



A61K 31/137 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 9/02 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 27/08 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004122639/15, 20.12.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.12.2002(30) Конвенционный приоритет:
21.12.2001 (пп.1-70) GB 0130763.6

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2005

(45) Опубликовано: 10.09.2008 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: FUJITA et al. Erythro-directive
reduction of alpha-substituted alkanones by
means of hydrosilanes in acidic media.
Journal of organic chemistry (1988), 53 (23),
реферат. Patil et al. Steric aspects of
adrenergic drugs. V. Beta adrenergic blocking
effects of optical isomers of methoxamine and
isopropylmethoxamine. J Pharmacol Exp Ther.
1967 Jun; (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
21.07.2004(86) Заявка РСТ:
GB 02/05864 (20.12.2002)(87) Публикация РСТ:
WO 03/055474 (10.07.2003)

Адрес для переписки:
127055, Москва, а/я 11, пат.пов.
Н.К.Попеленскому, рег. № 31

(72) Автор(ы):

БАППАС Норман (GB),
ТОМПСОН Джеффри Мартин (GB)

(73) Патентообладатель(и):
Норджин Юроп БВ (NL)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 1R,2S-МЕТОКСАМИНА, ЕГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ (ВАРИАНТЫ) И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к медицине и описывает фармацевтические композиции для лечения показаний, при которых используют агонист альфа-адренорецептора, содержащие 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль, смешанные или связанные с фармацевтически приемлемым носителем. Также описан способ получения 1R,2S-метоксамина. Изомер 1R,2S-метоксамина обладает повышенной активностью в качестве альфа-агониста по

сравнению с известным рацематом метоксамина. Он может быть использован местно для эффективного лечения недержания кала в низких дозах без местных или системных побочных эффектов, например без воздействия на кровяное давление. 1R,2S-метоксамин может быть использован в низких дозах и без существенных побочных эффектов для лечения других расстройств и нарушений желудочно-кишечного тракта. 5 н. и 65 з.п. ф-лы, 6 табл., 21 ил.

(56) (продолжение):

RU 2 3 3 2 9 8 9 C 2

RU 2 3 3 2 9 8 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 31/137 (2006.01)**A61P 11/02** (2006.01)**A61P 9/02** (2006.01)**A61P 1/00** (2006.01)**A61P 27/08** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004122639/15, 20.12.2002**(24) Effective date for property rights: **20.12.2002**(30) Priority:
21.12.2001 (cl.1-70) GB 0130763.6(43) Application published: **10.05.2005**(45) Date of publication: **10.09.2008 Bull. 25**(85) Commencement of national phase: **21.07.2004**(86) PCT application:
GB 02/05864 (20.12.2002)(87) PCT publication:
WO 03/055474 (10.07.2003)Mail address:
**127055, Moskva, a/ja 11, pat.pov.
N.K.Popelenskomu, reg. № 31**

(72) Inventor(s):

**BARRAS Norman (GB),
TOMPSON Dzhefri Martin (GB)**

(73) Proprietor(s):

Nordzhin Jurop BV (NL)(54) **METHOD FOR OBTAINING 1R,2S-METOXAMINE, THERAPEUTIC APPLICATION THEREOF (VERSIONS) AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: invention describes pharmaceutical compositions for treatment of indications when the alpha adrenoreceptor agonist is used containing its physiologically acceptable salt, admixed or bound with pharmaceutically acceptable medium. Also, the method for obtaining 1R,2S-metoxamine is described. Isomer of 1R,2S-metoxamine possesses hyperactivity as an alpha agonist in comparison with known racemate of

metoxamine. It can be used locally for effective treatment of incontinence of feces in low doses without local or systematic by-effects, for example, without influence on blood pressure. 1R, 2S-metoxamine can be used in low doses and without essential by-effects for treatment of other disorders and disturbances of gastroenteric tract.

EFFECT: increased efficiency of the composition and the method for treatment.

71 cl, 6 tbl, 11 dwg, 4 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к лечению недержания кала и других состояний.

Уровень техники

Недержание кала поражает около 2% взрослого населения (Nelson R., Norton N., Cautley E. и соавт., Распространение анального недержания среди населения (Community-based prevalence of anal incontinence), JAMA, 274:559-61, (1995)). Оно в большей степени распространено среди пожилых людей, и, вероятно, что многие люди не обращаются за помощью при наличии у них таких симптомов. Наиболее распространенной причиной недержания кала является повреждение комплекса анальных сфинктеров во время родов (Kamm M.A., Повреждение при родах и недержание кала (Obstetric damage and faecal incontinence), Lancet, 334:730-3 (1994)), вследствие либо пудендальной невропатии, либо непосредственной травмы в результате родов. Недержание кала может также наблюдаться в отсутствие структурных повреждений, в таких обстоятельствах наиболее распространенной причиной является не связанная с другими причинами дегенерация внутреннего анального сфинктера (IAS) (Vaizey C.J., Kamm M.A., Bartram C.I., Первичная дегенерация внутреннего анального сфинктера (Primary degeneration of the internal anal sphincter)).

Консервативные меры, применяемые при слабых симптомах недержания, включают прокладки (Jorge J.M., Wexner S.D., Этиология и лечение

недержания кала (Etiology and management of fecal incontinence), Dis Colon Rectum, 36:77-97, (1993)), тампоны (Mortensen N., Humphreys M.S., Тампон для применения при анальном недержании - одноразовое устройство для пациентов с аноректальным недержанием (The anal continence plug: a disposable device for patients with anorectal incontinence), Lancet, 338:1163-5, (1991)), препараты против диареи (Musial F., Enck P., Kalveram K.T. и соавт., Действие лоперамида на аноректальную функцию у нормального здорового человека (The effect of loperamide on anorectal function in normal healthy men), J. Clin. Gastroenterol., 15:321-4, (1992)) и изменение питания. Однако данные меры будут недостаточны для контроля некоторых случаев. Повреждение наружного анального сфинктера может подлежать перекрывающему восстановлению хирургическим путем (Cook T.A., Mortensen N.J., Лечение недержания кала после повреждений при родах (Management of faecal incontinence following obstetric injury), Br. J. Surg., 85:293-9, (1998)), тем не менее, результаты восстановления внутреннего сфинктера были необнадешивающими (Deen K.I., Kumar D., Williams J.G. и соавт., Рандомизированное исследование восстановления внутреннего анального сфинктера с использованием тазового дна при невропатическом недержании кала (Randomized trial of internal anal sphincter application with pelvic floor repair for neuropathic faecal incontinence), Dis Colon Rectum, 38:14-8, (1995)). Для более серьезных повреждений действительно существуют более обширные хирургические операции, включая создание искусственного кишечного сфинктера (Vaizey C.J., Kamm M.A., Gold D.M. и соавт., Клиническое, физиологическое и радиологическое исследование искусственного кишечного сфинктера, созданного для новых целей (Clinical, physiological and radiological

study of a new purpose-designed artificial bowel sphincter), Lancet, 353:105-9, (1998)), стимуляцию крестцовых нервов (Maloug A.J., Vaizey C.J., Nicholls R.J. и соавт., Постоянная стимуляция крестцовых нервов при недержании кала (Permanent sacral nerve stimulation for fecal incontinence), Ann. Surg., 232:143-8, (2000) и грацилопластику (пластику тонкой мышцей) (Baeten C.G., Konsten J., Spaans F. и соавт., Динамическая грацилопластика для лечения недержания кала (Dynamic graciloplasty for treatment of faecal incontinence). Lancet, 338:1163-5, (1991)). Данные операции являются серьезными вмешательствами, и могут либо быть неприемлемыми, либо плохо переноситься многими больными.

Применение местных агентов для лечения недержания кала представляет собой другой подход к старой проблеме. В публикации WO 98/27971 предлагают использование множества агентов для лечения недержания кала. Данные агенты включают агонисты α -адренорецепторов, ингибиторы синтазы оксида азота, простагландин $F_{2\alpha}$, допамин, морфин, β -блокаторы и 5-гидрокситриптамиин. Однако экспериментальные данные приводят только для фенилэфрина и ингибитора синтазы оксида азота $N\omega$ -нитро-1-аргинина.

Все клинические исследования по лекарственным препаратам местного применения для лечения недержания кала до настоящего времени были сфокусированы на фенилэфрине, агонисте α -1-адренорецептора. (Данные агенты ранее называли α -1 адренергические агонисты). Применение препарата фенилэфрина для местного нанесения, как утверждают, приводит у здоровых людей к повышению давления покоя в анальном (заднепроходном) канале в состоянии покоя. При нанесении на анус здоровых людей гель, содержащий 10 мас.% фенилэфрина, приводит к 33% повышению анального

давления покоя, которое сохраняется в среднем в течение 7 часов (Carapeti E.A., Kamm M.A., Evans B.K. и соавт., Наружное применение фенилэфрина

5 повышает давление покоя в анальном сфинктере (Topical phenylephrine increases anal sphincter resting pressure), Br. J. Surg., 86:267-70, (1999) (см. также публикацию WO 98/27971)). Применение гелей фенилэфрина для

10 местного нанесения было повторно проведено среди пациентов с нормальными, по данным ультразвуковой эхографии, анальными сфинктерами, но с низким давлением в анальном канале в состоянии покоя

15 и симптомами недержания. Однако в данной группе не было отмечено значительное повышение анального давления в состоянии покоя при

20 использовании 10 мас.% - 20 мас.% фенилэфриновых гелей, хотя повышение достигало статистически значимых величин у тех, субъектов, которых лечили

25 30% и 40% гелями (Cheetham M.J., Kamm M.A., Phillips R.K.S., Наружное применение фенилэфрина повышает давление покоя в анальном канале у

30 пациентов с недержанием кала (Topical phenylephrine increases anal canal resting pressure in patients with faecal incontinence), Gut, 48:356-9, (2001)).

35 Данные результаты позволяют предположить, что внутренний анальный сфинктер пациентов с недержанием менее чувствителен к агонистам адренорецепторов, чем сфинктер здоровых субъектов. Имеются также

40 данные, полученные в исследованиях in vitro, поддерживающие это утверждение (Speakman C.T., Hoyle C.H., Kamm M.A. и соавт., Нарушения адренергического контроля внутреннего анального сфинктера у пациентов с

45 идиопатическим недержанием кала (Adrenergic control of the internal anal sphincter is abnormal in patients with idiopathic faecal incontinence), Br. J. Surg.,

50 77:1342-4, (1990)).

Данный факт может также объяснить, почему при расширении работы с использованием фенилэфрина до рандомизированного исследования с использованием контроля, которое включало 36 пациентов с недержанием и нормальными по данным ультразвуковой эхографии сфинктерами, не было отмечено никаких значительных общих улучшений в плане недержания, давления покоя в анальном канале покоя или кровотоке в эпителиальной выстилке анального канала при использовании 10% фенилэфриновых гелей (Carapeti E.A., Kamm M.A., Phillips R.K.S., Рандомизированное исследование с контролем местного применения фенилэфрина при лечении недержания кала (Randomized controlled trial of topical phenylephrine in the treatment of faecal incontinence). Br. J. Surg. 87:38-42, (2000)). Напротив, в небольшом рандомизированном исследовании с контролем на пациентах с подтеканием кала после создания кармана из подвздошной кишки было обнаружено, что 10% фенилэфриновый гель дает значительно большее субъективное улучшение в плане недержания по сравнению с плацебо (Carapeti E.A., Kamm M.A., Nicholls R.J. и соавт., Рандомизированное исследование с контролем местного применения фенилэфрина при лечении недержания кала после создания кармана из подвздошной кишки (Randomized, controlled trial of topical phenylephrine for fecal incontinence in patients after ileoanal pouch construction), Dis Colon Rectum, 43:1059-63, (2000)).

Данные результаты показывают, что для того, чтобы быть эффективными при лечении недержания кала, необходимо, чтобы препараты фенилэфрина для местного применения содержали высокие концентрации фенилэфрина (порядка 30-40 мас. %). Показано, что таких уровнях происходит перианальный ожог (Carapeti E.A., Kamm M.A., Phillips R.K.S., Рандомизированное

исследование с контролем местного применения фенилэфрина при лечении
недержания кала (Randomized controlled trial of topical phenylephrine in the
5 treatment of faecal incontinence). Br. J. Surg. 87:38-42, (2000)). Уже только по
этой причине данные препараты не подходят для применения при лечении.

Фенилэфрин, который действует на α -адренергические рецепторы
10 сосудистой сети, обладает гипертензивными эффектами, известными также
как антигипотензивные эффекты или эффекты, повышающие кровяное
15 давление, и его использовали системно для лечения гипотензивных
состояний. Другое соображение относительно местного применения
фенилэфрина для лечения недержания кала состоит в том, что в высоких
20 дозах, необходимых для эффективного лечения недержания кала, т.е. при
использовании препаратов для местного применения, содержащих от 30 до
25 40 мас. % фенилэфрина, местно нанесенный агонист α -адренорецепторов мог
бы оказывать системное воздействие на сосуды, действуя на кровяное
30 давление и/или частоту пульса.

Данные соображения, касающиеся применения высоких доз агониста
 α -адренорецепторов при лечении недержания кала, поддерживаются теми
35 фактами, что побочные эффекты в отношении сердечно-сосудистой системы
отмечают при местном применении фенилэфрина в офтальмологии
40 (Fraunfelder F.T., Scafidi A.F., Возможные нежелательные эффекты наружного
глазного 10% фенилэфрина (Possible adverse effects from topical ocular 10%
phenylephrine), Am. J. Ophthalmol. 85:447-53, (1978)) и что наблюдается также
45 местное раздражение (Antibarro B., Barranco P., Ojeda J.A. Аллергический
контактный блефароконъюнктивит, вызываемый глазными каплями с
50 фенилэфрином (Allergic contact blepharoconjunctivitis-caused by phenylephrine

eyedrops), Contact Dermatitis, 25:323-4, (1991)). Данные соображения применимы также к другим агонистам α -адренорецепторов, которые действуют на α -адренергические рецепторы сосудистой сети, которые обладают такими же сосудосуживающими и гипертензивными свойствами, как фенилэфрин, и которые могут быть использованы при тех же показаниях, что фенилэфрин, т.е. в качестве агента, повышающего кровяное давление и в качестве сосудосуживающего агента. Метоксамин (2-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанол) представляет собой пример такого агониста α -адренорецепторов.

Метоксамин имеет два хиральных центра и, следовательно четыре стереоизомера. В настоящее время метоксамин, используемый в клинике в качестве агента, повышающего кровяное давление, и в качестве сосудосуживающего агента, представлен в форме смеси изомеров.

Fujita и Hiyama (Fujita M., Hiyama T., Эритро-направленное восстановление α -замещенных алканонов с использованием гидросиланов в кислых средах (Erythro-Directive Reduction of α -Substituted Alkanones by Means of Hydrosilans in Acidic Media), J. Org. Chem., 53:5415-5421, (1988)) представили так называемый способ эритро-направленного восстановления α -замещенных алканонов с помощью гидросиланов в кислых средах. Одно из полученных соединений, как утверждают, представляет собой (1R,2S)-2-амино-1-(2,5- диметоксифенил)-1-пропанол, который Fujita и Hiyama называют также L-эритро-метоксамин. Однако Fujita и Hiyama окончательно т.е. путем монокристаллической рентгеновской дифрактометрии не идентифицировали предполагаемый 1R,2S-изомер метоксамина (или любой

другой изомер, который они получили), и не провели никаких исследований, касающихся биологической активности предполагаемого 1R,2S-изомера метоксамина (или любого другого изомера, который они получили). Более того, хотя описанный способ синтеза пригоден для получения маленьких количеств (порядка 1 г) продукта, нами обнаружено, что способ не обеспечивает селективного получения заявленного 1R,2S-изомера при масштабировании для получения количеств больше, чем приблизительно 1 г, например, для получения приблизительно от 30 до 50 г данного изомера.

Способ Fujita и Hiyama включает восстановление α -аминокетона до спирта. Авторы указывают, что в ранее описанных способах восстановления α -аминокетона обычно наблюдается избыточное восстановление до углеводорода.

Авторы утверждают, что при использовании их способа образование углеводорода не определяется обычными аналитическими методами. Кроме того, они утверждают, что было очевидным высоко эритроселективное восстановление. Наблюдалась, как заявляют, селективность >99%.

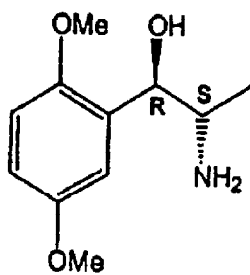
Хотя авторами были получены аналогичные результаты при продукции предполагаемого 1R,2S-изомера метоксамина (L-эритро-метоксамина) в маленьких масштабах (порядка 1 г), при масштабировании процесса до загрузок до 30-50 г было обнаружено, что, в противоположность данным Fujita и Hiyama, избыточное восстановление в действительности имеет место, при этом более 60% и до 70% продукта является углеводородом вместо желательного спирта. Более того, процесс не был эритро-селективным. Происходило образование значительных количеств трео-изомера.

Ссылаясь на свой способ и полученные изомеры, Fujita и Huiyama

используют как номенклатуру "R,S", так и номенклатуру "эритро/трео".
Поскольку номенклатура "R,S", предложенная Cahn-Ingold-Prelog, является
5 общепринятой, как однозначно определяющая изомеры, в данном контексте
для определения изомеров метоксамина используют терминологию "R,S", а
не терминологию "эритро/трео".

Раскрытие изобретения

Синтезирован 1R,2S-метоксамин, известный также как
15 L-эритро-метоксамин, и методами спектроскопии ядерно-магнитного
резонанса и монокристаллической рентгеновской дифрактометрии
подтверждено, что данный изомер имеет следующую структуру:



30 В данном изобретении представлен 1R,2S-метоксамин для применения
в качестве лекарственного средства.

35 В данном изобретении представлен 1R,2S-метоксамин для применения
в качестве агониста α -адренорецепторов.

В данном изобретении представлен 1R,2S-метоксамин для применения
40 с целью повышения тонуса гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта
и для применения при лечении расстройств или нарушений, обусловленных
потерей тонуса гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта.

45 В данном изобретении представлен также 1R,2S-метоксамин для
применения с целью повышения тонуса сфинктера желудочно-кишечного
50 тракта и для применения при лечении расстройств или нарушений,

обусловленных потерей тонуса сфинктера желудочно-кишечного тракта. Например, в данном изобретении представлен 1R,2S-метоксамин для применения с целью повышения тонуса сфинктера привратника и для применения при лечении гастрогенной диареи, а также для применения с целью повышения тонуса гастроэзофагеального (желудочно-пищеводного) сфинктера и для применения при лечении эзофагеального рефлюкса и болезни Баррета. В данном изобретении представлен 1R,2S-метоксамин для применения с целью повышения тонуса анального сфинктера и для применения при лечении недержания кала.

В данном изобретении представлен также 1R,2S-метоксамин для применения для профилактики и лечения расстройств и нарушений сердечной функции, например, расстройств и нарушений сердечного ритма.

В данном изобретении представлен также 1R,2S-метоксамин для применения в качестве сосудосуживающего агента. В данном изобретении представлен также 1R,2S-метоксамин для применения в качестве назального противозастойного средства и применения в качестве офтальмологического сосудосуживающего агента, а также в качестве мидриатического агента для расширения глазного зрачка.

В данном изобретении представлен также 1R,2S-метоксамин для применения в качестве гипертензивного (повышающего кровяное давление) агента, например, с целью профилактики или лечения гипотензии, в частности, для поддержания кровяного давления во время и/или после анестезии.

Кроме того, в изобретении представлено применение 1R,2S-метоксамина для приготовления лекарственного препарата для любого

из вышеуказанных применений.

В изобретении представлен также способ лечения млекопитающего, нуждающегося в лечении агонистом α -адренорецепторов, который предусматривает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества 1R,2S-метоксамина.

В данном изобретении представлен способ повышения тонуса гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта млекопитающего, который предусматривает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества 1R,2S-метоксамина.

В данном изобретении представлен способ лечения расстройства или нарушения, обусловленного потерей тонуса гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта, который предусматривает введение млекопитающему, нуждающемуся в данном лечении, терапевтически эффективного количества 1R,2S-метоксамина.

В данном изобретении представлен способ повышения тонуса желудочно-кишечного тракта млекопитающего, например, сфинктера привратника или анального сфинктера, который предусматривает введение млекопитающему терапевтически эффективного количества 1R,2S-метоксамина.

В данном изобретении представлен способ лечения расстройства или нарушения, обусловленного потерей тонуса сфинктера желудочно-кишечного тракта, который предусматривает введение млекопитающему, нуждающемуся в данном лечении, терапевтически эффективного количества 1R,2S-метоксамина. Такие нарушения включают гастрогенную диарею и недержание кала.

В данном изобретении представлен также способ профилактики или
лечения расстройств или нарушений сердечной функции у млекопитающего,
5 который предусматривает введение млекопитающему, нуждающемуся в
данном лечении, терапевтически эффективного количества
10 1R,2S-метоксамина. Такие нарушения включают расстройства или нарушений
сердечного ритма.

В изобретении представлен также способ лечения млекопитающего,
15 нуждающегося в лечении с использованием сосудосуживающего агента,
который предусматривает введение млекопитающему, нуждающемуся в
данном лечении, терапевтически эффективного количества
20 1R,2S-метоксамина. Такое лечение может быть лечением застойных явлений
в носу, красноты глаз или может быть направлено на расширение зрачка
25 глаза.

В изобретении представлен также способ лечения или профилактики
30 гипотензии, который предусматривает введение млекопитающему,
нуждающемуся в данном лечении, терапевтически эффективного количества
1R,2S-метоксамина, например, для поддержания кровяного давления во
35 время анестезии.

1R,2S-метоксамин может быть в форме свободного основания или его
40 соли. Для применения при лечении соль должна быть физиологически
приемлемой солью.

В данном изобретении представлена также фармацевтическая
45 композиция, содержащая 1R,2S-метоксамин или его физиологически
приемлемую соль, смешанные или связанные с фармацевтически
50 приемлемым носителем.

В данном изобретении представлен также способ, пригодный для получения 1R,2S-метоксамина, который предусматривает добавление по каплям трифторуксусной кислоты к раствору, содержащему диметилфенилсилан и (S)-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанон, у которого аминогруппа защищена, например, алкокси- или арилоксикарбонильной группой, в частности, метоксикарбонильной группой, и удаление защитной группы из полученного в результате аминок-защищенного(1R,2S)-2-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанола. Растворителем для раствора силана и пропанола является, в частности, хлорированный углеводород, например, дихлорметан. Восстановление пропанола с использованием диметилфенилсилана следует проводить при охлаждении. Реакцию, как правило, проводят при охлаждении на льду, например, при температуре в области 0°C. Данный процесс дает возможность получения 1R,2S-метоксамина на порядок выше, чем 1 г, например, порядка 30-50 г или больше.

Полученный в результате 1R,2S-метоксамин может быть превращен в соответствующую соль, например, соль кислоты, например, соль, как описано выше, в частности, путем реакции с кислотой.

В данном изобретении представлен также способ выделения 1R,2S-изомера метоксамина из смеси изомеров метоксамина, который предусматривает разделение смеси с помощью жидкостной хроматографии высокого давления с использованием хроматографической среды, которая содержит R,S-гидроксипропиловый эфир β -циклодекстрина, связанный с силикагелем, предпочтительно с последующей хроматографией с обращенной фазой при использовании хроматографической среды,

содержащей сополимер винилового спирта основание, дериватизированный введением октадецильных групп (C18) на гидроксильных группах сополимеров винилового спирта.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 представлена ванна для перфузии органов, в которой тестировали образцы в форме полосок мышцы внутреннего анального сфинктера свиньи с использованием рацемата метоксамина и его четырех индивидуальных изомеров.

На Фигурах 2-5 представлены кривые зависимости доза/ответ для мышцы внутреннего анального сфинктера при тестировании *in vitro*. На Фигурах 2 и 4 в качестве контроля использован фенилэфрин. Четыре изомера метоксамина были разделены с помощью жидкостной хроматографии с условиями, представленных в Примере 3. Они обозначены соответственно пикам 1-4 в соответствии с разделением при хроматографировании.

На Фигуре 2 показаны кривые зависимости доза/ответ с использованием рацемата метоксамина (черные круги) и фенилэфрина (белые квадраты).

На Фигуре 3 приведены кривые зависимости доза/ответ с использованием четырех изомеров метоксамина: пик 1 (черные круги), пик 2 (белые квадраты), пик 3 (белые треугольники) и пик 4 (X), как получено с помощью жидкостной хроматографии с условиями, представленных в Примере 3.

На Фигуре 4 показаны кривые зависимости доза/ответ с использованием рацемата метоксамина (черные круги), пика 2 (белые треугольники) и фенилэфрина (белые квадраты).

На Фигуре 5 представлены кривые зависимости доза/ответ с

использованием 1R,2S-метоксамина, синтезированного согласно Примеру 4, обозначенного как пик 2 (синтетический) (белые квадраты), и
5 1R,2S-метоксамина, полученного путем хроматографического разделения согласно Примеру 1, обозначенного как пик 2 (выделенный) (черные круги).

10 На Фигурах 6 - 11 представлены хроматограммы рацемата метоксамина и четырех изомеров, как получено с использованием жидкостной хроматографии в условиях, приведенных в Примере 3.

15 На Фигуре 6 представлена хроматограмма рацемата, демонстрирующая четыре пика (WWD1 A, длина волны=225 нм (Образец\01-16-8.D)).

20 На Фигуре 7 представлена хроматограмма рацемата метоксамина, показывающая, где сделаны разрезы для сбора разделенных пиков 1-4.

25 На Фигуре 8 представлена хроматограмма, демонстрирующая чистоту пика 3 (WWD1 A, Длина волны=225 нм (Образец\0116P3-5.D)).

30 На Фигуре 9 представлена хроматограмма, демонстрирующая чистоту пика 4 (WWD1 A, Длина волны=225 нм (Образец\0116P4-1.D)).

35 На Фигуре 10 представлена хроматограмма, демонстрирующая чистоту пика 1 (WWD1 A, Длина волны=225 нм (Образец\0116P1-4.D)).

На Фигуре 11 представлена хроматограмма, демонстрирующая чистоту пика 2 (WWD1 A, Длина волны=225 нм (Образец\0116P2-4.D)).

40 На Фигуре 12 показан ЯМР-спектр пика 1, на Фигуре 13 - ЯМР-спектр пика 3, на Фигуре 14 - ЯМР-спектр пика 2 и на Фигуре 15 - ЯМР-спектр пика
45 4.

На Фигуре 16 показана стереохимическая структура 1R,2S-метоксамина (пик 2).

50 На Фигуре 17 показан эффект доз 0,5 мл плацебо и 0,3%, 1%, 3%

(мас./мас.) 1R,2S-метоксаминовых гелей на периферическое систолическое артериальное кровяное давление у свиней.

На Фигуре 18 показан эффект доз 0,5 мл плацебо и 0,3%, 1% и 3% (мас./мас.) 1R,2S-метоксаминовых гелей на периферическое диастолическое артериальное кровяное давление у свиней.

На Фигуре 19 показан эффект доз 0,5 мл плацебо и 0,3%, 1% и 3% (мас./мас.) 1R,2S-метоксаминовых гелей на среднее периферическое диастолическое артериальное кровяное давление у свиней.

На Фигуре 20 показан эффект доз 0,5 мл плацебо и 0,3%, 1% и 3% (мас./мас.) 1R,2S-метоксаминовых гелей на среднее анальное давление покоя у свиней.

На Фигуре 21 показан эффект доз 0,5 мл плацебо и 0,3%, 1% и 3% (мас./мас.) 1R,2S-метоксаминовых гелей на частоту сердечных сокращений у свиней.

На каждой из Фигур 17 - 21 черные круги означают средние значения, белые круги - значения для свиньи 1, белые треугольники - значения для свиньи 3 и белые квадраты - значения для свиньи 4.

Осуществление изобретения

Данное изобретение касается 1R,2S-метоксамина и его терапевтического применения, например, в качестве агониста α -адренорецепторов.

Обнаружено, что 1R,2S-метоксамин в низких дозах эффективен в плане индукции сокращения мышцы внутреннего анального сфинктера *in vitro* и при местном применении *in vivo* и что данный эффект *in vivo* не сопровождается повышением кровяного давления.

Обнаружено, что 1R,2S-метоксамин по меньшей мере в четыре раза

более активен, чем фенилэфрин в плане индукции сокращения мышцы
внутреннего анального сфинктера *in vitro*. В исследованиях на свиньях *in vivo*
5 показано также, 0,5 мл геля, содержащего 1 мас.% 1R,2S-метоксамина, и
даже такая маленькая доза, как 0,5 мл геля, содержащего 0,3 мас.%
10 1R,2S-метоксамина, т.е. дозы 5 мг и 1,5 мг 1R,2S-метоксамина,
соответственно, при местном применении повышают давление во внутреннем
анальном сфинктере, не оказывая какого-либо воздействия на кровяное
15 давление.

Данные результаты имеют большое значение, поскольку местное
20 применение 1R,2S-метоксамина в результате приводит к повышению тонуса
анальной мышцы и давления в анальном канале, по количественным
характеристикам близкому эффектам, наблюдаемым при использовании
25 фенилэфрина, когда его применяют местно, но только за исключением
необходимой концентрации и дозы фенилэфрина и без повышения кровяного
30 давления.

Ранее описано, что метоксамин в форме смеси изомеров действует как
35 агонист α -адренорецепторов на α -адренергические рецепторы сосудистой
мускулатуры. Не будучи ограничены последующим, авторы предполагают, что
эффекты 1R,2S-метоксамина, наблюдаемые в отношении тонуса анальной
40 мышцы *in vivo*, являются результатом непосредственного воздействия
1R,2S-метоксамина на анальный сфинктер через α -адренергические
45 рецепторы в самих мышцах сфинктера, а не косвенного воздействия через
сосудистую мускулатуру кровеносных сосудов, снабжающих данные мышцы.

α -адренергические рецепторы имеются на протяжении всего
50 желудочно-кишечного тракта, как в самой гладкой мускулатуре тракта, так и

в различных сфинктерах тракта, включая внутренний анальный сфинктер, гастроэзофагеальный сфинктер, сфинктер привратника, сфинктер Одди и подвздошно-ободочный сфинктер. Снижение тонуса гладкой мускулатуры желудочно-кишечного (ЖК) тракта или какого-либо из сфинктеров ЖК-тракта может привести к нарушениям нормального функционирования тракта или клиническим нарушениям. Например, снижение тонуса анальных сфинктеров может в результате привести к недержанию кала; снижение тонуса сфинктера привратника может являться причиной гастрогенной диареи.

1R,2S-Метоксамин можно использовать для повышения тонуса гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта и для лечения расстройства или нарушения, которое происходит в результате потери тонуса гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта. 1R,2S-Метоксамин может быть также использован для повышения тонуса сфинктера желудочно-кишечного тракта и для лечения расстройства или нарушения, которое происходит в результате потери тонуса сфинктера желудочно-кишечного тракта.

Например, 1R,2S-метоксамин может быть использован для повышения тонуса анального сфинктера и лечения недержания кала. Наружное применение 1R,2S-метоксамина обеспечивает эффективное лечение недержания кала без существенных системных побочных эффектов, в частности, без вредного действия на сердечно-сосудистую систему, например, на кровяное давление, и без местного раздражения. 1R,2S-Метоксамин можно использовать для повышения тонуса сфинктера привратника и лечения гастрогенной диареи.

Альфа-адренергические рецепторы присутствуют также в сердечной мышце. 1R,2S-метоксамин может быть использован, как правило, путем

системного введения для предупреждения или лечения нарушений сердечной функции, например, нарушений сердечного ритма.

5 В настоящее время метоксамин в форме смеси изомеров используют в качестве агента, повышающего кровяное давление, известного также как гипертензивный или антигипотензивный агент и как сосудосуживающий агент.
10 Полагают, что эффекты повышения кровяного давления и сужения сосудов достигаются путем воздействия метоксамина на α -адренорецепторы сосудистой мускулатуры. 1R,2S-метоксамин может быть использован при
15 лечении любых показаний, при которых можно использовать α -адренергический агонист, в особенности, в качестве агониста α -адренорецепторов, действующего на α -адренергические рецепторы сосудистой мускулатуры, например, при любых показаниях, при которых
20 используют или использовали метоксамин в форме смеси изомеров или фенилэфрин. В частности, 1R,2S-метоксамин может быть использован как агент, повышающий кровяное давление или сосудосуживающий агент.
30

Субъектом, лечение которого предусматривается согласно данному изобретению, является млекопитающее. Млекопитающее, как правило,
35 представлено человеком, но может быть животным, выращиваемым с коммерческой целью, или домашним животным (животным-компаньоном).

40 Для лечения может быть использован 1R,2S-метоксамин как таковой, то есть в форме свободного основания, или в форме его физиологически приемлемой соли. До тех пор, пока не указано иначе, термин
45 "1R,2S-метоксамин", как используют ниже, включает как свободное основание, так и его физиологически приемлемые соли. Когда приводят
50 количества или проценты 1R,2S-метоксамина или его соли, предпочтительно

количество или концентрацию соли рассчитывать по 1R,2S-метоксамину
свободному основанию.

Соли 1R,2S-метоксамина представлены, например, солями кислот,
включая соли, полученные при добавлении кислоты. Примерами солей
являются соли соляной кислоты, бромисто-водородной кислоты, серной
кислоты, фосфоновой кислоты, уксусной кислоты, трифторуксусной кислоты,
молочной кислоты, пировиноградной кислоты, малоновой кислоты, янтарной
кислоты, глутаровой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты,
малеиновой кислоты, лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, щавелевой
кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты,
p-толуолсульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, изэтионовой
кислоты или камфарной кислоты.

1R,2S-метоксамин может применяться системно или несистемно, как
правило, в форме фармацевтической композиции, соответствующей данному
изобретению. Способ введения 1R,2S-метоксамина, соответствующие
фармацевтические композиции, а также предпочтительная доза зависят от
намеченного применения.

В изобретении представлен также способ получения 1R,2S-метоксамина
в масштабе, пригодном для фармацевтического применения, например, в
количествах, превышающих 1 г, в частности, приблизительно от 30 г до 50 г
или более. Способ описан выше и более детально представлен ниже. Способ,
предложенный ранее Fujita и соавт., работает в маленьких масштабах,
приблизительно до 1 г. Данный масштаб является слишком мелким даже для
получения субстанции для клинических исследований. Соответственно, ни
одно из применений, описанных в данном контексте, не было возможным до

разработки способа, соответствующего данному изобретению.

В данном изобретении представлена фармацевтическая композиция,
5 содержащая в качестве активного ингредиента 1R,2S-метоксамин или его
физиологически приемлемую соль, смешанные или связанные с
фармацевтически приемлемым носителем.

10 Фармацевтическая композиция, соответствующая данному изобретению,
может быть в форме, пригодной для достижения системного или местного
15 эффекта.

Термин "системный" используют в данном контексте для обозначения
20 "принадлежности или воздействия на тело в целом". Термин "локальный"
используют для обозначения "ограничения или принадлежности к одному
участку или части, он означает "необщий". Термин "местный" означает
25 "принадлежность к конкретной площади поверхности". Фармацевтическая
композиция, пригодная для местного нанесения на конкретную площадь
30 поверхности, например, кожи, как правило, дает эффект, который является
локальным, а не системным. Однако может быть разработан ряд местных
препаратов для главным образом системного введения активного
35 ингредиента. Если не определено иначе, термин "местный", например, как
в выражениях местное применение или фармацевтическая композиция для
40 местного применения, используют в данном контексте для обозначения
"принадлежности к конкретной площади поверхности наличия локального
45 эффекта".

Фармацевтические композиции, соответствующие данному изобретению,
включают композиции, пригодные для введения 1R,2S-метоксамина путем
50 инъекции или инфузии, подкожного введения, чрескожного введения,

перорального, в том числе подъязычного введения, ректального введения и
местного применения, например, нанесения на кожу, поверхность глаза или
5 слизистой оболочку носа.

Известны пригодные фармацевтические композиции для перорального
и подъязычного применения. Для перорального введения широко используют
10 таблетки и капсулы наряду с другими препаратами, например, пилюлями,
драже и пластинками, которые менее распространены. Могут быть
15 использованы препараты с задержанным или направленным
высвобождением, например, препараты для направленного высвобождения
в заранее определенной части ЖК-тракта, например, препараты с
20 отсроченным во времени или pH-зависимым высвобождением, в частности,
препараты, которые обеспечивают направленное высвобождение в желудке,
25 двенадцатиперстной кишке или нижних отделах ЖК-тракта, например, в
толстой кишке. В частности, могут быть использованы препараты, которые
30 разработаны для высвобождения активного ингредиента при pH среды
толстой кишки, равно как препараты, направленные на толстую кишку,
которые содержат покрытие, чувствительное к деградации бактериями,
35 населяющими толстую кишку. Препараты могут быть направлены на другие
области желудочно-кишечного тракта, например, на желудок или
40 двенадцатиперстную кишку. Для перорального применения могут быть
использованы жидкие препараты, например, сиропы или сгущенные
45 жидкости, в частности, сгущенные гели или суспензии.

Фармацевтические композиции, пригодные для ректального применения,
включают суппозитории, желатиновые ректальные капсулы и растворы для
50 клизмы.

Фармацевтические композиции, пригодные для нанесения на слизистую оболочку носа, представлены, например, каплями, спреями и аэрозолями.

5 Композиции для нанесения на поверхность глаза представлены, например, каплями, кремами и мазями.

10 Фармацевтическая композиция, соответствующая изобретению, может быть, например, в форме, пригодной для местного нанесения на кожу, в частности, гелем, кремом, мазью, пастой, пеной или липким пластырем.

15 Фармацевтическая композиция может быть предназначена для подкожного введения. Некоторые композиции, например, подкожные депо-препараты и липкие пластыри, могут обеспечивать задержанное или

20 непрерывное высвобождение.

25 Фармацевтические композиции, как описано выше, могут также содержать один или более дополнительных активных ингредиентов кроме 1R,2S-метоксамина. Например, композиции для местного нанесения на

30 анальную область с целью лечения недержания кала могут содержать любые фармацевтически активные ингредиенты, как правило, присутствующие в композициях для местного нанесения на анальную область, например,

35 стероид, действие которого может заключаться в снижении раздражения, и/или местный анестезирующий агент. Фармацевтическая композиция для

40 местного нанесения на кожу в анальной области может также содержать любой из агентов, выбранных из агентов, усиливающих проникновение в кожу, агентов, увлажняющих кожу и агентов, смягчающих кожу. Наружная

45 композиция для нанесения на кожу может быть представлена, например, в тубах, контейнерах с насосом или в аэрозольном баллоне.

50 Соответствующий данному изобретению фармацевтический препарат для

нанесения на кожу, например, гель, крем или мазь, особенно композиция, предназначенная для применения при лечении недержания кала, как правило, содержит не более 10 мас.% 1R,2S-метоксамина и обычно меньше 10%, например, до и включая 8%, например, до и включая 5%, например, до и включая 4%, 3%, 2% или 1% 1R,2S-метоксамина. Могут быть использованы препараты, содержащие 1 мас.% или меньше метоксамина, например, 0,8% или меньше, например, 0,5% или меньше, например, 0,3% или меньше, например, 0,1 мас.% 1R,2S-метоксамина. Композиция может содержать, например, от 0,1 мас.% до 5 мас.%, например, от 0,3 до 3 мас.% 1R,2S-метоксамина. Препарат может вводиться один или более раз в день, например, два или три раза в день, часто даже чаще, например, четыре или пять раз в день. Однократная доза препарата для местного применения обычно составляет приблизительно 1 мл геля, мази или крема, который, например, содержит такое количество 1R,2S-метоксамина, как описано выше. Доза 1R,2S- метоксамина, вводимая при одном нанесении, может быть рассчитана по объему наносимой композиции и концентрации 1R,2S-метоксамина в композиции. Например, 1 мл 1 мас.% 1R,2S-метоксаминового геля обеспечивает дозу 10 мг 1R,2S-метоксамина.

Фармацевтическая композиция, соответствующая данному изобретению, может быть представлена унифицированной лекарственной формой. Примеры унифицированных лекарственных форм для системного введения описаны выше. Для перорального и ректального введения унифицированные лекарственные формы включают, например, таблетки, капсулы и суппозитории, для введения путем инъекции или инфузии унифицированные лекарственные формы включают, например, флаконы и ампулы.

Унифицированные лекарственные формы для местного нанесения на кожу включают блистерные упаковки или пакеты, где каждый блистер или пакет содержит одноразовую дозу например, геля, крема или мази, в частности, как описано выше. Могут быть изготовлены дозированные устройства, например, устройства с насосом, для дозирования заранее заданного объема композиции для местного применения, например, крема, мази или геля. Для применения в качестве мидриатического агента для расширения глазного зрачка представлены унифицированные дозы по одной капле. В депо-препаратах или липких пластырях препарат может обеспечивать непрерывное высвобождение.

Фармацевтические композиции различных типов описаны выше, и известны другие композиции, пригодные для способов введения, описанных выше, а также составы данных композиций и способы их приготовления. Литературные данные, соответствующие области техники, включают справочники, например, E.W. Martin Справочник Ремингтона по фармацевтическим наукам (Remington's Pharmaceutical Sciences). В обзорах и печатных статьях описаны как стандартные, так и более сложные составы и устройства, например, различные типы липких пластырей.

Как отмечено выше, способ введения 1R,2S-метоксамина, подходящие фармацевтические композиции и предпочтительная доза зависят от предусматриваемого применения. При клиническом лечении, как правило, предпочтительно использовать самую низкую дозу, при которой достигается желаемый эффект. 1R,2S-метоксамин обладает активностью, по меньшей мере в четыре раза превышающей активность рацемата метоксамина, т.е. эквимольной смеси всех четырех изомеров. Соответственно для

использования при показании, при котором ранее использовали рацемат метоксамина, дозу 1R,2S-метоксамина, как правило, следует уменьшить, например, по меньшей мере до половины ранее используемой дозы, в частности, приблизительно до одной четвертой. Могут быть использованы даже более низкие дозы.

Для применения в качестве агента, повышающего кровяное давление, с целью лечения гипотензии 1R,2S-метоксамин, как правило, вводят системно. Например, при использовании для поддержания кровяного давления во время анестезии 1R,2S-метоксамин вводят путем инъекции или инфузии, в основном посредством внутривенной инъекции или инфузии.

Рекомендуемая доза раствора, содержащего 20 мг/мл метоксамина в форме смеси изомеров, в качестве агента, повышающего кровяное давление, для поддержания кровяного давления во время анестезии составляет от 0,15 до 0,25 мл при внутривенном введении и 1 мл при внутримышечном введении, т.е. рекомендуемая доза составляет от 3 до 5 мг при внутривенном введении и приблизительно 20 мг при внутримышечном введении. Доза 1R,2S-метоксамина для применения в качестве агента, повышающего кровяное давление, для поддержания кровяного давления во время анестезии может составлять, например, половину от данной дозы или меньше, например, одну четвертую от данной дозы или меньше, например, 1 мг или меньше при внутривенном введении и 5 мг или меньше при внутримышечном введении.

Для применения в качестве назального противозастойного агента 1R,2S-метоксамин, как правило, наносят местно на слизистую оболочку носа, например, в форме капель, спрея или аэрозоля.

1R,2S-метоксамин может быть использован как офтальмологический
сосудосуживающий агент, например, для лечения красноты глаза,
5 вызываемой, в частности, аллергической реакцией, сухой, запыленной или
накуренной атмосферой, невозможностью соответствующим образом
10 закрывать глаза или усталостью. 1R,2S-метоксамин может быть использован
также в качестве мидриатического агента для расширения глазного зрачка.
Для применения в офтальмологии 1R,2S-метоксамин может быть нанесен
15 местной на поверхность глаза, например, в форме капель, крема или мази.

Для лечения недержания кала 1R,2S-метоксамин может быть нанесен
20 местно, например, в области ануса и ягодиц. Фармацевтические композиции,
пригодные для такого местного применения включают гели, кремы, мази,
пасты и пены, жидкие композиции, в особенности сгущенные жидкости,
25 подкожные депо-препараты и чрескожные пластыри.

Преимущество местного применения 1R,2S-метоксамина,
30 соответствующего данному изобретению, т.е. наружного применения с
местным действием, состоит в снижении системных эффектов метоксамина,
например, эффектов на кровяное давление.

35 Может быть эффективным нанесение 1R,2S-метоксамина на анальную
область, т.е. на весь анус или его участки, анальный канал и область вокруг
40 ануса, которую называют перианальной областью, например, на любой или
все из следующих участков: эпителиальную выстилку анального канала,
анальный канал, внутренний анальный сфинктер и ягодицы. Например, крем,
45 мазь, гель или пену можно нанести на анальный канал и/или кожу вокруг
ануса с помощью аппликатора или пальца.

50 Альтернативным вариантом является инъекция 1R,2S-метоксамина

непосредственно в мышцу анального сфинктера или в другую ткань в анальной области. При наложении чрескожного пластыря системного действия на ягодицу, в частности, около анальной области, кроме системного эффекта будет оказывать локальное действие.

Когда препарат для местного применения представлен мазью, кремом, гелем или пастой в тубе, в инструкциях по применению может быть рекомендовано, например, выдавить 2-3 см препарата из тубы. Наружный препарат может быть представлен в контейнере, который содержит насос и дозирующее устройство, помогающее осуществлять правильное дозирование. Как правило, от приблизительно 0,5 до приблизительно 3 мл, например, приблизительно 1 мл, является подходящим объемом крема, геля или мази для местного применения. Однако при местном нанесении препарата, в особенности с помощью пальца, часто бывает трудным нанести точную дозу. Применение аппликатора может обеспечить более точное дозирование.

В инструкциях по применению должен быть указан рекомендуемый участок применения, например, следует ли наносить препарат на кожу вокруг ануса или препарат следует также ввести в анус.

Для эффективного лечения недержания кала было бы необходимо использовать фенилэфрин в препарате для местного применения, например в геле, в концентрации 30-40 мас.%, как правило, в объеме 1 мл, обеспечивающем дозу 400 мг фенилэфрина. Общая доза фенилэфрина и высокая концентрация будут приводить к проявлению системного и локального побочных эффектов, в частности, к побочным эффектам в отношении сердечно-сосудистой системы, например, к повышению кровяного давления, и к локальному раздражению кожи. Напротив, в исследованиях на

свиньях при использовании 1R,2S-метоксамина было обнаружено, что 0,5 мл гелей, содержащих 1 мас.% и 0,3 мас.% 1R,2S-метоксамина повышают давление во внутреннем анальном сфинктере, не оказывая воздействия на кровяное давление.

Согласно данному изобретению для лечения недержания кала предпочтительным является применение фармацевтической композиции, пригодной для местного нанесения, например геля, крема или мази, которые, как правило, содержат не более 10 мас.% 1R,2S-метоксамина и обычно меньше 10%, например до и включая 8%, например, до и включая 5%, например, до и включая 4%, 3%, 2% или 1% 1R,2S-метоксамина. Могут быть использованы препараты, содержащие 1 мас.% или меньше метоксамина, например, 0,8% или меньше, например, 0,5% или меньше, например, 0,3% или меньше, например, 0,1 мас.% 1R,2S-метоксамина. Подходящим объемом крема, геля или мази для местного нанесения является от приблизительно 0,5 до приблизительно 2 мл, предпочтительно приблизительно 1 мл. Композиция может вводиться один или более раз в день, например, два или три раза в день, часто даже чаще, например, четыре или пять раз в день. Типичная однократная доза препарата для местного применения составляет приблизительно 1 мл геля, мази или крема, например, содержащий количество 1R,2S-метоксамина, как описано выше. Доза 1R,2S-метоксамина, вводимая при нанесении, может быть рассчитана по объему наносимой композиции и концентрации 1R,2S-метоксамина в композиции. Например, 1 мл 1 мас.% 1R,2S-метоксаминового геля обеспечивает дозу 10 мг 1R,2S-метоксамина. В качестве примера представляют, что могут быть введены дозы, лежащие в интервале от 0,5 мг до 40 мг. Следует принять во

внимание, что доза, которую действительно вводят в соответствующую область, может быть меньше теоретической дозы вследствие потерь во время
нанесения.

При использовании с целью повышения тонуса гладких мышц желудочно-кишечного тракта и при использовании при лечении расстройства или нарушения, вызываемого потерей тонуса гладких мышц желудочно-кишечного тракта, а также при использовании с целью повышения тонуса сфинктера желудочно-кишечного тракта и при использовании для лечения расстройства или нарушения, вызываемого потерей тонуса сфинктера желудочно-кишечного тракта предпочтительным является местное нанесение 1R,2S-метоксамина, например, с помощью вышеописанной фармацевтической композиции, с целью избежания нежелательных системных подобных эффектов. Могут быть использованы композиции для соответствующего задержанного или направленного введения. Например, для применения с целью повышения тонуса гастроэзофагеального сфинктера и для применения при лечении рефлюкса, например болезни Барнетта, 1R,2S-метоксамин может быть введен в форме сгущенной жидкости, в частности, вязкого геля или суспензии. Для применения с целью повышения тонуса сфинктера привратника и для применения при лечении гастрогенной диареи 1R,2S-метоксамин может быть введен в форме сгущенной жидкости, в частности вязкого геля или суспензии, или твердой пероральной композиции с направленным высвобождением в желудке.

Для применения с целью профилактики или лечения расстройств или нарушений сердечной функции, например, расстройств или нарушений сердечного ритма, 1R,2S-метоксамин вводят системно, в частности, путем

инъекции или инфузии, например, в форме подходящей фармацевтической композиции, как описано выше.

Основным правилом является, что, если желателен локальный эффект, например, при лечении застойных явлений в носу, при офтальмологическом применении и при лечении недержания кала, желательно достижение локального эффекта без системного действия, например, без воздействия на кровяное давление. Тот факт, что 1R,2S-изомер обладает более высокой активностью, чем любой другой изомер или сам рацемат, означает, что одинаковый фармакологический эффект может быть достигнут при значительно более низкой дозировке, при которой снижается уровень нежелательных побочных эффектов.

Что касается системного применения 1R,2S-метоксамина, то возможно использование более низкой дозы для достижения такого же эффекта, который получают с помощью более высоких доз рацемата метоксамина.

Как объяснялось выше, обнаружено, что способом, предложенным Fujita и Niyaма, могут быть получены только очень маленькие количества 1R,2S-метоксамина, например, приблизительно до 1 г, такие количества слишком малы для практических целей. Вследствие этого предпочтительно получение изомера посредством процесса, соответствующего изобретению, который дает возможность более крупномасштабного производства, например, партиями по меньшей мере по 30 - 50 г.

Способ согласно данному изобретению предусматривает добавление по каплям трифторуксусной кислоты к раствору, содержащему диметилфенилсилан и (S)-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанон с защищенной аминогруппой, и удаление защитной группы из полученного в

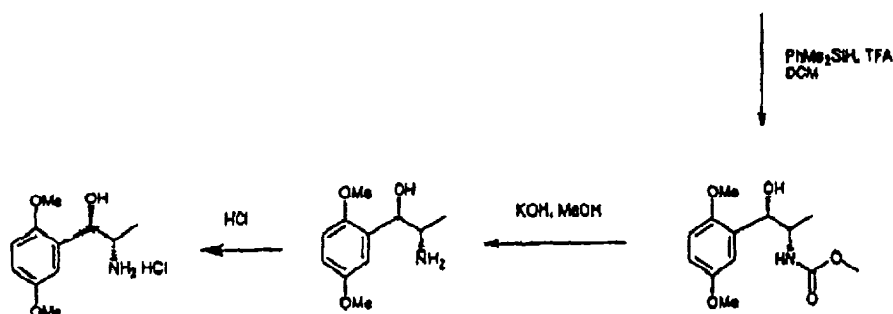
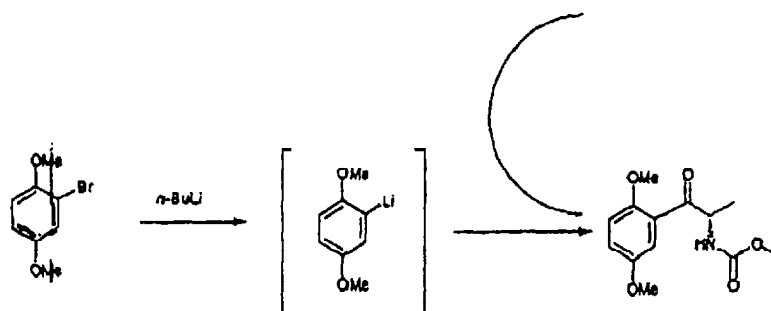
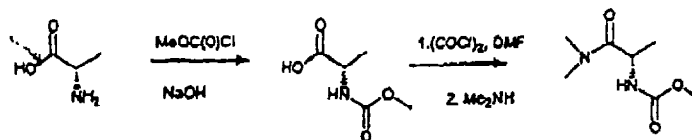
результате amino-защищенного (1R,2S)-2-amino-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанола. Защитная группа может быть представлена, например, алкокси-
или арилоксикарбонильной группой, в частности, метоксикарбонильной или
трет-бутоксикарбонильной группой. Предпочтительно, как правило,
использовать защитную группу, которая, по сравнению с другими защитными
группами, является маленькой и необъемной, с целью свести к минимуму
эффект защитной группы на стереоспецифичность реакции. Обычно
предпочтительной является метоксикарбонильная защитная группа.
Растворителем для раствора силана и пропанона служит, в частности,
хлорированный углеводород, например, дихлорметан. Преимущество
дихлорметана состоит в том, что он менее токсичен, чем другие
хлорированные углеводороды, например, хлороформ. Восстановление
пропанона с использованием диметилфенилсилана следует проводить при
охлаждении, поскольку при реакции происходит образование тепла. Как
правило, реакцию с добавлением трифторуксусной кислоты ведут при
охлаждении на льду, например, при температуре в области 0°C, и
предпочтительно, когда полученную в результате реакцию смесь
выдерживают при данной температуре, например, приблизительно в течение
одного часа.

Реакция может быть прекращена добавлением основания, например, гидроксида натрия. Если это желательно, продукт можно очистить кристаллизацией. Защитную группу удаляют из продукта с целью превращения его в 1R,2S-метоксамин путем восстановления, предпочтительно с использованием основания, например, гидроксида калия, в частности в условиях нагревания с обратным холодильником, например, в

течение приблизительно 20 часов.

В изобретении представлен также способ получения
5 (1R,2S)-2-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанола с аминогруппой,
защищенной предпочтительно, как описано выше. Процесс предусматривает
добавление по каплям трифторуксусной кислоты к раствору, содержащему
10 диметилфенилсилан и (S)-амино-1-(2,5- диметоксифенил)-1-пропанон,
аминогруппа которого защищена, предпочтительно, как описано выше.
15 Предпочтительными являются реагенты и условия реакции, как описано выше.

(S)-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанон с защищенной
20 аминогруппой может быть получен из L-аланина способом, описанным Fujita
и Hiyama. Вкратце, способ предусматривает защиту аминогруппы L-аланина,
превращение карбоксигруппы N-защищенного аланина в кислый хлорид *in situ*
25 с последующей реакцией с амином для получения амида N-защищенного
(S)-аланина и присоединение данного соединения к хлорированному
30 2,5-диметоксибензолу в присутствии *n*-бутиллития или реагента на основе
магния, например, реагента Гриньяра или типа реагента Гриньяра, с
образованием (S)-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанона с защищенной
35 аминогруппой. В способе, описанном Fujita и Hiyama, защитная группа амина
представлена метоксикарбонильной группой, амин - диметиламином,
40 хлорированный 2,5-диметоксибензол - бром-2,5-диметоксибензолом и
реагент, используемый в реакции присоединения - *n*-бутиллитием. Схема
45 реакции представлена ниже.



Fujita и Hiyama приводят детальные протоколы получения различных промежуточных продуктов в вышеприведенной схеме реакции. Однако любой из промежуточных продуктов схемы реакции Fujita и Hiyama может быть получен путем другого или модифицированного процесса. Например, отсутствует необходимость в каждой детали придерживаться данного протокола. Реагенты и/или условия реакции могут отличаться. Например, Fujita и Hiyama используют 3 эквивалента бром-2,5-диметоксибензола на стадии присоединения. Однако при масштабировании процесса от размера партии приблизительно 1 г до размера партии 30 г - 50 г было обнаружено, что полученный (S)-метоксикарбонил)амино]-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанон плохо поддается очистке. Было показано, что при использовании вместо этого только 1,5 эквивалентов бром-2,5-диметоксибензола и

н-бутиллития продукт значительно легче очистить и, что неожиданно, при этом не происходит уменьшения выхода, полученный выход составляет до 89% при расчете по аланину в качестве исходного материала. Более подробно детали приводят в Примерах ниже.

По желанию реагенты и условия реакции могут варьировать, например, как описано выше. Например, можно использовать различные защитные группы для аминокислот, в частности, может быть использована трет-бутоксикарбонильная группа. Вместо диметиламина можно использовать метоксиметиламин. Хлор- или йод-2,5-диметоксибензол могут быть использованы вместо бром-2,5-диметоксибензола. Однако данные варианты, вероятно, приведут в результате к снижению выхода и/или снижению стереоспецифичности реакции. Вследствие этого предпочтительным является использование рекомендованных реагентов и условий реакции.

Другим способом получения 1R,2S-метоксамина является хроматографическое разделение рацемата метоксамина или любой смеси изомеров метоксамина. Однако разделение и выделение традиционными хроматографическими методами является практически невозможным. Единственным реальным способом является хиральная жидкостная хроматография высокого давления (HPLC), и для применения данной методики требуются определенные модификации.

Хиральную хроматографию проводят предпочтительно с использованием хроматографической среды, созданной для разделения изомеров, например, хроматографической среды, которая содержит R,S-гидроксипропиловый эфир β -циклодекстрина. Свойством данной среды является формирование соединений включения. Например, может быть использован Cyclobond 1 2000

RSP, имеющийся в фирме Advanced Separation Technologies, 1 Blake Street, Congelton, Cheshire, England. Данная среда представляет собой

5 хроматографическую среду с обращенной фазой, которую производят путем ковалентного связывания β -циклодекстрина с частицами оксида кремния.

10 Некоторые вторичные гидроксильные группы циклодекстрина дериватизированы рацемическими (R,S)-гидроксипропильными группами, дающими возможность проводить дальнейшие взаимодействия с

15 растворенным веществом, направленные на связывание водорода. Растворенное вещество заключается в пустоты циклодекстрина в обращенной

20 фазе, и наряду со взаимодействиями гидроксипропильных боковых цепей, имеет место энантиоселективность. В качестве обзора по технологии циклодекстриновой хроматографии см., например, работы Ward и Armstrong²¹.

25 Для хроматографии может быть использована подвижная фаза, содержащая 0,1% водный триэтиламин. рН 0,1% водного триэтиламина можно подвести до рН 4,1, например, с помощью ледяной уксусной кислоты.

30

Применение Cyclobond 1 RSP дает возможность выделить два изомера метоксамина из рацемата метоксамина с высокой чистотой. Для разделения

35 двух других изомеров предпочтительно подвергнуть два других изомера дальнейшему хроматографированию, например, с использованием

40 хроматографической среды, содержащей сополимер винилового спирта основание, дериватизированный введением октадецильных (C18) на

45 гидроксильных группах сополимеров винилового спирта. Данную среду, например, для колонок C18, также производит фирма Advanced Separation Technologies, 1 Blake Street, Congelton, Cheshire, England. На колонках C18

50 концентрируют образец из подвижной фазы. Буфер можно удалить

промыыванием водой. Элюирование колонок метанолом позволяет выделить очищенные энантиомеры.

5 Применение Cyclobond 1 RSP с последующим использованием C18 приводит к получению очищенных образцов всех четырех изомеров. Дальнейшие детали приведены в Примерах ниже. Вместо Cyclobond 1 RSP и
10 C18 могут быть использованы другие аналогичные хроматографические среды, например, хроматографические среды, имеющие такой же или
15 близкий химический состав и/или такие же или близкие физико-химические хроматографические свойства.

20 Хотя хроматография пригодна для аналитических целей, она не подходит для крупномасштабного получения 1R,2S-метоксамина, достаточного для практических целей, например, для клинического применения.

25 Даже используя хиральную хроматографию невозможно однозначно соотнести хроматографические фракции с изомерными химическими
30 структурами. Для осуществления окончательной идентификации 1R,2S-изомера метоксамина, называемого также 1R,2S-метоксamiном, потребовалось использовать комбинацию ЯМР-спектроскопии и
35 монокристаллического рентгеновского дифракционного анализа.

 Как утверждается выше, было обнаружено, что 1R,2S-метоксамин по
40 меньшей мере в четыре раза более активен в плане индукции сокращения мышцы внутреннего анального сфинктера *in vitro*, чем фенилэфрин. В
45 исследованиях на свиньях *in vivo* было показано, что гели, содержащие 1 мас.% 1R,2S-метоксамина (L-эритро-метоксамина) и даже с таким низким содержанием, как 0,1 мас.% повышают давление во внутреннем анальном
50 сфинктере, не оказывая какое-либо воздействие на кровяное давление.

Данные результаты имеют большое значение, поскольку повышение давления в анальном канале по количественным характеристикам является близким эффектам, достигаемым при использовании фенилэфрина за исключением необходимой концентрации фенилэфрина. Полагают, что 1R,2S-метоксамин действует на внутренний анальный сфинктер через α -адренергические рецептор в мышце сфинктера.

Следующие неограничивающие Примеры иллюстрируют изобретение.

ПРИМЕР 1

Исследования воздействия *in vitro* изомеров метоксамина на мышцу внутреннего анального сфинктера.

Способы

Ткань получают от самок свиней породы Большая Белая с местной скотобойни. Нарезают части мышцы внутреннего анального сфинктера, и ткани сразу переносят в раствор Кребса при 4°C (120 мМ NaCl, 5,9 мМ KCl, 15,4 мМ Na₂HCO₃, 1,2 мМ NaH₂PO₄, 2,5 мМ CaCl₂, 1,2 мМ MgCl₂, 11,5 мМ глюкозы, уравновешенные 97% кислорода и 3% диоксида углерода для поддержания pH 7,4 $\pm$ 0,05). Эпителий анального канала удаляют вместе с подслизистой оболочкой. Нарезают полоски внутреннего анального сфинктера (IAS) размером приблизительно 1 x 1 x 7 мм каждая, массы от 2 мг до 8 мг и содержащие параллельные пучки мышц. Тонкие шелковые лигатуры размера 0-5 привязывают к каждому концу и полоски подвешивают для изометрического растяжения, регистрируемого в ваннах для перфузии органов (объемом 0,2 мл) (Brading A.F., Sibley G.N., Аппарат для суперфузии для стимуляции воздействием поля гладкой мышцы из мочевого пузыря млекопитающих (A superfusion apparatus to study field stimulation of smooth

muscle from mammalian urinary bladder), J. Physiol. 334:11-12P, (1983)), как показано на Фигуре 1. Полоску мышцы 1 держат с помощью нити 2 с целью ее фиксации в положении в кожухе Perspex 3. Полоски непрерывно обрызгивают раствором Кребса (37°C) со скоростью 1 мл/мин, который вводят через входное отверстие 4 и удаляют через сливное отверстие 5. Данный аппарат обеспечивает одновременное изучение шести полосок. К полоскам изначально прикладывают нагрузку 1 г и дают уравновеситься в течение по меньшей мере 90 минут. Натяжение измеряют с использованием динамометра Pioden с датчиком UF1 (Pioden Controls, Canterbury, UK), имеющим датчик натяжения 6 и кольцевые электроды 7 и 7a, и регистрируют оба показателя на шестиканальном перьевом самописце Tekman 900 (Tekman Electronics, Leamington Spa, UK) при использовании программы Chart v3.6 и системы поиска данных MacLab (MacLab Data Acquisition System) (AD Instruments, Australia).

Фенилэфрин (Sigma Chemical Co., Poole, UK), рацемат метоксамина и четыре изомера метоксамина растворяют в растворе Кребса и тестируют на наличие воздействия на тонус IAS. Рацемат метоксамина, т.е. эквимольную смесь четырех изомеров производит фирма Prosyth Limited, Acton, Sudbury, Suffolk. Четыре изомера (называемые пиками 1-4), разделяют, как описано в Примере 3. Пик 2 представляет собой 1R,2S-метоксамин. 1R,2S-изомер синтезируют также, как описано в Примере 4. То, что пик 2 представляет собой 1R,2S-метоксамин, подтверждают с помощью кристаллографии.

Полоски IAS приобретают внутренний тонус в период уравнивания. После уравнивания повышающие концентрации каждого из тест-соединений добавляют в периоды по 20 секунд, чередующиеся с

периодами промывания по меньшей мере по десять минут, пока тонус не возвращается на исходный уровень.

5 Результаты выражают как среднее (стандартная ошибка среднего) от числа хирургических препаратов, из которых получают полоски. От каждой свиньи для каждого тест-объекта используют максимум шесть полосок.

10 Индуцируемые тест-соединением повышения тонуса рассчитывают путем вычитания пикового значения тонуса, полученного после внесения
15 тест-соединения, из базового значения тонуса. Затем данную цифру выражают как процент максимального повышения тонуса, наблюдаемого во всем диапазоне использованных доз (10^{-2} М - 10^{-8} М). Все анализы проводят
20 с использованием программы Chart v3.6.

25 Значения EC_{50} (50% эффективной концентрации) рассчитывают с помощью построения кривых зависимости концентрация-ответ для каждой мышечной полоски. Дозу, вызывающую 50% от максимального сокращения
30 вычисляют с использованием линейной регрессии. Величины EC_{50} для различных лекарственных веществ сравнивают с помощью двустороннего критерия Стьюдента, принимая неравную дисперсию и считая достоверным
35 $p < 0,05$.

Результаты

40 *Рацемат метоксамина и фенилэфрин*

Оба, как рацемат метоксамина, так и фенилэфрин, вызывают
45 доза-зависимое сокращение полосок гладкой мышцы из IAS. Значения EC_{50} для рацемата метоксамина и фенилэфрина существенным образом не отличаются ($5,8 \times 10^{-5}$ М относительно $7,5 \times 10^{-5}$ М; $p = 0,44$). Кривые зависимости
50 концентрация-ответ представляют на Фигуре 2. $n = 24$ (4)

Стереоизомеры метоксамина

Все изомеры (пики 1 - 4) вызывают доза-зависимое сокращение гладкой
 5 мышцы из IAS. Значения EC_{50} представляют в Таблице 1.

Таблица 1

Тест-соединение	Рацемат или изомер	Значение EC_{50} , мкМ ($\pm$ SE) (стандартная ошибка)
Фенилэфрин	Рацемат	74,7 ($\pm$ 16,5)
Метоксамин	Рацемат	58,3 ($\pm$ 13,4)
	Пик 1:	317 ($\pm$ 4,06)
	Пик 2: 1R,2S	17,6 ($\pm$ 3,71)
	Пик 3:	165 ($\pm$ 12,1)
	Пик 4:	483 ($\pm$ 80,6)

Пик 2, 1R,2S-изомер, значительно более активен, чем пики 1, 3 и 4
 25 ($p < 0,01$). Кривые зависимости концентрация-ответ для четырех изомеров
 представляют на Фигуре 3. Пик 2, 1R,2S-изомер является также значительно
 30 более активным, чем рацемат метоксамина и фенилэфрин ($p < 0,01$), как
 показывают на кривых зависимости концентрация-ответ Фигуры 4.

1R,2S-метоксамин, синтезированный химическим путем (пик 2)

1R,2S-метоксамин, полученный путем химического синтеза, как описано
 в Примере 4, также вызывает доза-зависимое сокращение полосок
 40 внутреннего анального сфинктера. EC_{50} составляет 10,5 ($\pm$ 1,97) мкМ. Данное
 значение EC_{50} не отличается значительным образом от значения для пика 2,
 45 который представляет собой тот же самый изомер, полученный при
 хроматографическом разделении рацемата ($p = 0,10$), см. Фигуру 5.
 1R,2S-изомер, синтезированный химическим путем, также обладает
 50 значительно большей активностью, чем рацемат метоксамина ($p < 0,01$),

фенилэфрин ($p < 0,001$) и пики 1, 3 и 4, см. Фигуры 3 и 4.

ПРИМЕР 2

5 Хроматографическое разделение изомеров метоксамина.

Аналитическая очистка

10 Аналитическое разделение образца рацемата метоксамина, полученного от фирмы Prosynth Limited (см. Пример 2), на четыре индивидуальных энантиомера проводят в следующих хроматографических условиях:

15 Cyclobond 12000 RSP (Advanced Separation Technologies Ltd (Astec) 37 Leslie Court, P. O. Box 297 Whippany, NJ 07981 USA) кондиционируют подвижной фазой, содержащей ацетонитрил/0,1% триэтиламин ацетат в
20 соотношении 5/95 (об./об.), pH 4,1 до достижения стабильного базового уровня. Образец рацемата метоксамина (1 мг/мл) готовят в метаноле. Десять
25 микролитров приготовленного образца вводят в колонку, которую проводят со скоростью потока 0,6 мл/минуту. Мониторирование потока, выходящего из
30 колонки, осуществляют с помощью УФ-детектора, установленного на длину волны 254 нм. Отмечают четыре пика, см. Фигуру 6. При мониторинге
35 потока, выходящего из колонки, с помощью лазерного поляриметра отмечают, что два первых пика представляют собой диастереомеры. Это означает, что пики 1 и 3 пики 2 и 4 являются энантиомерными парами.

40 *Препаративная очистка*

Для очистки 100 мг каждого энантиомера сначала проводят хиральную
45 стационарную фазу и собирают пики 1 и 2. В качестве диастереоизомеров два данных пика подвергают дальнейшей очистке (рафинированию) на колонке Astec C18. При том же проведении на колонке RSP собирают
50 очищенный пик 3 и очищенный пик 4. Поскольку как проведение колонки C18

для разделения пиков 1 и 2, так и проведение колонки Cyclobond 12000 RSP осуществляют с использованием нелетучего буфера, разрабатывают способ адсорбции разделенных энантиомеров метоксамина на стационарной фазе C18. На колонке C18 концентрируют образец из подвижной фазы и удаляют буфер промыванием водой. Наконец, элюирование колонки C18 метанолом позволяет выделить очищенные энантиомеры.

Способ препаративной очистки

1. Получение триэтиламин ацетата: перемешивают 0,1% раствор триэтиламина качества для HPLC и доводят pH до 4,1 ледяной уксусной кислотой качества реагента.

2. Для очистки 100 мг каждого энантиомера необходимо растворить 800 мг рацемата метоксамина в 80 мл подвижной фазы. Колонку размером 22,1 x 250 мм, заполненную Cyclobond 1 2000 RSP 5 мк (Astec, каталожный No 20344), кондиционируют подвижной фазой, используемой, как указано выше, для аналитической колонки, которую пропускают со скоростью 20 мл/мин. Колонку мониторируют при длине волны 254 нм в УФ-области и делают впрыскивания по 2,5 мг каждые 20 мин. (всего 320 впрыскиваний). Прерывания для сбора отдельных пиков делают в соответствии стрелкам на Фигуре 7. Каждый из пиков 1 и 2 сближают и объединяют, тогда как пики 3 и 4 собирают индивидуально и объединяют.

Выделение разделенных пиков на колонке C18.

1. Колонку C18 размером 22,1 x 250 мм, наполненную стационарной фазой 5 мк, промывают водой. pH объединенных растворов подводят до 7,0 триэтиламином и вдвое увеличивают объем водой качества для HPLC.

2. Образец с подведенным pH закачивают в колонку C18 со скоростью

10 мл/мин.

3. Колбу ополаскивают водой и раствор, полученный при ополаскивании, пропускают через колонку. Дополнительное количество воды пропускают через колонку до тех пор, пока весь триэтиламин не вымоется из колонки. Вымывание измеряют по возвращению стабильного базового уровня с помощью УФ-детекции при длине волны 254 нм. Образец элюируют прокачиванием метанола через колонку. Окончание элюции отмечают по результатам УФ-мониторирования при длине волны 254 нм.

4. После элюции колонку снова промывают водой с целью подготовки к обработке следующего образца. Таким же образом индивидуально обрабатывают все пики 1, 2, 3 и пик 4.

5. Выделенный образец в метаноле концентрируют до образования сухого остатка на водяной бане при 40°C.

Обработка пиков 3 и 4.

Остаток, полученный из метанола после обработки на C18, перерастворяют в 20 мл метанольного JCL (0,1%) и снова выпаривают. Остаток растирают с эфиром (~ 15 мл) для получения порошка. На Фигуре 8 представлены результаты анализа чистоты пика 3 (140 мг) и на Фигуре 9 - результаты анализа чистоты пика 4 (105 мг).

Дальнейшая очистка пиков 1 и 2.

1. Колонку C18 5 микрон размером 250 X 30 мм уравнивают подвижной фазой: 0,1% ТЕАА, рН 4,1 в соотношении 20/80 при скорости потока 35 мл/мин.

2. Остаток из восстановленной колонки C18 объединенных пиков 1 и 2 растворяют в подвижной фазе и делают совместное впрыскивание 1 мг.

Выделение пика 1 и пика 2.

1. Колонку размером 22,1 x 250 мм кондиционируют водой качества для
5 HPLC.

2. В собранных и объединенных фракциях пика 1 и пика 2
10 триэтилацетатом подводят pH до 7,0 и вдвое увеличивают объем
добавлением воды качества для HPLC.

3. Индивидуальные объединенные фракции закачивают в колонку C18,
15 затем промывают колонку водой для удаления буфера и, наконец, элюируют
метанолом.

20 4. Метанол концентрируют для получения сухого остатка на водяной бане
при 40°C.

25 5. Метанольный остаток перерастворяют в метанольной HCl и снова
концентрируют.

30 6. Остаток, полученный при данной обработке, растирают с эфиром для
получения порошка, получают пик 1 (44 мг), и выход пика 1 составляет 44 мг,
а пика 2 - 29 мг.

Второе проведение пиков 1 и 2

35 Первые из представленных образцов пика 1 и пика 2 имеют низкий
выход и более низкую чистоту, чем намечено, и порошок сильно окрашен
40 (светло-зеленый). Полагают, что повторная обработка после первого
проведения может привести к некоторому самоокислению. Вследствие этого
45 решают повторить проведение колонки RSP сначала с общим рацематом. В
данном случае происходит сильное сближение пиков 1 и 2, так что их
невозможно подвергнуть повторному хроматографированию.

50 В результате выделение пика 1 и пика 2, обработанных, как указано

выше, значительно повышается и окрашивание становится значительно меньше. На Фигуре 10 представляют чистоту пика 1 (45 мг) и на Фигуре 11 - чистоту пика 2 (34 мг).

Характеризация изомеров с помощью ЯМР-спектроскопии

Протонный ЯМР-спектр четырех фракций (пики 1 - 4) в диметилсульфоксиде (d_6 -ДМСО) получают при комнатной температуре с использованием ЯМР-спектрометра Briker DRX 500 МГц, см. Фигуры 12 - 15. Хотя резонансы можно соотнести с определенным окружением протонов в структурах, возможность соотнесения с соответствующей стереохимией отсутствует.

Спектры для пика 1 (см. Фигуру 12) и пика 3 (см. Фигуру 13) почти идентичны, в частности, диагностические пики при 4,8 ppm (идентифицируют как b) как в структуре, так и в ЯМР-спектре и 6,0 ppm (d), что создает данные энантиомерные пары. Аналогично пик 2 (см. Фигуру 14) и пик 4 (см. Фигуру 15) также очень близки друг другу в положениях b и d, что снова делает их энантиомерными парами, но отличными от пиков 1 и 3. Даже аминные протоны выше 7,5 ppm (c) могут быть аналогично соответствующими. Изменяющееся окружение, такое, как обусловленное резонансами амина или спирта, часто бывает ненадежным, поскольку положение их химического сдвига зависит от концентрации и температуры. Резонанс спиртовой группы OH неотличим от резонанса остаточной воды при 3,3 ppm вследствие химического обмена. Соответственно, пики 1 и 3 представляют собой диастереоизомеры пиков 2 и 4.

ПРИМЕР 3**Синтез 1R,2S-метоксамина****(S)-N-Метоксикарбонилаланин**

К перемешиваемому раствору L-аланина (300 г, 3,37 моль гидрохлорида натрия, 1 Н, 1800 см³) при 0°C на ледяной бане по каплям добавляют в течение 2 часов метилхлорформиат (274 см³, 3,54 моль). Добавлением гидрохлорида натрия (5 Н) поддерживают pH раствора 9. Реакционную смесь перемешивают при 0°C в течение 3 часов, после чего ее подкисляют до pH 1 добавлением раствора фосфорной кислоты (15%) и экстрагируют диэтиловым эфиром (5 x 1000 см³). Объединенные органические экстракты высушивают (MgSO₄) и концентрируют при пониженном давлении, получая продукт в виде вязкого масла зеленого цвета (386 г, 78%). Данные ¹H ЯМР-спектроскопии (250 МГц; C²HCl₃): 1,48 (3H, d, J7,25, CH₃), 3,72 (3 H, s, COCH₃), 4,40 (1 H, квинтет J7,25, CH), 5,31 (1 H, bs, NH).

(S)-N-метоксикарбонил аланиндиметиламид

К перемешиваемому раствору MeOC-аланина (227 г, 1,54 моль) и диметилформамида (ДМФ) (25 см³) в сухом дихлоруретане (ДХУ) (2000 см³) при 0°C по каплям добавляют оксалилхлорид (146 см³, 1,62 моль) в течение 2 часов. Раствор перемешивают при 0°C до прекращения образования газов, после чего добавляют основной раствор диметиламина (676 г, 7,70 моль) в NaOH (3 Н, 2000 см³). Водный слой экстрагируют диэтиловым эфиром (2 x 500 см³) и объединенные органические слои высушивают (MgSO₄) и концентрируют при пониженном давлении, получая продукт в виде кристаллического твердого вещества белого цвета, которое не требует дальнейшей очистки (230 г, 86%). Данные ¹H ЯМР-спектроскопии (250 МГц ;

C^2HCl_3) 1,33 (3 H, d, J6,75, CH_3), 2,99 (3 H, s, OCH_3) 3,08 (3 H, s, OCH_3), 3,66 (3 H, s, $COCH_3$), 4,66 (H, квинтет, J7,00, CH), 5,75 (1 H, d, J5,75, NH).

(S)-2-[(метоксикарбонил)амино]-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанон.

К раствору бром-2,5-диметоксибензола (55 г, 0,25 моль) в ТГФ (тетрагидрофуране) (1000 cm^3) при температуре $-20^\circ C$ под азотом добавляют н-буллитий (100 cm^3 , 2,5 М в гексане, 0,25 моль). Смесь перемешивают при $-20^\circ C$ в течение 0,75 часов, после чего через канюлю добавляют раствор амида (30 г, 0,17 моль) в ТГФ (100 cm^3). Раствор перемешивают при температуре $-20^\circ C$ в течение 2 час., затем дают ему нагреться до комнатной температуры в течение 1 часа и гасят реакцию добавлением раствора хлорида аммония (700 cm^3). Раствор разбавляют диэтиловым эфиром (1000 cm^3), органический слой высушивают ($MgSO_4$) и концентрируют при пониженном давлении, получая масло желтого цвета. Продукт очищают с помощью сухой флеш-хроматографии на диоксиде кремния (элюант гексан/этилацетат 4:1, затем гексан/этилацетат 3:2) с образованием продукта в виде твердого кристаллического вещества белого цвета (45 г, 98%). Данные 1H ЯМР-спектроскопии (250 МГц; C^2HCl_3): 1,36 (3 H, d, J7,0, CH_3), 3,70 (3 H, s, $COCH_3$), 3,82 (3 H, s, OCH_3), 3,92 (3 H, s, OCH_3), 5,43 (1 H, квинтет, J 7,3, H-2), 5,80 (1 H, bs, NH), 6,94 (1 H, d, J 9,0, ArH), 7,10 (1 H, dd, J 9,0, 3,3, ArH), 7,32 (1 H, d, J 3,3, ArH).

(1R,2S)-2-[(метоксикарбонил)амино]-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанол.

К перемешиваемому раствору кетона, т.е. (S)-2-[(метоксикарбонил)амино]-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанона (20 г, 74,9 ммоль) и диметилфенилсилана (10,7 г, 78,6 ммоль) в сухом DCM (500

см₃) при 0°C на ледяной бане по каплям добавляют трифторуксусную кислоту (TFA) (50 см₃). Раствор перемешивают при 0°C в течение 1 часа, а затем
 5 гасят реакцию добавлением гидрохлорида натрия (500 см₃, 1 Н). Органический слой высушивают и концентрируют при пониженном давлении, получая масло желтого цвета, которое со временем затвердевает. Твердое
 10 вещество кристаллизуют из смеси эфир/гексан, получая продукт в виде кристаллического твердого вещества белого цвета (15,6 г, 75%). Данные ¹H ЯМР-спектроскопии (250 МГц; C²HCl₃) 1,03 (3 Н, d, J7,0, CH₃), 3,04 (1 Н, d, J4,3, OH), 3,68 (3 Н, s, COCH₃), 3,78 (3 Н, s, OCH₃), 3,80 (3 Н, s, OCH₃),
 15 3,94-3,99 (1 Н, m, H-2), 5,05-5,15 (2 Н, m, H-1 и NH), 6,72-6,85 (2 Н, m, ArH) 6,97 (1 Н, d, J 2,0, ArH).

(1R,2S)-Метоксамин.

25 К перемешиваемому раствору метоксикарбонил (MEOC)-защищенного спирта, т.е. (1R,2S)-2-[(метоксикарбонил)амино]-1-(2, 5-диметоксифенил)-1-пропанола (4,0 г, 14,9 ммоль) в метаноле (175 см³)
 30 добавляют раствор КОН (4,06 г, 72,8 ммоль) в воде (60 см³). Раствор охлаждают и подкисляют фосфорной кислотой (15% об./об). Раствор экстрагируют DCM (2 x 50 см³) и подщелачивают водный слой добавлением K₂CO₃. Водный слой экстрагируют диэтиловым эфиром (5 x 50 см³) и
 35 объединенные эфирные экстракты высушивают (MgSO₄) и концентрируют при пониженном давлении, получая продукт в виде прозрачного масла желтого цвета (1,9 г, 61%), Данные ¹H ЯМР-спектроскопии (250 МГц; C²HCl₃): 0,84 (3 Н, d, J 7,0, CH₃), 3,19-3,22 (1 Н, m, H-2), 3,71 (6 Н, s, 2 x OCH₃), 4,67 (1 Н, d, J 5,0, H-1), 6,66- 6,72 (2 Н, m, ArH), 6,92 (1 Н, d, J 2,5, ArH).
 45

(1R,2S)-метоксамин гидрохлорид.

Через охлажденный на льду раствор (1R,2S)-метоксамина (1,9 г, 9,00
 5 ммоль) в безводном диэтиловом эфире (30 см³) пропускают поток сухого газа
 HCl в течение 45 мин. Полученный осадок фильтруют с помощью отсоса,
 10 промывают холодным диэтиловым эфиром и высушивают под азотом, получая
 титульное соединение с виде твердого вещества белого цвета (1,5 г, 68%).
 Данные ¹H ЯМР-спектроскопии (250 МГц; [C²H₅]₂SO) 0,89 (3 H, d, J 6,8, CH₃),
 15 3,37-3,42 (1 H, m, H-2), 3,71 (3 H, s, OCH₃), 3,75 (3 H, s, OCH₃), 5,12 (1 H, s,
 H-1), 5,92 (1 H, d, J 4,3, OH), 6,84 (1 H, dd, J 8,8, 3,0, ArH), 6,92-7,00 (2 H, m,
 20 ArH); HPLC.

Аналитический способ анализа метоксамина

Для анализа образцов метоксамина используют следующий способ.

Способ

Колонка	: Cyclobond I RSP 250 x 4,6 мм
Температура колонки	: 23°C
Подвижная фаза	: 0,1% тетраэтиламмоний, pH 4,1*, 95% 35 об./об.
Скорость потока	: ацетонитрил 5% об./об.
Раствор	: 0,6 мл/мин.
Концентрация раствора	: 5 мг/л
Впрыскиваемый объем	: 2,5 мкл - 20 мкл
Детекция	: УФ, 230 нм

* каждый день готовят свежий ацетат тетраэтиламмония, pH 4,1.

ПРИМЕР 4**Сtereoхимическая характеристика 1R,2S-метоксамина посредством рентгеновского анализа монокристаллов**

Рентгеновский анализ монокристаллов представляет собой решающий инструмент для установления структуры. Гидрохлорид предполагаемого 1R,2S-изомера метоксамина (называемого также L-эритро-изомером) синтезируют, как описано в Примере 3. Гидрохлорид предполагаемого 1R,2R (D-трео)-изомера синтезируют в соответствии с модификацией способа, предложенного Fujita и Нуама, в которой в качестве восстановителя используют борогидрид натрия с целью получения смеси 1R,2R-(D-трео)- и 1R,2S-(D-эритро)-изомеров. 1R,2R-изомер очищают с использованием флеш-хроматографии на колонке с диоксидом кремния. Два соединения кристаллизуют из раствора метанола/этилацетата в атмосфере гексана. Полученные в результате кристаллы представляют собой очень тонкие пластинки, дающие очень хорошие результаты, на основании которых определяют структуры с достоверным коэффициентом точности. Для проведения рентгеновской кристаллографии используют прибор Nonius КарраCCD. Атомные координаты и параметры эквивалентного изотропного смещения приводят в Таблице 2. Данные анализа кристалла и уточнения структуры приводят в Таблице 3. Длины связей и углы приводят в Таблице 4. Параметры анизотропного смещения приводят в Таблице 5 и координаты водорода и параметры изотропного смещения - в Таблице 6.

ТАБЛИЦА 2.

Атомные координаты [$\text{\AA} \times 10^4$] и параметры эквивалентного изотропного смещения [$\text{\AA}^2 \times 10^3$] для pb0103. $U(\text{eq})$ определено как одна треть следа ортогонализованного U_{ij} тензора.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Cl(1)	-3293(1)	5351(1)	670(1)	29(1)
O(1)	-889(3)	2022(2)	957(1)	28(1)
O(2)	2949(3)	4524(2)	3752(1)	38(1)
O(3)	-4256(3)	-221(2)	3208(1)	30(1)
N(1)	-1904(3)	-935(2)	408(1)	24(1)
C(1)	1183(4)	3350(3)	3583(2)	28(1)
C(2)	583(4)	2757(3)	2715(1)	25(1)
C(3)	-1260(4)	1583(3)	2599(1)	23(1)
C(4)	-2503(4)	969(3)	3369(1)	24(1)
C(5)	-1909(4)	1570(3)	4237(1)	27(1)
C(6)	-105(4)	2762(3)	4335(1)	29(1)
C(7)	-2078(4)	1072(3)	1638(1)	23(1)
C(8)	-1501(4)	-703(3)	1421(1)	24(1)
C(9)	1147(4)	-1230(3)	1640(2)	38(1)
C(10)	4470(4)	5030(3)	3006(2)	37(1)
C(11)	-5712(4)	-746(3)	3969(2)	33(1)

ТАБЛИЦА 3.

Данные анализа кристалла и уточнение структуры для nb0103.

5	Идентификационный код	nb0103
	Эмпирическая формула	$C_{11}H_{18}ClNO_3$
10	Масса молекулы	247,71
	Температура	180(2) K
15	Длина волны	0,7107 Å
	Кристаллическая система	Моноклинная
20	Пространственная группа	P21
	Размеры элементарной ячейки	$a = 5,3331(3) \text{ Å}$ $\alpha = 90^\circ$
25		$b = 8,2342(6) \text{ Å}$ $\beta = 90,195(4)^\circ$
		$c = 14,6198(7) \text{ Å}$ $\gamma = 90^\circ$
30	Объем	$642,01(7) \text{ Å}^3$
	Z	2
35	Удельный вес (расчетный)	1,281 Мг/м ₃
	Коэффициент поглощения	$0,291 \text{ мм}^{-1}$
40	F(000)	264
	Размер кристалла	0,23 x 0,18 x 0,01 мм
45	θ -интервал для получения данных	3,73 - 27,44°

50

	Интервалы коэффициентов	$-6 \leq h \leq 6, -10 \leq k \leq 9, -17 \leq l \leq 18$
5	Полученные отражения	4436
	Независимые отражения	2536 ($R_{\text{int}} = 0,0288$)
10	Коррекция поглощения	Полуэмпирическая на основе эквивалентов
15	Макс. и мин. коэффициент прохождения	0,997 и 0,957
20	Способ уточнения	Полноматричные наименьшие квадраты на F^2
25	Данные/ограничения/параметры	2536/1/153
	Критерий сходимости на F_2	1,099
30	Конечные R-коэффициенты [$ I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0,0331, wR2 = 0,0832$
35	R-коэффициенты (по всем данным)	$R1 = 0,0379, wR2 = 0,0861$
40	Абсолютный параметр структуры	0,00(6)
45	Самый большой дифракционный пик и впадина	0,188 и -0,212 $\text{e}\text{\AA}^{-3}$

ТАБЛИЦА 4.

Длины связей [Å] и углы [°] для пв0103.

5	O(1)-C(7)	1,417(2)	O(1)-H(1)	0,86(3)
	O(3)-C(4)	1,375(3)	O(3)-C(11)	1,426(3)
10	N(1)-C(8)	1,509(2)	N(1)-H(1A)	0,9100
	N(1)-H(1B)	0,9100	N(1)-H(1C)	0,9100
15	C(1)-C(6)	1,386(3)	C(1)-C(2)	1,396(3)
	C(2)-C(3)	1,388(3)	C(2)-H(2A)	0,9500
20	C(3)-C(4)	1,401(3)	C(3)-C(7)	1,529(3)
	C(4)-C(5)	1,398(3)	C(5)-C(6)	1,381(3)
25	C(5)-H(5A)	0,9500	C(6)-H(6A)	0,9500
	C(7)-C(8)	1,527(3)	C(7)-H(7A)	1,0000
30	C(8)-C(9)	1,511(3)	C(8)-H(8A)	1,0000
	C(9)-H(9A)	0,9800	C(9)-H(9B)	0,9800
35	C(9)-H(9C)	0,9800	C(10)-H(10A)	0,9800
	C(10)-H(10B)	0,9800	C(10)-H(10C)	0,9800
40	C(11)-H(11A)	0,9800	C(11)-H(11B)	0,800
	C(11)-H(11C)	0,9800		
45				
50	C(7)-O(1)-H(1)	104,6(18)	C(1)-O(2)-C(10)	117,49(17)

	C(4)-O(3)-C(11)	117,06(17)	C(8)-N(1)-H(1A)	109,5
	C(8)-N(1)-H(1B)	109,5	H(1A)-N(1)-H(1B)	109,5
5	C(8)-N(1)-H(1C)	109,5	H(1A)-N(1)-H(1C)	109,5
	H(1B)-N(1)-H(1C)	109,5	O(2)-C(1)-C(6)	116,45(19)
10	O(2)-C(1)-C(2)	124,41(19)	C(6)-C(1)-C(2)	119,1(2)
	C(3)-C(2)-C(1)	120,92(18)	C(3)-C(2)-H(2A)	119,5
15	C(1)-C(2)-H(2A)	119,5	C(2)-C(3)-C(4)	119,34(18)
	C(2)-C(3)-C(7)	120,18(17)	C(4)-C(3)-C(7)	120,27(19)
20	O(3)-C(4)-C(5)	124,01(18)	O(3)-C(4)-C(3)	116,32(18)
	C(5)-C(4)-C(3)	119,7(2)	C(6)-C(5)-C(4)	120,07(18)
25	C(6)-C(5)-H(5A)	120,0	C(4)-C(5)-H(5A)	120,0
	C(5)-C(6)-C(1)	120,84(19)	C(5)-C(6)-H(6A)	119,6
30	C(1)-C(6)-H(6A)	119,6	O(1)-C(7)-C(8)	106,94(16)
	O(1)-C(7)-C(3)	111,52(18)	C(8)-C(7)-C(3)	113,41(18)
35	O(1)-C(7)-H(7A)	108,3	C(8)-C(7)-H(7A)	108,3
	C(3)-C(7)-H(7A)	108,3	N(1)-C(8)-C(9)	107,55(17)
40	N(1)-C(8)-C(7)	107,30(17)	C(9)-C(8)-C(7)	114,8(2)
	N(1)-C(8)-H(8A)	109,0	C(9)-C(8)-H(8A)	109,0
45	C(7)-C(8)-H(8A)	109,0	C(8)-C(9)-H(9A)	109,5
50				

C(8)-C(9)-H(9B)	109,5	H(9A)-C(9)-H(9B)	109,5
C(8)-C(9)-H(9C)	109,5	H(9A)-C(9)-H(9C)	109,5
H(9B)-C(9)-H(9C)	109,5	O(2)-C(10)-H(10A)	109,5
O(2)-C(10)-H(10B)	109,5	H(10A)-C(10)-H(10B)	109,5
O(2)-C(10)-H(10C)	109,5	H(10A)-C(10)-H(10C)	109,5
H(10B)-C(10)-H(10C)	109,5	O(3)-C(11)-H(11A)	109,5
O(3)-C(11)-H(11B)	109,5	H(11A)-C(11)-H(11B)	109,5
O(3)-C(11)-H(11C)	109,5	H(11A)-C(11)-H(11C)	109,5
H(11B)-C(11)-H(11C)	109,5		

Симметричные трансформации используют для генерации эквивалентных атомов:

ТАБЛИЦА 5.

Параметры анизотропного смещения [$\text{\AA}^2 \times 10^3$] для pb0103.

5 Экспонента фактора анизотропного смещения имеет форму: $-2\pi^2$

$$[(h a^*)^2 U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$$

10		U11	U22	U33	U23	U13	U12
	Cl(1)	32(1)	21(1)	33(1)	1(1)	0(1)	-2(1)
15	O(1)	43(1)	19(1)	21(1)	1(1)	8(1)	2(1)
	O(2)	41(1)	43(1)	30(1)	-13(1)	7(1)	-15
20	O(3)	36(1)	34(1)	21(1)	1(1)	6(1)	-10(1)
	N(1)	28(1)	19(1)	24(1)	-2(1)	-1(1)	0(1)
25	C(1)	29(1)	26(1)	30(1)	-5(1)	3(1)	1(1)
	C(2)	29(1)	24(1)	23(1)	-2(1)	5(1)	2(1)
30	C(3)	28(1)	20(1)	20(1)	0(1)	2(1)	2(1)
	C(4)	24(1)	24(1)	23(1)	0(1)	1(1)	2(1)
	C(5)	30(1)	33(1)	19(1)	1(1)	6(1)	2(1)
35	C(6)	34(1)	34(1)	20(1)	-5(1)	2(1)	2(1)
	C(7)	29(1)	22(1)	18(1)	2(1)	2(1)	0(1)
40	C(8)	33(1)	20(1)	20(1)	3(1)	0(1)	-1(1)
	C(9)	44(1)	34(1)	35(1)	-6(1)	-13(1)	14(1)
45	C(10)	36(1)	33(2)	41(1)	-3(1)	7(1)	-4(1)
	C(11)	32(1)	39(1)	28(1)	7(1)	5(1)	-3(1)

50

ТАБЛИЦА 6.

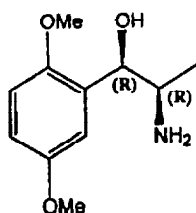
Координаты водорода ($\text{\AA} \times 10^4$) и параметры изотропного смещения($\text{\AA}^2 \times 10^3$) для nb0103.

5

		x	y	z	U(eq)
10	H(1)	-1670(50)	2940(40)	968(18)	40(8)
	H(1A)	-3403	-494	242	36
15	H(1B)	-1905	-2015	275	36
	H(1C)	-648	-437	95	36
20	H(2A)	1447	3162	2196	30
	H(5A)	-2747	1158	4760	33
	H(6A)	257	3184	4926	35
25	H(7A)	-3930	1238	1584	27
	H(8A)	-2700	-1412	1762	29
30	H(9A)	1427	-2328	1403	56
	H(B)	1398	-1226	2304	56
35	H(9C)	2335	-478	1355	56
	H(10A)	5757	5785	3227	55
40	H(10B)	3423	5573	2547	55
	H(10C)	5279	4080	2731	55
45	H(11A)	-6911	-1575	3768	49
	H(11B)	-6623	181	4225	49
50	H(11C)	-4602	-1206	4438	49

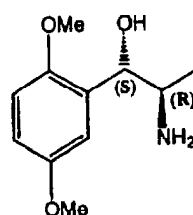
Данные результаты дают возможность однозначно идентифицировать
 изомер, синтезированный в Примере 2 и выделенный с помощью
 хроматографии как пик 2 в Примере 2, как 1R,2S-изомер метоксамина.
 Структура изомера представлена на Фигуре 16.

Результаты кристаллографического анализа и заключения, сделанные на
 основе данных ЯМР-спектроскопии, описанные выше в Примере 2, позволяют
 провести полную идентификацию изомеров метоксамина, как показано ниже:



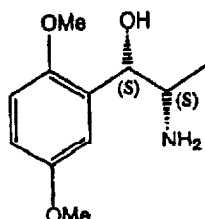
1R,2R-метоксамин

(D-трео-метоксамин)



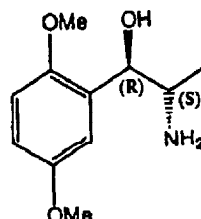
1S,2R-метоксамин

(D-эритро-метоксамин)



1S,2S-метоксамин

(L-трео-метоксамин)



1R,2S-метоксамин

(L-эритро-метоксамин)

ПРИМЕР 5

**Исследование влияния 1R,2S-метоксамина на различные
 сердечно-сосудистые параметры и среднее анальное давление покоя
 (MARF) у анестезированных свиней после местного нанесения на
 эпителиальную выстилку анального канала.**

Способ

Исследование проводят согласно следующему протоколу:

Тест-субстанции:

а) Плацебо в 4% (мас./мас.) геле

5 б) 0,3 масс% 1R,2S-метоксамин в 4% (мас./мас.) геле

с) 1% масс% 1R,2S-метоксамин в 4% (мас./мас.) геле

10 д) 3% масс% 1R,2S-метоксамин в 4% (мас./мас.) геле

4% (мас./мас.) гель содержит 4 г гидроксиметилцеллюлозы в 96 мл 0,5 М ацетатного буфера. 1 мас.% 1R,2S-метоксамина в 4% (мас./мас.) геле
15 содержит 1 г 1R,2S-метоксамина в 99 г 4% геля.

Животные/поддержание животных

20 В исследовании используют геттингенских минисвиней, приобретенных в фирме Ellegaard Gottingen Minipigs ApS, Soro Landevej 302, DK-4261 Dalmoose, Denmark. Каждое из животных в возрасте 4-5 месяцев в начале исследования
25 имеет массу телу 6,9-8,7 кг. Используют четырех самцов. Животное No 2 заменяют животным No 4, см. ниже.

Корм и вода для питья

30 Корм для минисвиней поставляет фирма Ellegaard Gottingen Minipigs ApS. В течение периода адаптации каждой свинье дают 200 г/кг массы тела
35 данного корма два раза в день. В случае плохого аппетита у животного корм оставляют на более длительный период (до 8 час.). В день перед введением
40 минисвиньи не получают никакого корма. Водопроводную воду дают без ограничений.

Содержание

45 Свиней содержат по одной в небольших закрытых загонах площадью приблизительно 3 м² на соломенной подстилке, где поддерживают
50 температуру 22°C ± 3°C (максимальный интервал) и естественный световой

цикл.

Анестезия

5 Минисвиньям проводят анестезию смесью хлоралозы и уретана (соотношение 1 + 5). При необходимости делают дополнительную анестезию. Для обеспечения общего состояния минисвиньи перед началом эксперимента
10 измеряют уровень газов и значение pH крови, взятой из правой или левой бедренной артерии, при использовании анализатора газов кров ABL 70 (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Для того, чтобы компенсировать потери
15 жидкости постоянно вводят раствор Рингера (5 мл/кг массы тела/час). Температуру тела животного поддерживают на уровне 38°C в течение
20 эксперимента с наружным обогреванием.

Введение тест-субстанций

25 Тест-субстанции наносят местно на эпителиальную выстилку анального канала, используя объем 0,5 мл/животное. Интервал между каждым из периодов наблюдения составляет 20 минут. Введение осуществляют с
30 использованием шприца объемом 1 мл, который вводят в анальный канал на глубину приблизительно 1 см. Тест-субстанции вводят медленно, вращая
35 шприц. После подготовки и стабилизации функций кровообращения в течение по меньшей мере 15 минут животных лечат плацебо или выбранными
40 уровнями доз тест-субстанции путем нанесения их на эпителиальную выстилку анального канала.

45 Перед первым введением и далее в подходящие точки времени после нанесения внутривенно вводят изопротеренол для контроля. Артеренол (норэпинафрина гидрохлорид, известный также как L-норадреналин) вводят
50 для контроля в конце образцов крови для анализа токсикокинетики.

Уровни доз

Исследования проводят с использованием следующих уровней доз:

5		Доза тест-субстанции (содержание, как субстанция об./об. в 4% об./об. геле)		
10		Свинья No 1	Свинья No 3	Свинья No 4
	Период I	0,5 мл плацебо	0,5 мл плацебо	0,5 мл плацебо
15	Период II	0,5 мл 0,3%	0,5 мл 1%	0,5 мл 0,3%
20	Период III	0,5 мл 1%	0,5 мл 3%	0,5 мл 3%

Свинью No 2 заменяют свиньей No 4, т.к. значения перед введением дозы для свиньи No 2 выходят за рамки нормы.

Измеряемые параметры*Препараты*

Минисвиней под анестезией фиксируют в дорзальном положении на операционном столе.

Периферическое артериальное кровяное давление

Внутриартериальный постоянный катетер (размер 0,8 x 1,4 мм, B. Braun Melsungen AG, D-34212 Melsungen, Germany) соединяют с датчиком давления (DTX, Pfrimmer-Viggo, Erlangen, Germany), регистрирующим систолическое или диастолическое артериальное кровяное давление в правой или левой бедренной артерии. Сигнал усиливают с помощью усилителя Hellige Servomed SMV 178 T (Hellige GmbH, D-79100 Freiburg, Germany). Кровяное давление регистрируют и мониторируют с помощью прибора Hellige Cardiognost EK 512

P (скорость подачи бумаги: 2,5 мм/сек.). Определяют систолическое и диастолическое давление [ммHg] и рассчитывают среднее давление по следующей формуле: среднее кровяное давление [ммHG] = (систолическое давление + (2 x диастолическое давление))/3

Частота сердечных сокращений и данные электрокардиографии

Регистрацию ЭКГ (электрокардиограммы) делают с использованием стандартных отведений электрокардиограммы от конечностей I, II и III, а также усиленных отведений электрокардиограммы от конечностей aVR, aVL и aVF. Используют стандартизацию 10 мм/1 мВ и скорость подачи бумаги 50 мм/сек. Регистрацию проводят с использованием прибора HELLIGE Marquette mac 5000 12SL. Записи визуально исследуют на предмет аритмий и аномалий электрических комплексов. Кроме того, для отведения от конечности II определяют: частоту сердечных сокращений [ударов/мин.], P-сегмент [мсек.], интервал P-Q [мсек.], комплекс QRS [мсек.], интервал Q-T [мсек.]. Значения QTc [мсек.] вычисляют по формуле van de Water: $QTc = QT - 0,087(\text{расстояние R-R} - 1000)$.

Среднее давление и давление покоя

Анальное давление покоя измеряют путем трехкратного введения манометрического зонда (Unisensor Microtipcatheter 8104-00-9409-D; Medical Measurement Systems b. v. , Collosseum 25, NL-7521 P. V. Enschede, The Netherlands) в прямую кишку. Анальное давление покоя, взятое как среднее по трем данным измерениям (MARP), регистрируют с помощью многоперьевого самописца Rikadenki.

Отбор образцов крови

Образцы крови (5 мл/точку времени) отбирают сразу и через 10, 20, 40,

60, 90 и 120 минут после начала введения и собирают в литий-гепариновых контейнерах. Образцы крови немедленно охлаждают до температуры +2°C - +8°C с помощью системы IsoTherm-Rack system (Eppendorf- Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg, Germany) и обрабатывают цельную кровь для получения EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)-плазмы. Плазму готовят с помощью центрифугирования (5 мин., 4000 об./мин. при +5°C) и делят на аликвоты приблизительно по 1 мл каждая. Обе аликвоты плазмы сразу замораживают при температуре по меньшей мере -80°C и хранят при данной температуре до отправления одной аликвоты на сухом льду на анализ.

На образце отмечают номер исследования, вид, номер животного, время отбора образца, тип образца, дату и уровень дозы.

Образцы анализируют на уровни метоксамина в плазме. Результаты представляют в Приложении 3.

Макроскопическое исследование

Во время экспериментов проводят макроскопическое исследование эпителиальной выстилки анального канала. Описывают любое видимое раздражение и/или эритему, вызываемые очень низким значением pH препарата тест-субстанции.

Оценка и время регистрации

Для каждого периода измерения частоту сердечных сокращений, ЭКГ и кровяное давление в бедренной артерии измеряют непрерывно и регистрируют сразу перед и через 5, 10, 15, 20, 40 и 60 минут после начала введения периодами по приблизительно 30 сек., а затем через интервалы по 20 минут до снижения какого-либо эффекта.

Статистика

Для каждого животного и дозы полученные значения сравнивают с исходными значениями. Средние значения для контрольной группы, получающей плацебо, сравнивают с помощью парного t-критерия Стьюдента (см. монографию Colquhoun, Лекции по биостатистике (Lectures on Biostatistics), § 10.6, 167-9 (1971), Clarendon Press, Oxford, England). Используют следующий предел: $p = 0,01 \Rightarrow t = 4,604$ (для 4 степеней свободы). В таблицах указаны достоверные разницы ($p \leq 0,01$) относительно исходных значений. Все вычисления проводят с наибольшей возможной точностью, а затем округляют до представленного номера десятичного разряда. Вследствие этого могут быть отклонения до 1%, обусловленные округлением.

Завершение исследования

В конце исследования животных умерщвляют.

Результаты

Периферическое артериальное кровяное давление

Никакой из уровней тестируемых доз 1R,2S- метоксамина не оказывает воздействия на систолическое, диастолическое или среднее кровяное давление.

При всех исследованных концентрациях 1R,2S-метоксамина изменения кровяного давления отмечают у отдельных животных. Данные изменения не считают связанными с субстанцией, поскольку они находятся в рамках нормальной вариабельности, обусловленной длительной анестезией, при использовании двух животных/точку времени.

Представлены индивидуальные и средние значения. См. Фигуры 17-19. На Фигуре 17 показывают периферическое систолическое артериальное

кровенное давление, на Фигуре 18 представляют периферическое диастолическое артериальное кровяное давление и на Фигуре 19 показывают среднее артериальное кровяное давление.

Среднее анальное давление покоя (MARP)

Лечение 1R,2S-метоксамином в концентрации 0,3% вызывает доза-зависимое повышение MARP до 50 ммHg (73% по сравнению с исходным значением) в среднем за период 110 минут, начиная с пятой минуты после введения обеим свиньям. 1% гель вызывает дальнейшее повышение MARP до 64 ммHg (повышение на 227%) в среднем через 20 минут после нанесения. Применение 3% геля приводит в результате к доза-зависимому ответу MARP приблизительно до 70 ммHg. Оба животных испытывают воздействие в сходной степени. Индивидуальные и средние значения представляют на Фигуре 20.

Частота сердечных сокращений и ЭКГ

Оценка частоты сердечных сокращений и параметров ЭКГ показывает отсутствие связанного с субстанцией воздействия на Р-сегмент, интервал Р-Q, интервал Q-T, величину QTc и комплекс QRS на любом из исследованных уровней доз. В частности, не обнаружено никаких признаков удлинения QT-интервала.

Визуальная оценка записей ЭКГ не показывает никаких незрелых желудочковых комплексов.

При концентрациях 1R,2S-метоксамина 1% и 3% наблюдают повышение частоты сердечных сокращений до приблизительно 100 ударов/мин. (повышение на 29%) в среднем через 2 часа после нанесения у свиней 1 и 3. После этого имеет место очень постепенная нормализация. Данные

изменения не считают связанными с субстанцией, поскольку они находятся в рамках нормальной вариабельности, обусловленной длительной анестезией, при использовании двух животных/точку времени.

Аналогично все изменения, отмеченные в данном исследовании у отдельных животных, также не считают связанными с субстанцией, поскольку они находятся в рамках нормальной вариабельности, обусловленной длительной анестезией, при использовании двух животных/точку времени.

Индивидуальные и средние значения частоты сердечных сокращений представляют на Фигуре 21.

Реактивность функций кровообращения

Никакие гели 1R,2S-метоксамина не влияют на ожидаемые реакции артеренола или изопротеренола.

Макроскопическое исследование

Не наблюдают никаких патологических изменений после применения 0,3%, 1% или 3% 1R,2S-метоксамина.

Уровни метоксамина в плазме

Образцы анализируют на уровни метоксамина в плазме.

Доза-зависимые уровни метоксамина в плазме обнаруживают у всех животных:

Уровни дозы, который дает 0,3% гель, приводит в результате к средним пиковым уровням в плазме 4,90 и 6,97 нг/мл через 40 минут.

Уровни дозы, который дает 1,0% гель, приводит в результате к средним пиковым уровням в плазме 9,88 и 11,0 нг/мл через 20-40 минут.

Уровни дозы, который дает 3,0% гель, приводит в результате к средним пиковым уровням в плазме 50,4 и 61,3 нг/мл через 40-60 минут.

Между свиньями имеются незначительные различия.

Выводы

5 Целью данного эксперимента является оценка влияния
1R,2S-метоксамина на некоторые сердечно-сосудистые параметры и среднее
анальное давление покоя (MARF) у минисвиней под анестезией после
10 местного нанесения на эпителиальную выстилку анального канала.

0,5 мл тест-субстанции/животное вводят путем нанесения на
15 эпителиальную выстилку анального канала в виде плацебо, 0,3%, 1% или 3%
1R,2S- метоксамина (мас./мас.).

20 Интервал, используемый между каждым из нанесений, составляет по
меньшей мере 2 часа. Результаты сравнивают с соответствующими
значениями перед введением дозы.

25 В данных условиях исследования лечение 0,3%, 1% или 3%
1R,2S-метоксamiном не приводит к изменениям сердечно-сосудистых
30 параметров. Связанное с дозой повышение MARF отмечают при всех трех
концентрациях:

35 Концентрация 0,3% 1R,2S-метоксамина вызывает повышение MARF на
50 ммHg по сравнению с исходными значениями, концентрация 1% вызывает
повышение MARF на 64 и концентрация 3% вызывает повышение MARF на 70
40 ммHg. Оба животных испытывают воздействие в сходной степени.

45 Не отмечают никакого влияния на частоту сердечных сокращений и
параметры ЭКГ: P-сегмент, интервал P-Q, интервал Q-T, комплекс QRS и
величину QTc. В частности, не обнаружено никаких признаков удлинения
интервала Q-T. Отсутствует воздействие на ожидаемые реакции минисвиней
50 на артеренол и изопротеренол.

При макроскопическом исследовании патологических изменений не отмечают.

Уровни метоксамина в плазме отражают связь воздействия дозы с максимальными уровнями в плазме 6, 10 и 56 нг метоксамина/мл плазмы для 0,3%, 1% и 3% препаратов, соответственно. Максимальные уровни в плазме наблюдают приблизительно через 40 минут после нанесения. Между свиньями имеется небольшая разница.

Свинья является модельным животным, которое, как известно, в высокой степени соответствует человеку. Полученные выше результаты, демонстрирующие повышение давления покоя внутреннего анального сфинктера при местном нанесении 1R,2S-метоксамина в низких концентрациях и, следовательно, в низких дозах, без местных или системных побочных эффектов, в частности без местного раздражения и без воздействия на кровяное давление, предсказывают получение аналогичных результатов у человека и эффективность местно нанесенного 1R,2S-метоксамина при лечении недержания кала и аналогичных состояний, в частности, таких, при которых желательно повышение тонуса сфинктера.

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для лечения показаний, при которых используют агонист альфа-адренорецептора, содержащая 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль, смешанные или связанные с фармацевтически приемлемым носителем.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, в которой указанное показание представляет недержание кала.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2 в форме, пригодной для достижения локального эффекта.

4. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2 в форме, пригодной для местного применения.

5. Фармацевтическая композиция по п.4 в форме, пригодной для местного нанесения на анальную область.

6. Фармацевтическая композиция по п.4, которая содержит 1R,2S-метоксамин в количестве до 4 мас.% включительно.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, которая содержит 1R,2S-метоксамин в количестве до 3 мас.% включительно.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, которая содержит 1R,2S-метоксамин в количестве до 2 мас.% включительно.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, которая содержит 1R,2S-метоксамин в количестве до 1 мас.% включительно.

10. Фармацевтическая композиция по п.7, которая содержит 1R,2S-метоксамин в количестве от 0,3 до 3 мас.% включительно.

5 11. Фармацевтическая композиция по п.4 в форме крема или мази.

12. Фармацевтическая композиция по п.4 в форме геля, пасты, пены или липкого пластыря.

10 13. Фармацевтическая композиция по п.4 в форме, пригодной для местного применения к анальной области, дополнительно содержащая фармацевтически активные ингредиенты, обычно присутствующие в композициях для анального применения, в частности стероида для уменьшения раздражения и/или местного анестезирующего средства.

14. Фармацевтическая композиция по п.4 в форме, пригодной для местного применения к анальной области, дополнительно содержащая, по меньшей мере, один агент, выбранный из группы, включающей агенты, усиливающие пенетрацию, увлажняющие кожу и
15 смягчающие кожу.

15. Фармацевтическая композиция по п.4 в форме тюбика, контейнера с насосом или аэрозоля.

16. Фармацевтическая композиция по п.15 в форме тюбика.

17. Фармацевтическая композиция по п.15 в форме контейнера с насосом или аэрозоля.

20 18. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2 в унифицированной дозированной лекарственной форме.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, в которой дозированная форма представляет прозрачную упаковку или пакет-саше, который содержит унифицированную дозу геля, крема или мази.

25 20. Фармацевтическая композиция по п.18, которая снабжена дозатором.

21. Фармацевтическая композиция по п.4, в которой местное применение обеспечивается контейнером, содержащим насос, и дозатором для правильной дозировки.

22. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2 в форме, пригодной для перорального, ректального или парентерального введения.

30 23. Фармацевтическая композиция по п.22 в форме, пригодной для ректального введения.

24. Фармацевтическая композиция по п.22, которая является композицией с задержанным во времени высвобождением, композицией, высвобождающей активную субстанцию при pH толстой кишки, или композицией, содержащей покрытие,
35 чувствительное к деградации бактериями, населяющими толстую кишку.

25. Применение 1R,2S-метоксамина или его физиологически приемлемой соли в качестве α -адренергического агониста.

26. Применение по п.25 для лечения недержания кала.

27. Применение по п.25, в котором показание является повышением тонуса анального
40 сфинктера.

28. Применение по п.25, в котором показание представляет повышение давления внутренней выстилки анального сфинктера в состоянии покоя.

29. Применение по любому из пп.25-28, в котором 1R,2S-метоксамин назначают в дозе, сниженной до половины по сравнению с дозой, которая была назначена при использовании
45 рацемата 1R,2S-метоксамата для лечения такого же показания.

30. Применение по любому из пп.25-28, в котором 1R,2S-метоксамин назначают в дозе, сниженной до четверти по сравнению с дозой, которая была назначена при использовании рацемата 1R,2S-метоксамата для лечения такого же показания.

31. Применение по любому из пп.25-28, при котором не повышается давление крови.

50 32. Применение по любому пп.25-28, представляющее местное применение.

33. Применение по п.32 посредством нанесения на анальную область.

34. Применение по п.32 посредством нанесения на всю или часть области, включающей анус, анальный канал или область вокруг ануса.

35. Применение по п.32 посредством нанесения на всю или часть области, включающей эпителиальную выстилку анального канала, анальный канал, внутренний анальный сфинктер, область вокруг ануса и ягодицы.

36. Применение по любому из пп.25-28, в котором назначают 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль один, два, три, четыре или пять раз в день.

37. Применение по любому из пп.25-28, в котором назначают 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль два или три раза в день.

38. Применение по любому из пп.25-28, в котором назначают 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль четыре или пять раз в день.

39. Применение по любому из пп.25-28, в котором доза содержит от 0,5 до 40 мг метоксамина.

40. Применение по п.39, в котором доза содержит от 3 до 30 мг метоксамина.

41. Применение по п.39, в котором доза содержит от 3 до 30 мг метоксамина и при местном применении вводится в объеме 1 мл.

42. Применение по любому из пп.25-28, в котором 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль назначают в дозе, содержащей 1R,2S-метоксамин в количестве от 0,1 до 0,3 мас.% включительно в пересчете на метоксамин.

43. Применение по любому из пп.25-28, в котором 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль назначают местно в объеме от 0,5 до 3 мл.

44. Применение по п.43, в котором 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль назначают в объеме 1 мл.

45. Способ лечения показаний (состояний) при которых используют агонист α -адренорецептора, отличающийся тем, что назначают терапевтически эффективное количество 1R,2S-метоксамина или его физиологически приемлемой соли млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении.

46. Способ по п.45, отличающийся тем, что указанное показание представляет недержание кала.

47.Способ по п.45, отличающийся тем, что показание является повышением тонуса анального сфинктера.

48.Способ по п.45, отличающийся тем, что показание представляет повышение давления внутренней выстилки анального сфинктера в состоянии покоя.

49. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что 1R,2S-метоксамин назначают в дозе, сниженной до половины по сравнению с дозой, которая была назначена при использовании рацемата 1R,2S-метоксамата для лечения такого же показания.

50. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что 1R,2S-метоксамин назначают в дозе, сниженной до четверти по сравнению с дозой, которая была назначена при использовании рацемата 1R,2S-метоксамата для лечения такого же показания.

51. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что в нем не повышается давление крови.

52. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что 1R,2S-метоксамин назначают местно.

53. Способ по п.52, отличающийся тем, что указанное соединение наносят местно на анальную область.

54. Способ по п.52, отличающийся тем, что указанное соединение наносят местно на всю или часть области, включающей анус, анальный канал и область вокруг ануса.

55. Способ по п.52, отличающийся тем, что указанное соединение наносят местно на всю или часть области, включающей эпителиальную выстилку анального канала, анальный канал, внутренний анальный сфинктер, область вокруг ануса и ягодицы.

56. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что назначают 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль один, два, три, четыре или пять раз в день.

57. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что назначают 1R,2S-метоксамин или его физиологически приемлемую соль два или три раза в день.

58. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что назначают 1R,2S-метоксамин

или его физиологически приемлемую соль четыре или пять раз в день.

59. Способ по любому из пп.25-28, отличающийся тем, что доза содержит от 0,5 до 40 мг метоксамина.

60. Способ по п.59, отличающийся тем, что доза содержит от 3 до 30 мг метоксамина.

5 61. Способ по п.59, отличающийся тем, что доза содержит от 3 до 30 мг метоксамина и при местном применении вводится в объеме 1 мл.

62. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что 1R,2S-метоксамин назначают в дозе, содержащей 1R,2S-метоксамин в количестве от 0,1 до 0,3 мас. %.

10 63. Способ по любому из пп.45-48, отличающийся тем, что 1R,2S-метоксамин назначают местно в объеме от 0,5 до 3 мл.

64. Способ по п.63, отличающийся тем, что 1R,2S-метоксамин назначают в объеме 1 мл.

65. Применение 1R,2S-метоксамина или его физиологически приемлемой соли в качестве активного ингредиента при приготовлении лекарственного препарата для применения по любому из пп.25-28.

15 66. Способ получения 1R,2S-метоксамина, отличающийся тем, что трифторуксусную кислоту добавляют по каплям к раствору, содержащему (S)-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанон с защищенной аминогруппой и диметилфенилсилан, и удаляют защитную группу из полученного в результате аминозащищенного (1R,2S)-2-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанола.

20 67. Способ по п.66, отличающийся тем, что первую стадию проводят при охлаждении.

68. Способ по п.66, отличающийся тем, что полученный в результате 1R,2S-метоксамин превращают в его соль.

69. Способ по пп.66-68, отличающийся тем, что (S)-амино-1-(2,5-диметоксифенил)-1-пропанон с защищенной аминогруппой получают путем превращения (S)-N-

25 аланиндиметиламида с защищенной аминогруппой в кислый хлорид и реакции полученного в результате кислого хлорида *in situ* с 1,5 эквивалентами н-бутиллития и 1,5 эквивалентами бром-2,5-диметоксибензола.

70. Способ по п.69, отличающийся тем, что (S)-N-аланиндиметиламид с защищенной аминогруппой получают путем реакции L-аланина с метилхлорформиатом.

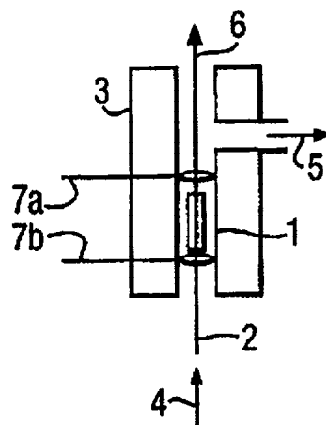
30

35

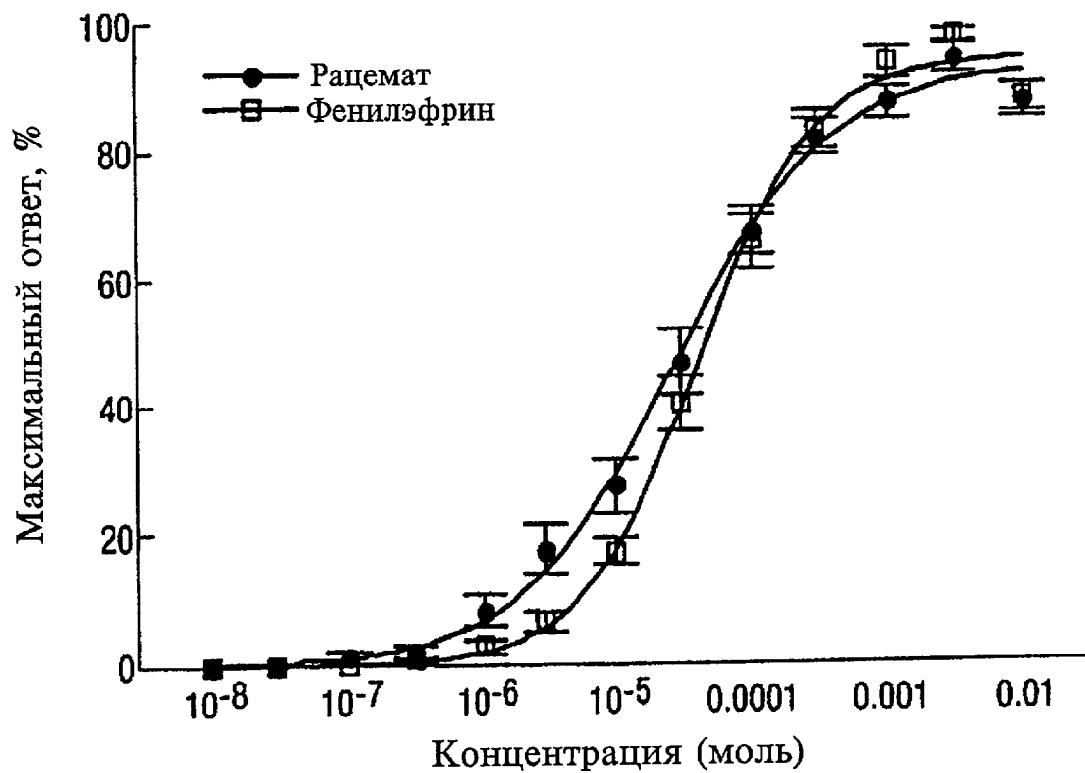
40

45

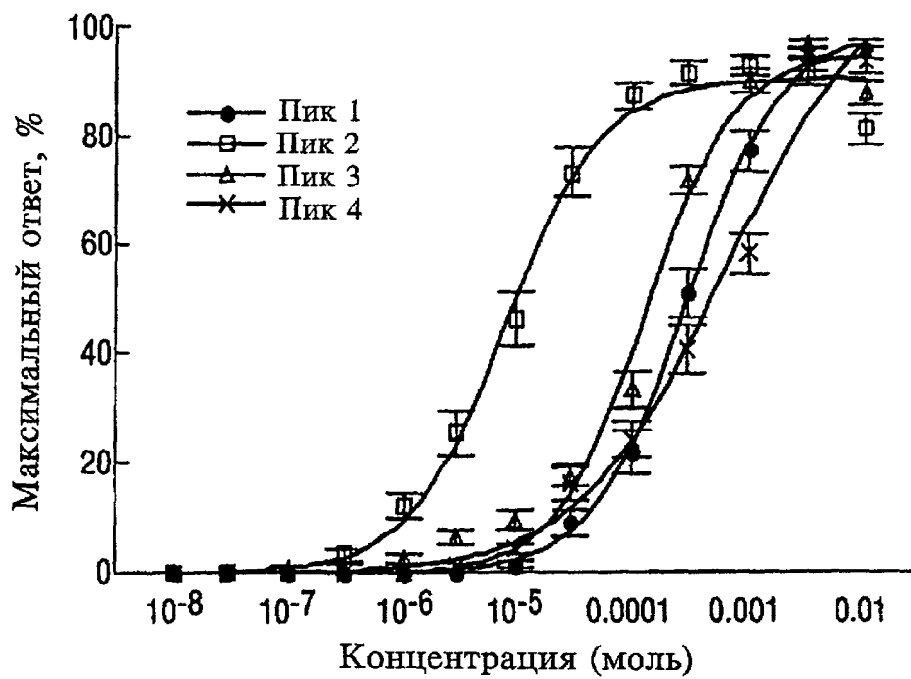
50



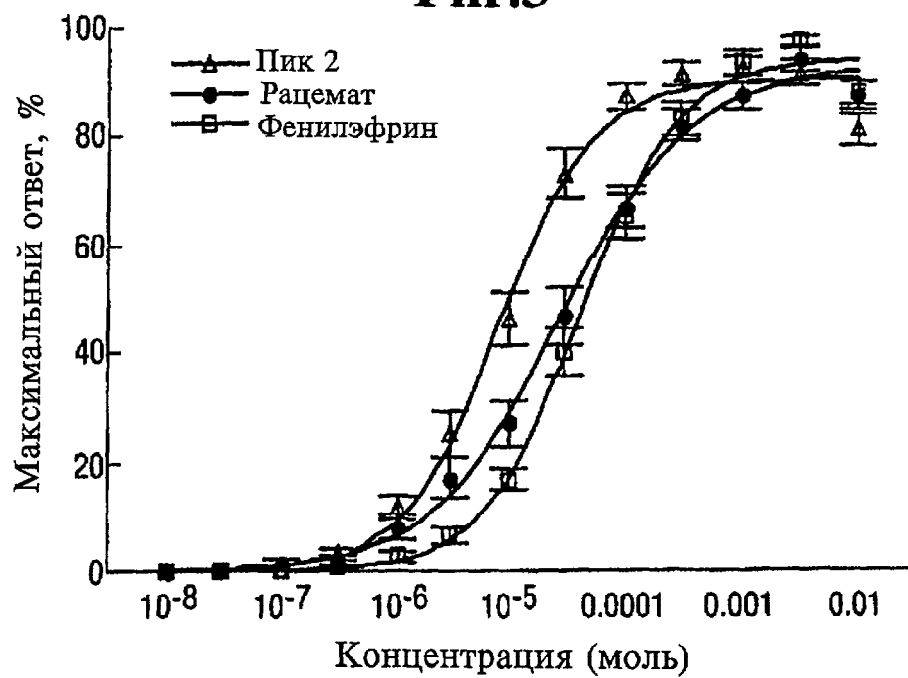
Фиг.1



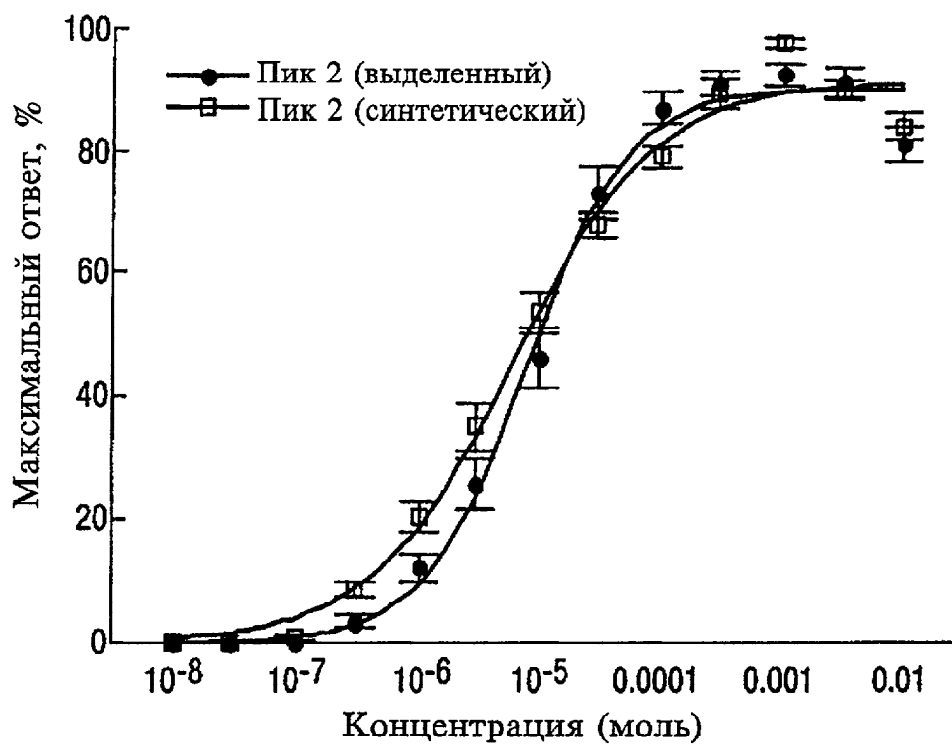
Фиг.2



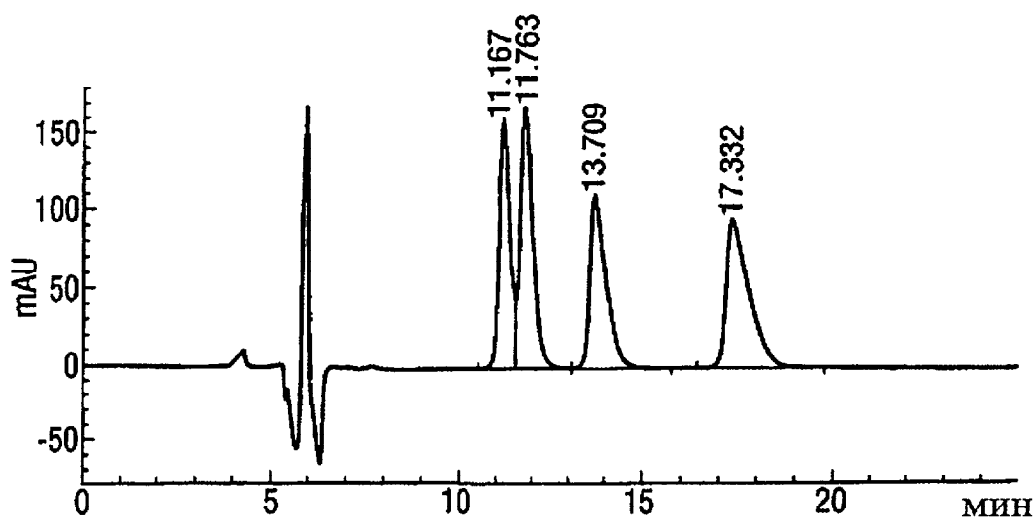
Фиг.3

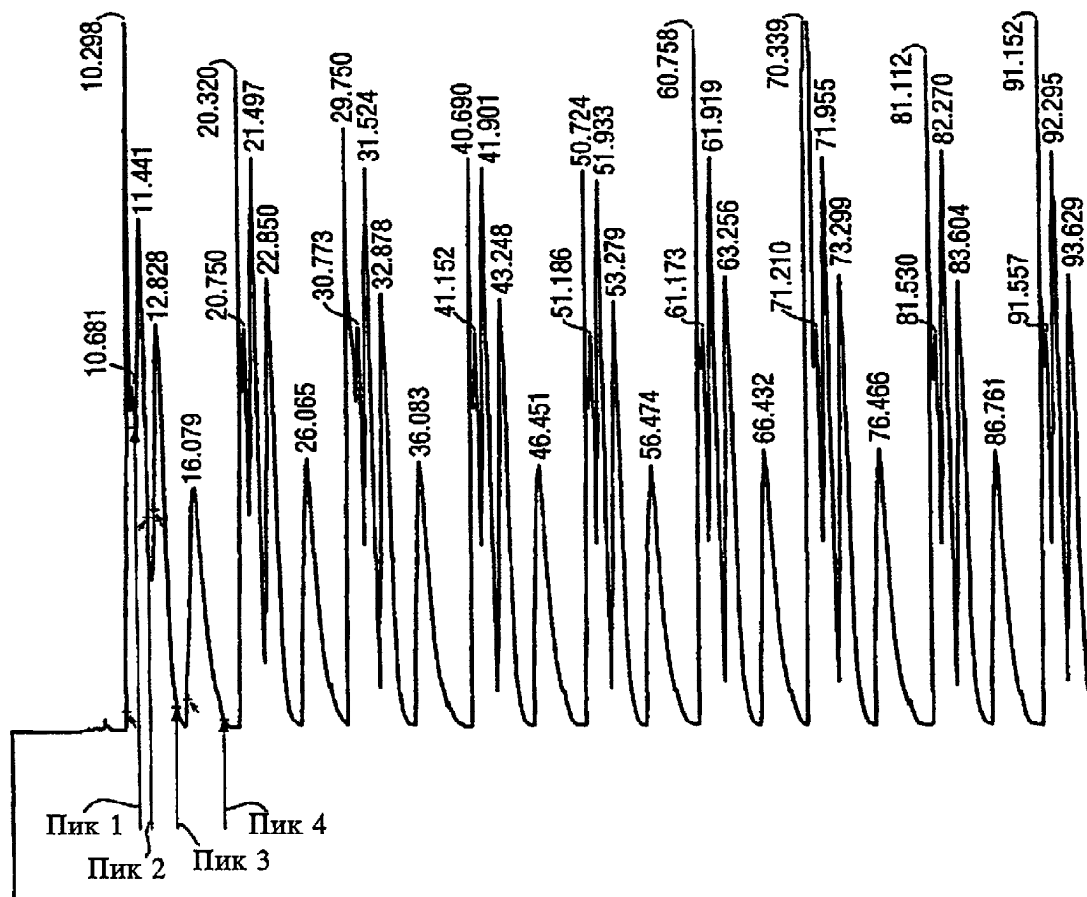


Фиг.4

**Фиг.5**

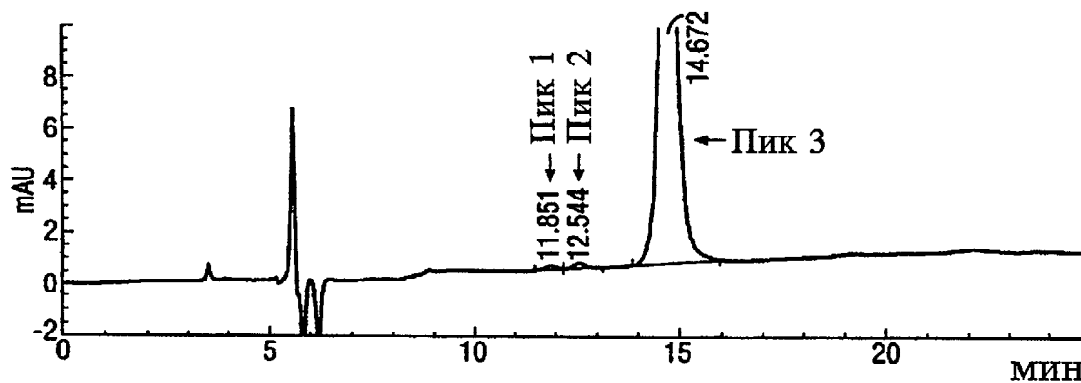
VWD1 A, Длина волны = 225нм (Образец\01-16-8.D)

**Фиг.6**



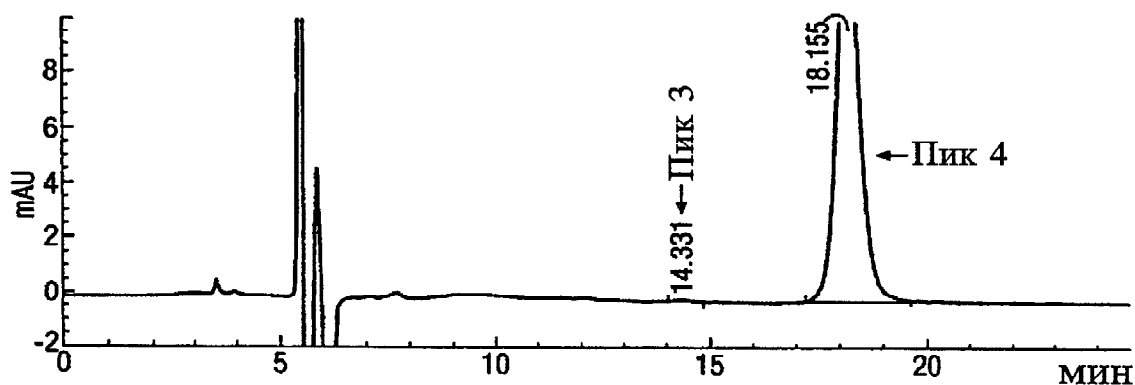
Фиг.7

VWD1 A, Длина волны = 225нм (Образец\0116P3-5.D)

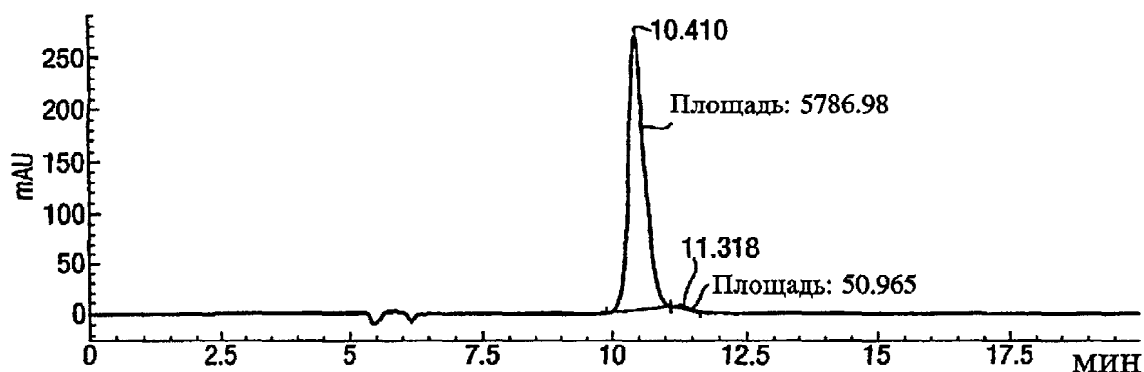


Фиг.8

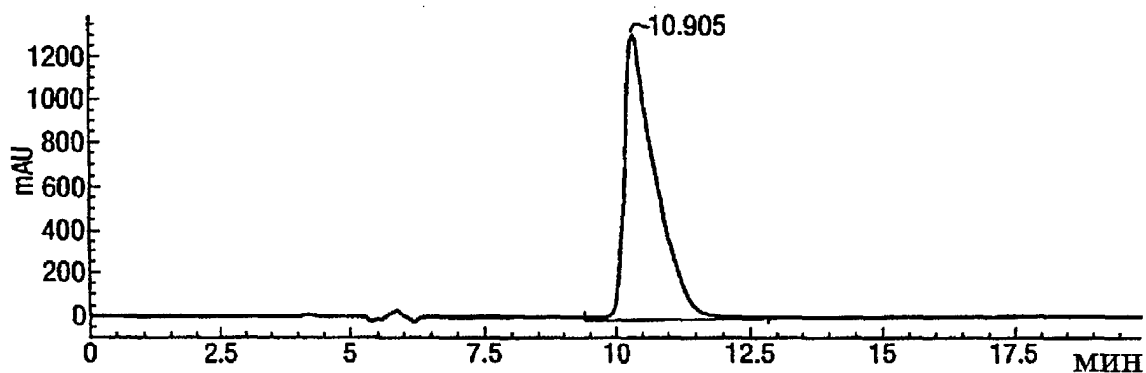
VWD1 A, Длина волны = 225нм (Образец\0116P4-1.D)

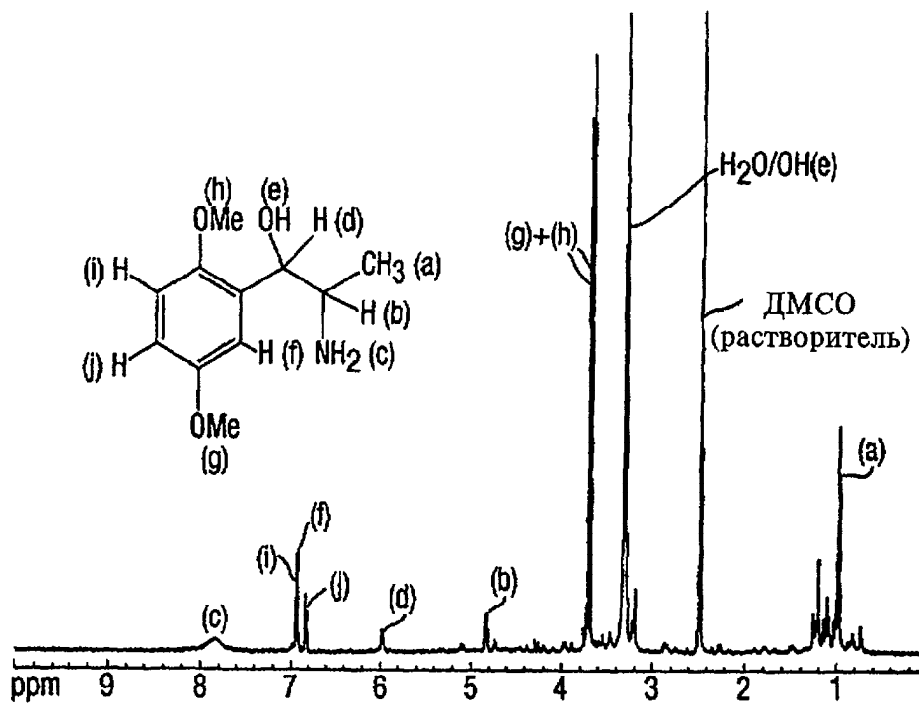
**Фиг.9**

VWD1 A, Длина волны = 225нм (Образец\0116P1-4.D)

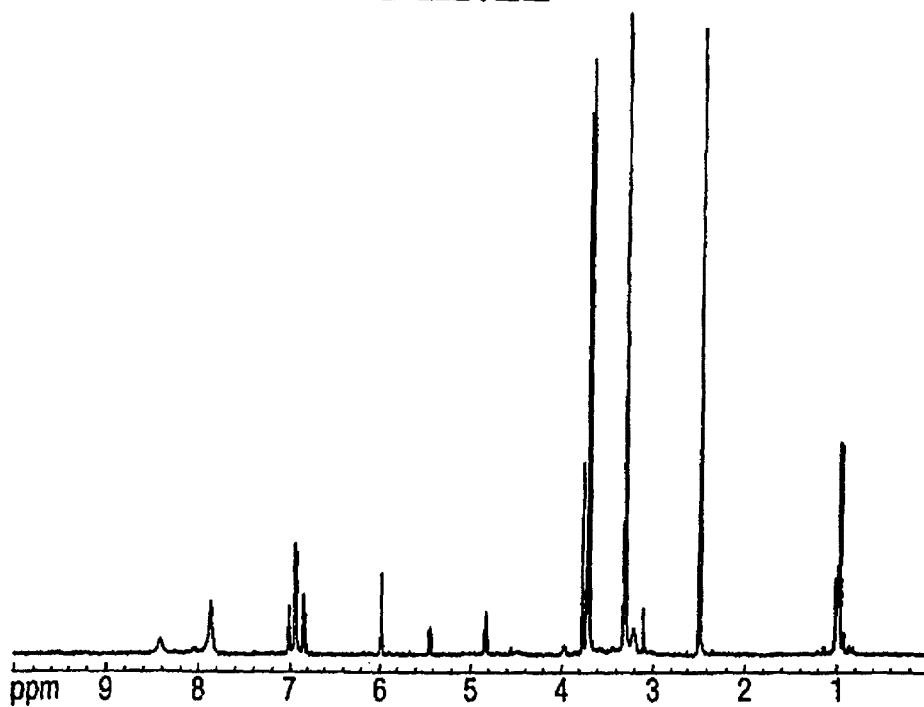
**Фиг.10**

VWD1 A, Длина волны = 225нм (Образец\0116P2-4.D)

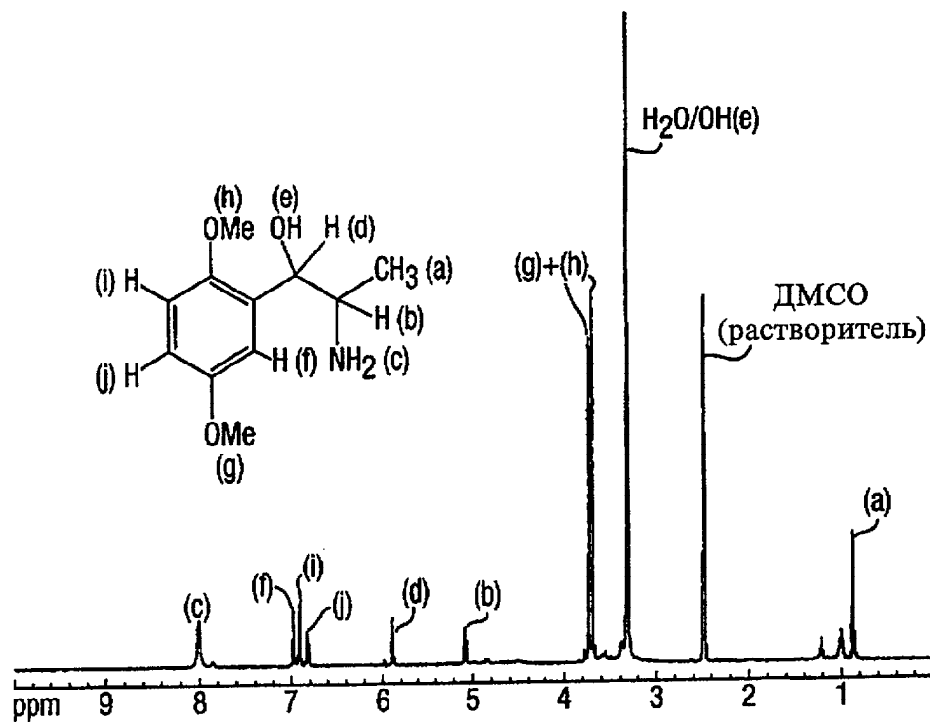
**Фиг.11**



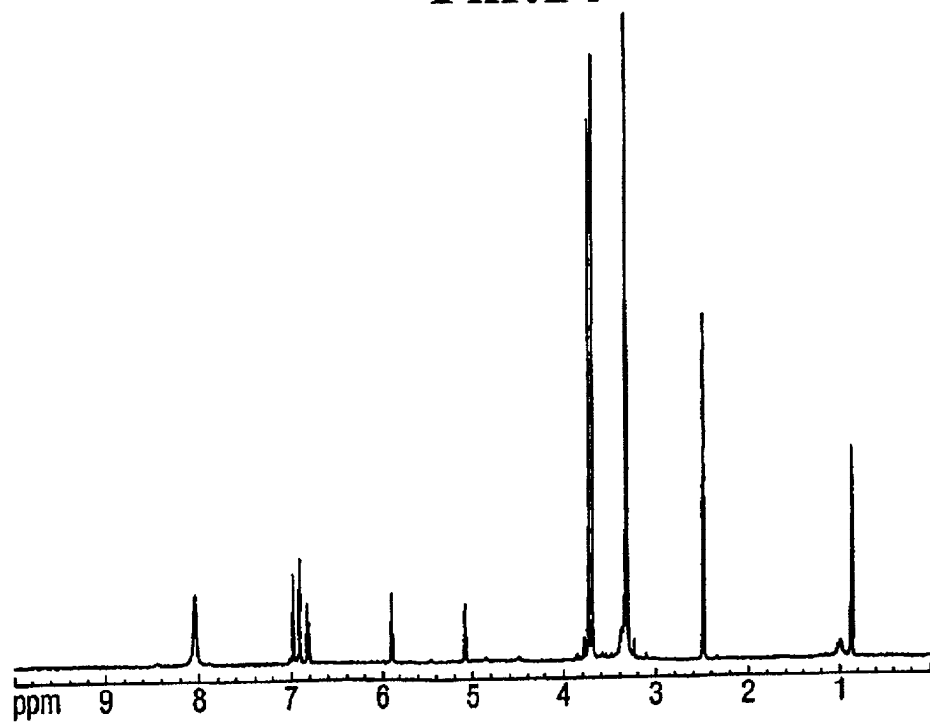
Фиг.12



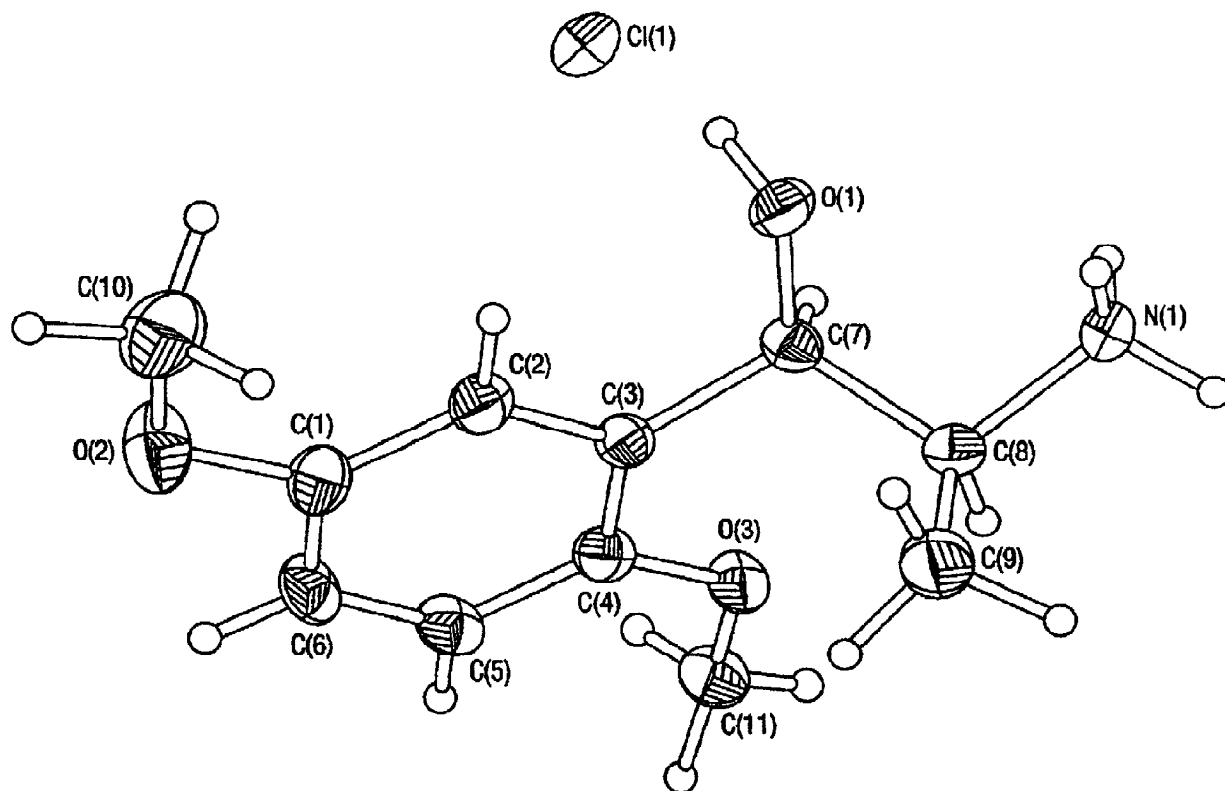
Фиг.13



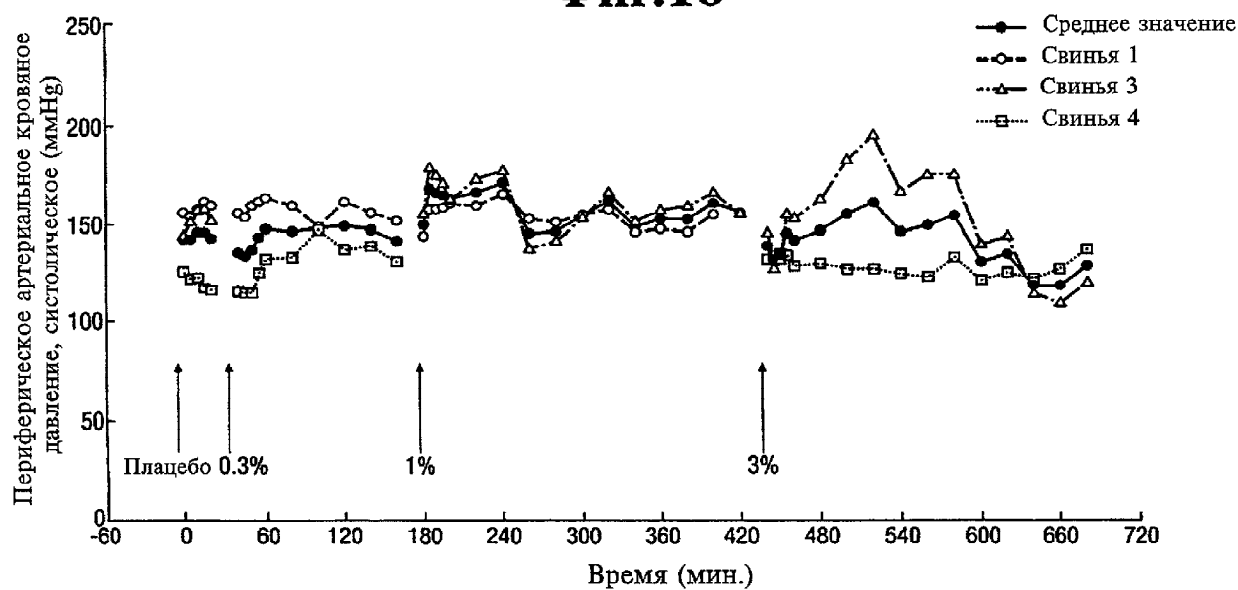
Фиг.14



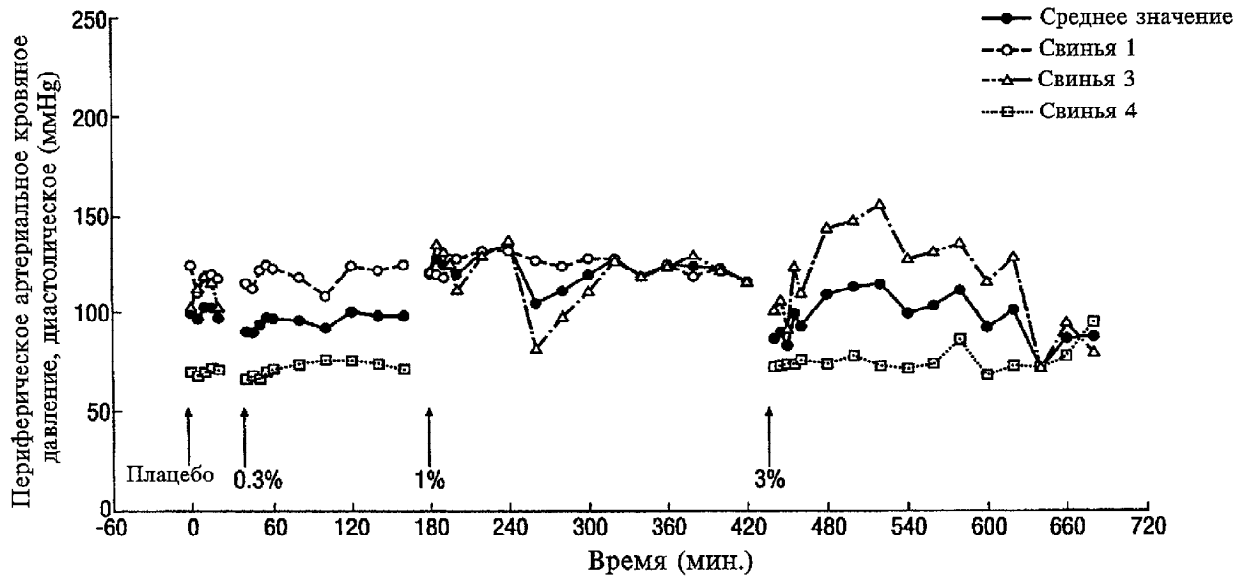
Фиг.15



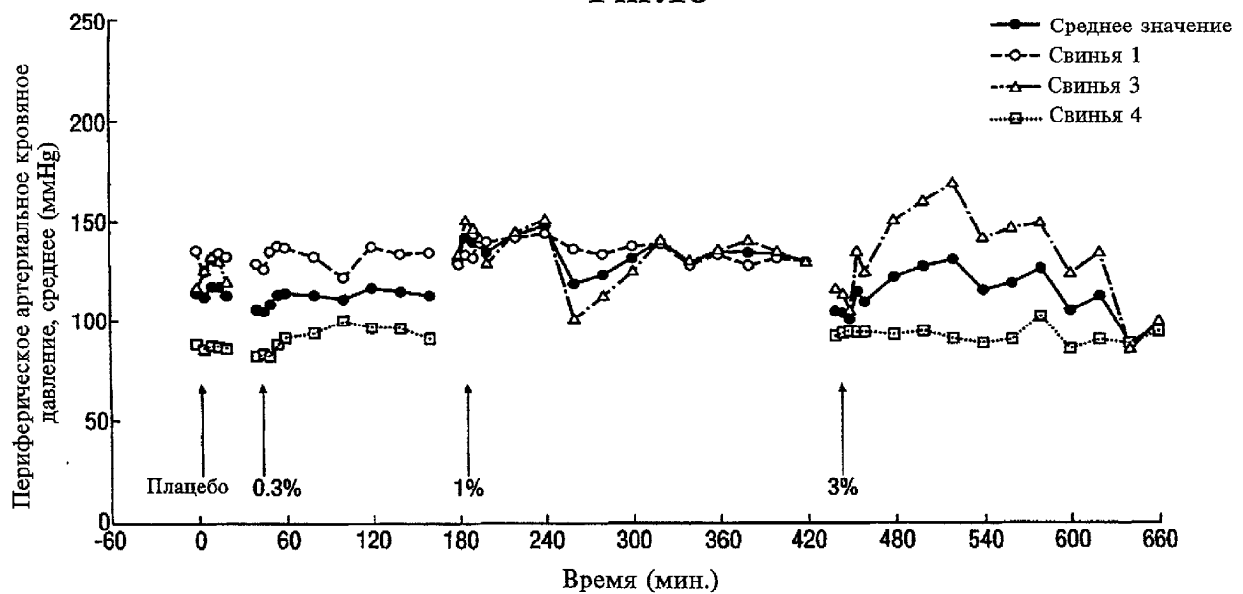
Фиг.16



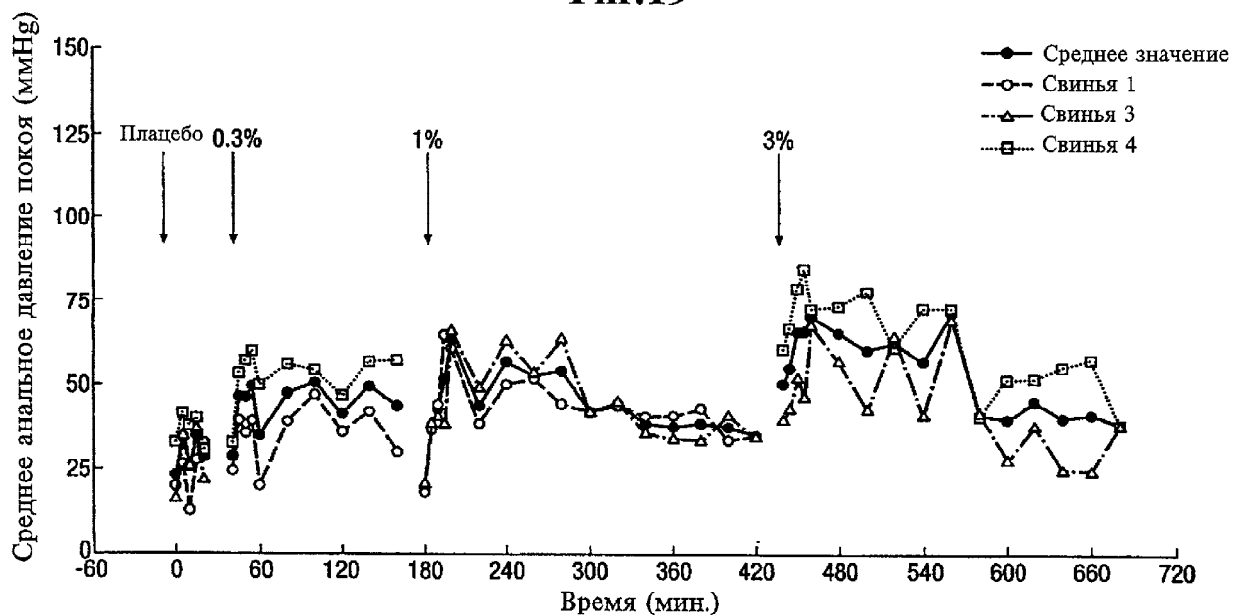
Фиг.17



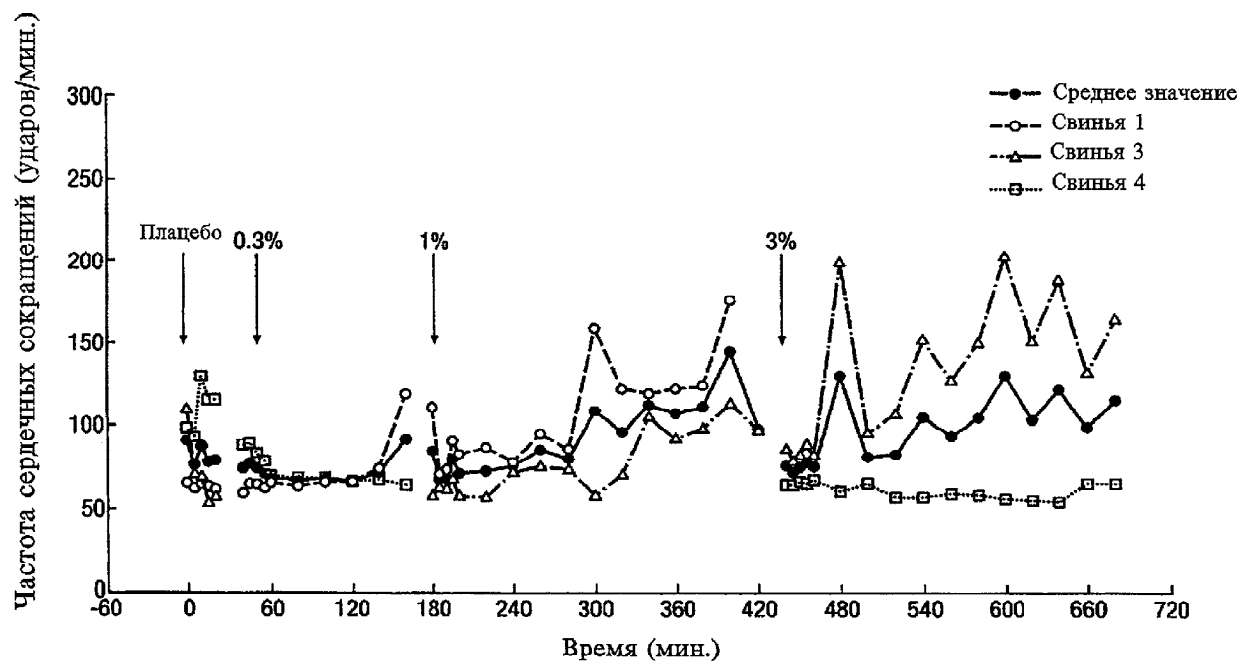
Фиг.18



Фиг.19



Фиг.20



Фиг.21