

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036830**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.24

(21) Номер заявки
201690480

(22) Дата подачи заявки
2014.07.25

(51) Int. Cl. **C07D 207/22** (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
A61P 5/10 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРРОЛИДИНА В КАЧЕСТВЕ АНТАГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ ОКСИТОЦИНА/ВАЗОПРЕССИНА V1a ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНА У ПАЦИЕНТОВ, КОТОРЫЕ ПОДВЕРГАЮТСЯ ПРОЦЕДУРЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

(31) **13183723.9**

(32) **2013.09.10**

(33) **EP**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/EP2014/066075**

(87) **WO 2015/036160 2015.03.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОБСЕВА С.А. (CH)

(72) Изобретатель:
Шолле Андрэ (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A1-2004005249**
WO-A2-2005082848

(57) Изобретение относится к соединению, которое представляет собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он и/или активный метаболит указанного соединения, обладающему антагонистическим действием на рецептор окситоцина и/или рецептор вазопрессина V1a, для применения при лечении пациентов, которые подвергаются процедурам вспомогательной репродукции. В частности, изобретение относится к применению соединения, которое представляет собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он и/или активный метаболит указанного соединения для предотвращения неудачной имплантации эмбриона и улучшения результатов переноса эмбрионов у пациентов, которые подвергаются процедуре переноса эмбриона, такой как процедура экстракорпорального оплодотворения - переноса эмбрионов (IVF-ET).

B1**036830****036830****B1**

Область техники

Изобретение относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения, обладающему антагонистическим действием на рецептор окситоцина и/или рецептор вазопрессина V1a, для применения при лечении пациентов, которые подвергаются процедурам вспомогательной репродукции, таким как экстракорпоральное оплодотворение - перенос эмбрионов.

Уровень техники

Окситоцин (ОТ) представляет собой циклический нонапептид, который опосредует физиологическое действие посредством активации рецептора окситоцина (ОТ-R), рецептора клеточной мембраны, принадлежащего к классу рецепторов, сопряженных с G-белком, который аналогичен рецепторам аргинин-вазопрессина. Одна из важных функций окситоцина (ОТ) состоит в том, чтобы вызывать сокращение матки млекопитающих во время родов. Повторяющиеся, согласованные и регулярные сокращения матки вызывают раскрытие шейки матки, разрыв плодных оболочек и приводят к выходу плода. Преждевременные роды происходят в случае, когда указанные сокращения возникают до истечения нормального срока беременности. Преждевременное повышение активности матки представляет собой наиболее распространенное проявление преждевременных родов.

Преждевременные роды приводят к нежелательному преждевременному рождению, серьезной проблеме в области здравоохранения, которая остается основной причиной перинатальной смертности и тяжелых заболеваний, в частности, респираторного дистресс-синдрома, внутрижелудочкового кровоизлияния, бронхопульмональной дисплазии и некротизирующих энтероколитов, которые гораздо чаще встречаются у недоношенных детей, чем у детей, родившихся в срок. Долговременные нарушения, такие как церебральный паралич, нарушение зрения и нарушение слуха, также чаще встречаются у недоношенных детей. В настоящее время преждевременное рождение остается основной причиной младенческой смертности и заболеваемости в промышленно развитых странах, где несмотря на значительные улучшения акушерской медицины обуславливает высокие затраты на неонатальную интенсивную терапию недоношенных детей. Фактические затраты для общества являются еще более высокими с учетом предоставления медицинских услуг при заболеваниях, связанных с преждевременным рождением детей, таких как респираторный дистресс-синдром, сердечные патологии, церебральный паралич, эпилепсия и серьезные нарушения способности к обучению. Ведение преждевременных родов представляет собой серьезную проблему в области акушерства.

Система ОТ/ОТ-R играет жизненно важную роль в инициации процесса родов у млекопитающих, в частности у людей. Плотность ОТ-R в миометрии заметно увеличивается перед началом и во время родов. Кроме того, считается, что местная концентрация ОТ пептидного гормона у человека заметно увеличивается перед родами. Высокие циркулирующие концентрации прогестерона вызывают неподвижность матки, при этом матка приобретает сократительную способность. Незадолго до наступления срока родов концентрация прогестерона в плазме падает, экспрессия ОТ-R в матке заметно возрастает, ОТ высвобождается, и сократительная активность матки повышается. В срок схватки достигают пика, что приводит к родоразрешению вследствие двух воздействующих друг на друга петель положительной обратной связи. Первая из них представляет собой местную маточную петлю: внутри самой матки под действием ОТ и сокращений матки вырабатываются и высвобождаются сократительные простагландины. Указанные простагландины могут играть дополнительную роль в созревании шейки матки и ослабление прочности плодных оболочек. Вторая петля включает гипоталамус: в ответ на сокращения матки и растяжение влагалища и шейки матки крупноклеточные нейроны в гипоталамусе, вырабатывающие окситоцин, увеличивают активность, что приводит к высвобождению ОТ из терминалей аксонов указанных нейронов в нейрогипофизе. Высвобожденный ОТ действует на матку, как стимулируя дальнейшую выработку простагландинов, так и способствуя дальнейшим сокращениям матки.

Таким образом, блокирование действия ОТ посредством обеспечения антагонистического действия на ОТ-R может представлять собой привлекательный метод лечения заболеваний, связанных с активностью ОТ-R, в частности преждевременных родов.

Токолитические, то есть расслабляющие мускулатуру матки, агенты применяли в клинических исследованиях для фармацевтического лечения преждевременных родов. Большинство указанных агентов используют без подтвержденных показаний к применению. Они продемонстрировали очень ограниченную эффективность, при наличии таковой, в отношении продления срока беременности и без явного свидетельства улучшения неонатального исхода. Современные токолитические средства очень часто связаны с нежелательным неблагоприятным воздействием на женщин, плод или новорожденного. Такие токолитические средства включают агонисты бета-2 адренергических рецепторов, ингибиторы синтеза простагландинов, сульфат магния, источники азотной кислоты и блокаторы кальциевых каналов. Агонисты бета-2 адренергических рецепторов, такие как ритодрин или тербуталин, вызывают ряд сердечно-сосудистых и метаболических побочных эффектов, включая материнскую тахикардию, учащенное сердцебиение, гипотензию, измененную функцию щитовидной железы, а также гипогликемию, тахикардию плода и новорожденного. Ритодрин уже не является одобренным FDA (Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов). Блокатор кальциевых каналов нифедипин также

представляет собой лекарственное средство, которое применяют, чтобы попытаться остановить схватки. Некоторые из побочных эффектов, которые могут возникнуть, включают покраснение лица, головную боль, тошноту, учащённое сердцебиение и головокружение. Также был применён ингибитор полного синтеза простагландинов (НПВС) индометацин. Указанное лекарственное средство также может вызывать серьёзные последствия для плода: сужение артериального протока, лёгочную гипертензию, снижение функции почек с олигогидрамнионом, внутрижелудочковое кровоизлияние, гипербилирубинемия, некротизирующий энтероколит. Побочные эффекты у матери включают дискомфорт в животе, тошноту, рвоту, депрессию и приступы головокружения у матери. Другим НПВС является сулиндак, который имеет профиль побочных эффектов, аналогичный профилю индометацина. В случае сульфата магния метаанализы не смогли подтвердить, что указанное соединение является токолитическим средством. У женщин отмечались серьёзные побочные эффекты, такие как покраснение лица, летаргия, головная боль, мышечная слабость, отёк лёгких и остановка сердца. У новорождённого, который был подвергнут воздействию сульфата магния, могут обнаруживаться летаргия, гипотония, угнетение дыхания, проблемы с костями, остеопения и переломы. В настоящее время FDA не рекомендует специалистам в области здравоохранения применение инъекций сульфата магния в течение периода времени более 5-7 суток для остановки преждевременных родов у женщин.

Атозибан, двойной антагонист рецептора вазопрессина V1a и OT-R, продаётся в ЕС и применяется для остановки схваток и задержки преждевременных родов на несколько дней. Атозибан представляет собой пептид, который не является перорально биодоступным и должен вводиться парентерально. Указанное соединение быстро разлагается в кровотоке с помощью ферментов, и его применение ограничено максимум 48 ч.

Кроме того, были разработаны непептидные антагонисты OT-R, такие как производные пирролидина (WO 01/72705, WO 02/102799, WO 2002/074741, WO 2004/005249) в виде смесей изомеров.

Таким образом, сохраняется значительная нереализованная потребность в эффективном и перорально селективном антагонисте OT-R для лечения заболеваний, связанных с активностью OT-R, в частности преждевременных родов.

Краткое описание изобретения

В соответствии с изобретением предложено соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения для лечения и/или предотвращения нарушений, связанных с активностью рецептора окситоцина и/или активностью рецептора вазопрессина V1a.

В соответствии с изобретением также предложен способ получения и выделения соединения формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активного метаболита указанного соединения в, по существу, чистой форме.

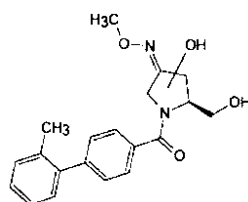
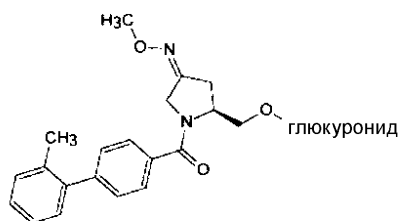
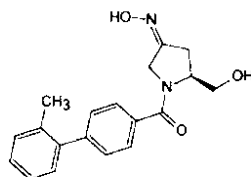
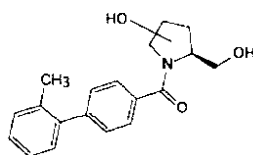
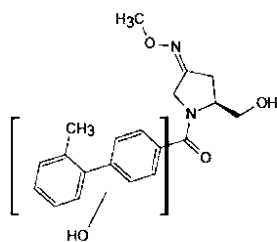
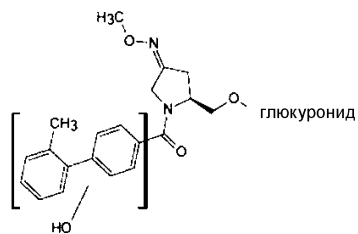
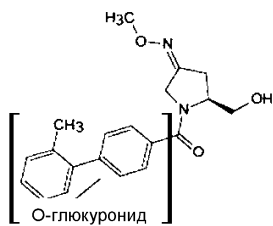
Подробное описание изобретения

Изобретение относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения, при этом указанное соединение имеет Z-изомерную конфигурацию О-метилоксимной функциональной группы.

Соединение формулы О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она отличается от соединений согласно настоящему изобретению О-метилоксимной функциональной группой, имеющей E-изомерную конфигурацию.

В настоящей заявке термин "активный метаболит указанного соединения" относится к продукту, полученному в результате метаболизма указанного соединения в организме или *in vitro*, в рассматриваемом случае О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, который обладает такой же биологической активностью, как и О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Активные метаболиты О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она могут быть обнаружены с применением стандартных методов, известных в данной области, и их активность можно определить с применением испытаний, таких как испытания, описанные в настоящей заявке. Такие метаболиты могут образовываться, например, в результате окисления, глюкуронидации или другой конъюгации, гидролиза, восстановления и т.п. введённой Z-формы. Соответственно, настоящее изобретение включает активные метаболиты О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, включая соединения, полученные посредством способа, включающего приведение соединения согласно настоящему изобретению в контакт с млекопитающим в течение периода времени, достаточного для получения метаболического продукта указанного соединения. Такой метаболит также можно получить *in vitro* посредством окисления, восстановления, гидролиза, глюкуронидации или другого конъюгационного превращения соответствующего О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она. Примеры активных метаболитов О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она включают соединения, структуры которых представлены ниже:



Соединение, которое при введении пациенту способно превращаться в соединение, представляющее собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, и/или активный метаболит указанного соединения, описанный выше, известен как "про-

лекарство". Пролекарство, например, может превращаться в организме, например, посредством гидролиза в крови, в его активную форму, которая обладает лечебным эффектом. Фармацевтически приемлемые пролекарства описаны в T. Higuchi и V. Stella, *Prodrugs as Novel Delivery Systems*, том 14 A.C.S. Symposium Series (1976); "Design of Prodrugs", ред. H. Bundgaard, Elsevier, 1985 и в Edward B. Roche, ред., *Bio-reversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association и Pergamon Press, 1987, которые включены в настоящее описание посредством ссылок.

Соединение согласно настоящему изобретению получают такими способами, как способы, предложенные, например, в WO 2004/005249 и WO 2005/082848. Однако указанное соединение синтезируют и получают в виде смеси изомеров, представляющей собой О-метилоксим (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, содержащей О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения, содержащему по меньшей мере от 85 до 100% соединения формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или метаболита указанного соединения, предпочтительно от 85 до 99,9%, более предпочтительно от 90 до 99,9% и ещё более предпочтительно от 95 до 99,9% указанного соединения.

В качестве альтернативы, настоящее изобретение относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения, полученному в, по существу, чистой форме.

В настоящей заявке термин "по существу, чистый" относится к соединению, полученному в форме, которая, по существу, не содержит других соединений. Примеры указанных "других соединений" включают О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он, оксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, (3R,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-3-метоксиаминопирролидин, (3S,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-3-метоксиаминопирролидин, О-метилоксим (3Z,5S)-5-(О-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и О-метилоксим (3E,5S)-5-(О-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Наиболее предпочтительно соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения, по существу, не содержит соединения формулы О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Ещё более предпочтительно чистота соединения формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активного метаболита указанного соединения в, по существу, чистой форме составляет по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,2%, по меньшей мере 99,3%, по меньшей мере 99,4%, по меньшей мере 99,5%, по меньшей мере 99,6%, по меньшей мере 99,7%, по меньшей мере 99,8%, по меньшей мере 99,9% или по меньшей мере 100%, и, следовательно, указанная форма, по существу, не содержит соединения формулы О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, т.е. указанное соединение составляет менее 45%, менее 35%, менее 25%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 3%, более предпочтительно менее 2%, ещё более предпочтительно менее 1%.

Ещё более предпочтительно чистота соединения формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активного метаболита указанного соединения в, по существу, чистой форме находится по меньшей мере в диапазоне от 85 до 100%, предпочтительно от 85 до 99,9%, более предпочтительно от 90 до 99,9% и ещё более предпочтительно в диапазоне от 95 до 99,9%.

В зависимости от используемой номенклатуры соединение согласно настоящему изобретению "О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она" также можно определить как "О-метилоксим (4Z,2S)-2-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-4-она".

В целом, соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения представляет собой антагонист рецептора окситоцина.

В настоящей заявке термин "антагонист рецептора окситоцина" относится к соединению, которое действует посредством ингибирования (частично или полностью) или блокирования рецептора окситоцина (OT-R), тем самым предотвращая активацию рецептора окситоцином.

В настоящем изобретении предложено соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного

го соединения, при этом указанное соединение представляет собой частичный или полный антагонист рецептора окситоцина, и при этом константа ингибирования K_i составляет менее чем примерно 1 мкМ. Предпочтительно указанная константа ингибирования K_i составляет менее чем примерно 0,1 мкМ, более предпочтительно менее чем примерно 0,06 мкМ.

В настоящем изобретении также предложено соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения, при этом указанное соединение представляет собой антагонист рецептора окситоцина, и при этом концентрация полумаксимального ингибирования IC_{50} составляет менее чем примерно 1 мкМ. Предпочтительно указанная концентрация IC_{50} составляет менее чем примерно 0,1 мкМ, более предпочтительно менее чем примерно 0,09 мкМ.

Также в целом, соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения представляет собой антагонист рецептора вазопрессина V1a.

В настоящей заявке термин "антагонист рецептора вазопрессина V1a" относится к соединению, которое действует посредством ингибирования (частично или полностью) или блокирования рецептора вазопрессина V1 (также известного как рецептор аргинин-вазопрессина 1A), тем самым предотвращая активацию рецептора вазопрессином. Рецептор вазопрессина V1a является одним из трёх основных типов рецепторов для пептидного гормона аргинин-вазопрессина, остальными являются рецепторы V1b и V2.

Предпочтительно соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения представляет собой антагонист рецептора вазопрессина V1a, при этом константа ингибирования K_i составляет менее чем примерно 1 мкМ. Наиболее предпочтительно указанная константа ингибирования K_i составляет менее чем примерно 0,5 мкМ, ещё более предпочтительно менее чем примерно 0,15 мкМ.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения, который представляет собой антагонист рецептора окситоцина и антагонист рецептора вазопрессина V1a.

Как правило, соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения подавляет сокращения матки. Предпочтительно указанное соединение подавляет сокращения матки быстро, в промежутки времени 2-30, предпочтительно 5-20 мин после введения.

Заявители неожиданно обнаружили, что ингибирующая активность является специфической для, по существу, чистой Z-формы формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или метаболита указанного соединения. Как показано в примерах, по существу, чистая E-форма формулы О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она не проявляет эффективности, поскольку указанное соединение не подавляет сокращений матки.

Схему дозирования соединения согласно настоящему изобретению и/или активного метаболита указанного соединения выбирают в соответствии с различными факторами, включая тип, вид, возраст, вес, пол и состояние здоровья пациента; тяжесть патологического состояния, подлежащего лечению; способ введения; функцию почек и печени пациента и конкретное применяемое соединение или активный метаболит указанного соединения. Врач средней квалификации может легко определить и назначить эффективное количество лекарственного средства, требуемого для предотвращения, противодействия или прекращения развития патологического состояния.

Предпочтительно соединение согласно настоящему изобретению и/или активный метаболит указанного соединения можно вводить в виде однократной дозы, или общую дозу можно вводить в виде разделённых доз два, три или четыре раза в сутки.

Предпочтительно в соответствии с настоящим изобретением предложено соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения, при этом указанное соединение вводят субъекту в виде однократной дозы от 50 до 900 мг, более предпочтительно в виде однократной дозы от 100 до 600 мг.

Хотя соединение согласно настоящему изобретению и/или активный метаболит указанного соединения можно применять в качестве единственного активного ингредиента лекарственного средства, также возможно применение указанного соединения в комбинации по меньшей мере с одним или более дополнительными активными соединениями. Такие дополнительные активные соединения могут представлять собой дополнительные соединения согласно настоящему изобретению или другие активные соединения, выбранные из группы, включающей блокаторы кальциевых каналов, сульфат магния, селективные модуляторы простагландинов, агонисты бета-2-адренергических рецепторов, агонисты бета-3-адренергических рецепторов и/или кортикостероиды.

В качестве альтернативы, соединение согласно настоящему изобретению и/или активный метаболит указанного соединения можно вводить совместно или отдельно по меньшей мере с одним соединением, выбранным из группы, включающей блокаторы кальциевых каналов (такие как нифедипин), суль-

фат магния, модуляторы рецепторов простагландинов (такие как агонисты или антагонисты рецептора EP1, или EP2, или EP3, или EP4, или FP), ингибиторы синтеза простагландинов (такие как индометацин, нимесулид, сулиндак, рофекоксиб, целекоксиб), агонисты бета-2-адренергических рецепторов (такие как ритодрин, тербуталин, салбутамол), агонисты бета-3-адренергических рецепторов, источники азотной кислоты (такие как тринитрат глицерина) и/или кортикостероиды (такие как дексаметазон, бетаметазон).

В настоящей заявке термин "совместно" относится к введению соединения формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активного метаболита указанного соединения, за которым далее сразу же следует введение по меньшей мере одного соединения, выбранного из группы, предложенной выше.

В настоящей заявке термин "раздельно (охватывающий последовательное или последующее введение)" относится к введению соединения формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активного метаболита указанного соединения с последующим периодом перерыва, за которым далее следует введение по меньшей мере одного соединения, предложенного выше.

В целом, соединение согласно настоящему изобретению является стабильным в плазме. В настоящей заявке термин "стабильный" относится к присутствию соединения формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активного метаболита указанного соединения в плазме субъекта после введения, и при этом изомерное взаимопревращение указанных соединений, по существу, не допускается.

В целом, в настоящем изобретении субъект, нуждающийся в нём, предпочтительно представляет собой млекопитающее, наиболее предпочтительно человека, более предпочтительно женщину и наиболее предпочтительно женщину детородного возраста.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения для применения в качестве лекарственного средства, например, для применения для лечения и/или предотвращения нарушений, связанных с активностью рецептора окситоцина и/или активностью рецептора вазопрессина V1a, в частности, для лечения и/или предотвращения неудачной имплантации эмбриона вследствие сокращений матки и бесплодия.

Технологии вспомогательной репродукции (искусственного оплодотворения) представляют собой методы, применяемые в отношении людей для лечения бесплодия и в отношении животных для получения беременностей. Бесплодие, которое затрагивает примерно 10% человеческих пар в мире, можно лечить посредством экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбриона (ЭКО-ПЭ) или в менее сложных случаях посредством искусственной инсеминации. В целом, успех переноса эмбриона зависит от рецептивности матки, свойства, которое определяется как способность матки обеспечивать оптимальные условия для надлежащей имплантации и развития эмбриона. Основными составляющими рецептивности матки являются сократительная активность матки и состояние эндометрия.

Сокращения матки, возникающие в процессе переноса эмбрионов, могут выталкивать эмбрионы из матки во влагалище или фаллопиевы трубы, что может служить причиной безуспешного лечения или, в другом случае, причиной внематочной беременности, серьёзного, потенциально опасного для жизни осложнения.

В целом, настоящее изобретение относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения для применения в технологии вспомогательной репродукции.

Например, настоящее изобретение относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения для применения для лечения бесплодия посредством метода, представляющего собой экстракорпоральное оплодотворение с переносом эмбриона (ЭКО-ПЭ).

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активному метаболиту указанного соединения для применения для снижения возможности неудачи имплантации эмбриона вследствие сокращений матки.

В настоящем изобретении также предусмотрено соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения для применения для снижения сокращений, возникающих в процессе переноса эмбриона.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В настоящей заявке "фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество" представляет собой среду, обычно применяемую в данной области для доставки биологически активных агентов пациентам. Специалисту в данной области известен целый ряд таких носителей, разба-

вителей или вспомогательных веществ, подходящих для приготовления фармацевтической композиции (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Mack Publishing Company, 1990, стр. 1289-1329). Носитель(и), разбавитель(и) или вспомогательное(ые) вещество(а) должно быть совместимым с другими ингредиентами состава, способным обеспечивать фармацевтический состав и безвредным для потребителя.

Соединение согласно настоящему изобретению и/или активный метаболит указанного соединения совместно с традиционно применяемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом можно приготовить в виде фармацевтических композиций и их единичных доз и в такой форме можно применять в виде твёрдых лекарственных форм, таких как таблетки или заполненные капсулы, или жидких лекарственных форм, таких как растворы, суспензии, эмульсии, эликсиры или капсулы, заполненные тем же самым, все для перорального применения, или в форме стерильных растворов для инъекций для парентерального (включая подкожное) применения. Такие фармацевтические композиции и единичные лекарственные формы указанных композиций могут содержать ингредиенты в традиционных пропорциях с или без дополнительных активных соединений или действующих начал, и такие единичные лекарственные формы могут содержать любое подходящее эффективное количество активного ингредиента, то есть соединения согласно настоящему изобретению, соразмерное диапазону суточных доз, предназначенному для применения.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить различными способами, включая пероральный, ректальный, вагинальный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный и интраназальный. В зависимости от предполагаемого способа доставки соединения предпочтительно готовят в виде или инъекционных, или пероральных композиций. Композиции для перорального введения могут иметь форму нерасфасованных жидких растворов или суспензий или нерасфасованных порошков. Однако чаще композиции представляют в единичных лекарственных формах для облегчения точного дозирования. Термин "единичные лекарственные формы" относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных доз для людей и других млекопитающих, при этом каждая единица содержит предварительно определённое количество активного вещества, рассчитанное на получение требуемого терапевтического эффекта, совместно с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом. Типичные единичные лекарственные формы включают предварительно заполненные, предварительно отмеренные ампулы или шприцы с жидкими композициями или пилюли, таблетки, капсулы и т.п. в случае твёрдых композиций. В таких композициях соединение согласно настоящему изобретению обычно представляет собой минорный компонент (от примерно 0,1 до примерно 50% по массе или предпочтительно от примерно 1 до примерно 40% по массе), при этом остальная часть представляет собой различные основы или носители и технологические добавки, способствующие образованию требуемой лекарственной формы.

Предпочтительно фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или активный метаболит указанного соединения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, вводят пероральным, вагинальным или внутривенным способом.

Жидкие лекарственные формы, подходящие для перорального введения, могут содержать подходящую водную или неводную основу с буферами, суспендирующими и диспергирующими агентами, красителями, ароматизаторами и т.п. Твёрдые лекарственные формы могут содержать, например, любой из следующих ингредиентов или любое из соединений аналогичной природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза, вещество для улучшения распадаемости, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния; вещество, обеспечивающее скольжение, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизирующий агент, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

Инъекционные композиции обычно основаны на инъекционном стерильном солевом растворе, или фосфатно-солевом буферном растворе, или других носителях для инъекционной лекарственной формы, известных в данной области.

Соединения согласно настоящему изобретению также можно вводить в формах с замедленным высвобождением или в составе систем доставки лекарственных средств с замедленным высвобождением. Описание типичных веществ с замедленным высвобождением также можно найти в Gennaro A.R. с соавт., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Easton: The Mack Publishing Company, 1995.

Примеры

Пример 1. Очистка О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

1.1. Синтез О-метилоксим (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

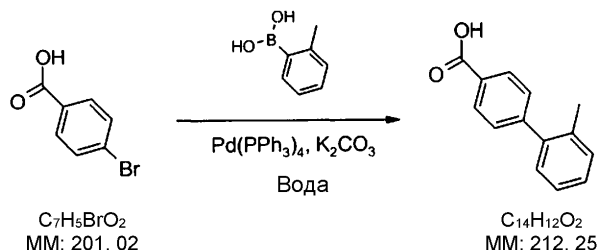
Настоящее изобретение относится к синтезу и очистке О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, полученного в виде неочищенной смеси

изомеров, содержащей О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Пути синтеза соединений согласно настоящему изобретению представляют собой, например, пути синтеза, описанные в WO 2004005249 и WO 2005082848.

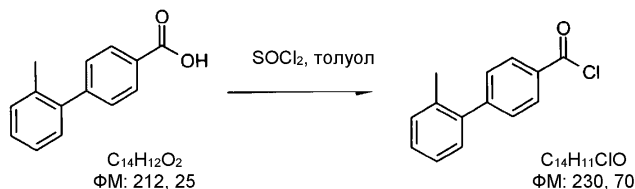
Например, соединение согласно настоящему изобретению О-метилоксим (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она также можно получить согласно этапам 1-7, описанным ниже.

Этап 1. Получение 4-(2-метилфенил)бензойной кислоты



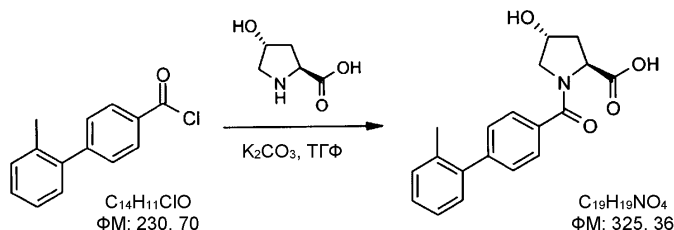
Раствор карбоната калия (0,908 кг, 6,57 моль, 2,06 мас.) в воде (2,20 л, 5,0 об.) загружали к взвеси 4-бромбензойной кислоты (0,441 кг, 2,19 моль, 1,0 мас.) в воде (4,41 л, 15,0 об.) при температуре от 15 до 25°C. Полученную взвесь перемешивали при температуре от 15 до 25°C и дегазировали три раза с применением цикла продувки вакуум-азот. Затем загружали тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0) (0,022 кг, 0,019 моль, 0,05 мас.) и повторяли цикл продувки вакуум-азот. Раствор о-толилборной кислоты (0,313 кг, 2,30 моль, 0,707 мас.) в метаноле (3,53 л, 8,0 об.) дегазировали три раза с применением цикла продувки вакуум-азот, а затем загружали к взвеси 4-бромбензойной кислоты при температуре от 15 до 25°C. Реакционную смесь нагревали до температуры кипения (от 71 до 78°C) и выдерживали при кипячении с обратным холодильником до завершения реакции (реакция считается завершённой при степени превращения 95%), определённого посредством ¹H ЯМР-анализа (d₆-DMCO), обычно в течение периода от 1,5 до 2,5 ч. Реакционную смесь концентрировали в вакууме до 15 об. при температуре от 40 до 45°C. К остатку добавляли толуол (4,41 л, 10,0 об.) и тетрагидрофуран (4,41 л, 10,0 об.), полученную смесь энергично перемешивали и подкисляли до pH 1 с применением соляной кислоты (6М, 2,00 л, 4,5 об.). Содержимое энергично перемешивали в течение периода от 30 до 60 мин и разделяли слои. К водной фазе добавляли толуол (2,20 л, 5,0 об.) и тетрагидрофуран (2,20 л, 5,0 об.) и смесь перемешивали в течение периода от 5 до 10 мин. Слои разделяли, объединённые органические фазы фильтровали и концентрировали в вакууме до 10,0 об. при температуре от 35 до 40°C. К остатку добавляли толуол (4,41 л, 10,0 об.) и полученную смесь концентрировали в вакууме при температуре от 35 до 40°C. Содержание тетрагидрофурана в полученной взвеси определяли посредством ¹H ЯМР-анализа (d₆-DMCO) (пороговый уровень: ≤1,0 мас./мас.%, тетрагидрофурана относительно толуола). Взвесь охлаждали до температуры от 0 до 5°C и выдерживали при указанной температуре в течение периода от 30 до 60 мин, твёрдое вещество собирали посредством фильтрования и отфильтрованный осадок промывали толуолом (2,20 л, 5,0 об.). Твёрдое вещество сушили в вакуумной печи при температуре от 35 до 40°C с получением 4-(2-метилфенил)бензойной кислоты [0,438 кг, 94,1%-ный, 99,3 мас./мас.%, ¹H ЯМР (d₆-DMCO) соответствует структуре] в виде бледно-жёлтого твёрдого вещества.

Этап 2. Получение хлоридангидрида 4-(2-метилфенил)бензойной кислоты



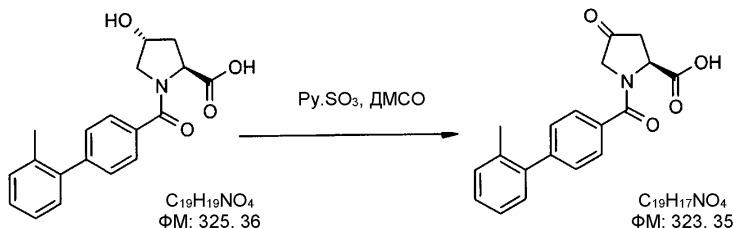
К взвеси 4-(2-метилфенил)бензойной кислоты (0,435 кг, 2,05 моль, 1,0 мас.) в толуоле (4,35 л, 10,0 об.) добавляли тионилхлорид (0,300 л, 4,11 моль, 0,685 об.) при температуре от 10 до 25°C, и смесь нагревали до температуры от 75 до 80°C и выдерживали при указанной температуре до завершения реакции, определённого посредством ¹H ЯМР-анализа (d₆-бензол), обычно в течение периода от 4 до 5 ч. Завершение реакции сопровождалось образованием мутного раствора. Полученную смесь концентрировали до 5,0 об. посредством удаления толуола при пониженном давлении при температуре от 35 до 45°C. К концентрату добавляли толуол (2,18 л, 5,0 об.) и смесь концентрировали до 4,0 об. посредством удаления толуола при пониженном давлении при температуре от 35 до 45°C. Полученную смесь фильтровали через бумагу на основе стеклянного микролокна и отфильтрованный осадок промывали толуолом (0,44 л, 1,0 об.). Раствор хлоридангидрида 4-(2-метилфенил)бензойной кислоты [0,439 кг, 92,8%-ный, 100,9 мас./мас.%, ¹H ЯМР (d₆-бензол) соответствует структуре] в толуоле применяли непосредственно на этапе 3.

Этап 3. Получение (4R)-4-гидрокси-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-L-пролина



Раствор карбоната калия (0,526 кг, 3,81 моль, 1,2 мас.) в воде (0,57 л, 1,3 об.) загружали к раствору 4-гидрокси-L-пролина (0,274 кг, 2,09 моль, 0,625 мас.) в тетрагидрофуране (2,20 л, 5,0 об.) и воде (0,44 л, 1,0 об.) при температуре от 15 до 25°C с последующим линейным орошением (line rinse) водой (0,44 л, 1,0 об.). Смесь охлаждали до температуры от 0 до 5°C при быстром перемешивании и при указанной температуре загружали раствор хлоридангирида 4-(2-метилфенил)бензойной кислоты (0,438 кг, 1,90 моль, 1,0 мас.) в толуоле (2,19 л, 5,0 об.) с последующим линейным орошением толуолом (0,44 л, 1,0 об.). Реакционную смесь нагревали до температуры от 15 до 25°C в течение периода от 1 до 2 ч и перемешивали при указанной температуре до завершения реакции исходя из ТСХ-анализа. К реакционной смеси загружали воду (2,20 л, 5,0 об.) при температуре от 15 до 25°C и разделяли слои. Водную фазу подкисляли до pH от 5 до 6 с применением соляной кислоты (6М, 0,66 л, 1,5 об.), а затем до pH 1 с применением соляной кислоты (2М, 0,88 л, 2,0 об.) при температуре от 15 до 25°C. Смесь охлаждали до температуры от 0 до 5°C и выдерживали при указанной температуре в течение периода от 30 до 60 мин, выпавшее в осадок твёрдое вещество собирали посредством фильтрования, отфильтрованный осадок промывали водой (2×1,75 л, 2×4,0 об.) и толуолом (0,88 л, 2,0 об.) и отделяли влагу (pulled dry) на фильтре в течение периода от 12 до 24 ч. Собранное твёрдое вещество сушили в вакууме при температуре от 40 до 45°C до тех пор, пока содержание воды, определённое по методу Карла Фишера, не составляло ≤0,2 мас./мас.%, с получением (4R)-4-гидрокси-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-L-пролина [0,599 кг, 97,0%-ный, 136,8 мас./мас.%, ¹H ЯМР (d₆-ДМСО) соответствует структуре] в виде грязно-белого твёрдого вещества.

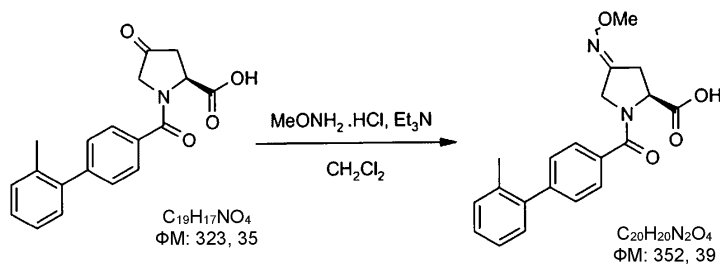
Этап 4. Получение 1-(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил-4-оксо-L-пролина



К раствору (4R)-4-гидрокси-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-L-пролина (0,598 кг, 1,84 моль, 1,0 мас.) в диметилсульфоксиде (4,42 л, 7,4 об.) загружали триэтиламин (1,80 л, 13,56 моль, 3,0 об.) при температуре от 15 до 20°C. Комплекс пиридин-триоксид серы (0,879 кг, 5,52 моль, 1,47 мас.) загружали порциями при температуре от 15 и 25°C и реакционную смесь перемешивали при указанной температуре до завершения реакции, определённого посредством ТСХ-анализа (обычно в течение периода от 1 до 3 ч). Реакцию гасили соляной кислотой (3М, 4,80 л, 8,0 об.) при температуре от 0 до 30°C, загружали тетрагидрофуран (3,00 л, 5,0 об.) и гептан (0,60 л, 1,0 об.), слои разделяли и водную фазу экстрагировали тетрагидрофураном (2×3,00 л, 2×5,0 об.). Объединённые органические фазы промывали соляной кислотой (1М, 2×1,20 л, 2×2,0 об.) и насыщенным раствором хлорида натрия (2×1,20 л, 2×2,0 об.), водные промывные жидкости объединяли и подвергали обратной экстракции тетрагидрофураном (2×0,60 л, 2×1,0 об.). Объединённые органические вещества сушили над сульфатом магния (1,794 кг, 3,0 мас.), фильтровали, отфильтрованный осадок промывали тетрагидрофураном (0,60 л, 1,0 об.) и фильтраты концентрировали в вакууме при температуре от 40 до 45°C с получением бледно-коричневой пены. К пене загружали этилацетат (6,00 л, 10,0 об.), содержимое перемешивали в течение периода от 5 до 10 мин для достижения растворения, и растворитель удаляли в вакууме при температуре от 40 до 45°C. Указанную процедуру повторяли с применением этилацетата (6,00 л, 5,0 об.) до тех пор, пока тетрагидрофуран не прекращал обнаруживаться посредством ¹H ЯМР-анализа (d₆-ДМСО). Остаток суспендировали в этилацетате (4,80 л, 8,0 об.), добавляли активированный уголь (0,084 кг, 0,14 мас.) с последующим линейным орошением этилацетатом (3,00 л, 5,0 об.), полученную смесь нагревали до температуры от 70 до 80°C и выдерживали при указанной температуре в течение периода от 20 до 30 мин, охлаждали до температуры от 40 до 55°C и фильтровали через бумагу на основе стеклянного микрофильтра. Отфильтрованный осадок промывали этилацетатом (1,50 л, 2,5 об.) и объединённые фильтраты и промывную жидкость концентрировали в вакууме до количества от 2,5 до 3,5 об. при температуре от 40 до 45°C. Кристаллизация начиналась в процессе концентрирования. Концентрат перемещали в подходящий сосуд с линейным орошением этилацетатом (0,30 л, 0,5 об.) и нагревали до температуры от 70 до 80°C. При необходимости для дости-

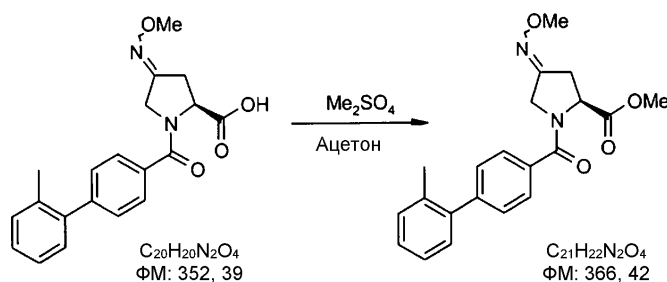
жения растворения добавляли дополнительный этилацетат (0,30 л, 0,5 об.). При температуре от 70 до 80°C добавляли гептан (1,80 л, 3,0 об.) и содержимому позволяли охлаждаться до температуры от 15 до 25°C в течение периода 1 до 2 ч. Взвесь дополнительно охлаждали до температуры от 0 до 5°C и выдерживали при указанной температуре в течение периода от 2 до 3 ч, фильтровали, и отфильтрованный осадок промывали смесью этилацетат:гептан (1:1, 0,60 л, 1,0 об.) при температуре от 0 до 5°C с последующим промыванием гептаном (3,0 л, 2,5 об.). Собранное твёрдое вещество сушили в вакууме при температуре от 40 до 45°C с получением 1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-4-оксо-L-пролина [0,444 кг, 74,7%-ный, 74,2 мас./мас.%, ^1H ЯМР (d_6 -ДМСО) соответствует структуре] в виде грязно-белого твёрдого вещества.

Этап 5. Получение (4Z/E)-4-метоксиимино-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-L-пролина



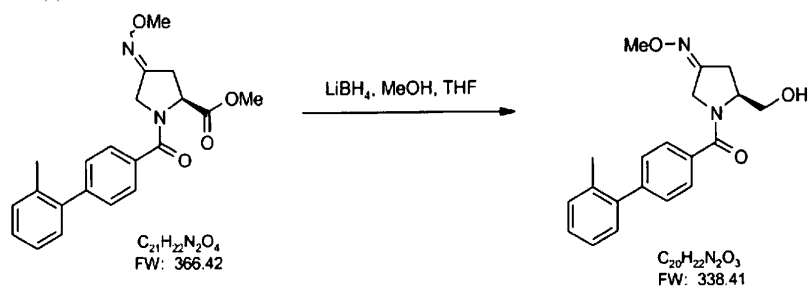
К раствору 1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-4-оксо-L-пролина (0,434 кг, 1,34 моль, 1,0 мас.) в дихлорметане (4,40 л, 10,0 об.) добавляли триэтиламин (0,40 л, 2,85 моль, 0,92 об.) при температуре от 10 до 25°C с последующим линейным орошением дихлорметаном (0,43 л, 1,0 об.). Метоксиламин гидрохлорид (0,130 кг, 1,56 моль, 0,30 мас.) добавляли порциями при температуре от 10 до 25°C с последующим линейным орошением дихлорметаном (0,43 л, 1,0 об.) и реакционную смесь перемешивали при температуре от 10 до 25°C до завершения реакции, определённого посредством ТСХ-анализа (обычно в течение периода от 3 до 5 ч, элюент для ТСХ: дихлорметан:метанол:уксусная кислота (90:10:1); УФ-визуализация). Растворитель удаляли в вакууме при температуре от 35 до 40°C, полученную смесь растворяли в этилацетате (4,40 л, 10,0 об.) и промывали соляной кислотой (1М, 2×2,20 л, 2×5,0 об.). Кислые промывные воды подвергали обратной экстракции этилацетатом (2,20 л, 5,0 об.), объединённые органические фазы промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (3,10 л, 7,0 об.), сушили над сульфатом магния (0,300 кг, 0,69 мас.), фильтровали и отфильтрованный осадок промывали этилацетатом (2,20 л, 5,0 об.). Фильтрат и промывные воды объединяли и концентрировали в вакууме при температуре от 35 до 40°C с получением 4-метоксиимино-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-L-пролина [0,476 кг, 100,6%-ный, 109,6 мас./мас.%, ^1H ЯМР (CDCl_3) соответствует структуре] в виде грязно-белого твёрдого вещества.

Этап 6. Получение (4Z/E,2S)-метил-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-4-метоксииминопирролидин-2-карбоксилата



К раствору 4-метоксиимино-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-L-пролина (0,475 кг, 1,35 моль, 1,0 мас.) в ацетоне (4,75 л, 10,0 об.) добавляли карбонат калия (0,476 кг, 3,44 моль, 1,0 мас.) и смесь охлаждали до температуры от 0 до 10°C. Диметилсульфат (0,128 л, 1,35 моль, 0,27 об.) добавляли при температуре от 0 до 15°C и смесь перемешивали при температуре от 15 до 25°C до завершения реакции, определённого посредством ТСХ-анализа, обычно в течение периода от 3 до 16 ч. Растворитель удаляли в вакууме при температуре от 40 до 45°C и полученную смесь распределяли между этилацетатом (3,80 л, 8,0 об.) и водой (3,80 л, 8,0 об.). Слои разделяли, органическую фазу промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (2,85 л, 6,0 об.), сушили над сульфатом натрия (0,953 кг, 2,0 мас.) и фильтровали. Отфильтрованный осадок промывали этилацетатом (0,48 л, 1,0 об.) и объединённые фильтрат и промывную жидкость концентрировали в вакууме при температуре от 40 до 45°C. Избыток этилацетата удаляли посредством азеотропной перегонки стетрагидрофураном (2×0,95 л, 2×2,0 об.) в вакууме при температуре от 40 до 45°C с получением (4Z/E,2S)-метил-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-4-метоксииминопирролидин-2-карбоксилата [0,492 кг, 99,6%-ный, 103,6 мас./мас.%, ^1H ЯМР (CDCl_3) соответствует структуре] в виде вязкого коричневого масла.

Этап 7. Получение О-метилоксим (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она



LiBH₄, MeOH, ТГФ

Борогидрид лития (0,049 кг, 2,26 моль, 0,1 мас.) порциями добавляли к перемешанному раствору (4Z/E,2S)-метил-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]-4-метоксииминопирролидин-2-карбоксилата (0,492 кг, 1,34 моль, 1,0 мас.) в тетрагидрофуране (2,31 л, 4,7 об.) и метаноле (2,31 л, 4,7 об.) при температуре от 0 до 30°C. Смесь перемешивали при температуре от 15 до 25°C до завершения реакции, определённого посредством ТСХ-анализа (элюент: этилацетат; визуализация: нингидрин), обычно в течение периода от 2 до 6 ч. Реакционную смесь гасили водой (0,40 л, 0,8 об.) при температуре от 15 до 25°C и перемешивали при температуре от 15 до 25°C в течение периода от 16 до 20 ч. Полученную смесь концентрировали в вакууме при температуре от 40 до 45°C и остаток распределяли между водой (2,46 л, 5,0 об.) и этилацетатом (4,92 л, 10,0 об.). Слои разделяли, органическую фазу последовательно промывали соляной кислотой (1М, 2,46 л, 5,0 об.), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (2,46 л, 5,0 об.) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (2,46 л, 5,0 об.). Органическую фазу сушили над сульфатом магния (0,985 кг, 2,0 мас.), фильтровали и отфильтрованный осадок промывали этилацетатом (0,50 л, 1,0 об.). Объединённые фильтрат и промывную жидкость концентрировали в вакууме с получением неочищенной смеси изомеров, содержавшей О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она [0,395 кг, 86,9%-ный, 80,3 мас./мас.%, ¹H ЯМР (CDCl₃) соответствует структуре; площадь пиков согласно ВЭЖХ 82,0%, отношение Z/E 71,4:28,6] в виде вязкого коричневого масла. Масло растворяли в толуоле (0,40 л, 1,0 об. относительно массы продукта) и хранили до тех пор, пока оно не потребовалось.

1.2. Флэш-хроматография на сухой колонке неочищенного О-метилоксима (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Очистку посредством флэш-хроматографии на сухой колонке неочищенной смеси изомеров, полученной согласно протоколу, описанному выше, пытались проводить с применением различных условий элюирования. Неочищенную смесь О-метилоксима (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, концентрированную досуха, повторно растворяли в 2 объёмах толуола и наносили на слой SiO₂ (5 мас.) перед элюированием с применением фракций элюента в количестве 25 объёмов. Фракции 1-5: элюированные чистым толуолом Фракции 6-10: элюированные толуолом/MeOH 1% об./об. Фракции 10-15: элюированные толуолом/MeOH 2% об./об.

Схематический ТСХ-профиль собранных фракций

Неочищенная смесь	○	⊗	⊗	○	○
Фракции 1-7	+			○	○
Фракции 8-13	+	○	⊗	⊗	○
Фракции 14-15	+	○	○		
	Rf=0		Rf=1		

Z- и E-формы представлены заштрихованными пятнами. Фракции 8-13 объединяли и концентрировали досуха. Результаты свидетельствуют о 75% выделении. Не происходило улучшения отношения E/Z. Было отмечено незначительное повышение чистоты смеси изомеров (E+Z) по площади пиков, составлявшее примерно 4%, до и после флэш-хроматографии на сухой колонке (табл. I).

Таблица I. Сравнительный профиль примесей до и после флэш-хроматографии на сухой колонке

	площадь пиков, %			
	Примесь при ОВУ 0,7	E+Z-изомеры	Примесь при ОВУ 1,08	ОВУ 1,12 (Ar-Ar-CH ₂ OH)
До флэш-хроматографии на сухой колонке	4,6	91,3	<0,5	4,1

После флэш-хроматографии на сухой колонке	2,5	95,6	<0,5	0,7
---	-----	------	------	-----

ОВУ: относительное время удерживания.

Флэш-хроматография на сухой колонке неочищенной смеси изомеров не обеспечивают очистку О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она. Отношение E/Z до и после флэш-хроматографии на сухой колонке остаётся в диапазоне от 30/70 до 40/60.

Кроме того, следует рассматривать возможность осуществления такого метода исходя из масштаба, в котором необходимо выполнять операцию. В масштабе 20 л указанная операция не будет давать экономии по времени.

1.3. Оценка кристаллизации чистого Z из неочищенной смеси изомеров.

В первой части оценки кристаллизации чистого О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она из неочищенной смеси О-метилоксима (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она рассматривались растворимость и возможные условия кристаллизации чистого О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она. Результаты испытаний на растворимость/кристаллизацию, проведённых в масштабе 15 мг, представлены в табл. II ниже.

Таблица II. Качественные данные о растворимости О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она

Растворитель	Растворяется в:	Комментарий
гептан	--	нерастворим в 20 об.
толуол	2 об. холодного	
ДИПЭ	40 об. горячего	
ТГФ	4 об. холодного	
tBuOH	6 об. горячего	
МИБК	4 об. горячего	
ИПС	4 об. горячего	

Предварительная проверка на растворимость свидетельствовала о том, что чистый изомер О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она растворим в целом ряде растворителей.

Исходя из вышеуказанных результатов исследовали кристаллизацию посредством добавления антирастворителя, и результаты представлены в табл. III. Антирастворитель добавляли к тёплому раствору температурой примерно 40-50°C и позволяли охлаждаться до комнатной температуры.

В частности, воду (антирастворитель) добавляли к тёплому (40-50°C) раствору О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она в ИПС до достижения помутнения и смеси позволяли охлаждаться до комнатной температуры.

Таблица III. Кристаллизация посредством добавления антирастворителя

Растворитель	Антирастворитель	Комментарий
толуол 20 об.	гептан 39 об.	выделение масла
ТГФ 10 об.	гептан 40 об.	выделение масла
tBuOH 10 об.	вода 20 об.	выделение масла
МИБК 10 об.	гептан 40 об.	выделение масла
ИПС 20 об.	вода 160 об.	сверхмелкое твёрдое вещество, выделение масла при оттаивании
ИПС 8 об.	вода 18 об.	сверхмелкое твёрдое вещество, выделение масла при оттаивании
ДМСО 10 об.	вода 12 об.	гель
NMP 10 об.	вода 28 об.	выделение масла
MeOH 10 об.	вода 10 об.	выделение масла
ДМСО 20 об.	вода 16 об.	выделение масла
ацетон 10 об.	вода 10 об.	выделение масла
ДХМ 10 об.	гептан 50 об.	выделение масла

Условия кристаллизации посредством ИПС/воды применяли в отношении неочищенной смеси изомеров. Раствор в толуоле сначала концентрировали досуха перед растворением в ИПС (8 об.) и добавлением воды (18 об.). К сожалению, указанная процедура приводила к расслоению вещества в виде масла (material de-mixing as oil).

В другом эксперименте антирастворитель добавляли к раствору неочищенного О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она (чистота по площади пика 90,4%, содержал 0,5 мас./мас.%, толуола и 3,7 мас./мас.%. ТГФ) при комнатной температуре до достижения помутнения и смесь выдерживали при комнатной температуре (табл. IV).

Таблица IV. Кристаллизация посредством добавления воды при 18-22°C

Растворитель	Антирастворитель	Комментарий
MeOH 5 об.	вода 3 об.	выделение масла
ДМСО 5 об.	вода 3 об.	выделение масла

На данном этапе исследования не были обнаружены подходящие условия кристаллизации чистого О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она или обеспечения выделения твёрдого вещества, содержавшего О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Дальнейшие попытки кристаллизации осуществляли с применением неочищенной смеси изомеров О-метилоксима (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она. Во всех случаях объём растворителей был меньше того, который был использован ранее, и соответствовал только одному растворителю. Неочищенное вещество (отношение E/Z 33:67 и чистота (E+Z) по площади пиков 79,52%), применённое для указанной кристаллизации, концентрировали до пены (табл. V).

Таблица V. Кристаллизация из одного растворителя при более низком объёме

Вещество	Растворитель	Выдерживание в морозильной камере	Выдерживание в холодильнике
'Чистое Z'	Этилацетат 1,8 об.	Кристаллизуется, повторно растворяется по мере того, как нагревается.	Остаётся в растворе с и без введения затравки после 2 суток.

Неочищенное		Не кристаллизуется с или без введения затравки.	н/д
'Чистое Z'		При добавлении эфира при 18-22°C начинает растворяться, затем снова выпадает. Выделение 70% Применено для затравливания	н/д
Неочищенное	Диэтиловый эфир 2,3 об.	Выделяется масло Повторно растворяется по мере того, как нагревается	Кристаллизуется, выделение 41 %, отношение E/Z 40/60, чистота по площади пиков 85,4%. (маточные растворы: отношение E/Z 20/80, чистота по площади пиков 62,1%). Затравка не используется.
'Чистое Z'		Выделяется масло. Повторно растворяется по мере того, как нагревается.	Остаётся в растворе с и без введения затравки после 2 суток.
Неочищенное	ТБМЭ 2,3 об.	Выделяется масло Повторно растворяется по мере того, как нагревается.	Остаётся в растворе с и без введения затравки после 2 суток.

Кристаллизация с применением этилацетата с последующим выдерживанием в морозильной камере в течение ночи обеспечивает кристаллизацию при применении чистого вещества О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, но указанное вещество быстро растворялось повторно по мере того, как образец нагревался. При применении неочищенного вещества в этилацетате кристаллы не обнаруживались даже при добавлении затравки.

Кристаллизация с применением диэтилового эфира с последующим выдерживанием в холодильнике обеспечивала кристаллизацию при применении неочищенного вещества О-метилоксима (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она. Твёрдое вещество собирали с выделением 41%. К сожалению, собранное твёрдое вещество имело несколько худшее отношение E/Z, чем исходное вещество, и несколько более высокую химическую чистоту.

ТБМЭ в качестве растворителя как для чистого Z, так и для неочищенного вещества обеспечивал выделение масла после выдерживания в морозильной камере и оставлял указанное вещество в растворе после выдерживания в холодильнике с применением и без применения затравки.

Подходящие условия кристаллизации неочищенной смеси изомеров, обеспечивающие улучшение отношения Z/E и чистоты смеси изомеров (E+Z), не были обнаружены.

1.4. По существу, чистая форма О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

1.4.1. Очистка в небольших масштабах.

Процедуру выделения О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она в, по существу, чистой форме осуществляли посредством хроматографии с применением системы Biotage (Biotage AB, SE-751 03 Уппсала, Швеция) неочищенной смеси изомеров, выделенной после восстановления сложного эфира оксима (этап 7 примера 1).

Пять различных партий (№ 020, 180, 062, 068, 076) неочищенной смеси изомеров подвергали очистке посредством хроматографии с применением Biotage. Кроме того, в отношении партий № 068 и 076 применяли различные условия. Очистку осуществляли с применением добавления 5 мас./мас.%, внутреннего стандарта, представлявшего собой метиловый эфир оксима, (№ 068) и с применением перегруженной колонки Biotage (№ 076).

Каждую хроматографию выполняли с применением картриджей Biotage 40M (40 г диоксида кремния), которые предварительно были промыты толуолом. Затем элюировали смесью толуол : MeOH (99:1 об./об.), и собирали 100 мл фракции (общий объём 4 л) с последующим промыванием смесью толу-

ол:MeOH (96:4 об./об.).

Фракции анализировали посредством ТСХ (элюент:этилацетат) для определения того, какие фракции можно было отбросить, а какие фракции содержали Z-изомер. Затем указанные Z-фракции анализировали посредством ВЭЖХ. Пороговые критерии для фракции составляли >96% Z-изомера и <1,2% E-изомера.

Неожиданно оказалось, что очистка различных партий посредством хроматографии с применением Biotage являлась очень эффективной, поскольку по существу чистая форма О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она была очищена на 99,4% (партии № 020, 062, 068) и на 99,2% (партии № 180, 076). В частности, хроматография с применением Biotage в присутствии сложного эфира оксима удаляла 5 мас./мас.%, сложного эфира оксима без ущерба для выделения или качества (партия № 068), и 25% перегрузка колонки Biotage не приводила к снижению выхода или качества (партия № 076).

Таблица VI. Эффективность хроматографии с применением Biotage

№ партии	% E/Z на входе	% E/Z на выходе	выход Z-изомера
020	3,0 г чистота по площади пика 85,7% % E/Z: 30,5/69,5	Чистые Z-фракции: 1,0 г чистота по площади пика 98,8% % E/Z: 0,6/99,4	33%
180	2,0 г чистота по площади пика 92,0% % E/Z: 32,8/67,2	Чистые Z-фракции: 0,9 г чистота по площади пика 99,6% % E/Z: 0,8/99,2	45%
062	3,0 г чистота по площади пика 83,5% % E/Z: 32,7/67,3	Чистые Z-фракции: 1,3 г чистота по площади пика 99,8% % E/Z: 0,6/99,4 Смесь: 1,2 г чистота по площади пика 91,0% % E/Z: 69,6/30,4	43% 11%
068	3,0 г с добавлением ~5% сложного эфира чистота по площади пика ~78% % E/Z: 32,7/67,3	Чистые Z-фракции: 1,2 г чистота по площади пика 99,8% % E/Z: 0,6/99,4 Смесь: 0,6 г чистота по площади пика 98,8% % E/Z: 27,9/72,1 Чистые E-фракции: 1,1 г чистота по площади пика 70,7% % E/Z: 98,7/1,3 (19,3% сложный эфир)	40% 14% не прим.
076	3,8 г чистота по площади пика 83,5% % E/Z: 32,7/67,3	Чистые Z-фракции: 1,4 г чистота по площади пика 99,8% % E/Z: 0,8/99,2 Смесь: 1,8 г чистота по площади пика 95,0% % E/Z: 63,6/36,4	37% 17%

1.4.2. Очистка в крупных масштабах.

Различные партии неочищенного О-метилоксима (3Z/E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она (0,392 кг, 1,16 моль, 1,0 мас.) загружали в 150 л модуль ввода образца (SIM unit) Biotage в виде примерно 50 мас./мас.%, раствора в толуоле и подвергали очистке с применением 1% метанола в толуоле (150 л) с последующим применением 2% метанола в толуоле (50 л), размер фракций составлял 5,0 л. Собранные фракции анализировали посредством ТСХ¹⁵ и, при необходимости, ВЭЖХ анализом. Фракции, которые были признаны содержащими чистый О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она (критерии: площадь пика Z-изомера ≥96,00%, площадь пика E-изомера ≤1,20%), объединяли и концентрировали в вакууме при температуре от 40 до 45°C. К остатку добавляли абсолютный этанол (2×2 л), и раствор концентрировали в вакууме при температуре от 40 до 45°C до тех пор, пока не становилось возможным произведение манипуляций с пенообразным твердым веществом. Требуемый продукт О-метилоксим (3Z,5S)-1-[(бифенил-4-ил-карбонил)-5-гидроксиметил]пирролидин-3-она (0,089 кг, 22,7 мас./мас.%, ¹H ЯМР (CDCl₃) соответствует структуре, площадь пика согласно ВЭЖХ 99,3%, отношение Z/E 98,4:0,9)

получали в виде твёрдого вещества от грязно-белого до светло-коричневого цвета.

Таблица VII. Краткое описание очистки различных партий О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она в, по существу, чистой форме

№ партии	Вещество на входе (кг)	Продукт (кг)	Выход (% масс./масс.)	Z-форма, % (площадь пика, %)	E-форма, % (площадь пика, %)
12	0,392	0,089	22,8	98,65	0,85
116	0,392	0,114	29	98,34	0,89
120	0,441	0,081	18,4	97,90	1,81
122	0,380	0,094	24,3	98,52	1,14
124	0,387	0,096	25,3	98,89	0,73
126	0,390	0,132	33,8	98,40	0,95
128	0,526	0,010	2	98,20	0,83
130	0,453	0,086	19	98,46	1,23
132	0,440	0,082	19,3	98,86	0,85
134	0,39	0,144	36,9	98,73	0,96
138	0,273	0,098	35,9	98,92	0,66
140	0,463	0,059	13,1	98,52	1,13
142	0,462	0,084	18,4	99,37	0,48
144	0,442	0,126	29	99,1	0,68
146	0,409	0,135	33,5	99,21	0,46
148	0,460	0,107	23,8	99,13	0,65
150	0,409	0,071	18	98,92	0,66
152	0,392	0,054	14,3	98,82	0,76
156	0,445	0,039	8,8	98,64	0,87
158	0,392	0,06	15,3	98,73	0,63
162	0,435	0,150	34,5	98,94	0,79
164	0,434	0,192	44,2	99,21	0,58
166	0,415	0,074	17,8	98,79	0,73
174	0,518	0,108	20,8	99,11	0,64
176	0,342	0,072	21	98,88	0,77
178	0,415	0,074	17,8	99,07	0,71
180	0,353	0,174	49,3	99,03	0,82
182	0,270	0,178	65,9	99,10	0,53

Соответствующие партии О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она (2,713 кг, 1,0 масс), выделенные в результате хроматографии с применением Biotage, объединяли и растворяли в абсолютном этаноле (5,16 л, 2,0 об.) при температуре от 15 до 25°C, очищали посредством фильтрования через бумагу на основе стеклянного микроволокна и промывную жидкость, представлявшую собой абсолютный этанол (0,50 л, 0,2 об.), наносили на фильтр. Объединённые фильтраты порциями концентрировали в вакууме при температуре от 40 до 45°C. Полученную смесь перемещали на сушильные лотки и сушили в вакууме при 30°C в течение 24 ч. Затем температуру в печи постепенно повышали от 30 до 40°C в течение 80 ч. Уровень остаточного растворителя определя-

ли посредством ^1H ЯМР-анализа (CDCl_3), и когда обнаруживали, что указанный уровень составлял $<1,0$ мас./мас.%, твёрдое вещество пропускали через сито с отверстиями 500 мкм. Твёрдое вещество возвращали в печь и сушили при температуре от 40 до 42°C до тех пор, пока уровень растворителя не становился $\leq 0,40$ мас./мас.%, с получением О-метилоксима (3Z,5S)-1-[(бифенил-4-ил-карбонил)-5-гидроксиметил]пирролидин-3-она (2,633 кг, 97,1 мас./мас.%, ^1H ЯМР (CDCl_3) соответствует структуре, площадь пика согласно ВЭЖХ 98,65%).

Объединённая процедура подытожена ниже.

Вещество на входе: 2,713 кг.

Вещество на выходе: 2,633 кг.

Выход: 97,1 мас./мас.%.

Пример 2. Связывание О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она с OT-R и рецептором вазопрессина V1a.

Связывание с OT-R и рецептором вазопрессина V1a.

Конкурентное связывание с рецептором окситоцина человека измеряли *in vitro* с применением сцинтилляционного анализа сближения.

Указанный анализ обеспечивает определение аффинности испытываемых соединений по отношению к OT-R. Мембраны из HEK293EBNA (клеток, экспрессирующих OT-R) суспендировали в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl_2 и 0,1% BCA (мас./об.). Мембраны (2-4 мкг) смешивали с 0,1 мг шариков для сцинтилляционного анализа сближения (SPA), покрытых агглютинином зародыша пшеницы, (АЗП-ПВТ-полиэтилениминовых шариков от Amersham) и 0,2 нМ меченного радиоактивным изотопом [^{125}I] OVTA (OVTA, будучи орнитин-вазоактивным, является аналогом OT в экспериментах по конкурентному связыванию). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1 мкМ окситоцина. Общий анализируемый объём составлял 100 мкл. Планшеты (планшет Corning® NBS) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и производили подсчёты на сцинтилляционном счётчике для планшетов Mibrobeta®. Конкурентное связывание осуществляли в присутствии соединений согласно настоящему изобретению в следующих концентрациях: 30, 10, 1 мкМ, 300, 100, 10, 1 нМ, 100, 10 пМ. Данные конкурентного связывания анализировали с применением итеративной нелинейной программы аппроксимации кривых "Prism" (GraphPad Software, Inc).

Способность соединений согласно настоящему изобретению ингибировать связывание I-OVTA с OT-рецептором оценивали с применением вышеописанного биологического анализа *in vitro*. Аффинность связывания испытываемых соединений из вышеуказанных примеров выражается константой ингибирования (K_i ; нМ). На основании указанных значений можно сделать вывод, что указанные испытываемые соединения согласно настоящему изобретению демонстрируют значительное связывание с рецептором окситоцина.

Константа ингибирования K_i для О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она по отношению к рецептору окситоцина составляет K_i (нМ) = 52 нМ и по отношению к рецептору вазопрессина V1a составляет K_i (нМ) = 120 нМ. Таким образом, О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она является селективным по отношению к рецептору окситоцина.

Пример 3. О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она представляет собой антагонист OT-R.

Ингибирование окситоцине-индуцированной мобилизации Ca^{2+} в клетках HEK293EBNA, трансфицированных OT-R, измеряли посредством FLIPR (спектрофотометра для чтения планшетов для визуализации флуоресценции).

Указанный анализ позволяет измерить ингибирование OT/OT-R-опосредованной мобилизации кальция посредством соединения, представляющего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

FLIPR® представляет собой устройство для визуализации флуоресценции с применением лазера (лазера на ионах аргона) для одновременного освещения и чтения (с помощью охлаждаемой ПЗС-камеры) каждой лунки 96-луночного планшета, что, таким образом, обеспечивает возможность быстрых измерений большого числа образцов.

Приготовление планшетов: FLIPR-планшеты предварительно покрывали 10 мкг/мл PLL (поли-L-лизин) + 0,1% желатином для прикрепления клеток HEK293EBNA (человеческих эмбриональных клеток почек, экспрессирующих OT-R) и инкубировали в течение периода от 30 мин до 2 суток при 37°C. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (60000 клеток/лунка).

Маркировка с применением Fluo-4: 50 мкг Fluo-4 (чувствительного к Ca^{2+} флуоресцентного красителя) растворяли в 20 мкл плюроновой кислоты (20% в ДМСО). Затем растворенный Fluo-4 разбавляли 10 мл культуральной среды DMEM (Dubecco's Minimal Essential Medium, минимальная питательная среда Игла в модификации Дульбекко)-F12. Планшеты один раз промывали средой DMEM-F12. 100 мкл среды DMEM-F12, содержащей Fluo-4, добавляли к HEK-клеткам, которые инкубировали в течение 1,5-2 ч в указанной флуоресцентной среде. Fluo-4 поглощается цитоплазмой клеток.

Буфер: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM глюкоза, EGTA (этилен-бис(оксиэтилен-нитрило)тетрауксусная кислота). pH доводили до 7,4.

Выполнение анализа: готовили не менее 80 мкл/лунка соединения, представлявшего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, (5×) в вышеуказанном буфере (1×) (96-луночные планшеты). Соединение, представлявшее собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, добавляли в 96-луночные планшеты в различных концентрациях (30, 10, 1 мкМ, 300, 100, 10, 1 нМ, 100, 10 пМ). Окситоцин (ОТ) добавляли в концентрации 40 нМ.

Затем измеряли относительную флуоресценцию Fluo-4 ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 590$ нм) посредством FLIPR в присутствии или при отсутствии соединений, представлявших собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она. Можно было обнаружить флуоресценцию маркера, чувствительного к количеству Ca²⁺, перемещению Ca²⁺. Далее можно было определить способность соединения, представлявшего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, противодействовать окситоцин-индуцированной внутриклеточной мобилизации Ca²⁺, опосредованной рецептором окситоцина.

Соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она ингибирует активность окситоцина на ОТ-R с IC₅₀ 81 нМ.

Пример 4. Подавление спонтанных сокращений матки у крысы на позднем сроке беременности, находившейся под наркозом.

4.1. Протокол эксперимента.

Самок крыс Sprague Dawley CD (SD) BR (Charles River, Калько, Италия) на поздних сроках беременности (подтверждено на 19-21 днях беременности) массой 350-400 г наркотизировали уретаном (1,05 г/кг, внутривенно) и помещали на гомеотермический операционный стол. Производили срединный разрез на уровне гипогастрия, обнажали один из рогов беременной матки, и его трубный конец (около яичника) закрывали посредством наложения лигатуры из хирургического шёлка.

В соответствии с плодом, находившимся рядом с яичником, стенку рога матки надрезали, стараясь не повредить прилегающую плаценту, и трубку PE 240 с латексным баллоном (длина в пустом состоянии 9 мм, ёмкость 0,1 мл; Radnoti, Монровия, СА, США) на конце вставляли в просвет и прикрепляли к стенке матки с помощью хирургического шёлка. После заполнения внутренней полости латексного баллона 0,1 мл стерильного физиологического раствора катетер соединяли с системой усиления/регистрации (MacLab, ADInstruments Pty Ltd, Касл-Хилл, Австралия) через датчик давления P23ID Gould-Statham. Одну из яремных вен отделяли и канюлировали с применением полиэтиленовой канюли PE60 для обеспечения возможности внутривенного введения. После хирургической подготовки устанавливали 30-минутный период стабилизации, а затем оценивали воздействие возрастающих доз соединений согласно настоящему изобретению (введённых в виде внутривенной инфузии в течение 10 мин, болюсно внутривенно или перорально) посредством измерения возникавших в результате сокращений матки.

В случае внутривенного введения (инфузионно или болюсно) сократительную активность матки количественно определяли посредством вычисления площади под кривой (ППК) в течение 10-минутного периода выполнения инъекции. Процентное изменение значений ППК, относившихся к спонтанной реакции матки, отмечаемой после каждого введения соединения, вычисляли по сравнению со значением, зафиксированным до первого введения дозы (исходным значением). Влияние испытываемых соединений согласно настоящему изобретению оценивали посредством сравнения значений внутриполостного давления в матке до и после лечения.

В случае перорального введения тот же метод вычислений применяли в различных временных точках после лечения. Статистические различия между лечебными группами в каждой временной точке определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением критерия Тьюки.

4.2. Результаты.

На фиг. 1А и В изображены дозозависимые влияния Z-изомера и E-изомера, введённых пероральным способом, на подавление спонтанных сокращений матки у находившихся под наркозом беременных крыс незадолго до срока родов (19-21 дней беременности). Данные представлены в виде средних значений $\pm$ СО для n=6-8 животных на группу. Ось ординат отображает сокращения матки в виде % значения по сравнению со значением до введения дозы, установленным на уровне 100%. Ось абсцисс отображает время после введения дозы в минутах. Сокращения непрерывно фиксировали, и площадь под кривой (ППК) интегрировали по 10-минутным интервалам времени.

Результаты, представленные на фиг. 1А, свидетельствуют о том, что О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она (Z-форма) способен быстро подавлять спонтанные сокращения матки у крысы на позднем сроке беременности, находящейся под наркозом, в различных дозах (10, 30 или 60 мг/кг) по сравнению с контрольным носителем NP3S (5% N-метилпирролидона, 25% полиэтиленгликоля 200, 30% полиэтиленгликоля 400, 20% пропиленгликоля, 20% солевого раствора). Подавление сокращений матки на 15% может наблюдаться через 5-15 мин после

введения, по существу, чистой Z-формы. Эффективное подавление на 42% наблюдается через 170-180 мин после введения указанного соединения.

Напротив, не наблюдалось подавления сокращения матки О-метилоксимом (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она в различных дозах (10, 30 или 60 мг/кг, Е-форма) в любой момент времени в течение 170-180 мин наблюдения (фиг. 1В).

Настоящее изобретение неожиданно демонстрирует, что, по существу, чистая Z-форма, имеющая формулу О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, подавляет сокращение матки, тогда как, по существу, чистая Е-форма не обладает эффективностью. Таким образом, настоящее изобретение предпочтительно относится к биологически активным соединениям, представляющим собой соединение формулы О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она и/или метаболит указанного соединения, в, по существу, чистой форме, которые можно вводить в более низкой дозе по сравнению с указанными соединениями, обеспеченными в смеси изомеров.

Пример 5. Стабильность О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она *in vivo*.

Изомерное взаимопревращение [^{14}C]-О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она исследовали после однократного перорального и внутривенного введения доз (номинальных доз 30 мг/кг, 25 мКи/крыса) восьми здоровым самкам крыс ($n = 4$ для каждого способа введения дозы).

Животные, использованные в указанном исследовании, представляли собой крыс-альбиносов Sprague-Dawley, CrI: CD®BR. Все животные были предоставлены Charles River UK Ltd (Маргит, Кент, UK). Животные имели массу в диапазоне 200-260 г и возраст примерно 2 месяца. Крысам присваивали уникальный идентификационный номер, и крыс обнаруживали с помощью уникальных меток на хвостах плюс расположения клеток.

Дозовые группы были следующими: 4 самкам дозу вводили перорально, и 4 самкам дозу вводили внутривенно.

Лекарственные формы для перорального и внутривенного введения [^{14}C]-О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она готовили отдельно в каждой фазе дозирования (dose phase) при уровне целевой дозы 30 мг/кг и при концентрации радиоактивного вещества примерно 25 мКи/крыса. Лекарственные формы готовили в соответствующей матрице; внутривенные дозы готовили в NP3S, тогда как пероральные дозы готовили в смеси лабрасол:вода (1:1 об./об.).

Хроматографический анализ с применением ВЭЖХ свидетельствовал о том, что радиоактивные компоненты, демонстрирующие совместную хроматографию с Е-изомером формулы О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она, не присутствовали в пероральных или внутривенных лекарственных формах до или после введения дозы. Следовательно, не происходило поддающегося обнаружению взаимопревращения О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она в О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она в процессе приготовления или введения дозы. Не было никаких доказательств того, что [^{14}C]-Е-изомер формулы О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она присутствовал в плазме, собранной не более чем через 6 ч после перорального или внутривенного введения [^{14}C]-О-метилоксима (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

Таким образом, при применении описанных методов [^{14}C]-О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она не подвергается поддающемуся обнаружению изомерному взаимопревращению *in vivo* после перорального или внутривенного введения дозы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, представляющего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он, для предотвращения неудачной имплантации эмбриона у нуждающегося в этом субъекта.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанного субъекта подвергают процедуре экстракорпорального оплодотворения с переносом эмбриона (ЭКО-ПЭ).

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанный субъект представляет собой женщину.

4. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанное соединение приготовлено в форме для перорального введения указанному субъекту.

5. Применение соединения, представляющего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он для снижения вероятности неудачной имплантации эмбриона у пациента, представляющего собой женщину, которая подвергается процедуре экстракорпорального оплодотворения с переносом эмбриона (ЭКО-ПЭ).

6. Применение по п.5, отличающееся тем, что указанное соединение приготовлено в форме для перорального введения указанному пациенту.

в процессе переноса эмбриона, у субъекта, представляющего собой женщину, причём указанное соединение содержит менее чем 15% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

32. Применение по п.31, отличающееся тем, что указанное соединение содержит менее чем 10% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

33. Применение по п.32, отличающееся тем, что указанное соединение содержит менее чем 5% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

34. Применение по п.33, отличающееся тем, что указанное соединение содержит менее чем 1% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

35. Применение по п.31, отличающееся тем, что указанного субъекта подвергают процедуре экстракорпорального оплодотворения с переносом эмбриона (ЭКО-ПЭ).

36. Применение по п.31 или 35, отличающееся тем, что указанное соединение приготовлено в форме для перорального введения указанному субъекту.

37. Способ предотвращения неудачной имплантации эмбриона у нуждающегося в этом субъекта, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту соединения, представляющего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он, причём указанное соединение содержит менее чем 15% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 10% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

39. Способ по п.38, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 5% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

40. Способ по п.39, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 1% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

41. Способ по п.37, отличающийся тем, что указанного субъекта подвергают процедуре экстракорпорального оплодотворения с переносом эмбриона (ЭКО-ПЭ).

42. Способ по п.37 или 41, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой женщину.

43. Способ по п.37 или 41, отличающийся тем, что указанное соединение приготовлено в форме для перорального введения указанному субъекту.

44. Способ снижения вероятности неудачной имплантации эмбриона у пациента, представляющего собой женщину, которая подвергается процедуре экстракорпорального оплодотворения с переносом эмбриона (ЭКО-ПЭ), при этом указанный способ включает введение указанному пациенту соединения, представляющего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он, причём указанное соединение содержит менее чем 15% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

45. Способ по п.44, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 10% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

46. Способ по п.45, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 5% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

47. Способ по п.46, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 1% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

48. Способ по п.44, отличающийся тем, что указанное соединение приготовлено в форме для перорального введения указанному пациенту.

49. Способ снижения сокращений матки, возникающих в процессе переноса эмбриона, у субъекта, представляющего собой женщину, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту соединения, представляющего собой О-метилоксим (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он, причём указанное соединение содержит менее чем 15% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

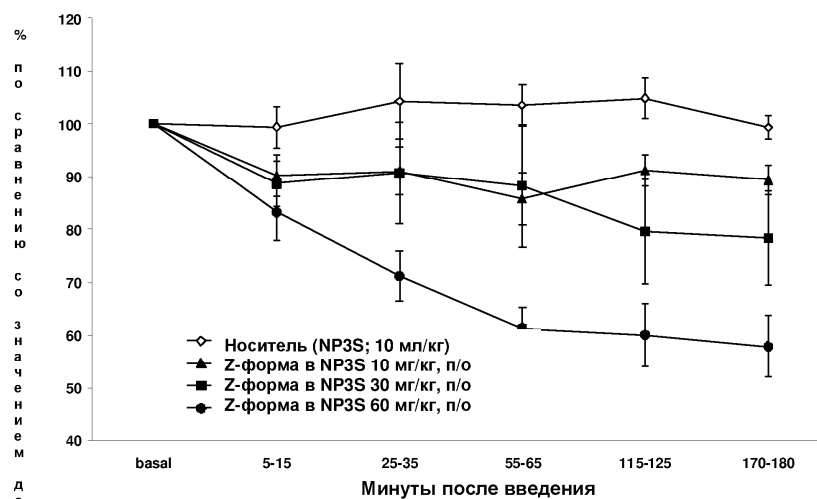
50. Способ по п.49, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 10% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

51. Способ по п.50, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 5% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

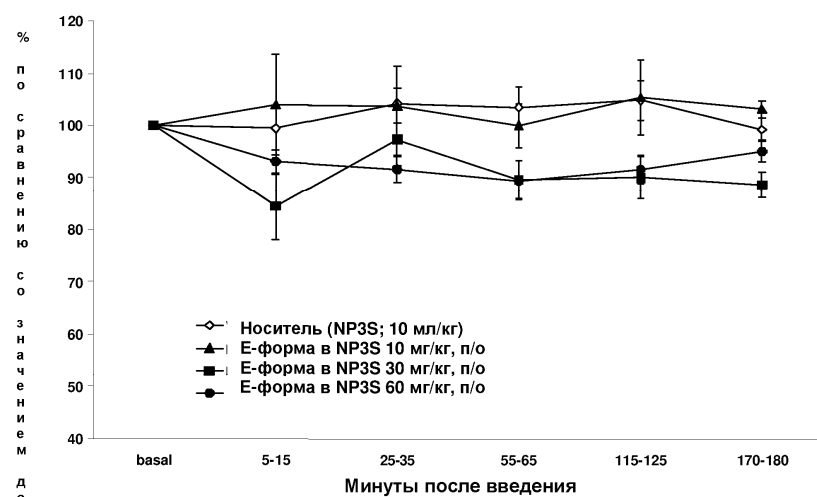
52. Способ по п.51, отличающийся тем, что указанное соединение содержит менее чем 1% О-метилоксим (3E,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-она.

53. Способ по п.49, отличающийся тем, что указанного субъекта подвергают процедуре экстракорпорального оплодотворения с переносом эмбриона (ЭКО-ПЭ).

54. Способ по п.49 или 53, отличающийся тем, что указанное соединение приготовлено в форме для перорального введения указанному субъекту.



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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