке (40000) и данные анализируют с помощью программного обеспечения FloJo (TreeStar). Устанавливают FSC/SSC гейт так, чтобы включить все моноциты (низкий SSC, повышенный FSC), но исключить из анализа гранулоциты. Эту селектированную (пропущенную) популяцию затем анализируют на экспрессию Ly6C (FITC), F4/80 (PE). Число моноцитов/макрофагов в брюшной полости определяют, умножая общее число клеток в брюшной полости, подсчитанное счетчиком клеток, на процентное содержание моноцитов/макрофагов, идентифицированное с помощью клеток F4/80⁺ проточной цитометрией. Статистическую значимость разницы между средними значениями анализируют, применяя парный "двуххвостовой" t тест с уровнем значимости для значений p ниже 0,05.

Результаты.

Соединение из примера 1 проверяют на мышинной hCCR2 KI модели TG перитонита, чтобы определить его EC₅₀ при ингибировании моноцитарно/макрофагальной инфильтрации. Мышам вводят тиогликолят и перорально вводят соединение из примера 1 в дозе 1, 5 или 25 мг/кг BID (два раза в сутки). Через 48 ч после введения TG treatment проводят перитонеальный лаваж для анализа клеточного инфильтрата. В случае соединения из примера 1, по показаниям счетчика клеток, наблюдается зависимое от дозы уменьшение числа тотальных перитонеальных лейкоцитов (фиг. 15). На основании дифференциального подсчета лейкоцитов оценкой морфологии образцов лаважа можно сделать вывод, что соединение из примера 1 демонстрирует зависимое от дозы ингибирование инфилюкса моноцитов/макрофагов. Дозы 1, 5, 25 мг/кг вызывают ингибирование 20, 62 и 69% соответственно. Статистически значимое ингибирование

достигается при дозах 5 и 25 мг/кг (фиг. 15). В двух самостоятельных исследованиях среднее значение EC_{50} для ингибирования моноцитарно/макрофагальной инфильтрации оценивается величиной $3,0 \pm 0,9$ нМ.

Инфильтрат рекрутированных моноцитов/макрофагов анализируют также количественно проточной цитометрией. Для того чтобы отличить рекрутированные моноциты/макрофаги от резидентных макрофагов и гранулоцитов, проводят окрашивание как F4/80, так и Ly6C поверхностных маркеров макроцитов/макрофагов для определения рекрутированных моноцитов/макрофагов. Используя этот метод, аналогичное зависимое от дозы статистически значимое ингибирование моноцитарно/макрофагальной инфильтрации наблюдают при всех трех дозах (фиг. 16). При дозах 1, 5 и 25 мг/кг наблюдается ингибирование 38, 71 и 86% соответственно. В двух самостоятельных исследованиях этот метод показывает среднее значение EC_{50} для ингибирования моноцитарно/макрофагальной инфильтрации $2,2 \pm 0,5$ нМ.

Для того чтобы оценить *in vivo* уровни занятости рецептора соединением из примера 1 на модели 48-часового вызванного тиогликолятом перитонита при использовании мыши hCCR2 нок-ин (knock-in), определяют уровни в плазме как соединения из примера 1, так и MCP-1, лиганда мышинового CCR2. Предупреждение при этой оценке, во внимание принимается только CCR2 и его основной лиганд MCP-1. Занятость рецептора лигандом в присутствии конкурентного ингибитора определяют по уравнению Гаддума

$$\frac{[RI]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_d / [L]) (1 + [I] / K_i)}$$

Так как соединение из примера 1 является конкурентным ингибитором связывания MCP-1 с CCR2, количества как рецепторного комплекса мышинный MCP-1/CCR2, так и рецепторного комплекса соединения из примера 1/CCR2 можно определить, используя сывороточные уровни как мышинового MCP-1, так и не связанного с белком соединения из примера 1 в плазме. K_d связывания мышинового MCP-1 с hCCR2 равно $0,91 \pm 0,08$ нМ ($n=8$), эту величину определяют в экспериментах по конкурентному связыванию холодного лиганда с применением ^{125}I -человеческого MCP-1. Среднее значение K_i для связывания соединения из примера 1 с hCCR2 равно 1,2 нМ. Относительное содержание рецепторных комплексов мышинный MCP-1/CCR2 определяют по уравнению, приведенному выше. Уравнение для определения относительного содержания комплексов соединения из примера 1/CCR2 выглядит следующим образом:

$$\frac{[RI]}{[R]} = \frac{1}{1 + (K_i / [I]) (1 + [L] / K_d)}$$

Наконец, количество свободного CCR2 определяют по уравнению

$$[CCR2]_{\text{тотальн.}} = [CCR2]_{\text{своб.}} + [\text{мышинный MCP-1/CCR2}] + [\text{пример 1/CCR2}].$$

Как показано в табл. 15, процент ингибирования моноцитарно/макрофагальной инфильтрации в брюшную полость через 48 ч отражает процентное содержание рецепторного комплекса пример 1/CCR2 (пример 1 - занятый CCR2).

Таблица 15

Определение *in vivo* занятости рецепторов в крови мышей HCCR2 KI на модели 48-часового TG перитонита

Доза (мг/кг)	Концентрация мышинового MCP-1 в плазме (нМ)	Концентрация своб. соединения Пример 1 в плазме (нМ) (кратн. связыван. IC90 CCR2)	% CCR2, связанного с мышинным MCP-1	% CCR2, связанного с соединением Пример 1	%своб. CCR2	Ингибирование моноцитарно/макрофагальной инфильтрации ^a %
25	0.041	24 (1.4)	0.2	95.0	4.8	86
5	0.043	4 (0.2)	1.1	76.1	22.8	71
1	0.027	1 (0.05)	1.6	44.7	53.7	38
0 (носитель)	0.03	0	3.2	0	96.8	0

^a FACS анализ тотальных моноцитов/макрофагов.

Раздел 4.

Определение эффективности при хронических заболеваниях.

Методы.

Для изучения действия соединения из примера 1 на ЕАЕ (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит) модель рассеянного склероза берут группы мышей по 10 в каждой. В день 0 мышей hCCR2 KI иммунизируют, вводя подкожно всего 200 мкл 300 мкг миелинового гликопротеина олигодендроцитов (MOG) 35-55 (Genemed Synthesis) в смеси 1:1 с 300 мкг микобактерий *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) (Becton-Dickinson) в неполном адьюванте Фрейнда (IFA) (Sigma-Aldrich). В день 0 (через 2 ч после иммунизации) и на 2 день мышам интраперитонеально инъецируют 100 мкл 400 нг коклюшного

токсина. Клиническую оценку (в баллах) начинают вести на 10 день, проводят три раза в неделю в ходе всего исследования по шкале 0-5: 0 - признаки заболевания отсутствуют; 0,5 - частичная слабость хвоста; 1 - поникший (дряблый) хвост или утиная походка с напряжением хвостовых мышц; 1,5 - утиная походка с частичной слабостью хвоста; 2 - утиная походка с поникшим (дряблым) хвостом (атаксия); 2,5 - атаксия с частичным параличом задних конечностей; 3 - полный паралич одной задней конечности; 3,5 - полный паралич одной задней конечности с частичным параличом второй задней конечности; 4 - полный паралич двух задних конечностей; 4,5 - агония; 5 - смерть. Пероральное введение соединения из примера 1 в дозе 55 мг/кг (ВІД, дважды в день) начинают в 1 день.

Результаты.

В двух исследованиях из трех проведенных соединение из примера 1 значительно снижает клиническую оценку ($p < 0,05$) (фиг. 17). IC_{50} равна 2,2 нМ для соединения из примера 1 при связывании ^{125}I -мышинного МСР-1 с hCCR2-экспрессирующими клетками, hPVMCs (имитация hCCR2 KI состояния). С учетом этой величины IC_{50} дозы 55 мг/кг дают при минимальной концентрации свободной плазмы ~2-кратное IC_{90} связывания. Гистологическая оценка спинного мозга на 22 день не показывает значительного различия инфильтрата из воспалительных клеток в целом у мышей, получавших соединение из примера 1, по сравнению с мышами, получавшими носитель. У мышей, получавших соединение по изобретению, наблюдают заметный инфильтрат из нейтрофилов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамид или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Кристаллическая форма N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида или его фармацевтически приемлемой соли.

3. Кристаллическая форма по п.2, отличающаяся следующими параметрами элементарной ячейки:

размеры ячейки:

$a=11,8427(3)$,

$b=18,1503(7)$,

$c=12,7923(4)$,

$\alpha=90$,

$\beta=105,362(2)$,

$\gamma=90$,

пространственная группа $P2_1$,

молекулы/элементарная ячейка 2,

причем указанный кристалл находится при температуре примерно 22°C.

4. Кристаллическая форма по пп.2, 3, отличающаяся тем, что ее порошковая рентгенограмма содержит три или более значений 2θ ($CuK\alpha$ $\lambda=1,541$ Å), выбранных из 7,2; 8,7; 9,7; 12,5; 12,8; 13,3; 16,0; 16,6; 18,2 и 18,8, при температуре примерно 22°C.

5. Кристаллическая форма по пп.2-4, отличающаяся тем, что ее порошковая рентгенограмма содержит четыре или более значений 2θ ($CuK\alpha$ $\lambda=1,541$ Å), выбранных из 7,2; 8,7; 9,7; 12,5; 12,8; 13,3; 16,0; 16,6; 18,2 и 18,8, при температуре примерно 22°C.

6. Кристаллическая форма по пп.2-5, отличающаяся тем, что относительные координаты атомов такие, как приведенные в табл. 7.

7. Кристаллическая форма по пп.2-6, отличающаяся тем, что ее порошковая рентгенограмма находится в соответствии с фиг. 2.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

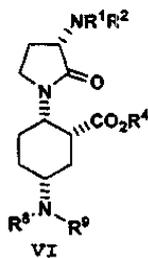
9. Способ лечения заболевания у млекопитающего, заключающийся во введении этому млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения по пп.1-7, причем заболевание выбирают из диабета, ожирения, метаболического синдрома, удара, невропатической боли, ишемической кардиомиопатии, псориаза, гипертензии, склеродермии, остеоартрита, аневризмы, лихорадки, сердечно-сосудистого заболевания, болезни Крона, застойной сердечной недостаточности, аутоиммунных заболеваний, ВИЧ-инфекции, ассоциированной с ВИЧ деменции, идиопатического легочного фиброза, артериосклероза трансплантата, вызванной физическими или химическими причинами травмы головного мозга, воспалительного заболевания кишечника, альвеолита, колита, системной красной волчанки, нефротоксического сывороточного нефрита, гломерулонефрита, астмы, рассеянного склероза, атеросклероза, васкулита, нестабильных атероматозных бляшек, ревматоидного артрита, рестеноза, венозной неинтимальной гиперплазии, гиперплазии неинтимы трансплантата при диализе, гиперплазии интимы артериовенозного шунта, трансплантации органа, хронической нефропатии трансплантата и рака.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что заболевание выбирают из диабета, ожирения, болезни

Крона, системной красной волчанки, гломерулонефрита, рассеянного склероза, атеросклероза, рестеноза и трансплантации органа.

11. Способ по пп.9, 10, отличающийся тем, что заболевание выбирают из рассеянного склероза, атеросклероза, болезни Крона и диабета.

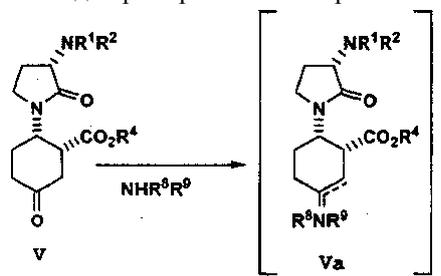
12. Способ получения соединения формулы VI



или его соли, который включает

восстановительное аминирование соединения формулы V амином формулы NH(R⁸)(R⁹) с образованием соединения формулы VI, при этом восстановительное аминирование включает следующие стадии:

(а) прибавление амина и дегидратирующего агента к соединению формулы V в апротонном растворителе при температуре примерно от -20 до примерно 50°C с образованием имина/енамина формулы Va



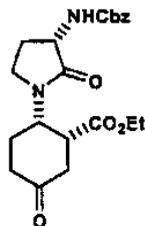
(б) реакция раствора имина/енамина формулы Va в присутствии платинового катализатора, 5% Pt/S/C, с газообразным водородом под давлением с образованием сложного эфира формулы VI;

где R¹ и R², независимо, обозначают водород или аминокзащитную группу, выбранную из Boc, Cbz или бензильной группы;

R⁴ обозначает C₁-₆алкил и

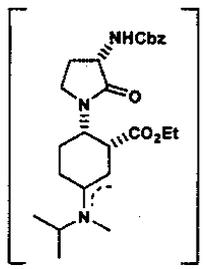
R⁸ и R⁹, независимо, обозначают водород или C₁-₆алкил.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что соединение формулы V представляет собой



или его соль;

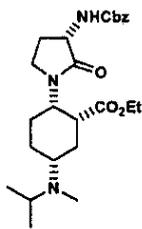
соединение формулы Va представляет собой



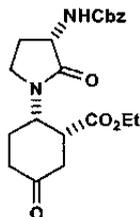
или его соль;

соединение формулы VI представляет собой

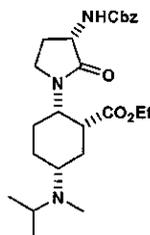
014960



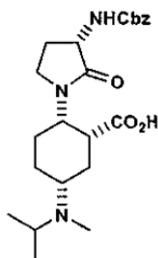
или его соль.
14. Соединение



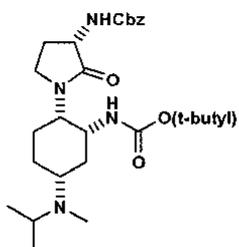
или его соль.
15. Соединение



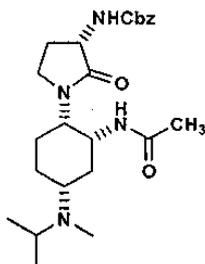
или его соль.
16. Соединение



или его соль.
17. Соединение

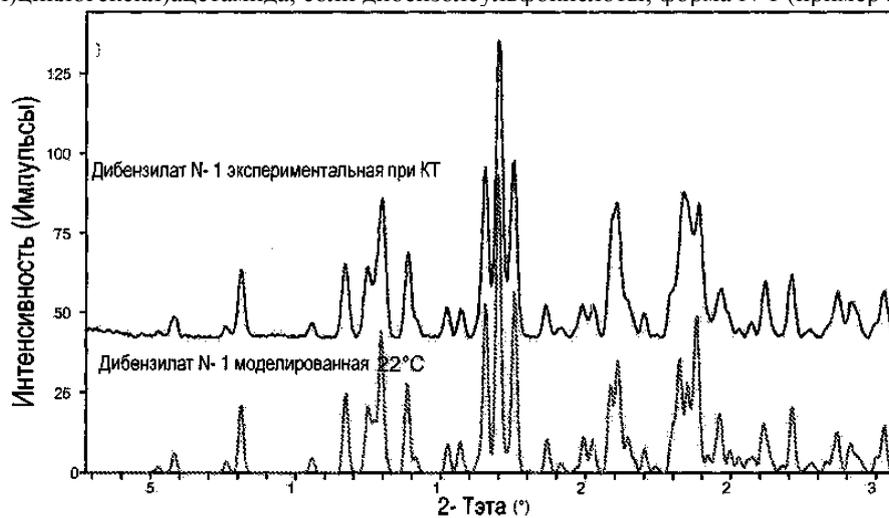


или его соль.
18. Соединение



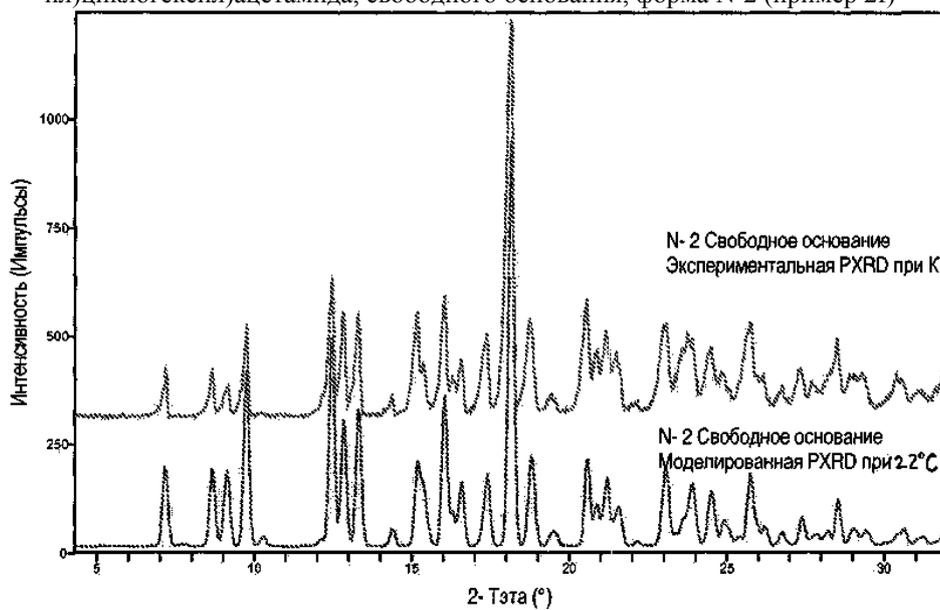
или его соль.

Экспериментально полученная и моделированная порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, соли дибензолсульфокислоты, форма N-1 (пример 2a)



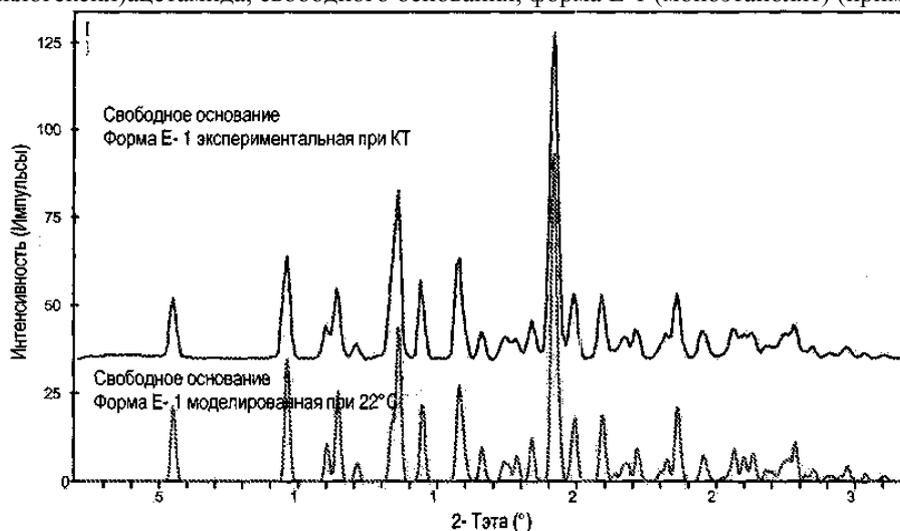
Фиг. 1

Экспериментально полученная и моделированная порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2 (пример 2f)



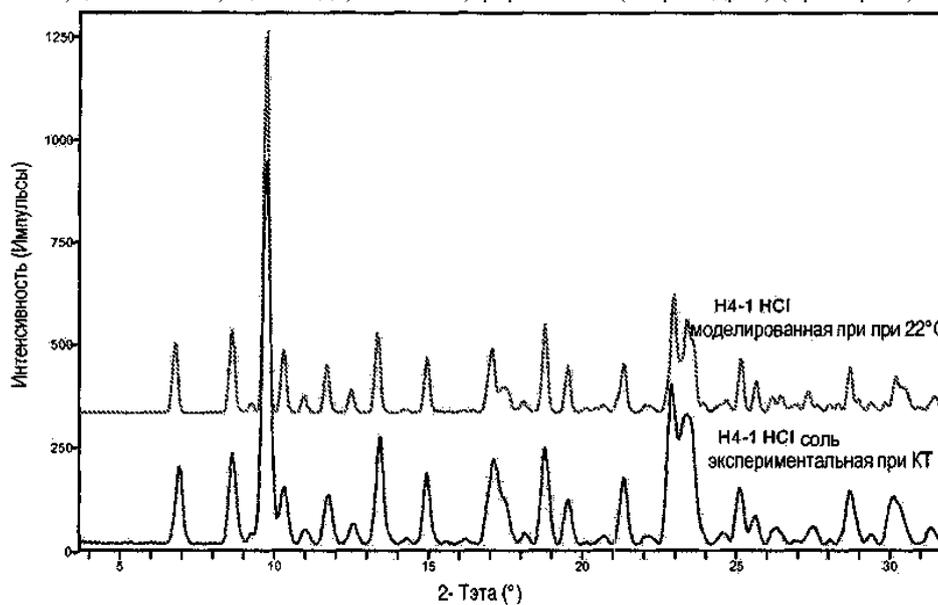
Фиг. 2

Экспериментально полученная и моделированная порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма E-1 (моноэтанолат) (пример 2d)



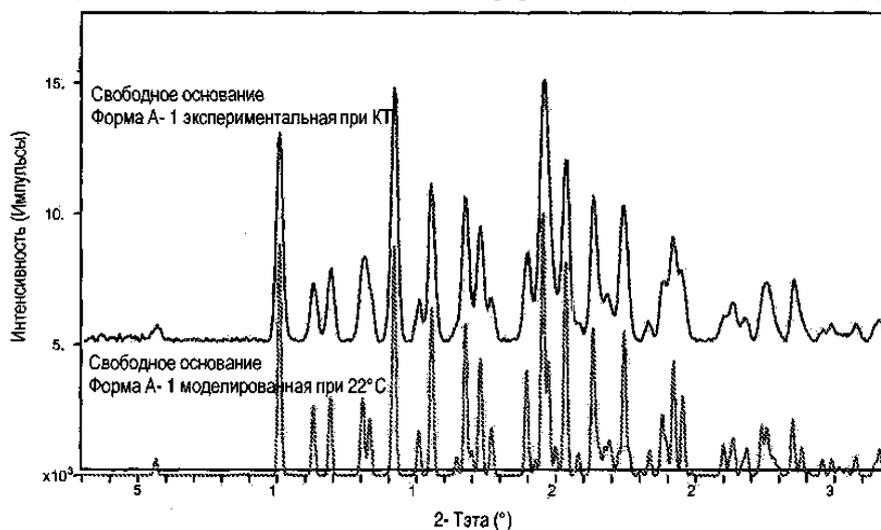
Фиг. 3

Экспериментально полученная и моделированная порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, соли HCl, форма H4-1 (тетрагидрат) (пример 2h)



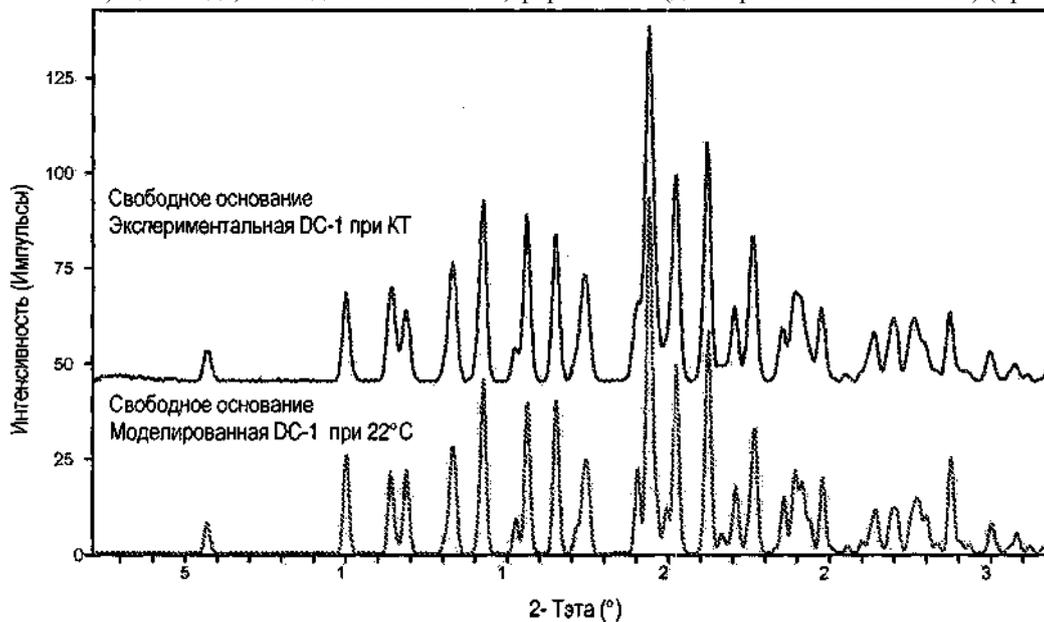
Фиг. 4

Экспериментально полученная и моделированная порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма А-1 (ацетон моносолюват) (пример 2e)



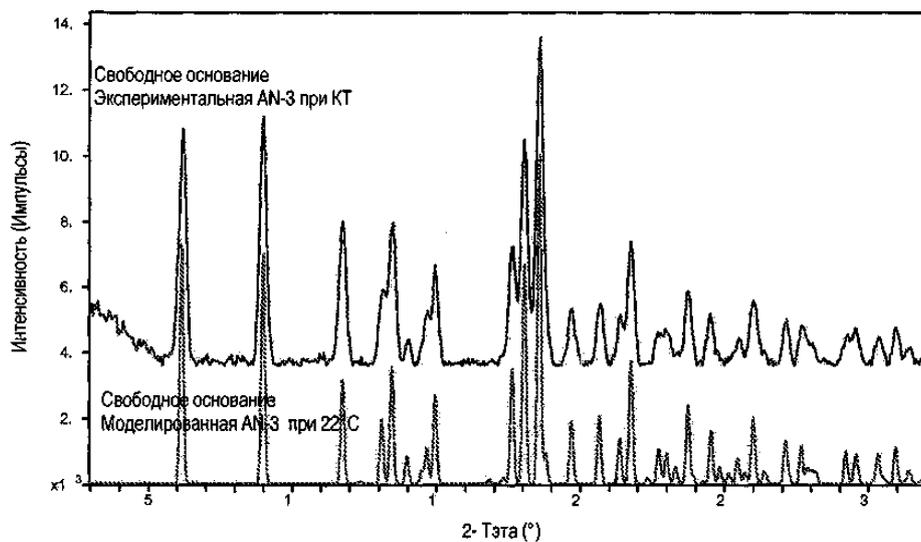
Фиг. 5

Экспериментально полученная и моделированная порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма DC-1 (дихлорметан моносолюват) (пример 2b)



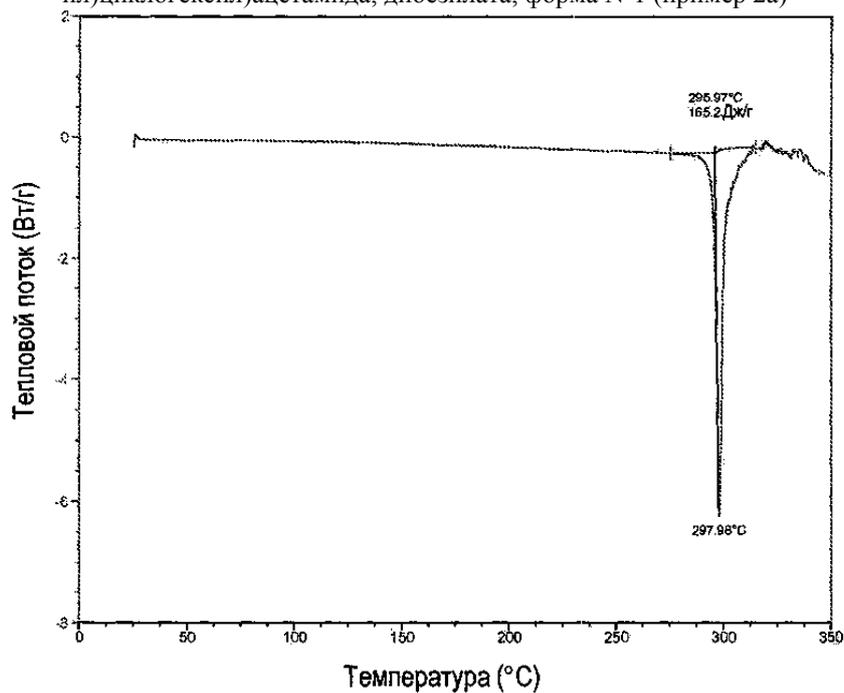
Фиг. 6

Экспериментально полученная и моделированная порошковые рентгенограммы N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма AN-3 (ацетонитрил моно сольват) (пример 2g)



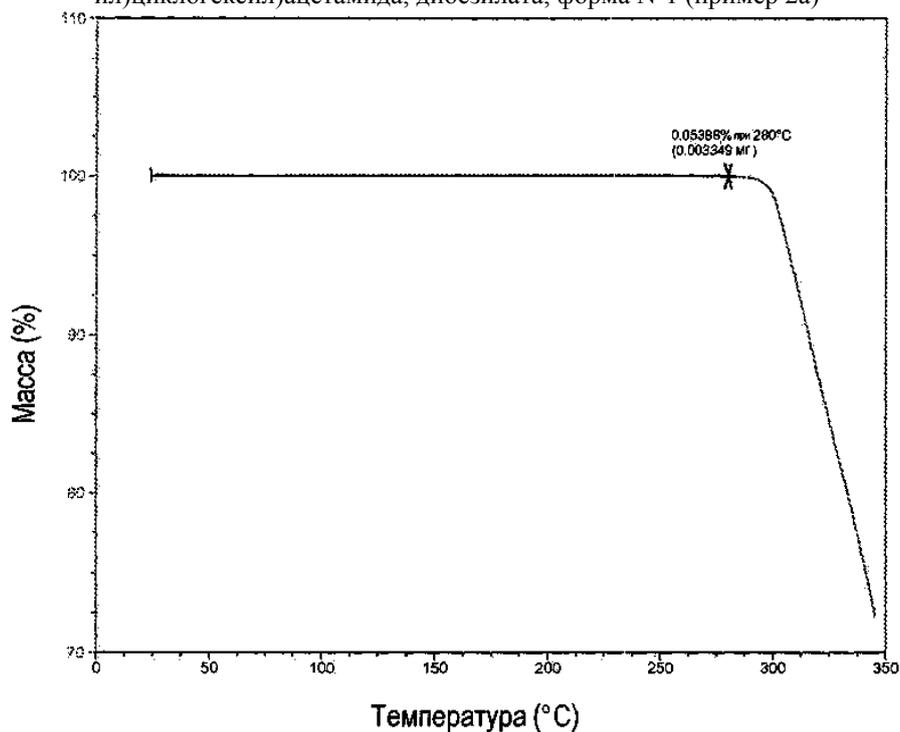
Фиг. 7

Результаты ДСК (DSC, дифференциальной сканирующей калориметрии) N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, дибезилата, форма N-1 (пример 2a)



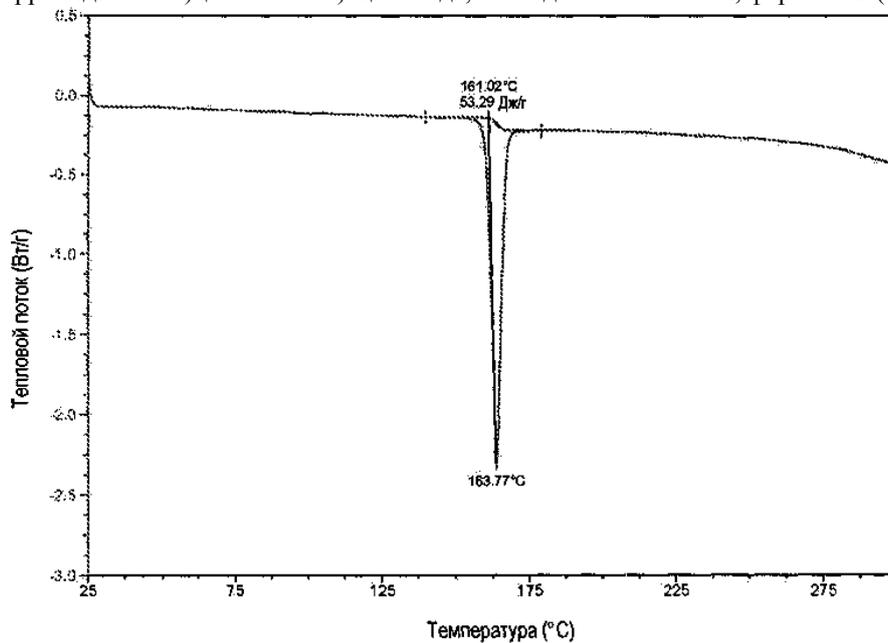
Фиг. 8

Результаты ТГА (TGA, термогравиметрического анализа) N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, дибезилата, форма N-1 (пример 2a)



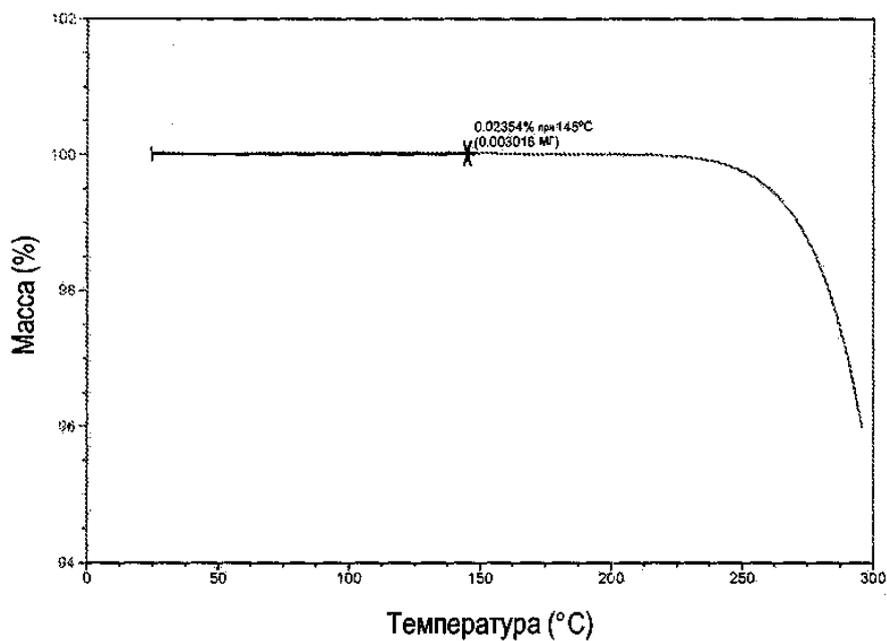
Фиг. 9

Данные ДСК N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2 (пример 2f)



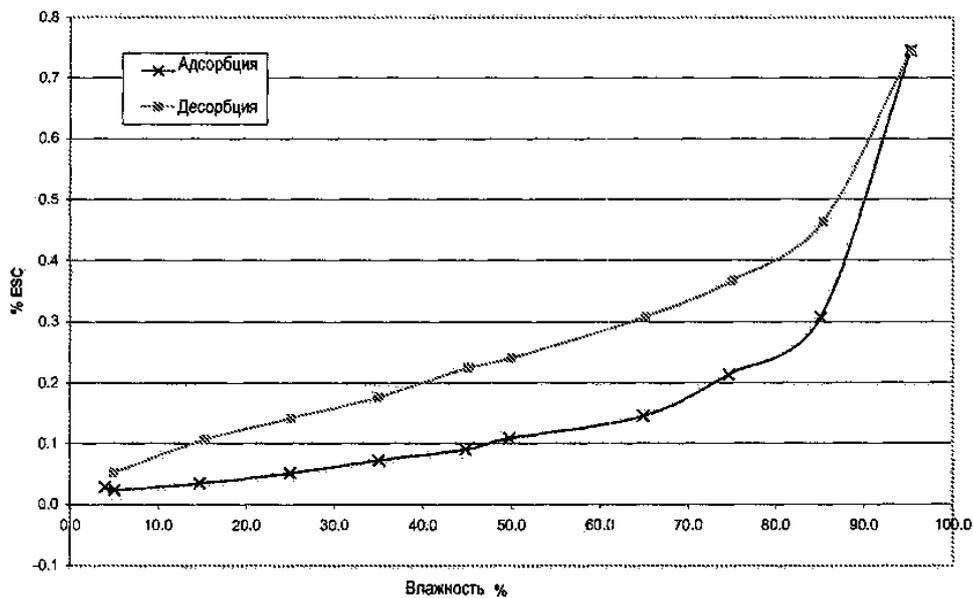
Фиг. 10

TGA N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2 (пример 2f)



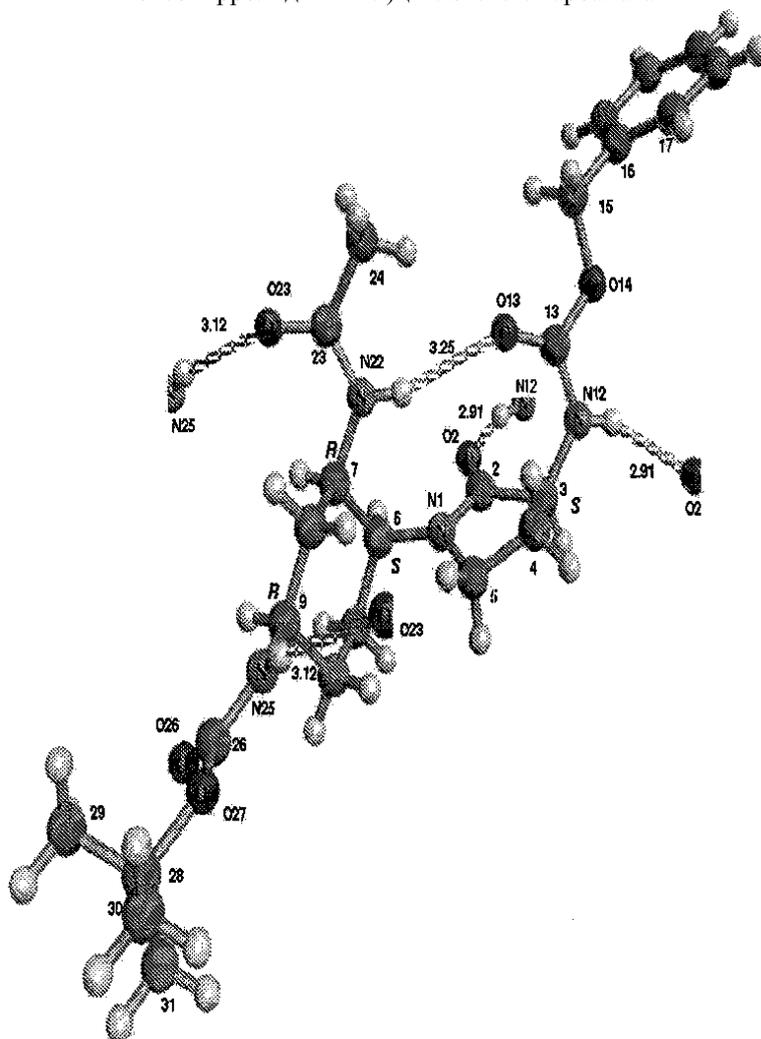
Фиг. 11

Изотерма сорбции влаги N-((1R,2S,5R)-5-(изопропил(метил)амино)-2-((S)-2-оксо-3-(6-(трифторметил)хиназолин-4-иламино)пирролидин-1-ил)циклогексил)ацетамида, свободного основания, форма N-2 (пример 2f)



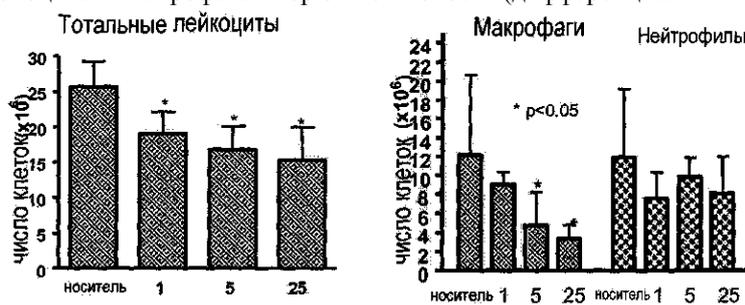
Фиг. 12

Кристаллическая структура трет-бутил-(1R,2R,4S)-3-ацетида-4-((S)-3-(бензилоксикарбониламино)-2-оксопирролидин-1-ил)циклогексилкарбамата



Фиг. 13

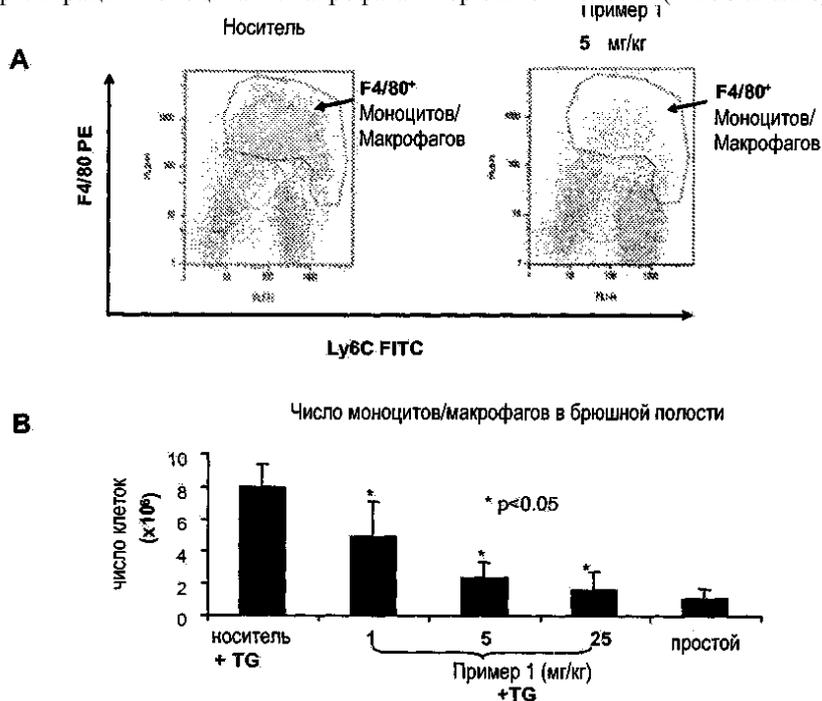
Модель 48-часового TG перитонита у мышей hCCR2 KI: ингибирование соединением из примера 1 инфильтрации моноцитами/макрофагами брюшной полости (дифференциальный подсчет клеток)



Соединение из Примера 1 мг/кг п.о. BID

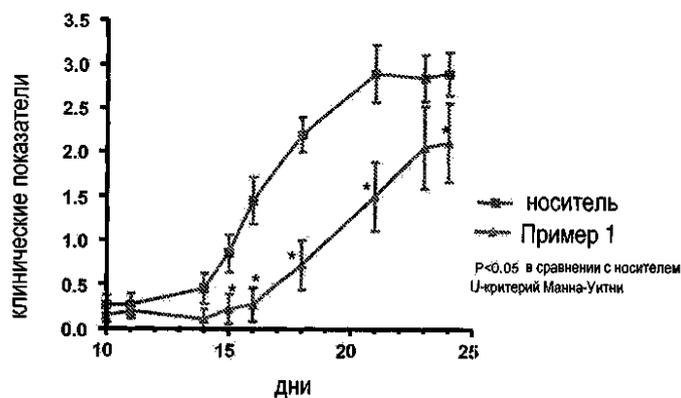
Фиг. 14

Модель 48-часового TG перитонита у мышей hCCR2 KI: ингибирование соединением из примера 1 инфильтрации моноцитами/макрофагами брюшной полости (FACS анализ)



Фиг. 15

ЕАЕ у мышей hCCR2 KI: клинические показатели лечения соединением из примера 1



Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2