



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07D 487/10 (2006.01); A61K 31/4439 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015112098, 05.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.09.2013Дата регистрации:
21.03.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
06.09.2012 JP 2012-195761

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2016 Бюл. № 30

(45) Опубликовано: 21.03.2018 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 06.04.2015(86) Заявка РСТ:
JP 2013/073865 (05.09.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/038606 (13.03.2014)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЙОСИДА Соко (JP),
СУГИМОТО Юуити (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ДАЙИТИ САНКИО КОМПАНИ,
ЛИМИТЕД (JP)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2006091646 A2, 31.08.2006. WIO
2012038307 A1, 29.03.2012. WO 2010121995 A1,
28.10.2010. RU 2008131905 A, 20.03.2010.

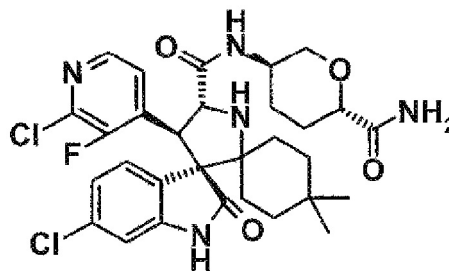
(54) КРИСТАЛЛЫ ПРОИЗВОДНЫХ ДИСПИРОПИРРОЛИДИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к кристаллам (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпирдин-4-ил)-4,4-диметил-2-оксо-1,2-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3'3'-индол]-5'-карбоксамид, который представлен следующей формулой (1), или его солей, таких как гидрохлорид, метансульфонат, бензолсульфонат и толуолсульфонат, которые ингибируют Mdm2 и обладают противоопухолевой активностью, а также к

лекарственному средству на их основе: 7 н. и 11 з.п. ф-лы, 24 ил., 8 табл., 2 пр.

Формула 1





FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07D 487/10 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07D 487/10 (2006.01); A61K 31/4439 (2006.01)

(21)(22) Application: 2015112098, 05.09.2013

(24) Effective date for property rights:
05.09.2013Registration date:
21.03.2018

Priority:

(30) Convention priority:
06.09.2012 JP 2012-195761

(43) Application published: 27.10.2016 Bull. № 30

(45) Date of publication: 21.03.2018 Bull. № 9

(85) Commencement of national phase: 06.04.2015

(86) PCT application:
JP 2013/073865 (05.09.2013)(87) PCT publication:
WO 2014/038606 (13.03.2014)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

JOSIDA Soko (JP),
SUGIMOTO Yuuiti (JP)

(73) Proprietor(s):

DAJITI SANKIO KOMPANI, LIMITED (JP)

(54) CRYSTALS OF DIPYROPYRROLIDINE DERIVATIVES

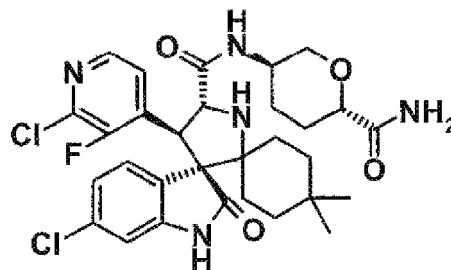
(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to crystals (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-carbamoyl tetrahydro-2H-pyran-3-yl]-6-chloro-4'-(2-chloro-3-fluoropyridin-4-yl)-4,4-dimethyl-2-oxo-1,2-dihydrodispiro [cyclohexane-1,2'-pyrrolidin-3'3-indole]-5'-carboxamide, which is represented by the following formula (1), or salts thereof, such as hydrochloride, methanesulfonate, benzenesulfonate and toluenesulfonate, which inhibit Mdm2 and have anti-tumor activity, as well as to a drug on their basis.

F o r m u l a

1



EFFECT: invention has anti-tumor activity.

18 cl, 24 dwg, 8 tbl, 2 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к кристаллам соединения диспиропирролидина, обладающим противоопухолевой активностью вследствие ингибирования murine double minute 2 (Mdm2) или его соли.

Предшествующий уровень техники

p53 известен как важный фактор ингибирования злокачественного перерождения клеток. P53 представляет собой фактор транскрипции, который индуцирует экспрессию генов, вовлеченных в клеточный цикл и апоптоз клеток в ответ на различные стрессы. Считают, что p53 ингибирует злокачественное перерождение клеток вследствие его функции регуляции транскрипции. Действительно, делецию или мутацию гена p53 наблюдают в около половины всех случаев рака человека.

Между тем, повышенная экспрессия murine double minute 2 (Mdm2), варианта E3 убиквитинлигазы, известна как фактор злокачественного перерождения клеток, которые становятся злокачественными, несмотря на присутствие нормального p53. Mdm2 представляет собой белок, чья экспрессия индуцируется p53. Mdm2 отрицательно регулирует p53 путем разрушения p53 в результате связывания домена транскрипционной активности p53, снижения транскрипционной активности p53, экспорта p53 из ядра и в последующем действуя в отношении p53 как убиквитинлигаза. Следовательно, считают, что инактивация функций и деградация p53 запускаются в клетках, в которых повышается экспрессия Mdm2, что приводит к злокачественному перерождению (непатентный документ 1).

Принимая во внимание указанные функции Mdm2, было предложено множество подходов использования веществ, которые ингибируют подавление функций p53 в результате действия Mdm2, как кандидатов в противоопухолевые средства. Были описаны примеры ингибиторов Mdm2, нацеленных на сайты связывания Mdm2-p53, которые включают производные спирооксиндола (патентные документы 1-15, непатентный документы 1-3), производные индола (патентный документ 16), производные пирролидин-2-карбоксамидов (патентный документ 17), производные пирролидинона (патентный документ 18) и производные изоиндолинона (патентный документ 19, непатентный документ 4).

Список ссылок

Патентные документы

Патентный документ 1: WO 2006/091646.

Патентный документ 2: WO 2006/136606.

Патентный документ 3: WO 2007/104664.

Патентный документ 4: WO 2007/104714.

Патентный документ 5: WO 2008/034736.

Патентный документ 6: WO 2008/036168.

Патентный документ 7: WO 2008/055812.

Патентный документ 8: WO 2008/141917.

Патентный документ 9: WO 2008/141975.

Патентный документ 10: WO 2009/077357.

Патентный документ 11: WO 2009/080488.

Патентный документ 12: WO 2010/084097.

Патентный документ 13: WO 2010/091979.

Патентный документ 14: WO 2010/094622.

Патентный документ 15: WO 2010/121995.

Патентный документ 16: WO 2008/119741.

Патентный документ 17: WO 2010/031713.

Патентный документ 18: WO 2010/028862.

Патентный документ 19: WO 2006/024837.

Непатентные документы

Непатентный документ 1: J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 10130-10131.

Непатентный документ 2: J. Med. Chem., 2006, 49, 3432-3435.

Непатентный документ 3: J. Med. Chem., 2009, 52, 7970-7973.

Непатентный документ 4: J. Med. Chem., 2006, 49, 6209-6221.

Сущность изобретения

Техническая проблема

Производное диспиропирролидина проявляет превосходную активность ингибирования Mdm2 и, следовательно, ожидаемо может использоваться в качестве лекарственного средства, в особенности, в качестве противоракового средства. Кроме того, для промышленного производства достоверно важно обнаружить кристаллы производного.

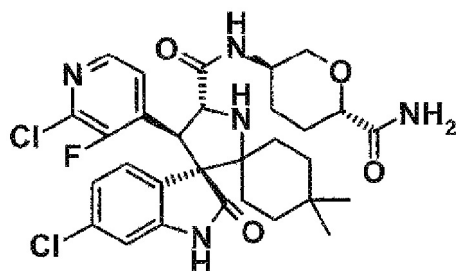
Решение проблемы

Авторы настоящего изобретения провели обширные исследования улучшения медицинской применимости производного диспиропирролидина, которое проявляет активность ингибирования Mdm2 и обладает противоопухолевой активностью, и улучшения свойств твердого состояния с указанной целью. В результате, авторы настоящего изобретения обнаружили кристаллы производного диспиропирролидина, представленные следующей формулой (1), или его соли.

Точнее настоящее изобретение относится к [1]-[18], представленным ниже.

[[1] Кристалл (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро [циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксамида, представленный следующей формулой (1), или его соль:

Формула 1



2] Кристалл соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 1 в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda = 1,54$ ангстрем).

[3] Кристалл соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 2, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda = 1,54$ ангстрем).

[4] Кристалл соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 3, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda = 1.54$ ангстрем).

[5] Кристалл гидрохлорида соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую

дифрактограмму, как показано на фиг. 4, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

5 [6] Кристалл метансульфоната соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 6, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

10 [7] Кристалл этансульфоната соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 7, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

15 [8] Кристалл бензолсульфоната соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 8, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

[9] Кристалл толуолсульфоната соединения, как определено в [1], имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 9, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

20 [10] Кристалл по [2], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,78, 9,14, 10,06, 10,78, 12,18, 13,42, 14,34, 15,50, 16,62, 17,06, 17,66, 18,18, 18,74, 20,18, 22,46, 24,90, 25,54, 26,94, 27,58$ и $28,90$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

25 [11] Кристалл по [3], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,62, 13,06, 15,10, 17,22$ и $21,98$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

[12] Кристалл по [4], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=9,18, 12,18, 15,58, 16,22, 17,22, 18,42, 18,82$ и $19,86$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=$
30 $1,54$ ангстрем).

[13] Кристалл по [5], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,46, 7,86, 9,12, 13,00, 14,42, 19,32, 20,34, 20,42$ и $21,98$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=$
35 $1,54$ ангстрем).

[14] Кристалл по [6], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,56, 8,26, 14,00, 16,26, 16,78, 17,2, 18,42, 18,62, 20,28$ и $23,06$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=$
40 $1,54$ ангстрем).

[15] Кристалл по [7], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,28, 7,72, 12,62, 14,06, 15,50, 16,62, 16,96, 19,68, 21,18,$ и $25,82$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=$
45 $1,54$ ангстрем).

[16] Кристалл по [8], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,22, 7,34, 7,90, 12,46, 13,60, 14,22, 15,56, 18,86, 19,04, 19,52, 19,72$ и $20,54$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

[17] Кристалл по [9], проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,16, 7,18, 7,88, 12,38, 13,50, 13,88, 15,46, 18,46, 19,10, 19,28, 19,66, 20,28, 21,88$ и $24,68$ в

порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

[18] Лекарственное средство, содержащее кристалл по любому из [1]-[17].

Преимущественные эффекты изобретения

- 5 Настоящее изобретение обеспечивает кристаллы (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3'3"-индол]-5'-карбоксамиды или его соли, обладающие активностью ингибирования Mdm2. Кристаллы по настоящему изобретению обладают превосходными физико-химическими свойствами
- 10 в твердом состоянии и являются применимыми в качестве противоопухолевых средств.

Краткое описание чертежей

- [Фиг. 1]. На фиг. 1 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-1. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/
- 15 секунду (имп/сек), и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, представленный в значениях 2θ .

- [Фиг. 2]. На фиг. 2 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-2. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/
- 20 секунду (имп/сек), и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

- [Фиг. 3]. На фиг. 3 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-3. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/
- 25 секунду (имп/сек), и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

- [Фиг. 4]. На фиг. 4 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (гидрохлорида), полученного в примере 2. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/секунду (имп/сек),
- 30 и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

- [Фиг. 5]. На фиг. 5 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма соединения (сульфата), полученного в примере 3. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/секунду (имп/сек), и
- горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

- 35 [Фиг. 6]. На фиг. 6 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (метансульфоната), полученного в примере 4. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/секунду (имп/сек), и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

- [Фиг. 7]. На фиг. 7 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (этансульфоната), полученного в примере 5. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/секунду (имп/сек),
- 40 и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

- [Фиг. 8]. На фиг. 8 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (бензолсульфоната), полученного в примере 6. На фигуре вертикальная ось представляет собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/секунду (имп/сек),
- 45 и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

[Фиг. 9]. На фиг. 9 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристалла (толуолсульфоната), полученного в примере 7. На фигуре вертикальная ось представляет

собой интенсивность дифракции, показанную в единицах импульсов/секунду (имп/сек), и горизонтальная ось представляет собой угол дифракции, показанный в значениях 2θ .

[Фиг. 10]. На фиг. 10 показаны изотермы адсорбции-десорбции кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-1. На фигуре вертикальная ось представляет собой изменение (%) массы соединения и горизонтальная ось представляет собой влажность (%ОВ).

[Фиг. 11]. На фиг. 11 показаны изотермы адсорбции-десорбции кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-2. На фигуре вертикальная ось представляет собой изменение (%) массы соединения и горизонтальная ось представляет собой влажность (%ОВ).

[Фиг. 12]. На фиг. 12 показаны изотермы адсорбции-десорбции кристалла (гидрохлорида), полученного в примере 2. На фигуре вертикальная ось представляет собой изменение (%) массы соединения и горизонтальная ось представляет собой влажность (%ОВ).

[Фиг. 13]. На фиг. 13 показаны изотермы адсорбции-десорбции кристалла (метансульфоната), полученного в примере 4. На фигуре вертикальная ось представляет собой изменение (%) массы соединения и горизонтальная ось представляет собой влажность (%ОВ).

[Фиг. 14]. На фиг. 14 показаны изотермы адсорбции-десорбции кристалла (этансульфоната), полученного в примере 5. На фигуре вертикальная ось представляет собой изменение (%) массы соединения и горизонтальная ось представляет собой влажность (%ОВ).

[Фиг. 15]. На фиг. 15 показаны изотермы адсорбции-десорбции кристалла (бензолсульфоната), полученного в примере 6. На фигуре вертикальная ось представляет собой изменение (%) массы соединения и горизонтальная ось представляет собой влажность (%ОВ).

[Фиг. 16]. На фиг. 16 показаны изотермы адсорбции-десорбции кристалла (толуолсульфоната), полученного в примере 7. На фигуре вертикальная ось представляет собой изменение (%) массы соединения и горизонтальная ось представляет собой влажность (%ОВ).

[Фиг. 17]. На фиг. 17 показана диаграмма, демонстрирующая данные термоанализа кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-1. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная ось представляет собой температуру ($^{\circ}\text{C}$). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

[Фиг. 18]. На фиг. 18 показана диаграмма, показывающая данные термоанализа кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-2. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная ось представляет собой температуру ($^{\circ}\text{C}$). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

[Фиг. 19]. На фиг. 19 показана диаграмма, показывающая данные термоанализа кристалла (свободной формы), полученного в примере 1-3. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная ось представляет собой температуру ($^{\circ}\text{C}$). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

[Фиг. 20]. На фиг. 20 показана диаграмма, показывающая данные термоанализа кристалла (гидрохлорида), полученного в примере 2. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная

ось представляет собой температуру (°C). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

[Фиг. 21]. На фиг. 21 показана диаграмма, показывающая данные термоанализа кристалла (метансульфоната), полученного в примере 4. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная ось представляет собой температуру (°C). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

[Фиг. 22]. На фиг. 22 показана диаграмма, демонстрирующая данные термоанализа кристалла (этансульфоната), полученного в примере 5. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная ось представляет собой температуру (°C). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

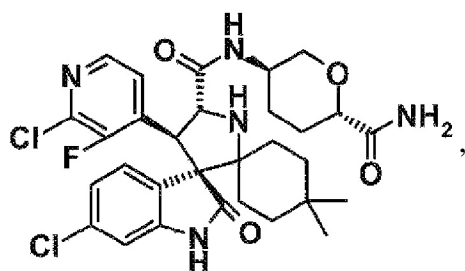
[Фиг. 23]. На фиг. 23 показана диаграмма, демонстрирующая данные термоанализа кристалла (бензолсульфоната), полученного в примере 6. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная ось представляет собой температуру (°C). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

[Фиг. 24]. На фиг. 24 показана диаграмма, демонстрирующая данные термоанализа кристалла (толуолсульфоната), полученного в примере 7. На фигуре вертикальная ось представляет собой разницу температур (DTA) и изменение массы (TG) и горизонтальная ось представляет собой температуру (°C). Сплошная линия отображает кривую DTA и пунктирная линия отображает кривую TG.

Описание вариантов осуществления изобретения

Настоящее изобретение относится к кристаллам (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиرو[циклогексан-1,2'-пирролидин-3'3"-индол]-5'-карбоксамида, представленного следующей формулой (1):

Формула 2



(далее также называемое как соединение (1)) или его соли. В указанном контексте кристаллы относятся к твердым веществам, имеющим трехмерные регулярные повторы атомов (или их популяций), составляющих внутреннюю структуру, и отличаются от аморфного твердого вещества, которое не имеет такой регулярной внутренней структуры.

Примеры соли соединения (1) включают любые таковые, описанные в примерах. Соединение (1) или его соль могут быть представлены в свободной или сольватированной форме. Соединение (1) или его соль могут присутствовать в форме гидрата, например, вследствие абсорбции влаги из воздуха. Сольваты особо не ограничены, пока они являются фармацевтически приемлемыми. Их специфические примеры включают гидрат, этанолсольват и 2-пропанолсольват.

Даже кристаллы, полученные из одного и того же соединения, могут быть получены как множество кристаллов (кристаллические полиморфы), отличающиеся по внутренней

структуре и физико-химическим свойствам в зависимости от условий кристаллизации. Кристаллами по настоящему изобретению могут быть любые из указанных кристаллических полиморфов или может быть смесь двух или более кристаллических полиморфов.

5 Кристаллы по настоящему изобретению могут иметь прикрепленную воду, как результат абсорбции влаги, когда они остаются на воздухе, или могут образовывать гидрат, например, при нагревании до 25-150°C в обычных атмосферных условиях. Кроме того, кристаллы по настоящему изобретению также могут иметь прикрепленный остаточный растворитель или содержать растворитель, используемый в кристаллизации
10 в сольвате.

В настоящей спецификации кристаллы настоящего изобретения могут быть определены на основании данных порошковой рентгеновской дифракции. Порошковая рентгеновская дифракция может проводиться путем измерения и анализа, обычно используемых в области техники, и может быть проведена, например, посредством
15 метода, описанного в примерах. В общем, гидраты или дегидраты могут варьироваться по параметрам решетки в результате адсорбции или десорбции кристаллической воды с формированием изменений угла дифракции (2θ) в порошковой рентгеновской дифракции. Также интенсивность пика может изменяться в зависимости от, например, различий в поверхности роста кристаллов или подобного (поведение кристалла).
20 Соответственно, в случае, когда кристаллы по настоящему изобретению определяют на основании данных порошковой рентгеновской дифракции, кристаллы, которые соответствуют им в отношении углов дифракции пиков при порошковой рентгеновской дифракции и в порошковых рентгеновских дифрактограммах, а также гидраты и дегидраты, полученные из них, также включены в рамки настоящего изобретения.

25 В предпочтительном варианте осуществления изобретения кристалл по настоящему изобретению представляет собой кристалл (свободную форму), имеющий порошковую рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 1 в виде схемы порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также кристаллом является кристалл, проявляющий
30 характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,78, 9,14, 10,06, 10,78, 12,18, 13,42, 14,34, 15,50, 16,62, 17,06, 17,66, 18,18, 18,74, 20,18, 22,46, 24,90, 25,54, 26,94, 27,58$ и $28,90$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения кристалл по настоящему изобретению представляет собой кристалл (свободную форму), имеющий порошковую рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 2, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также кристаллом является кристалл, проявляющий
40 характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,62, 13,06, 15,10, 17,22$ и $21,98$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения кристаллом по настоящему изобретению является кристалл (свободная форма), имеющий порошковую рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 3, в виде порошковой
45 рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также кристалл представляет собой кристалл, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=9,18, 12,18, 15,58, 16,22, 17,22, 18,42, 18,82$ и $19,86$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с

использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения кристаллом по настоящему изобретению является кристалл (гидрохлорид), имеющих порошковую рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 4, в виде порошковой
 5 рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также, кристаллом является кристалл, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,46, 7,86, 9,12, 13,00, 14,42, 19,32, 20,34, 20,42$ и $21,98$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

10 В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения кристаллом по настоящему изобретению является кристалл (метансульфонат), имеющий порошковую рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 6, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также, кристаллом является кристалл, проявляющий характерные
 15 пики при углах дифракции $2\theta=7,56, 8,26, 14,00, 16,26, 16,78, 17,72, 18,42, 18,62, 20,28$ и $23,06$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения кристаллом по настоящему изобретению является кристалл (этансульфонат), имеющий порошковую
 20 рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 7, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также, кристаллом является кристалл, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,28, 7,72, 12,62, 14,06, 15,50, 16,62, 16,96, 19,68, 21,18$ и $25,82$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с
 25 использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения кристаллом по настоящему изобретению является кристалл (бензолсульфонат), имеющий порошковую рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 8, в виде порошковой
 30 рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также, кристаллом является кристалл, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,22, 7,34, 7,90, 12,46, 13,60, 14,22, 15,56, 18,86, 19,04, 19,52, 19,72$ и $20,54$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения кристаллом по
 35 настоящему изобретению является кристалл (толуолсульфонат), имеющий порошковую рентгеновскую дифрактограмму, показанную на фиг. 9, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем). Также, кристаллом является кристалл, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,16, 7,18, 7,88, 12,38, 13,50, 13,88, 15,46,$
 40 $18,46, 19,10, 19,28, 19,66, 20,28, 21,88$ и $24,68$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение относится к лекарственному средству, содержащему в качестве активного ингредиента кристалл по настоящему
 45 изобретению.

Лекарственное средство, содержащее кристалл по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента, предпочтительно обеспечивают в форме фармацевтической композиции, включающей кристалл по настоящему изобретению и один или два или

более фармацевтически приемлемых носителей. Лекарственное средство по настоящему изобретению особо не ограничено лекарственной формой и может вводиться перорально или парентерально. Предпочтительно, лекарственное средство по настоящему изобретению вводят перорально.

- 5 Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает кристалл по настоящему изобретению в качестве, по меньшей мере, части соединения (1). Фармацевтическая композиция может содержать кристаллическую форму соединения (1), иную, чем кристаллы по настоящему изобретению. Содержание кристалла по настоящему изобретению в фармацевтической композиции может находиться в
- 10 диапазоне от 0,01 масс. % до 99,9 масс. % относительно всего соединения (1) в фармацевтической композиции, например, 0,01 масс. % или более, 0,05 масс. % или более, 0,1 масс. % или более, 0,5 масс. % или более, 1 масс. % или более, 2 масс. % или более, 3 масс. % или более, 4 масс. % или более, 5 масс. % или более, 10 масс. % или более, 20 масс. % или более, 30 масс. % или более, 40 масс. % или более, 50 масс. % или
- 15 более, 60 масс. % или более, 70 масс. % или более, 80 масс. % или более, 90 масс. % или более, 95 масс. % или более, 96 масс. % или более, 97 масс. % или более, 98 масс. % или более, 99 масс. % или более, 99,5 масс. % или более, 99,6 масс. % или более, 99,7 масс. % или более, 99,8 масс. % или более, или 99,9 масс. % или более. Присутствие или отсутствие кристалла по настоящему изобретению в фармацевтической композиции
- 20 может быть подтверждено методом инструментального анализа (например, рентгеновская порошковая дифракция, термический анализ или ИК спектры поглощения), описанным в настоящей спецификации.

- Кристаллы по настоящему изобретению могут быть использованы в качестве ингибитора Mdm2 и могут быть использованы в качестве лекарственного средства,
- 25 особенно предпочтительно противоракового средства, содержащего кристаллы по настоящему изобретению.

- В одном варианте осуществления настоящего изобретения кристалл по настоящему изобретению может быть использован в качестве ингибитора, связывающего p53-Mdm2, и/или ингибитора Mdm2 убиквитинлигазы, так как соединение (1) ингибирует связывание
- 30 p53 с Mdm2 и убиквитинирование p53 посредством Mdm2.

- Состояние связывания p53-Mdm2 может быть исследовано методом, обычно используемым специалистом в области техники для оценки состояния связывания между белками (например, иммунологическими методиками, методиками поверхностного плазмонного резонанса, и др.). Примеры методов для изучения состояния связывания
- 35 Mdm2-p53 с использованием иммунологической методики включают метод иммуноседиментации и иммуноферментного анализа (ELISA). Используемым антителом в указанных иммунологических методиках может быть анти-Mdm2 антитело и/или анти-p53 антитело, которые могут непосредственно определять Mdm2 и/или p53. Когда Mdm2 и/или p53 метят меткой (например, GST меткой или гистидиновой меткой) или
- 40 подобным, может быть использовано антитело, подходящее для метки (например, анти-GST антитело или анти-гистидиновое антитело). Методы для изучения состояния связывания Mdm2-p53 с использованием иммунологической методики описаны в, например, WO 2003/51359, WO 2003/51360, патентной заявке США № публикации 2004/259867 или 2004/259884 и WO 2005/110996. Методы изучения состояния связывания
- 45 Mdm2-p53 с использованием методики поверхностного плазмонного резонанса описаны в, например, Science, vol. 303, pp. 844-848, 2004.

Активность убиквитинлигазы Mdm2 в отношении p53 может быть оценена посредством анализа убиквитинлигазы, обычно используемого специалистом в области

техники. Убиквитинлигазная активность может быть определена, например, посредством сравнения убиквитинирования р53 ферментом активации убиквитина (E1), ферментом, связывающим убиквитин (E2), и убиквитинлигазой (E3) (Mdm2) в присутствии и
 5 отсутствии тестируемого соединения (например, относительно WO 2001/75145 и WO 2003/76608).

В другом варианте осуществления изобретения кристалл по настоящему изобретению может быть использован в качестве ингибитора супрессии транскрипционной активности р53, так как соединение (1) восстанавливает функции р53 в качестве фактора транскрипции, который подавляется Mdm2, путем ингибирования связывания Mdm2 с
 10 доменом активации р53. Ингибитор супрессии активности транскрипции р53 может быть получен посредством, например, измерения уровня мРНК или уровня белка, чья транскрипция регулируется р53 (например, р21^{Waf1/Cip1}) в присутствии или отсутствии тестируемого соединения посредством метода измерения мРНК (например, Нозерн
 15 блоттинг) или метода измерения белка (например, Вестерн блоттинг), обычно используемых специалистом в области техники, и выбора тестируемого соединения в качестве ингибитора супрессии транскрипционной активности р53, когда уровень мРНК или уровень белка повышается в присутствии тестируемого соединения по сравнению с таковым в отсутствие тестируемого соединения. Более того, ингибитор супрессии
 20 транскрипционной активности р53 также может быть определен при помощи анализа по гену репортеру с использованием репортерной активности гена репортера, включающего отвечающий элемент р53 в качестве индикатора.

В другом варианте осуществления изобретения кристалл по настоящему изобретению может быть использован в качестве ингибитора деградации р53, так как соединение
 25 (1) ингибирует убиквитинирование р53 посредством Mdm2 и таким образом предотвращает деградацию р53 в протеасомах. Ингибитор деградации р53 может быть получен, например, посредством измерения уровня белка р53 в присутствии или
 30 отсутствии тестируемого соединения при помощи метода измерения белка (например, Вестерн блоттинг), обычно используемого специалистом в области техники, и выбора тестируемого соединения в качестве ингибитора деградации р53, когда уровень белка повышается в присутствии тестируемого соединения по сравнению с таковым в
 35 отсутствие тестируемого соединения.

В другом варианте осуществления изобретения кристалл по настоящему изобретению может быть использован в качестве противоопухолевого средства, так как соединение
 40 (1) нормализует функции р53 в качестве ограничивающего рак гена, путем ингибирования связывания Mdm2-р53 и/или убиквитинирования р53 посредством Mdm2.

Активность ингибирования клеточного роста может быть оценена методами для тестирования ингибирования роста, обычно используемыми специалистом в области
 45 техники. Активность ингибирования роста клеток может быть определена посредством, например, сравнения уровня клеточного роста (например, опухолевых клеток) в присутствии или отсутствие тестируемого соединения, как описано в следующем тестовом примере 2. Уровень клеточного роста может быть оценен с использованием, например, тест-системы для оценки живых клеток. Примеры метода для оценки живых
 50 клеток включают тест поглощения [³H]-тимидина, метод BrdU, анализ МТТ и так далее.

Более того *in vivo* противоопухолевая активность может быть исследована методами
 55 для тестирования противоопухолевой активности, обычно используемыми специалистом в области техники. *In vivo* противоопухолевая активность по настоящему изобретению может быть подтверждена, например, посредством трансплантации различных опухолевых клеток мышам, крысам или подобным; после подтверждения прививки

трансплантированных клеток, перорального или внутривенного введения соединения по настоящему изобретению животным; через несколько дней или несколько недель, сравнения роста опухоли в группе, которой не вводили лекарственное средство, с таковым, в группе, которой вводили соединение.

5 Кристалл по настоящему изобретению может быть использован для лечения опухолей или раков, например, рака легкого, рака пищеварительной системы, рака яичника, рака матки, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака печени, рака головы и шеи, рака крови, рака почки, рака кожи (злокачественной меланомы и др.), ретинобластомы, опухолей яичек и саркомы, более предпочтительно рака легких, рака
10 молочной железы, рака предстательной железы, рака толстой кишки, острого миелолейкоза, злокачественной лимфомы, злокачественной меланомы, ретинобластомы, нейробластомы и саркомы. Однако настоящее изобретение не ограничено указанными раками.

Лекарственное средство по настоящему изобретению может содержать кристалл по
15 настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель и может вводиться в различных инъекциях, таких как внутривенная инъекция, внутримышечная инъекция и подкожная инъекция, или посредством различных методов, таких как пероральное введение или чрескожное введение. Фармацевтически приемлемый носитель обозначает фармакологически приемлемый материал (например, вспомогательное вещество,
20 разбавитель, добавку, растворитель и др.), которые вовлечены в транспорт композиции, содержащей кристалл по настоящему изобретению, из заданного органа в другой орган.

Композиция может быть получена путем выбора подходящей формы рецептирования (например, пероральной композиции или инъекции) в зависимости от метода введения и с использованием различных обычно используемых методов для получения
25 композиции. Примеры пероральных композиций включают таблетки, порошки, гранулы, капсулы, пилюли, пастилки, растворы, сиропы, эликсиры, эмульсии, масляные или водные суспензии и так далее. При пероральном введении могут быть использованы свободное соединение или солевая форма. Водная композиция может быть получена путем получения аддукта кислоты с фармакологически приемлемой кислотой или путем
30 получения соли щелочного металла, такого как натрий. В инъекции в композиции могут быть использованы стабилизатор, консервант, растворяющая добавка и подобные. После заполнения в сосуд раствора, который может содержать указанные добавки и подобные, композиция для применения может быть получена в виде твердой композиции путем лиофилизации или подобного. Более того, одна доза может быть заполнена в
35 один сосуд или две или более доз могут быть заполнены в сосуд.

Примеры твердых композиций включают таблетки, порошки, гранулы, капсулы, пилюли и пастилки. Указанные твердые композиции могут содержать фармацевтически приемлемые добавки вместе с кристаллом по настоящему изобретению. Примеры добавок включают наполнители, модифицирующие агенты, вяжущие вещества,
40 дезинтегрирующие агенты, средства, обеспечивающие растворение, средства, увлажняющие кожу, и смазывающие вещества, и они могут быть выбраны и смешаны, как требуется для получения композиции.

Примеры жидких композиций включают растворы, сиропы, эликсиры, эмульсии и суспензии. Такие жидкие композиции могут содержать фармацевтически приемлемые
45 добавки вместе с кристаллом по настоящему изобретению. Примеры добавок включают суспендирующие вещества и эмульгаторы и их выбирают и смешивают, как требуется для получения композиции.

Кристалл по настоящему изобретению может быть использован в лечении рака

млекопитающих, в частности, людей. Доза и интервал между введениями могут быть соответственно выбраны в зависимости от локализации заболевания, роста, массы тела, пола или анамнеза пациента, в соответствии с решением врача. Когда соединение по
 5 настоящему изобретению вводят человеку, диапазон доз составляет приблизительно от 0,01 до 500 мг/кг массы тела в сутки, предпочтительно при бл. от 0,1 до 100 мг/кг массы тела. Предпочтительно соединение по настоящему изобретению вводят человеку один раз в сутки или дозу делят на две или четыре и введение повторяют с соответствующим интервалом. Более того, суточная доза может превосходить вышеупомянутую дозу по решению врача, если необходимо.

10 Кристалл по настоящему изобретению может быть использован в комбинации с дополнительным противоопухолевым средством. Их примеры включают противоопухолевые антибиотики, противоопухолевые растительные компоненты, BRM (регуляторы биологического ответа), гормоны, витамины, противоопухолевые антитела, молекулярные таргетные лекарственные средства, и другие противоопухолевые средства.

15 Точнее, примеры алкилирующих агентов включают: алкилирующие агенты, такие как азотистый иприт, N-оксид азотистого иприта, и хлорамбуцил; азиридиновые алкилирующие агенты, такие как карбоквон и тиотепа; эпоксидные алкилирующие агенты, такие как дибромманнит и дибромодульцитол; нитрозомочевинные алкилирующие агенты, такие как кармустин, ломустин, семустин, нимустина
 20 гидрохлорид, стрептозоцин, хлорзотоцин и ранимустин; и бусульфан, импросульфана тозилат и дакарбазин.

Примеры различных метаболических антагонистов включают: пуриновые метаболические антагонисты, такие как 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин и тиоинозин; пиримидиновые метаболические антагонисты, такие как фторурацил, тегафур, тегафур-
 25 урацил, кармофур, доксифлуридин, броксуридин, цитарабин и эноцитабин; и метаболические агонисты фолиевой кислоты, такие как метотрексат и триметотрексат.

Примеры противоопухолевых антибиотиков включают: противоопухолевые антрациклиновые антибиотики, такие как митомицин C, блеомицин, пепломицин, даунорубицин, акларубицин, доксорубицин, пирарубицин, ТНР-адриамицин, 4'-
 30 эпидоксорубицин и эпирубицин; и хромомицин A3 и актиномицин D.

Примеры противоопухолевых растительных компонентов включают: винка алкалоиды, такие как виндезин, винкристин и винбластин; таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел; и эпиподофиллотоксины, такие как этопозид и тенипозид.

Примеры BRM включают факторы некроза опухоли и индометацин.

35 Примеры гормонов включают гидрокортизон, дексаметазон, метилпреднизолон, преднизолон, прастерон, бетаметазон, триамцинолон, оксиметолон, надролон, метенолон, фосфестрол, этинилэстрадиол, хлормадион и медроксипрогестерон.

Примеры витаминов включают витамин C и витамин A.

Примеры противоопухолевых антител и молекулярных таргетных лекарственных
 40 средств включают трастузумаб, ритуксимаб, цетуксимаб, нимотузумаб, денозумаб, бевацизумаб, инфликсимаб, иматиниба мезилат, gefitinib, эрлотиниб, сунитиниб, лапатиниб и сорафениб.

Примеры других противоопухолевых средств включают цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, тамоксифен, камптотецин, ифосфамид, циклофосфамид, мелфалан, L-
 45 аспарагиназу, ацеглатон, сизофиран, пицибанил, прокарбазин, пипоброман, неокарцинонстатин, гидроксимочевину, убенимекс и крестин.

Настоящее изобретение также включает метод для профилактики и/или лечения рака, включающий введение кристалла по настоящему изобретению.

Исходный материал для кристаллов по настоящему изобретению (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксамида или его соли могут быть получены, например, в соответствии с

примерами, упомянутыми ниже.

Измерение порошковой рентгеновской дифракции проводили в примере 1 при Cu K α длине волны $\lambda=1,54$ ангстрем путем метода трансмиссии с использованием D8 Discover с GADDS CST (Bruker Axs K.K.) (вольтаж пробирки: 40 кВ, ток пробирки: 40 мА, диапазон сканирования: 2-40, скорость сканирования: 20°С/мин). Измерение порошковой рентгеновской дифракции проводили в других примерах при Cu K α длине волны $\lambda=1,54$ ангстрем с использованием прибора для порошковой рентгеновской дифракции отраженного типа (RINT-TTR III, производимый Rigaku Corp.) и не отражающего держателя образцов для образцов (вольтаж пробирки: 50 кВ, ток пробирки: 300 мА, диапазон сканирования: 2-40°С, скорость сканирования: 20°С/мин, глубина образца: 0,02°, скорость вращения: 120 об./мин).

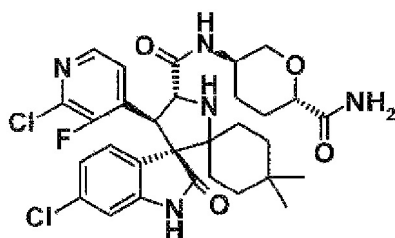
Приборами, используемыми для измерения адсорбции и десорбции, были приборы TA SGA-CX (примеры 2, 6 и 7) и приборы TA VTI-SA (примеры 1,4 и 5 (температура: 25°С, влажность 40, 60, 70, 80, 90, 80, 70, 60, 40, 20, 10, 20, 40, 60, 70% ОВ)).

В термическом анализе (TG/DTA) использовали TG/DTA6200, производимый SII Nanotechnology Inc. (скорость повышения температуры: 10°С, мин, окружающий газ: азот, скорость тока газообразного азота: 200 мл/мин).

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Формула 3



(3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксамида

Соединение (35 мг, 0,24 ммоль), полученное на стадии 3 контрольного примера 2, триэтиламин (0,04 мл, 0,30 ммоль), 1-гидроксibenзотриазол (27 мг, 0,20 ммоль) и гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (46 мг, 0,24 ммоль) добавляли к N,N-диметиоформамидному (4 мл) раствору соединения (100 мг, 0,20 ммоль), полученному на стадии 3 контрольного примера 1, и полученную смесь перемешивали при 50°С в течение 1 часа. После охлаждения реакционную смесь разводили этилацетатом, промывали водой, насыщенным раствором бикарбоната натрия и соевым раствором в указанном порядке, и затем сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель выпаривали при пониженном давлении, затем остаток очищали колоночной хроматографией на NH-силикагеле [хлороформ : метанол = 50:1 (об./об.)] и полученный очищенный продукт растворяли в метаноле (10 мл) и перемешивали при 60°С в течение 24 часов. Растворитель выпаривали при пониженном давлении для получения 94 мг (76%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 0,68 (3H, с), 0,95 (3H, с), 1,11-1,27 (2H, м), 1,35-1,81 (8H, м), 2,10-2,17 (1H, м), 2,25-2,32 (1H, м), 3,15 (1H, т, J=10,5 Гц), 3,27 (1H, ушир.с), 3,80 (1H, дд, J=11,0 Гц, 2,3 Гц), 3,85-3,95 (1H, м), 4,13 (1H, ддд, J=10,8 Гц, 4,5 Гц, 1,3 Гц), 4,44 (1H, д, J=9,2 Гц), 4,64 (1H, д, J=9,2 Гц), 5,46 (1H, д, J=3,7 Гц), 6,49 (1H, д, J=3,7 Гц), 6,74 (1H, д, J=1,8 Гц), 7,07 (1H, дд, J=8,2 Гц, 1,8 Гц), 7,31 (1H, дд, J=8,2 Гц, 2,3 Гц), 7,48-7,52 (2H, м), 7,62 (1H, с), 8,05 (1H, д, J=5,5 Гц).

MS (ESI) m/z: 618 (M+H)⁺.

Пример 1-1

Смесь трихлорэтилена/этанола (95/5) (4,75 мл) добавляли к соединению (302 мг, 0,49 ммоль), полученному в примере 1, и затем полученную смесь нагревали до приблизительно 50°C для растворения. Реакционную смесь оставляли стоять при комнатной температуре для осаждения кристалла. Осажденные кристаллы собирали фильтрацией и сушили при комнатной температуре для получения кристалла. Кристалл подвергали порошковой рентгеновской дифракции, одновременной термогравиметрии и дифференциальному термическому анализу (TG/DTA), и оценке адсорбции-десорбции.

Альтернативно, кристалл также может быть получен с использованием этилформата и ацетонитрила.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма показана на фиг. 1, изотермы адсорбции-десорбции показаны на фиг. 10 и данные термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 17.

Таблица 1

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 22 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	7.78	11.35	28	11	17.66	5.02	28
2	9.14	9.66	72	12	18.18	4.87	77
3	10.06	8.78	22	13	18.74	4.73	100
4	10.78	8.20	39	14	20.18	4.40	72
5	12.18	7.26	67	15	22.46	3.95	30
6	13.42	6.59	26	16	24.90	3.57	34
7	14.34	6.17	23	17	25.54	3.48	33
8	15.50	5.71	43	18	26.94	3.31	25
9	16.62	5.33	24	19	27.58	3.23	27
10	17.06	5.19	32	20	28.90	3.09	27

Пример 1-2

Метанол (3,6 мл) добавляли к соединению (301 мг, 0,49 ммоль), полученному в примере 1, и затем полученную смесь нагревали до приблизительно 50°C для растворения. Реакционную смесь оставляли стоять при комнатной температуре для осаждения кристалла. Осажденные кристаллы собирали фильтрацией и сушили при комнатной температуре для получения кристалла. Кристалл подвергали измерению порошковой рентгеновской дифракции, TG/DTA и показателей адсорбции-десорбции.

Альтернативно, кристалл также может быть получен с использованием 2-бутанона.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма показана на фиг. 2, изотермы адсорбции-десорбции показаны на фиг. 11 и данные термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 18.

Таблица 2

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 14 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	7.62	11.59	100	4	17.22	5.14	27
2	13.06	6.77	14	5	21.98	4.04	19
3	15.10	5.86	47				

Пример 1-3

Трихлорэтилен (1,5 мл) добавляли к соединению (100 мг, 0,16 ммоль), полученному в примере 1, и затем полученную смесь нагревали до приблизительно 50°C для растворения. Реакционную смесь оставляли стоять при комнатной температуре для осаждения кристалла. Осажденные кристаллы собирали фильтрацией и сушили при комнатной температуре для получения кристалла. Кристаллы подвергали измерению порошковой рентгеновской дифракции и TG/DTA.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма показана на фиг. 3 и результаты термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 19.

Таблица 3

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 44 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	9.18	9.62	100	5	17.22	5.14	54
2	12.18	7.26	58	6	18.42	4.81	73
3	15.58	5.68	44	7	18.82	4.71	66
4	16.22	5.46	48	8	19.86	4.47	49

Пример 2

Кристалл сольвата гидрохлорида (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксамиды воды/2-пропанола (IPA)

Концентрированную хлористоводородную кислоту (0,026 мл, 0,31 ммоль) добавляли к раствору соединения (192 мл, 0,31 ммоль) в 2-пропаноле (2,0 мл), полученному в примере 1, и затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Осадок собирали фильтрацией для получения 173 мг (85%) указанного в заголовке кристалла.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ: 0,62 (3H, c), 0,92 (3H, c), 1,13-1,61 (6H, м), 1,67-2,09 (5H, м), 2,45-2,88 (1H, м), 3,47-4,01 (5H, м), 4,58-4,77 (1H, м), 4,83-5,11 (1H, м), 6,79 (1H, c), 6,98-7,25 (3H, м), 7,51-7,73 (2H, м), 8,20-8,41 (1H, м), 8,51-8,73 (1H, м), 8,79-9,05 (1H, м), 10,35 (1H, ушир.с), 11,18 (1H, ушир.с).

Анал. расчет. для C₃₀H₃₄Cl₂FN₅O₄·HCl·0,75 H₂O·IPA: C, 54,48; H, 6,03; N, 9,63.

Обнаружено: C, 54,47; H, 6,14; N, 9,65.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма указанного в заголовке кристалла показана на фиг. 4, изотермы адсорбции-десорбции показаны на фиг. 12, и данные термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 20.

Таблица 4

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 15 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	6.46	13.67	35	6	19.32	4.59	17
2	7.86	11.24	100	7	20.34	4.36	29
3	9.12	9.69	17	8	20.42	4.35	28
4	13.00	6.80	15	9	21.98	4.04	16
5	14.42	6.14	29				

Пример 3

Сольват сульфата (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро [циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксамида воды/2-пропанол (IPA)

Концентрированную серную кислоту (0,005 мл, 0,08 ммоль) добавляли к раствору соединения (52 мг, 0,08 ммоль), полученного в примере 1, в 2-пропанол (0,05 мл) и затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней. Осадок собирали фильтрацией для получения 20 мг (34%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆): δ 0,62 (3H, c), 0,92 (3H, c), 1,03-2,01 (11H, м), 2,30 (3H, c), 2,47-2,56 (1H, м), 3,72-3,65 (4H, м), 4,62-4,75 (1H, м), 5,95-5,09 (1H, м), 6,73-6,85 (1H, м), 7,04-7,20 (3H, м), 7,54-7,73 (2H, м), 8,23-8,36 (1H, м), 8,60-8,75 (1H, м), 8,83-8,98 (1H, м), 10,83 (1H, ушир.с), 11,22 (1H, ушир.с).

Анал. расчет. для C₃₀H₃₄Cl₂FN₅O₄·H₂SO₄·0,25 H₂O·IPA: C, 49,94; H, 5,71; N, 8,82. Обнаружено: C, 49,74; H, 5,41; N, 8,85.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма указанного в заголовке соединения показана на фиг. 5.

Пример 4

Кристалл гидрата метансульфоната (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксамида

Метансульфоновую кислоту (0,026 мл, 0,39 ммоль) добавляли к раствору соединения (221 мг, 0,36 ммоль), полученного в примере 1, в 2-пропанол (3 мл) и затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Осадок собирали фильтрацией для получения 48 мг (19%) указанного в заголовке кристалла.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 0,62 (3H, c), 0,92 (3H, c), 1,03-2,01 (11H, м), 2,30 (3H, c), 2,47-2,56 (1H, м), 3,72-3,65 (4H, м), 4,62-4,75 (1H, м), 5,95-5,09 (1H, м), 6,73-6,85 (1H, м), 7,04-7,20 (3H, м), 7,54-7,73 (2H, м), 8,23-8,36 (1H, м), 8,60-8,75 (1H, м), 8,83-8,98 (1H, м), 10,83 (1H, ушир.с), 11,22 (1H, ушир.с).

Анал. расчет. для C₃₀H₃₄Cl₂FN₅O₄·CH₃SO₃H·2H₂O: C, 49,60; H, 5,64; N, 9,33. Обнаружено: C, 49,63; H, 5,45; N, 9,30.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма указанного в заголовке кристалла показана на фиг. 6, изотермы адсорбции-десорбции показаны на фиг. 13, и данные термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 21.

Таблица 5

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 31 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	7.56	11.68	48	6	17.72	5.00	65
2	8.26	10.70	31	7	18.42	4.81	42
3	14.00	6.32	100	8	18.62	4.76	42
4	16.26	5.45	47	9	20.28	4.38	94
5	16.78	5.28	67	10	23.06	3.85	37

Пример 5

Кристалл гидрата этансульфоната (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2Н-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксоамида

Этансульфоновую кислоту (0,032 мл, 0,39 ммоль) добавляли к раствору соединения (221 мг, 0,36 ммоль), полученного в примере 1, в 2-пропанол (3 мл) и затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 23 часов.

Осадок собирали фильтрацией с получением 128 мг (49%) указанного в заголовке кристалла.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 0,62 (3H, c), 0,92 (3H, c), 1,05 (3H, т, J=7,4 Гц), 1,09-1,59 (6H, м), 1,62-2,06 (5H, м), 2,38 (2H, кв, J=7,4 Гц), 2,59-3,07 (1H, м), 3,27-3,79 (5H, м), 4,53-4,76 (1H, м), 4,78-5,16 (1H, м), 6,79 (1H, c), 7,00-7,23 (3H, м), 7,51-7,75 (2H, м), 8,21-8,41 (1H, м), 8,48-9,07 (1H, м), 10,35 (1H, ушир.с), 11,19 (1H, ушир.с).

Анал. расчет. для C₃₀H₃₄Cl₂FN₅O₄·C₂H₅SO₃H·H₂O: C, 48,00; H, 6,04; N, 8,75.

Обнаружено: C, 47,97; H, 5,93; N, 8,56.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма указанного в заголовке кристалла показана на фиг. 7, изотермы адсорбции-десорбции показаны на фиг. 14, и данные термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 22.

Таблица 6

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 23 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	6.28	14.06	100	6	16.62	5.33	28
2	7.72	11.44	39	7	16.96	5.22	32
3	12.62	7.01	39	8	19.68	4.51	36
4	14.06	6.29	36	9	21.18	4.19	38
5	15.50	5.71	23	10	25.82	3.45	24

Пример 6

Кристалл гидрата бензолсульфоната (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2Н-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксоамида

Моногидрат бензолсульфоновой кислоты (30 мг, 0,17 ммоль) добавляли к раствору соединения (104 мг, 0,17 ммоль), полученного в примере 1, в 2-пропанол (1 мл) и затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов.

Осадок собирали фильтрацией для получения 116 мг (89%) указанного в заголовке

кристалла.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,69 (3H, с), 0,88 (3H, с), 1,09-1,85 (7H, м), 1,88-2,19 (4H, м), 2,53-2,77 (1H, м), 2,95-3,10 (1H, м), 3,53-3,69 (1H, м), 3,71-3,89 (2H, м), 4,68-4,85 (1H, м), 5,47-5,80 (2H, м), 6,52 (1H, с), 6,77-6,90 (1H, м), 7,03-7,11 (1H, м), 7,24-7,44 (5H, м), 7,63-7,98 (4H, м), 8,09-8,43 (1H, м), 10,16 (1H, ушир.с), 10,96 (1H, ушир.с).

Анал. расщ. для $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{FN}_5\text{O}_4\cdot\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_3\text{H}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$: С, 53,80; Н, 5,39; N, 8,71.

Обнаружено: С, 53,89; Н, 5,40; N, 8,80.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма указанного в заголовке кристалла показана на фиг. 8, изотермы адсорбции-десорбции показаны на фиг. 15, и данные термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 23.

Таблица 7

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 16 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	6.22	14.20	25	7	15.56	5.69	22
2	7.34	12.03	100	8	18.86	4.70	16
3	7.90	11.18	50	9	19.04	4.66	16
4	12.46	7.10	18	10	19.52	4.54	19
5	13.60	6.51	16	11	19.72	4.50	23
6	14.22	6.22	16	12	20.54	4.32	20

Пример 7

Кристалл гидрата п-толуолсульфоната (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоксоамида

Раствор ацетонитрила (4 мл) моногидрата п-толуолсульфоновой кислоты (85 мг, 0,45 ммоль) добавляли к суспензии соединения (300 мг, 0,50 ммоль), полученного в примере 1, в ацетонитриле (4 мл) и затем полученную смесь нагревали при приблизительно 50°C для растворения. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 дня. Осадок собирали фильтрацией для получения 255 мг (66%) указанного в заголовке кристалла.

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 0,63 (3H, с), 0,92 (3H, с), 1,09-1,59 (6H, м), 1,66-2,03 (5H, м), 2,29 (3H, с), 2,70-2,91 (1H, м), 3,34-3,74 (5H, м), 4,67 (1H, д, $J=10,1$ Гц), 4,80-5,11 (1H, м), 6,80 (1H, с), 7,02-7,22 (5H, м), 7,43-7,52 (2H, м), 7,55-7,70 (2H, м), 8,23-8,39 (1H, м), 8,45-8,74 (1H, м), 10,33 (1H, ушир.с), 11,14 (1H, ушир.с).

Анал. расщ. для $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{FN}_5\text{O}_4\cdot\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$: С, 54,34; Н, 5,55; N, 8,56.

Обнаружено: С, 54,06; Н, 5,45; N, 8,50.

Порошковая рентгеновская дифрактограмма указанного в заголовке кристалла показана на фиг. 9, изотермы адсорбции-десорбции показаны на фиг. 16, и данные термического анализа (TG/DTA) показаны на фиг. 24.

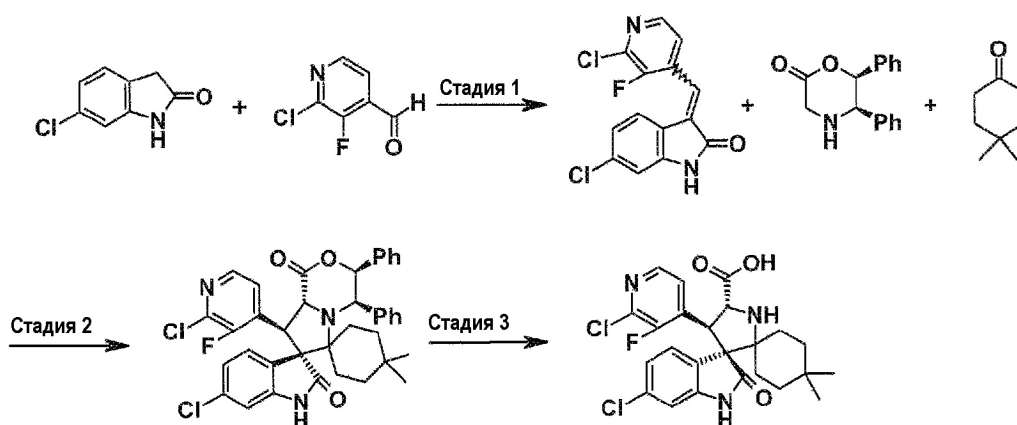
Таблица 8

Пик порошковой рентгеновской дифрактограммы (относительная интенсивность 17 или более)

Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность	Номер пика	2θ	Значение d	Относительная интенсивность
1	6.16	14.34	23	8	18.46	4.80	21
2	7.18	12.30	100	9	19.10	4.64	27
3	7.88	11.21	48	10	19.28	4.60	19
4	12.38	7.14	18	11	19.66	4.51	22
5	13.50	6.55	22	12	20.28	4.38	32
6	13.88	6.37	23	13	21.88	4.06	17
7	15.46	5.73	25	14	24.68	3.60	19

Контрольный пример 1

Формула 4



Стадия 1. (3E/Z)-6-хлор-3-[(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)метилден]-1,3-дигидро-2H-индол-2-он

N,N-диизопропилэтиламин (0,46 мл, 2,63 ммоль) добавляли к раствору 6-хлор-1,3-дигидро-2H-индол-2-она (2,20 г, 13,11 ммоль) и 2-хлор-3-фторизоникотинальдегида (2,20 г, 13,8 ммоль) в метаноле (130 мл) и полученную смесь нагревали в колбе с обратным холодильником в течение 16 часов. После охлаждения осадок собирали фильтрацией, промывали холодным метанолом и сушили для получения 3,37 г (83%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

MS (APCI) m/z: 309 (M+H)⁺.

Стадия 2. (3'S,4'R,7'S,8'S,8a'R)-6"-хлор-8'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-3',4'-дифенил-3',4',8',8a'-тетрагидро-1'H-диспиро[циклогексан-1,6'-пирроло[2,1-с][1,4]оксазин-7',3"-индол]-1',2"(1"H)-дион

Комплекс трифторида борона-диэтилового эфира (0,15 мл, 1,20 ммоль) и 4A молекулярные сита (порошок) (3 г) добавляли к тетрагидрофурановому раствору (30 мл) соединения (1,86 г, 6,00 ммоль), полученного на стадии 1, (5R,6S)-5,6-дифенилморфолин-2-ону (1,67 г, 6,60 ммоль) и 4,4-диметилциклогексанону (0,83 г, 6,60 ммоль) в атмосфере азота и полученную смесь перемешивали при нагревании при 70°C в течение 7 дней. После охлаждения нерастворимое вещество удаляли фильтрацией через целит и фильтрат промывали солевым раствором и затем сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель выпаривали при пониженном давлении и осадок очищали колоночной хроматографией на силикагеле [н-гексан : этилацетат = 4:1 → 1:1

(об./об.)] для получения 3,39 г (84%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 0,21 (3H, с), 0,53 (3H, с), 0,89-1,08 (3H, м), 1,28-1,43 (3H, м), 1,73-1,81 (1H, м), 2,23-2,33 (1H, м), 4,58 (1H, д, $J=11,0$ Гц), 4,86 (1H, д, $J=3,2$ Гц), 5,31 (1H, д, $J=11,0$ Гц), 6,25 (1H, д, $J=8,3$ Гц), 6,67 (1H, дд, $J=8,3$ Гц, 1,8 Гц), 6,72-6,77 (2H, м), 6,93 (1H, д, $J=1,8$ Гц), 7,04-7,17 (6H, м), 7,18-7,25 (3H, м), 7,79 (1H, т, $J=4,6$ Гц), 7,99 (1H, с), 8,29 (1H, д, $J=5,0$ Гц).

MS (APCI) m/z : 670 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Стадия 3. (4'S,5'R)-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоновая кислота

Соединение (630 мг, 0,94 ммоль), полученное на стадии 2, растворяли в ацетонитриле (10 мл) и воде (4 мл), добавляли карбонат калия (130 мг, 0,94 ммоль) и полученную смесь нагревали в колбе с обратным холодильником при 85°C в течение 16 часов. После охлаждения добавляли безводный сульфат магния (113 мг, 0,94 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. После экстракции этилацетатом органический слой промывали соевым раствором и сушили над безводным сульфатом магния. Растворитель выпаривали при пониженном давлении для получения (4'S,5'R)-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-1'-[(1R,2S)-2-гидрокси-1,2-дифенилэтил]-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3',3"-индол]-5'-карбоновой кислоты (650 мг, 100%) в виде твердого вещества

(МС (ESI) m/z : 688 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$). Полученную карбоновую кислоту (650 мг, 0,94 ммоль) растворяли в метаноле (30 мл) и воде (8 мл), добавляли церий (IV) нитрат диаммония (1,55 г, 2,82 ммоль) при ледяном охлаждении и полученную смесь перемешивали при той же температуре в течение 30 минут. Карбонат калия (780 мг, 5,64 ммоль) добавляли при ледяном охлаждении и полученную смесь перемешивали при той же температуре в течение 1 часа. Нерастворимое вещество удаляли путем фильтрации через целит, затем фильтрат концентрировали при пониженном давлении и к полученному остатку добавляли воду с последующей экстракцией этилацетатом. Органический слой промывали соевым раствором и сушили над безводным сульфатом натрия.

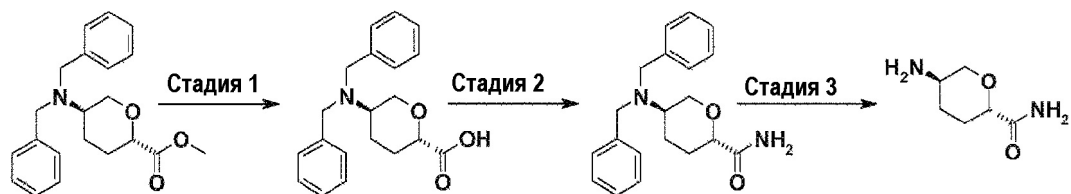
Растворитель выпаривали при пониженном давлении и полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле [хлороформ : метанол = 20:1 \rightarrow 4:1 (об./об.)] для получения 152 мг (33%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

^1H ЯМР (500 МГц, CD_3OD): δ 0,74 (3H, с), 0,9 (3H, с), 1,29-1,44 (2H, м), 1,48-1,58 (2H, м), 1,64-1,76 (1H, м), 1,94-2,02 (1H, м), 2,11 (1H, ддд, $J=14,0$ Гц, 14,0 Гц, 4,0 Гц), 2,43-2,53 (1H, м), 5,07 (1H, д, $J=10,3$ Гц), 5,32 (1H, д, $J=10,3$ Гц), 6,84 (1H, д, $J=1,7$ Гц), 7,16 (1H, дд, $J=8,3$ Гц, 2,0 Гц), 7,63 (1H, дд, $J=8,0$ Гц, 2,3 Гц), 7,75 (1H, т, $J=5,2$ Гц), 8,15 (1H, д, $J=5,2$ Гц).

MS (ESI) m/z : 492 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Контрольный пример 2

Формула 5



Стадия 1. 2,6-ангди-3,4,5-тридесокси-5-(дибензиламино)-L-эритрогексоновая

кислота

Метил 2,6-ангидро-3,4,5-тридезоксид-5-(добензиламино)-L-эритрогексонат (1,60 г, 4,70 ммоль) растворяли в метаноле (30 мл), 1Н раствор гидроксида натрия (10 мл) постепенно добавляли при ледяном охлаждении и затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Dowex 50W-X8 добавляли к реакционной смеси для доведения рН до 5-6, нерастворимое вещество удаляли фильтрацией и затем фильтрат концентрировали при пониженном давлении для получения 1,7 г (100%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 1,18-1,26 (1H, м), 1,36-1,48 (1H, м), 1,79-1,97 (2H, м), 2,62 (1H, т, $J=11,0$ Гц), 3,18 (1H, т, $J=10,4$ Гц), 3,40 (1H, д, $J=11,5$ Гц), 3,51-3,61 (4H, м), 3,90-3,99 (1H, м), 7,12-7,38 (10H, м).

MS (ESI) m/z : 326 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Стадия 2. (2S,5R)-5-(добензиламино)тетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамид

Соединение (870 мг, 2,67 ммоль), полученное на стадии 1 выше, растворяли в N,N-диметилформамиде (30 мл), добавляли 1-гидроксibenзотриазол (361 мг, 2,67 ммоль) и гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (614 мг, 3,20 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Добавляли хлорид аммония (285 мг, 5,44 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (1,86 мл, 10,7 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 8 часов. Реакционную смесь разводили этилацетатом и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия и соевым раствором в указанном порядке и сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель выпаривали при пониженном давлении для получения 495 мг (57%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 1,35-1,45 (1H, м), 1,60-1,70 (1H, м), 2,10-2,18 (1H, м), 2,21-2,28 (1H, м), 2,76 (1H, тт, $J=11,4$ Гц, 4,0 Гц), 3,44 (1H, т, $J=10,9$ Гц), 3,67 (4H, кв, $J=14,2$ Гц), 3,71-3,73 (1H, м), 4,04 (1H, дкв, $J=11,0$ Гц, 2,1 Гц), 5,35 (1H, с), 6,40 (1H, с), 7,21-7,36 (10H, м).

MS (ESI) m/z : 325 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Стадия 3. (2S,5R)-5-аминотетрагидро-2H-пиран-2-карбоксамид

Соединение (490 мг, 1,51 ммоль), полученное на стадии 2 выше, растворяли в этаноле (10 мл), добавляли 20% гидроксид палладия (100 мг) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов в атмосфере водорода. Катализатор удаляли фильтрацией через целит, затем растворитель в фильтрате выпаривали при пониженном давлении и остаток сушили для получения 215 мг (99%) указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1,11-1,22 (1H, м), 1,25-1,35 (1H, м), 1,83-1,91 (2H, м), 2,51-2,60 (1H, м), 2,90 (1H, т, $J=10,5$ Гц), 3,52 (1H, д, $J=11,9$ Гц), 3,78-3,84 (1H, м), 6,99 (1H, ушир.с), 7,09 (1H, ушир.с).

MS (ESI) m/z : 145 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Тестовый пример 1. Анализ связывания Mdm2/p53

Разведение белка, содержащее 6,25 нМ каждого из белков His-p53 (сшитый белок р53 частичного белка, имеющего аминокислоты р53 в положениях 1-132, с белком гистидином) и GST-Mdm2 (сшитый белок частичного белка Mdm2, имеющего аминокислоты Mdm2 в положениях 25-108 с остатком лейцина 33, замещенным глютаминовой кислотой, с глютаминотрансферазой) получали с использованием

белкового буферного раствора (20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% BSA). Такое разведение белка добавляли в количестве 8 мкл/ячейку в 384-луночный планшет (384-луночный низкообъемный NBC, Corning Inc., каталожный №: 3676).

5 Далее тестируемое соединение разводили ДМСО для получения белкового буферного раствора, содержащего 10% разведение, и такой буферный раствор добавляли в планшет в количестве 4 мкл/ячейку.

Впоследствии раствор, содержащий XL-665-меченное анти-His антитело (HTRF моноклональное анти-6HIS антитело, меченное XL665 (каталожный №: 61HISXLB), Shering/Cisbio Bioassays) и европий (Eu)-меченное анти-GST антитело (HTRF
10 моноклональное анти-GST антитело, меченное криптатом европия, Shering/Cisbio Bioassays, каталожный №: 61GSTKLB) в концентрациях 2,5 мкг/мл и 0,325 мкг/мл, соответственно, получали с использованием буферного раствора для разведения антител (20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% BSA, 0,5 M KF). Указанные разведения добавляли в количестве 8 мкл/ячейку (общий объем реакционного раствора: 20 мкл/
15 ячейку). Затем планшет оставляли при 25° в течение 1 часа.

Флуоресценцию с временным разрешением при 620 нм и 665 нм измеряли с длиной волны испускания 320 нм с использованием счетчика планшетов (ARVOsx, PerkinElmer Co., Ltd. или PHERAstar, BMG LABTECH). Соотношение (R) рассчитывали с использованием измеренных значений (RFU 620 нм и RFU 665 нм) в соответствии со
20 следующей формулой:

$$R = (RFU\ 665\text{ нм} - BI \times RFU\ 620\text{ нм}) / RFU\ 620\text{ нм}.$$

BI: измеренное значение реакционного раствора при 665 нм (только каждого буферного раствора), не дополненного каждым белком, соединением и антителами.

$$C\ (\text{фактор коррекции}) = A - BI/D.$$

25 A и D: каждое измеренное значение реакционного раствора при 665 нм и 620 нм, дополненного только раствором Eu-меченного анти-GST антитела.

Значение R, рассчитанное из ячеек, дополненных His-p53, GST-Mdm2, тестируемым соединением и каждым антителом определяли как R (образец). Значение R, рассчитанное из ячеек, дополненных GST-Mdm2, тестируемым соединением и каждым антителом, но
30 без His-p53 определяли как R (исходно). Т/С рассчитывали из формулы, показанной ниже. Значение ИК₅₀ для связывания Mdm2/p53 рассчитывали при помощи сигмовидной коррективы.

$$T/C = (R\ (\text{образец}) - R\ (\text{исходно})) / (R\ (\text{контроль}) - R\ (\text{исходно})).$$

Соединение (1) проявляло значение ИК₅₀ 0,1 мкМ или ниже.

35 Тестовый пример 2. Анализ ингибирования роста клеток

Анализ ингибирования роста клеток проводили с использованием клеточной линии человеческих клеток рака легкого NCI-H460, имеющих дикий тип p53.

Клетки NCI-H460 суспендировали в среде (среда RPMI1640, содержащая 10% эмбриональной бычьей сыворотки) и суспензию инокулировали в количестве 500 клеток/
40 150 мкл/ячейку в 96-луночные мультячейные планшеты. Тестируемое соединение растворяли в ДМСО, и полученный раствор разводили средой для получения раствора образца (концентрация ДМСО: 1% или ниже). На следующий день после инокуляции среду, не дополненную тестируемым соединением или раствором образца, добавляли
45 в количестве 50 мкл/ячейку. Анализ МТТ проводили непосредственно после добавления среды в количестве 50 мкл на следующий день после инокуляции клеток и после того, как раствор образца или среды добавляли к клеткам с последующим культивированием при 37°C в течение 3 дней в атмосфере 5% CO₂. Анализ МТТ проводили, как показано

ниже.

5 мг/мл МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола, Sigma-Aldrich Co., М-2128) получали с использованием фосфатного буферного раствора (Dulbecco's phosphate-buffered saline). Указанный раствор МТТ добавляли в количестве 20 мкл/ячейку. Затем планшет культивировали при 37°C в течение 4 часов в атмосфере 5% CO₂. Планшет центрифугировали при 1200 об./мин в течение 5 минут и затем надосадочную жидкость культуры удаляли путем аспирации с использованием диспенсера. ДМСО добавляли в количестве 150 мкл/ячейку для растворения образующего формазана. Планшет перемешивали с использованием миксера планшетов для однородного распределения окрашивания каждой ячейки. Поглощение каждой ячейки измеряли в условиях ОП 540 нм и контроля 660 нм с использованием счетчика планшетов (SpectraMax PLUS384, Molecular Devices, CA, USA).

Значение ОП, измеренное в день добавления раствора образца, определяли как S. Значение ОП, измеренное через три дня после добавления раствора образца, определяли как T. Значение ОП, измеренное через три дня после добавления разведения ДМСО, определяли как C. T/C (%) определяли при каждой концентрации в соответствии с формулой расчета, показанной ниже, для получения кривой доза-ответ, из которой рассчитывали концентрацию 50% ингибирования роста (значение GI₅₀).

$$T/C (\%) = (T - S) / (C - S) \times 100.$$

Соединение (1) оказывало эффект ингибирования роста клеток GI₅₀ (мкМ) < 0,1.

Пример получения 1. Капсула

5 г кристалла, полученного в примерах, 115 г лактозы, 58 г кукурузного крахмала и 2 г стеарата магния смешивали с использованием V-смесителя и затем заполняли в количестве 180 мг/капсулу в № 3 оболочки капсул для получения капсул.

Пример получения 2. Таблетки

5 г кристалла, полученного в примерах, 90 г лактозы, 34 г кукурузного крахмала, 20 г кристаллической целлюлозы и 1 г стеарата магния смешивали с использованием V-смесителя и затем прессовали в таблетировочном прессе в массу 150 мг/таблетку для получения таблеток.

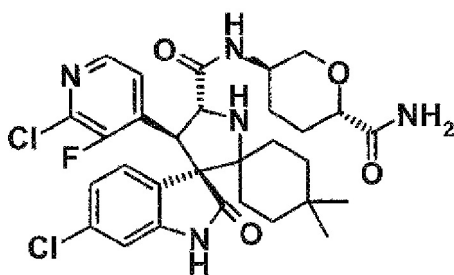
Пример получения 3. Суспензия

Метилцеллюлозу диспергировали и растворяли в очищенной воде для получения дисперсионной среды. Кристалл, полученный в примерах, отвешивали в мельницу. Дисперсионную среду добавляли к кристаллу небольшими частями, при тщательном перемешивании смеси. Очищенную воду добавляли для получения 100 г суспензии.

(57) Формула изобретения

1. Кристалл (3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-карбамоилтетрагидро-2H-пиран-3-ил]-6"-хлор-4'-(2-хлор-3-фторпиридин-4-ил)-4,4-диметил-2"-оксо-1",2"-дигидродиспиро[циклогексан-1,2'-пирролидин-3'3"-индол]-5'-карбоксоамида, представленный следующей формулой (1), или его соль:

Формула 1



2. Кристалл соединения по п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 1, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

3. Кристалл соединения по п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 2, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

4. Кристалл соединения по п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 3, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

5. Кристалл гидрохлорида соединения по п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 4, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

6. Кристалл метансульфоната соединения по п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 6, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

7. Кристалл этансульфоната соединения по п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 7, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

8. Кристалл бензолсульфоната соединения, как определено в п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 8, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

9. Кристалл толуолсульфоната соединения, как определено в п. 1, имеющий рентгеновскую дифрактограмму, как показано на фиг. 9, в виде порошковой рентгеновской дифрактограммы, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

10. Кристалл по п. 2, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,78, 9,14, 10,06, 10,78, 12,18, 13,42, 14,34, 15,50, 16,62, 17,06, 17,66, 18,18, 18,74, 20,18, 22,46, 24,90, 25,54, 26,94, 27,58$ и $28,90$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

11. Кристалл по п. 3, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,62, 13,06, 15,10, 17,22$ и $21,98$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

12. Кристалл по п. 4, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=9,18, 12,18, 15,58, 16,22, 17,22, 18,42, 18,82$ и $19,86$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

13. Кристалл по п. 5, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,46,$

7,86, 9,12, 13,00, 14,42, 19,32, 20,34, 20,42 и 21,98 в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

5 14. Кристалл по п. 6, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=7,56, 8,26, 14,00, 16,26, 16,78, 17,72, 18,42, 18,62, 20,28$ и $23,06$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

10 15. Кристалл по п. 7, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,28, 7,72, 12,62, 14,06, 15,50, 16,62, 16,96, 19,68, 21,18$ и $25,82$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

15 16. Кристалл по п. 8, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,22, 7,34, 7,90, 12,46, 13,60, 14,22, 15,56, 18,86, 19,04, 19,52, 19,72$ и $20,54$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

17. Кристалл по п. 9, проявляющий характерные пики при углах дифракции $2\theta=6,16, 7,18, 7,88, 12,38, 13,50, 13,88, 15,46, 18,46, 19,10, 19,28, 19,66, 20,28, 21,88$ и $24,68$ в порошковой рентгеновской дифрактограмме, полученной с использованием $K\alpha$ -излучения меди (длина волны $\lambda=1,54$ ангстрем).

20 18. Лекарственное средство, обладающее противоопухолевой активностью, содержащее кристалл по любому из пп. 1-17.

25

30

35

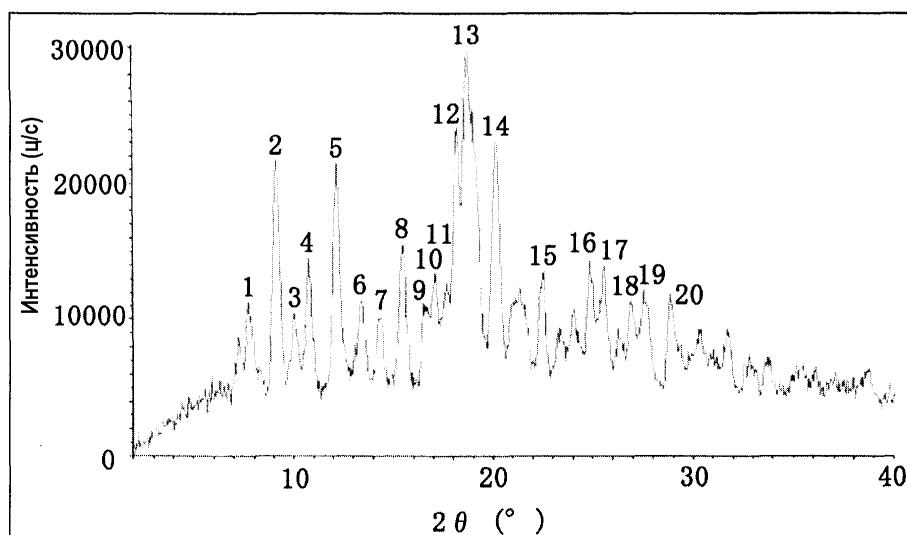
40

45

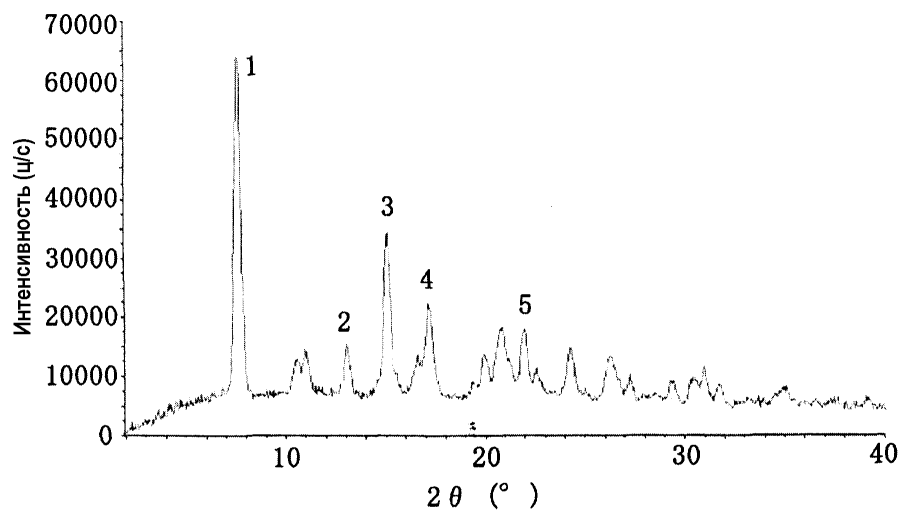
523191

1/12

ФИГ.1

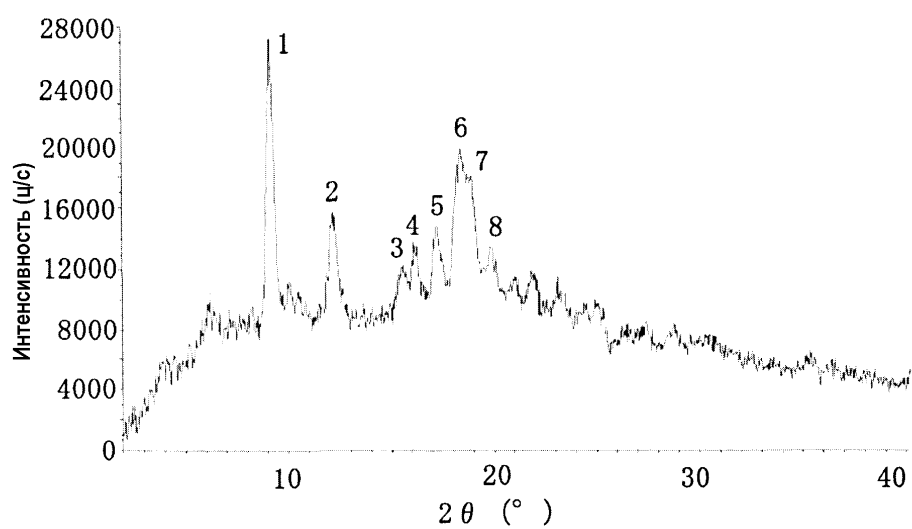


ФИГ.2

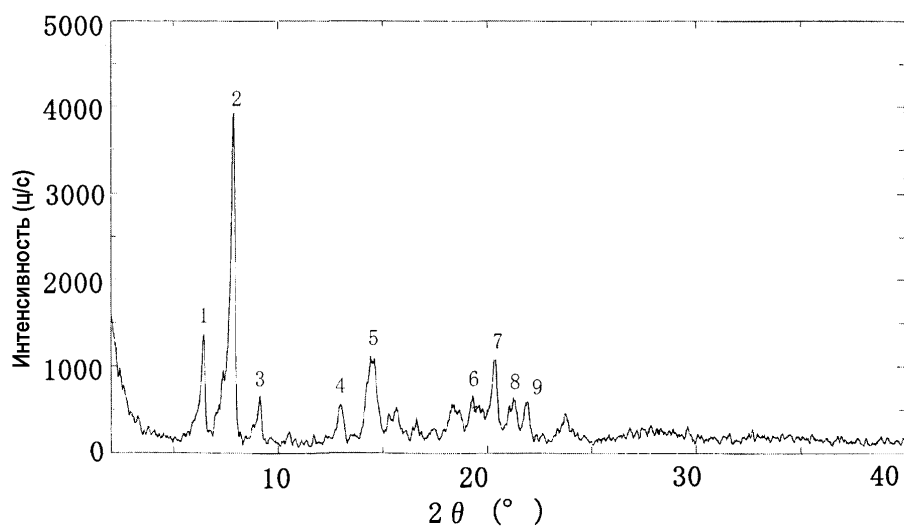


2/12

ФИГ.3

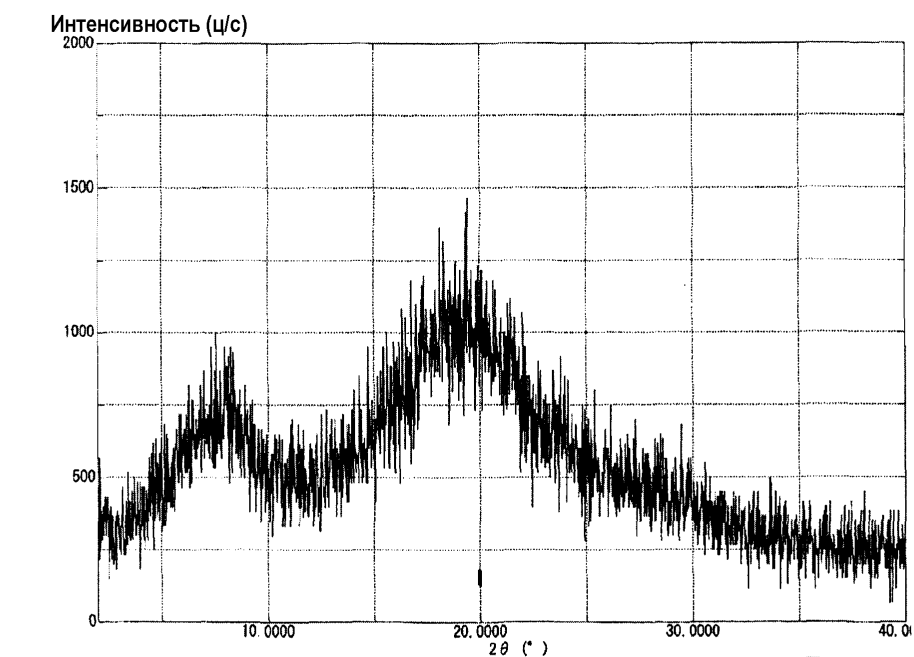


ФИГ.4

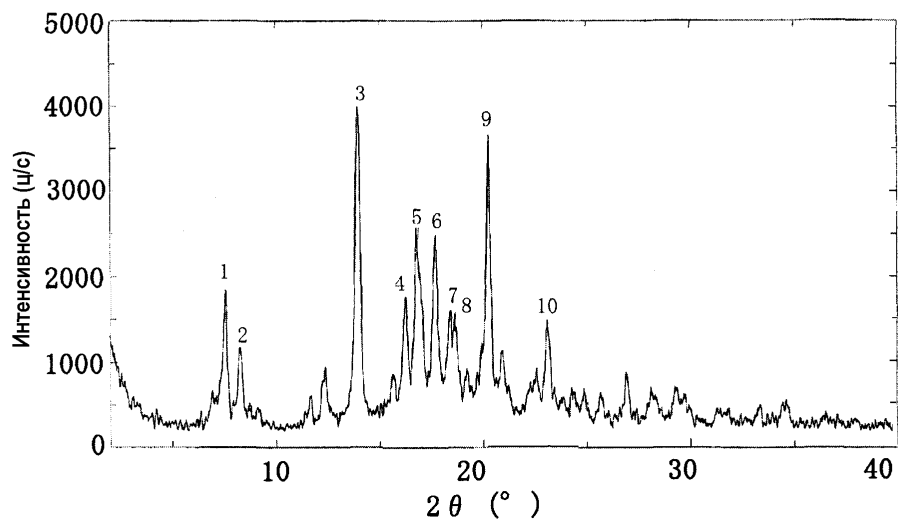


ФИГ.5

3/12

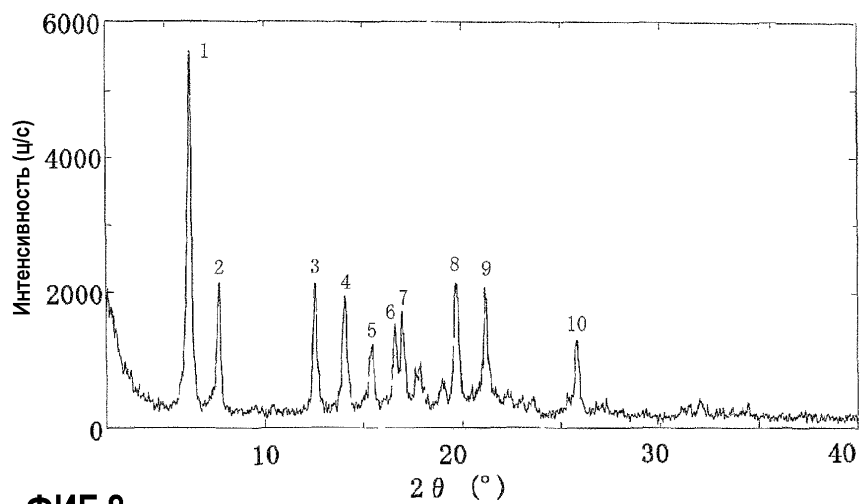


ФИГ.6

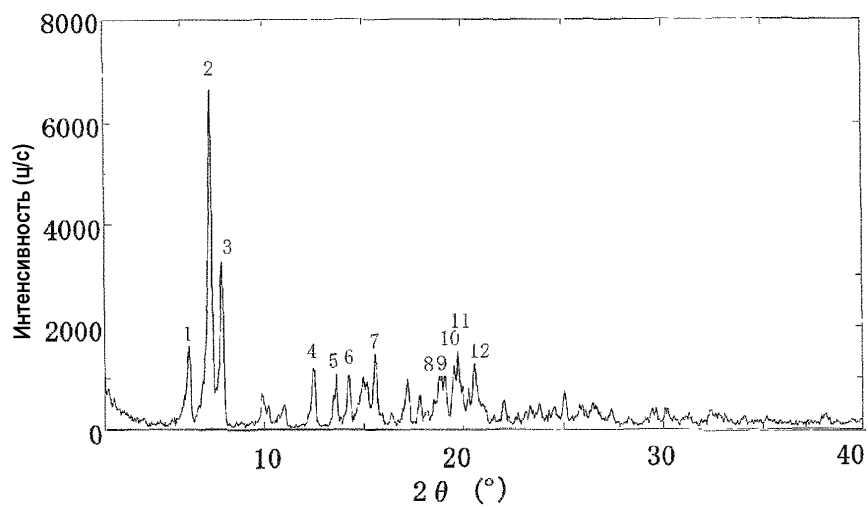


4/12

ФИГ.7

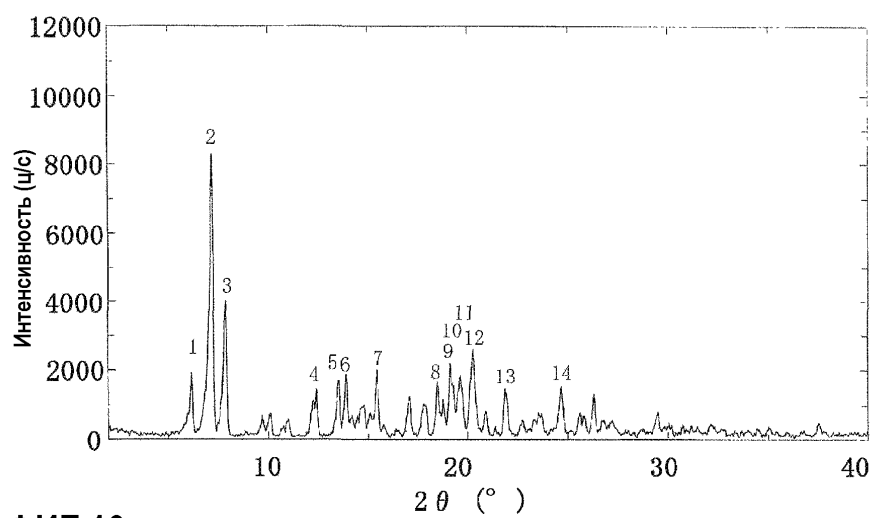


ФИГ.8

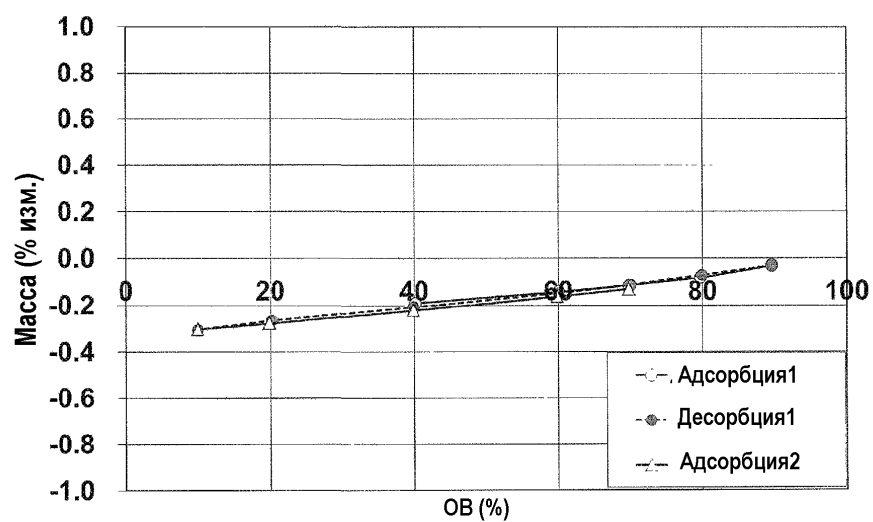


5/12

ФИГ.9

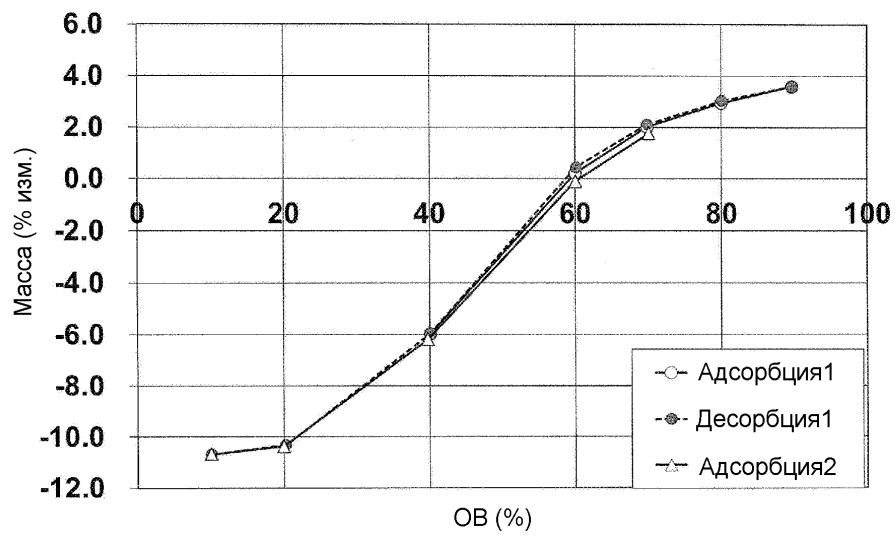


ФИГ.10

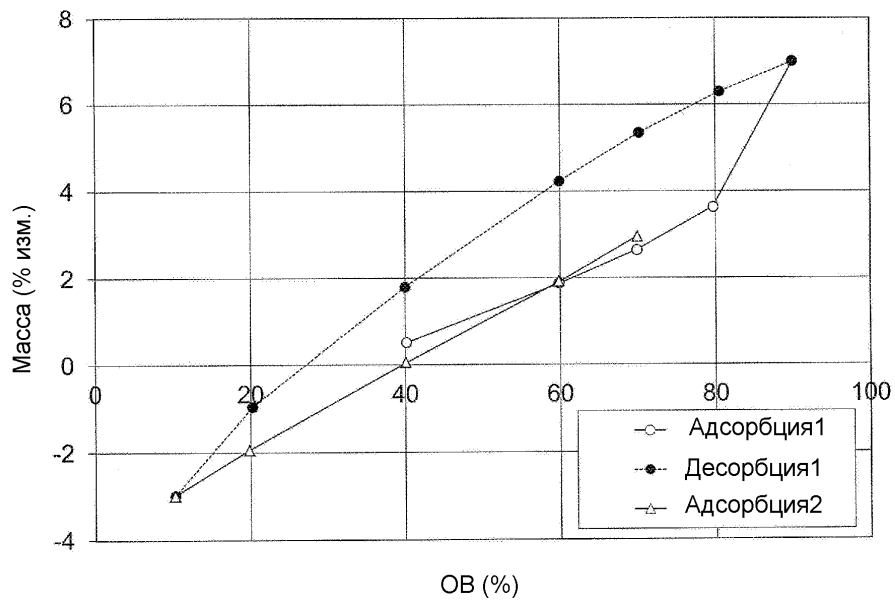


6/12

ФИГ.11

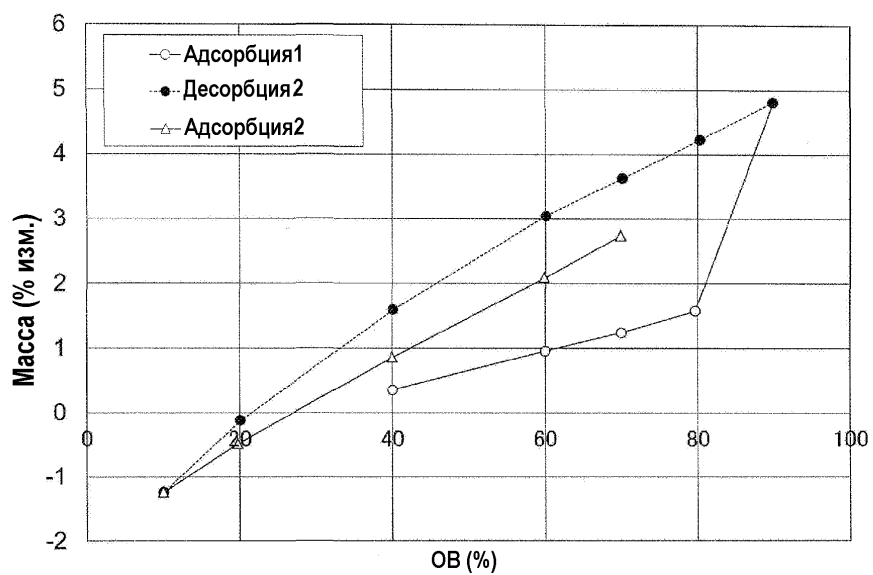


ФИГ.12

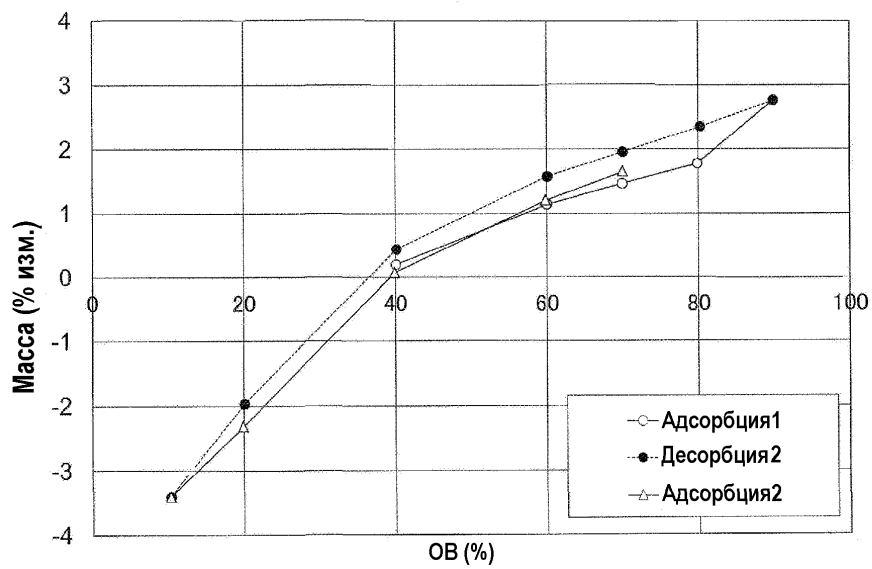


7/12

ФИГ.13

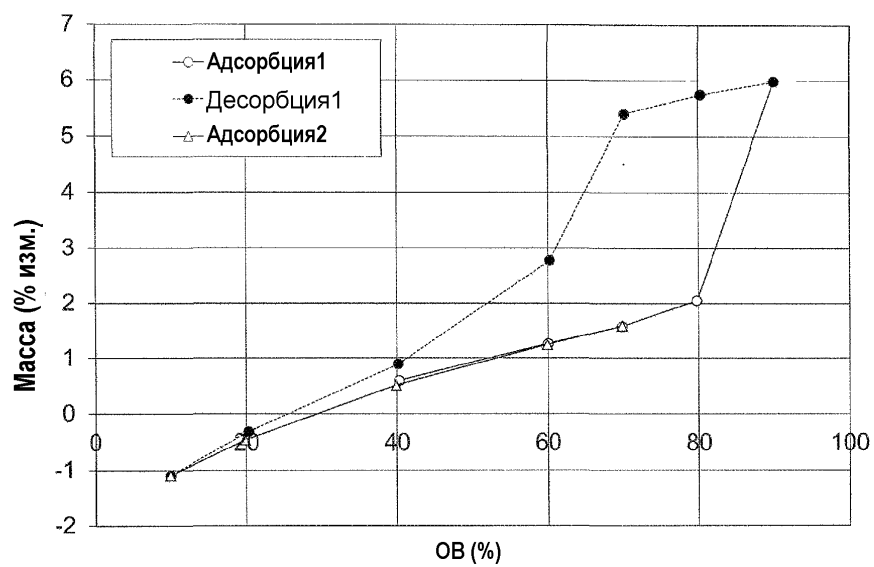


ФИГ.14

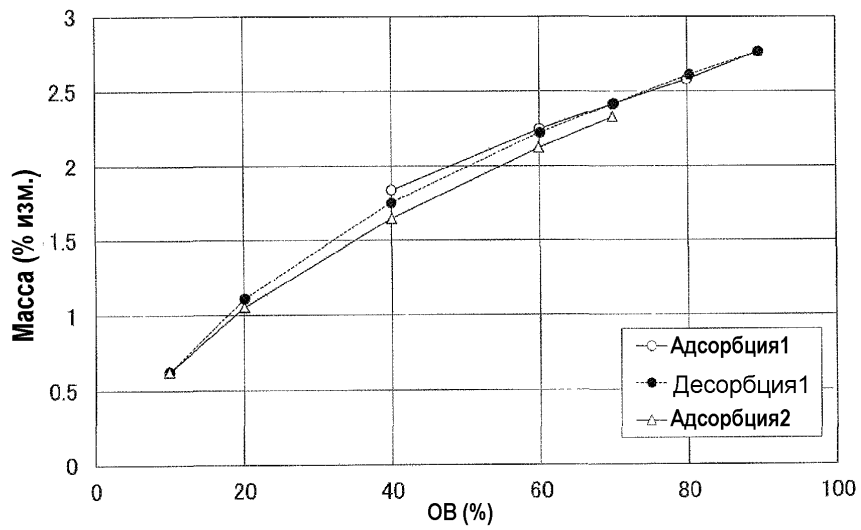


8/12

ФИГ.15

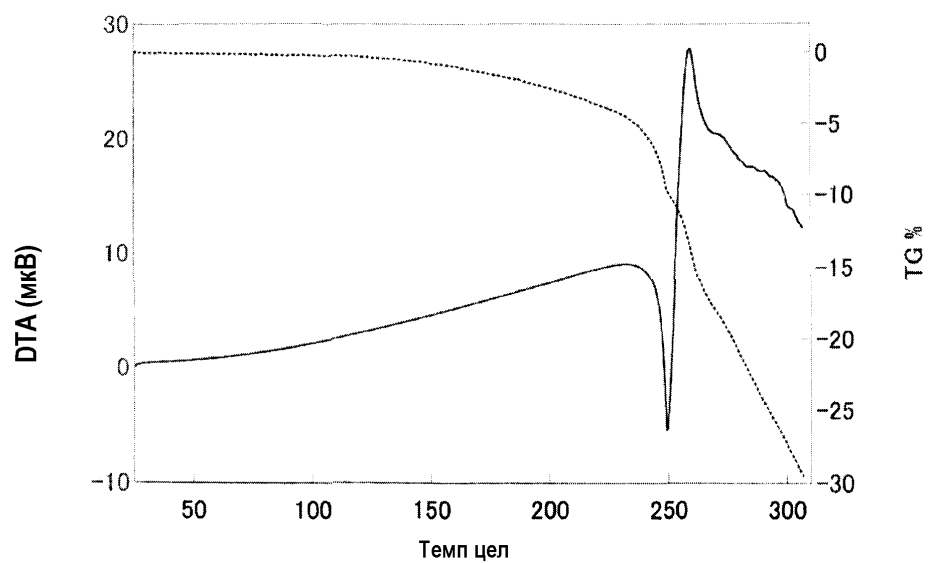


ФИГ.16

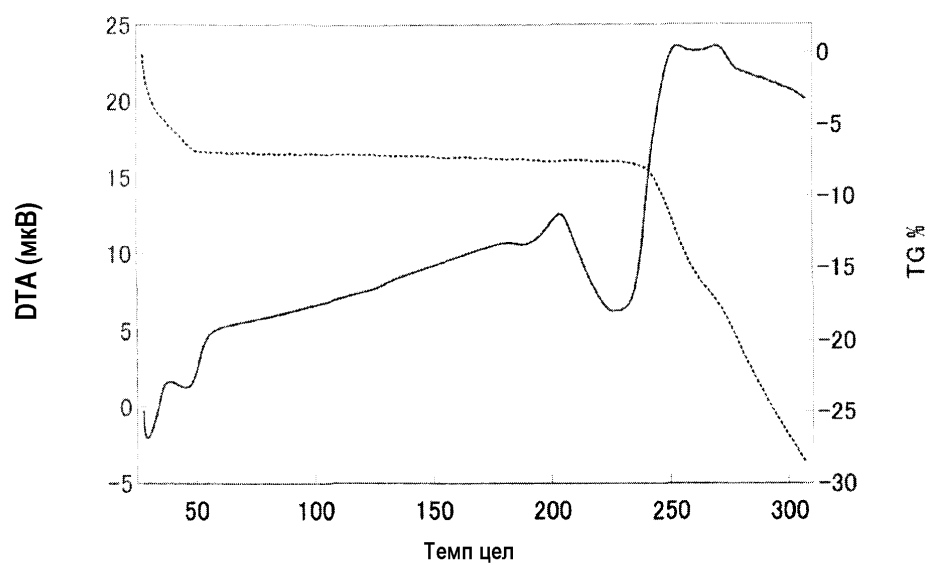


9/12

ФИГ.17

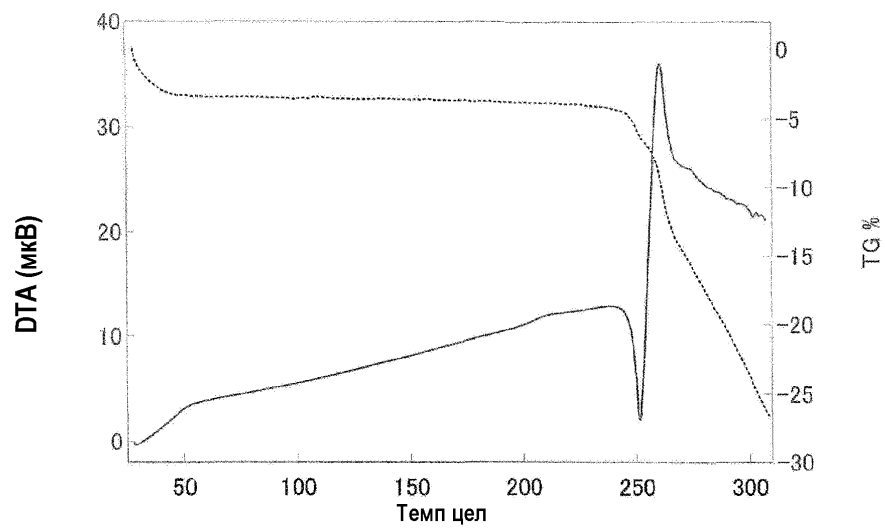


ФИГ.18

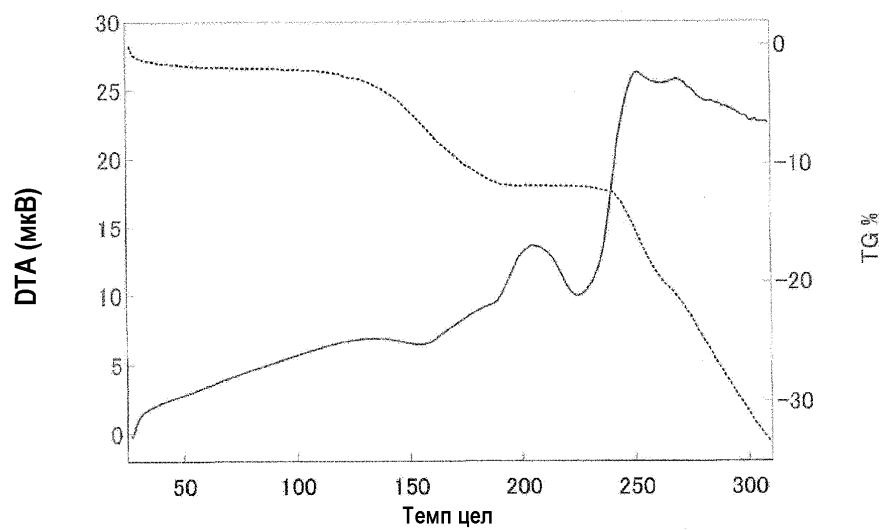


10/12

ФИГ.19

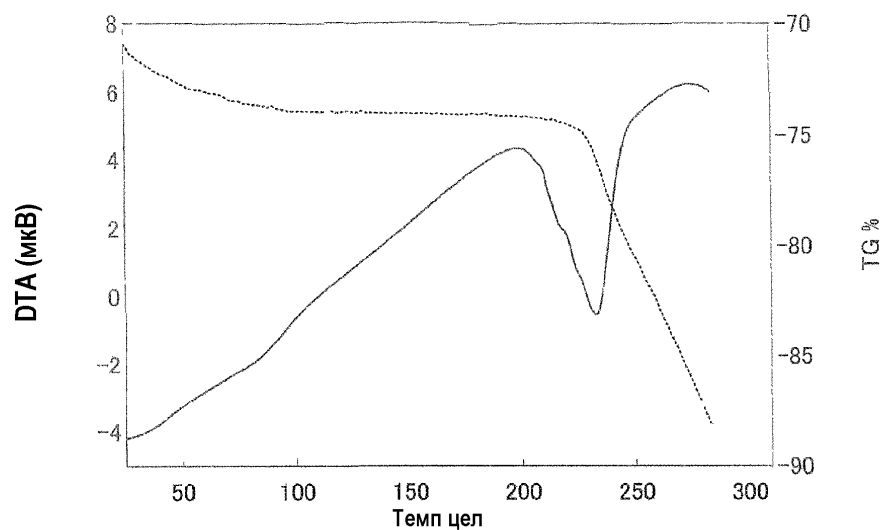


ФИГ.20

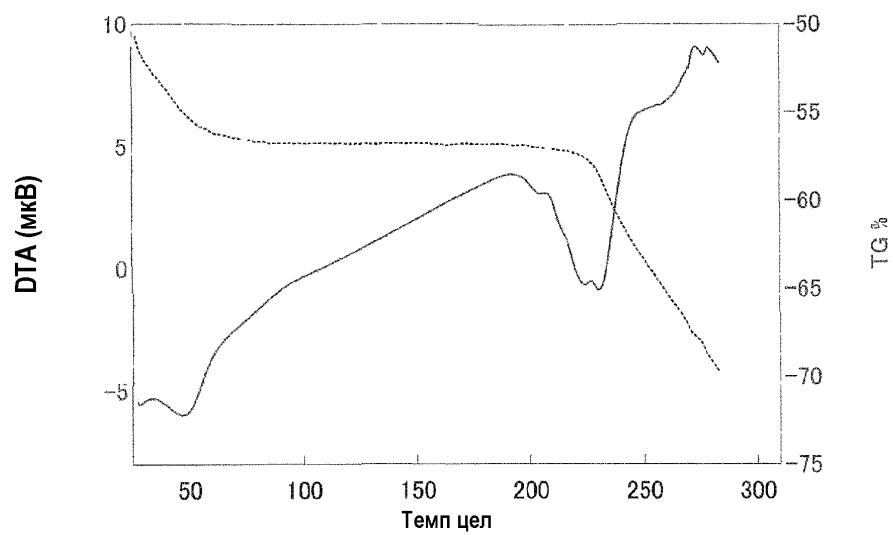


11/12

ФИГ.21

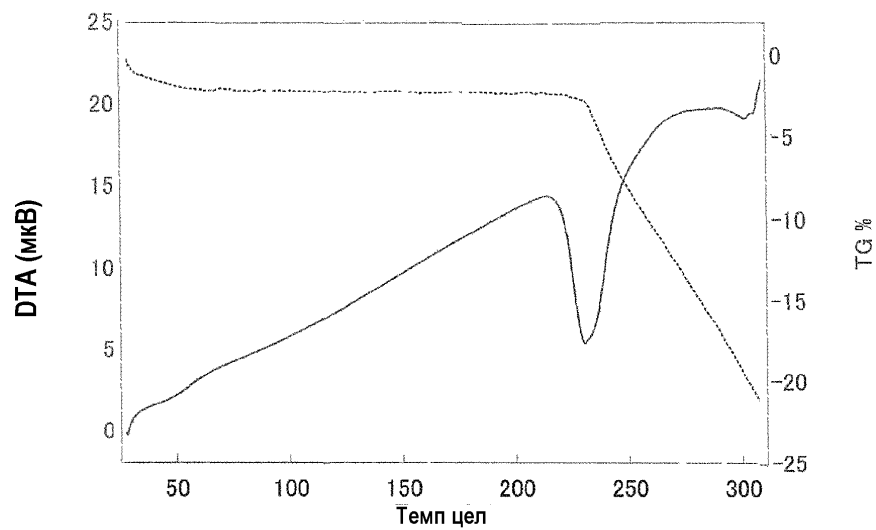


ФИГ.22



12/12

ФИГ.23



ФИГ.24

