

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992144 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.17(22) Дата подачи заявки
2018.04.18(51) Int. Cl. C07D 413/14 (2006.01)
C07D 417/14 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/427 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)

(54) НОВЫЕ СОЛИ-ИНГИБИТОРЫ ФЕРРОПОРТИНА

(31) 17166907.0

(32) 2017.04.18

(33) EP

(86) PCT/EP2018/059906

(87) WO 2018/192973 2018.10.25

(71) Заявитель:

ВИФОР (ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ) АГ
(CH)

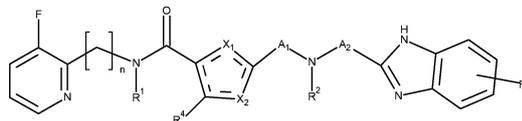
(72) Изобретатель:

Моррис Колин Д. (US), Блаттер Фриц,
Лападула Джузеппе, Райм Штефан
(CH), Бургерт Михель (DE), Филипп
Эрик (CH)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение касается новых солей соединений общей формулы (I), фармацевтических композиций, содержащих их, и их применения в качестве лекарственных средств, в частности применения в качестве ингибиторов ферропортина, более конкретно - для применения в профилактике и/или лечении заболеваний, вызванных недостатком гепсидина или нарушениями метаболизма железа, таких как, в частности, состояния перенасыщения железом, такие как, в частности, талассемия, серповидноклеточная анемия и гемохроматоз.



201992144

A1

A1

201992144

НОВЫЕ СОЛИ-ИНГИБИТОРЫ ФЕРРОПОРТИНА

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается новых солей соединений, имеющих общую формулу (I), фармацевтических композиций, содержащих их, и их применения в качестве лекарственных средств, в частности применения в качестве ингибиторов ферропортина, более конкретно – для применения в целях профилактики и/или лечения заболеваний, вызванных недостатком гепсидина или нарушениями метаболизма железа, таких как, в частности, состояния перенасыщения железом, такие как, в частности, талассемия, серповидноклеточная анемия и гемохроматоз.

Предшествующий уровень техники

Железо является незаменимым микроэлементом почти для всех организмов и необходимо, в частности, для роста и образования элементов крови. Сбалансированность метаболизма железа в данном случае регулируется главным образом на уровне возврата железа из гемоглобина стареющих эритроцитов и всасывания поступающего с пищей железа в двенадцатиперстной кишке. Высвобождающееся железо всасывается в кишечнике, в частности с помощью специфических транспортных систем (DMT-1, ферропортин), поступает в кровеносную систему и доставляется в соответствующие ткани и органы (трансферрин, трансферриновые рецепторы).

В организме человека железо играет огромную роль, среди прочего, в переносе кислорода, усвоении кислорода, осуществлении функций клеток, таких как перенос электронов в митохондриях, когнитивных функциях и т.д., и в энергообмене в целом.

В среднем, тело человека содержит 4-5 г железа, которое присутствует в ферментах, в гемоглобине и миоглобине, а также в виде депонированного или резервного железа в форме ферритина и гемосидерина. Примерно половина этого железа, около 2 г, представляет собой железо гема, связанное в составе гемоглобина эритроцитов. Поскольку эритроциты имеют ограниченное время жизни (75-150 дней), необходимо непрерывное образование новых и удаление старых эритроцитов (свыше 2 миллионов эритроцитов образуются каждую секунду). Высокую регенеративную способность обеспечивают макрофаги, поглощающие старые эритроциты посредством фагоцитоза, лизирующие их и регенерирующие полученное таким образом железо для дальнейшего метаболизма железа. Таким образом покрывается большая часть ежедневной потребности железа для эритропоэза, равной 25 мг.

Ежедневная потребность в железе у взрослого человека составляет от 0.5 до 1.5 мг

в день, детям и беременным женщинам необходимо 2-5 мг железа в день. Ежедневная потеря железа, например, вследствие отслоения клеток кожи и эпителия, невелика. Повышенная потеря железа наблюдается, например, во время менструального кровотечения у женщин. В целом, потеря крови может заметно понизить содержание железа, поскольку с двумя миллилитрами крови теряется примерно 1 мг железа. У здорового взрослого человека ежедневная потеря железа, в норме составляющая около 1 мг, обычно восполняется за счет ежедневного поступления с пищей, что восполняет суточную потребность в железе до нормального уровня.

Уровень железа регулируется всасыванием, и процент всасывания железа из пищи составляет от 6 до 12%; в случае железодефицита процент всасывания возрастает до 25%. Уровень всасывания регулируется организмом в зависимости от потребности в железе и размера запасов железа. В ходе этого процесса организм человека усваивает ионы как двухвалентного, так и трехвалентного железа. Обычно соединения железа(III) растворяются в желудке при достаточно кислых значениях pH, и таким образом становятся доступны для всасывания. Всасывание железа осуществляется в верхнем отделе тонкого кишечника клетками слизистой. В ходе этого процесса трехвалентное железо, не входящее в состав гема, сначала восстанавливается в мембране клеток кишечника до Fe(II) для всасывания, например, с помощью железо-редуктазы (связанный с мембраной дуоденальный цитохром b), так что затем оно может транспортироваться в клетки кишечника посредством транспортного белка DMT1 (переносчик двухвалентного металла 1). Напротив, железо гема поступает в энтероциты через клеточную мембрану без каких-либо изменений. В энтероцитах железо либо хранится в составе ферритина в качестве депонированного железа, либо выбрасывается в кровь транспортным белком ферропортином. В данном процессе центральную роль играет гепсидин, поскольку он представляет собой наиболее важный регулирующий фактор усвоения железа. Двухвалентное железо, транспортируемое в кровь ферропортином, превращают в трехвалентное железо оксидазы (церулоплазмин, гепестин), и затем трехвалентное железо транспортируется в соответствующие участки организма трансферрином (см., например, "Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism". M.W. Hentze, *Cell* 117, 2004, 285-297).

Организмы млекопитающих неспособны активно выводить железо. Метаболизм железа главным образом контролируется гепсидином через клеточное высвобождение железа из макрофагов, гепатоцитов и энтероцитов.

Гепсидин представляет собой пептидный гормон, вырабатываемый в печени. Превалирующая активная форма содержит 25 аминокислотных остатков (см., например,

статью "Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation". T. Ganz *Blood* 102,2003,783–8), хотя были обнаружены две формы, укороченные по аминоконцу: гепсидин-22 и гепсидин-20. Гепсидин воздействует на всасывание железа через кишечник, через плаценту, и на высвобождение железа из ретикулоэндотелиальной системы. В организме гепсидин синтезируется из так называемого про-гепсидина в печени, а про-гепсидин кодируется так называемым геном HAMP. Образование гепсидина регулируется в прямой корреляции с уровнем железа в организме, т.е. если в организм поступает достаточное количество железа и кислорода, образуется повышенное количество гепсидина, а если поступление железа и кислорода низкое, или в случае повышенного эритропоэза, образуется меньше гепсидина. В слизистых клетках тонкого кишечника и в макрофагах гепсидин связывается с транспортным белком ферропортином, посредством которого фагоцитарно рециркулируемое железо обычно транспортируется из клеток в кровь.

Транспортный белок ферропортин представляет собой трансмембранный белок, содержащий 57 аминокислотных остатков, который образуется в печени, селезенке, почках, сердце, кишечнике и плаценте. В частности, ферропортин локализован в базолатеральной мембране эпителиальных клеток кишечника. Связанный таким образом ферропортин воздействует на экспорт железа в кровь. В данном случае, наиболее вероятно, что ферропортин транспортирует железо в виде Fe^{2+} . Если гепсидин связан с ферропортином, ферропортин транспортируется внутрь клетки, где происходит его разрушение, в результате чего затем полностью блокируется выход фагоцитарно рециклизованного железа из клеток. Если ферропортин инактивируется, например, гепсидином, так что он не способен экспортировать железо, содержащееся в слизистых клетках, содержащееся в них железо теряется вследствие естественного выведения клеток со стулом. Таким образом, всасывание железа в кишечнике уменьшается, когда ферропортин инактивирован или подавлен, например, гепсидином. Кроме того, ферропортин заметно локализован в ретикулоэндотелиальной системе (RES), к которой принадлежат также макрофаги. Гепсидин играет важную роль при ухудшении обмена железа при хроническом воспалении. В случае таких воспалений в частности повышается уровень интерлейкина-6, что приводит к росту содержания гепсидина. В результате этого повышенное количество гепсидина связывается с ферропортином макрофагов, тем самым блокируя высвобождение железа, что в итоге приводит к развитию анемии, вызванной воспалением (ACD или AI).

С другой стороны, если содержание железа в плазме крови понижается, то уменьшается выработка гепсидина в гепатоцитах печени, и поэтому высвобождается

меньше гепсидина, соответственно инактивируется меньше ферропортина, что позволяет большему количеству накопленного железа транспортироваться в кровь.

Из сказанного выше становится понятно, что гепсидин-ферропортиновая система напрямую регулирует обмен железа и что нарушение механизма гепсидиновой регуляции напрямую влияет на обмен железа в организме. В принципе, механизм гепсидин-ферропортиновой регуляции работает на двух описанных ниже противоположных принципах:

С одной стороны, повышение содержания гепсидина приводит к инаktivации ферропортина, что блокирует высвобождение накопленного железа из клеток в кровь, тем самым понижая содержание железа в крови. В патологических случаях пониженный уровень железа в крови приводит к пониженному содержанию гемоглобина, уменьшению выработки эритроцитов и, как следствие, к железодефицитной анемии.

С другой стороны, снижение содержания гепсидина приводит к повышению содержания активного ферропортина, что позволяет увеличить высвобождение накопленного железа и увеличить поступление железа, например, из пищи, тем самым повышая уровень железа в крови. В патологических случаях повышенный уровень железа в крови приводит к перенасыщению железом.

Состояния и заболевания при перенасыщении железом характеризуются избыточным уровнем железа. Проблемы возникают из-за избыточного содержания железа в крови, которое приводит к появлению так называемого свободного железа (NTBI). Свободное железо быстро неспецифично поглощается органами, что ведет к накоплению железа в органах и тканях. Перенасыщение железом вызывает многие заболевания и нежелательные медицинские состояния, включая повреждения сердца, печени и эндокринной системы. Кроме того, накопление железа в мозге наблюдалось у пациентов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями, такими как, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Как особый вредоносный аспект избытка свободного железа следует упомянуть нежелательное образование радикалов. В частности, ионы железа(III) катализируют формирование (среди прочего, по реакции Фентона) активных форм кислорода (АФК). АФК вызывают повреждения ДНК, жиров, белков и углеводов, что оказывает долгосрочный эффект на клетки, ткани и органы. Образование АФК хорошо известно и описано в литературе как причина развития так называемого окислительного стресса.

Хорошо известный существующий в настоящее время метод лечения перенасыщения железом основан на концепции снижения количества железа в крови путем усиления выведения железа из организма. Старейший из известных и до сих пор

рутинно применяемый метод для здоровых в других аспектах пациентов состоит в регулярной флеботомии (кровопускание). После первой постановки диагноза, флеботомию назначают обычно довольно часто, например, 1 раз неделю, до приведения уровня железа к нормальному диапазону, после чего флеботомию назначают один раз в месяц или каждые три месяца, в зависимости от скорости накопления железа у конкретного пациента.

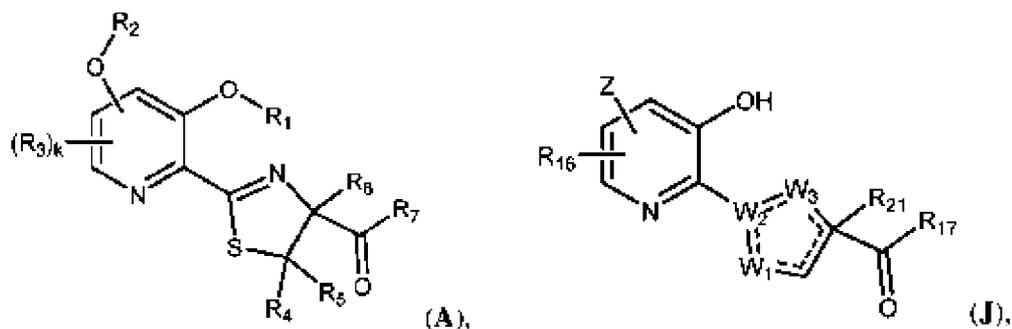
Для пациентов, не способных выдержать регулярные кровопускания, доступны к применению хелатирующие агенты. Например, дефероксамин (известный также как десферриоксамин В, N¹-{5-[ацетил(гидрокси)амино]пентил}-N-[5-({4-[(5-аминопентил) (гидрокси)амино]-4-оксобутаноил}амино)пентил]-N-гидроксисукцинамид или Desferal®), который представляет собой бактериальный сидерофор, известное лекарственное средство для применения в хелатирующей терапии. Дефероксамин связывает железо в кровеносной системе как хелатор и усиливает его выведение с мочой и калом. Типичное лечение хронического перенасыщения железом требует подкожного введения в течение 8-12 часов каждый день. Парэнтерально инъецируемые композиции солей десферриоксамина-В описаны, например, в WO 1998/25887.

Двумя новыми лекарственными средствами, лицензированными для применения у пациентов, которым делают регулярные переливания крови для лечения талассемии, приводящие к развитию перенасыщения железом, являются деферасирокс и деферипрон.

Деферасирокс (Exjade®, 4-(3,5-бис(2-гидроксифенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил) бензойная кислота), описанный, например, в WO 1997/49395, и деферипрон (Ferriprox®, 3-гидрокси-1,2-диметилпиридин-4(1H)-он) сходным образом работают как железо-хелатирующие агенты, и поэтому подходят для применения в качестве лекарственных соединений для железо-хелатирующей терапии.

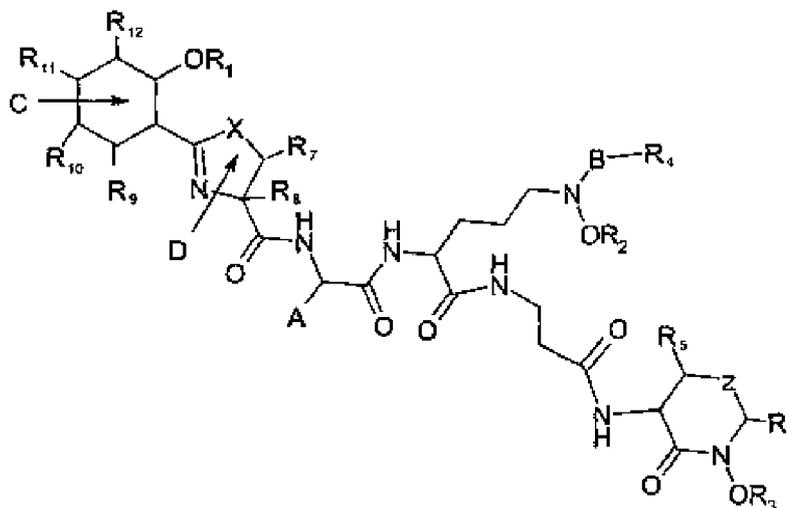
Были описаны также другие соединения, выступающие в роли хелаторов железа, для лечения перенасыщения железом. Например, WO 2013/142258 касается инкапсулированных частиц диэтилентриаминпентаацетата (ДТРА) и соли цинка. WO 2003/041709 касается 4-гидрокси-2-алкилхинолинов, таких как 4-гидрокси-2-нонилхинолин, в роли хелаторов железа. WO 1998/09626 касается хелатирующих агентов на основе дитиокарбамат-содержащих композиций для лечения состояний перенасыщения железом.

WO 2015/077655 касается производных десферритиоцина, имеющих общую формулу (A) или (J)



для применения в лечении заболеваний, связанных с перенасыщением железом. Согласно WO 2015/077655, было обнаружено, что указанные производные десферритиоцина работают как железо-хелатирующие агенты.

WO 2005/051411 касается новых антибиотиков или противогрибковых средств на основе оксахелина и его производных, имеющих формулу



которые были описаны как работающие в качестве хелаторов железа и подходящие для применения в лечении заболеваний, связанных с перенасыщением железом.

Недостатком лечения перенасыщения железом методом хелатирующей терапии является выведение хелатированного железа из организма тогда, когда перенасыщение железом уже произошло, вместо того, чтобы предотвращать наступление заболевания. Кроме того, известно, что применяемые лекарственные средства для железо-хелатирующей терапии обладают токсическим потенциалом.

Можно ожидать, что современные подходы последовательно заменят данный метод, в частности с ростом знаний об основополагающих механизмах и развитием подходящих методов терапии на основе этих знаний. Агонисты гепсидина или соединения, оказывающие подавляющий или поддерживающий эффект на биохимические пути регуляции обмена железа, в целом известны из предшествующего уровня техники.

Перенасыщение железом может происходить, например, в случае затруднения выработки гепсидина, например, вследствие генетического дефекта, такого как известное

заболевание, связанное с перенасыщением железом – гемохроматоз. Гемохроматоз представляет собой заболевание, связанное с перенасыщением железом, вызванное мутациями в генах, контролирующих синтез гепсидина, или в самом гене гепсидина. Низкие или нулевые уровни гепсидина у таких пациентов приводят к повышенным количествам активного ферропортина, что усиливает всасывание железа из пищи, приводя к сильному перенасыщению железом, вызывающему повреждения сердца, печени и эндокринной системы. Было показано, что белки-миметики гепсидина, т.е. белки, которые сходным образом связывают и инактивируют ферропортин, эффективно разворачивают процесс накопления железа в тканях у мышей с отключенным геном гепсидина, модели Типа 2 (juvenile) гемохроматоза. (Ramos et al., Blood 2012).

При известном заболевании, вызванном перенасыщением железом – бета-талассемии, мутация в гене бета-глобина вызывает снижение выработки гемоглобина и неэффективный эритропоэз, неспособность выработать достаточное количество красных кровяных телец вследствие повреждения и гибели развивающихся красных кровяных телец в костном мозге. Это вызывает усиление скорости эритропоэза и снижение уровня гепсидина для того, чтобы сделать доступным больше железа для нужд усиленного эритропоэза. Этот неадекватный ответ приводит к перенасыщению железом из-за пониженного уровня гепсидина, что приводит к появлению повышенного количества активного ферропортина и усиленному усвоению железа из пищи, как описано выше. Красные кровяные тельца при талассемии имеют укороченное время полужизни вследствие токсичности разбалансированного соотношения альфа- и бета-субъединиц гемоглобина. Также в лечении бета-талассемии было описано применение белков гепсидин-миметиков, терапевтический смысл применения которых основан на повышении активности гепсидина, приводящем к ограничению уровня железа и уменьшению вызванных железом повреждений в красных кровяных тельцах. Введение белков гепсидин-миметиков мышам $th3/+$, в модели талассемии, не зависящей от переливаний крови, приводило к ослаблению симптомов неэффективного эритропоэза, увеличению времени жизни красных кровяных телец и ослаблению анемии. В этой модели, профилактика перенасыщения железом вследствие уменьшения всасывания железа из пищи была выявлена как дополнительный положительный эффект терапии миметиками гепсидина (Gardenghi et al, 2010; Casu et al 2013).

Описанные методы терапии основаны на прямом вмешательстве в нарушенный путь обмена железа путем непосредственного воздействия через первичный регулятор гепсидин посредством введения миметика гепсидина или агониста гепсидина, т.е. воздействия посредством замещения или увеличения количества гепсидина. Этот подход

основан на терапевтическом принципе лечения перенасыщения железом, т.е. повышенного уровня железа в крови, путем подавления ферропортина через механизм инактивации гепсидина, что приводит к блокированию избыточного всасывания железа.

Другими известными заболеваниями, связанными с перенасыщением железом, являются заболевания, связанные с неэффективным эритропоэзом, такие как миелодиспластический синдром (известный также как MDS или миелодисплазия), истинная полицитемия и т.д.

Кроме того, мутации в генах, участвующих в регулировке работы системных депо железа, таких как гепсидин (*Hamp1*), белок гемохроматоза (*HFE*), гемоювелин (*HJV*) и трансферриновый рецептор 2 (*TFR2*), вызывают перенасыщение железом у мышей и людей. Соответственно, можно указать заболевания, связанные с мутациями гена *HFE*, заболевания, связанные с хроническим гемолизом, серповидно-клеточную анемию, нарушения мембраны эритроцитов, а также дефицит глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (дефицит *G6PD*), эритропоэтическую порфирию и атаксию Фридрейха. Кроме того, подтипы перенасыщения железом включают трансфузионное перенасыщение железом, интоксикацию железом, гемосидероз легких, остеопению, инсулинорезистентность, африканское перенасыщение железом, болезнь Галлервордена-Шпатца, гиперферритинемию, дефицит церулоплазмина, неонатальный гемохроматоз и нарушения в эритроцитах, включающие талассемию, альфа-талассемию, среднюю талассемию, серповидно-клеточную анемию и миелодиспластический синдром.

Другие заболевания и/или нарушения и/или болезненные состояния, связанные с повышенным уровнем железа, включают (но не ограничиваются только ими) заболевания, вызванные повышенным уровнем железа, включая атаксию, атаксию Фридрейха, возрастную макулодистрофию, возрастную катаракту, возрастные заболевания сетчатки и нейродегенеративные заболевания, где указанные нейродегенеративные заболевания включают болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, синдром беспокойных ног и болезнь Хантингтона.

Гепсидин представляет собой защищающий хозяина белок, являющийся компонентом врожденной иммунной системы, которая осуществляет ответ вторгающимся организмам.

Сообщалось, что многие бактерии сильно зависят от поступления железа от хозяина (так называемые сидерофильные организмы) и выработали механизмы захвата железа из окружающих тканей. Возможность ограничить количество железа, доступного таким организмам, посредством применения ингибиторов ферропортина может стать эффективной вспомогательной терапией. Одним таким сидерофильным организмом

является *Vibrio vulnificus*, вызывающий редкие, но чрезвычайно тяжелые инфекции в прибрежных населенных пунктах, часто у пациентов с недиагностированным перенасыщением железом. Исследования на животных, которым инокулировали летальные дозы *Vibrio vulnificus*, показали почти 100%-ную выживаемость при лечении белками, являющимися миметиками гепсидина, инактивирующими ферропортин, вне зависимости от того, когда начинали лечение – до или после инфицирования (Arezes et al 2015).

В качестве известных миметиков гепсидина можно указать так называемые минигепсидины, описанные, например, в WO 2013/086143. Минигепсидины представляют собой малоразмерные синтетические пептидные аналоги N-конца гепсидина, который отвечает за взаимодействие гепсидина с ферропортином. Минигепсидины были разработаны на основе открытия того факта, что первых 9 аминокислот гепсидина (DTNFPICIF) достаточно для проявления активности *in vitro* (измеряется по разрушению ферропортин-GFP). Минигепсидины содержат модифицированную последовательность девяти аминокислот гепсидина для повышения устойчивости к протеолизу и усиления биофизического взаимодействия с ферропортином. Описано, что минигепсидины могут применяться для лечения состояний перенасыщения железом у людей, вызванных дефицитом гепсидина.

В WO 2015/069660 описаны способы усиления выработки гепсидина для лечения состояний перенасыщений железом посредством снижения содержания свободного железа (NTBI) введением модифицированного железосвязывающего/высвобождающего трансферрина.

Все описанные соединения, работающие как агонисты гепсидина, миметики гепсидина или ингибиторы ферропортина и т.д., являются соединениями с относительно высоким молекулярным весом, в особенности те, которые получают главным образом методами геной инженерии. Были описаны различные другие подходы на основе биомолекулярных взаимодействий и биомолекул. Недостатками являются сложное получение и высокая чувствительность таких биомолекулярных соединений. В частности, методы, основанные на антителах к ферропортину, недостаточно эффективны, поскольку подавляемый антителами ферропортин непрерывно воспроизводится организмом, и поэтому подавление недостаточно длительное для достижения целевого терапевтического эффекта.

Известны также низкомолекулярные соединения, которые участвуют в обмене железа и могут оказывать ингибирующий или промотирующий эффект.

Например, в WO 2008/151288, WO 2008/118790, WO 2008/115999 и WO

2008/109840 описаны соединения, работающие как ингибиторы транспортера двухвалентных металлов 1 (DMT1), и их применение для лечения таких нарушений обмена железа, как талассемия или гемохроматоз.

В WO 2008/123093 описан агент для профилактики или лечения состояний перенасыщения железом, представляющий собой 22 бета-метоксиолеан-12-ен-3 бета,24(4 бета)-диол.

EP 1074254 и EP1072265 касаются применения растительных полифенолов с катехиновой и флавоноидной структурой для лечения перенасыщения железом.

WO 2011/029832 касается тиазольных и оксазольных соединений, которые работают как антагонисты гепсидина и поэтому описаны как подходящие для лечения заболеваний, связанных с дефицитом железа. В этом документе описано, что гепсидин-антагонистическая активность ингибирует подавление ферропортина гепсидином, что представляет собой эффект, противоположный обнаруженному авторами настоящего изобретения для новых тиазольных и оксазольных соединений.

В неопубликованных международных заявках на патент PCT/EP2016/075305 и PCT/EP2016/075306 описаны соединения, обладающие активностью в качестве ингибиторов ферропортина, которые перекрываются с некоторыми соединениями, имеющими формулу (I) по настоящему изобретению, и в целом находятся в форме свободных оснований и/или их фармацевтически приемлемых солей. В этих международных заявках на патент указан общий список возможных кислот для фармацевтически приемлемых солей. Кроме того, в этих международных заявках на патент указаны некоторые частные примеры соединений в форме 2HCl солей, 3HCl солей или 4HCl солей, из которых только некоторые частные примеры HCl-солей перекрываются с некоторыми соединениями, имеющими формулу (I) по настоящему изобретению. Соответственно, в настоящем изобретении описан новый набор очень специфичной группы соединений, имеющих формулу (I), находящихся в форме соли (вместо свободного основания или смесей солей и свободных оснований) и дополнительно характеризуемых новой подборкой специфических соотношений противоионов (свободное основание/соединение (I) : кислота).

Химические соединения, и их соли, на основе структур, имеющих общую формулу (I) по настоящему изобретению, до настоящего момента не были описаны в связи с их активностью в качестве ингибиторов ферропортина или для применения в профилактике и лечении нарушений метаболизма железа, связанных с повышенным уровнем железа, таких как перенасыщение железом.

В US 2004/0138268 A1, US 2011/0224136 A1, CN 103508957, WO 2006/062224 A1,

WO 2015/051362 A1, EP 1953145 A1, WO 2009/154739 A2, GB 937878 A, WO 2011/023722 A1, WO 2010/020556 A1, WO 2005/011685 A1, WO 00/56724 A1, WO 2010/036632 A1, WO 2005/014576 A1, WO 2013/067578 A1, WO 2005/116355 A1, EP 1 889 842 A1, US 2013/303508 A1, WO 98/27108 A2, WO 2006/040646 A1, WO2010/078408 A1 или в работе Ashish K. Pathak et al. "Solution-Phase Parallel Synthesis of Acyclic Nucleoside Libraries of Purine, Pyrimidine, and Triazole Acetamides", ACS Combinatorial Science Vol. 16, No. 9, pages 485-493, 2014, Zou Yiquan et al. "Discovery of pyrazole as C-terminus of selective BACE1 inhibitors"; Eur. J. of Medicinal Chemistry 68 (2013) 270-283, Tussing-Humphreys et al. "Rethinking Iron Regulation and Assessment in Iron Deficiency, Anemia of Chronic Disease, and Obesity: Introducing Heparidin" J. Academy of Nutrition and Dietetics (2012), Vol. 122, No. 3, 391-400, Riordan et al. "Bleomycin analogs. Synthesis and proton ЯMP spectral assignments of thiazole amides related to bleomycin A2 (1)"; J. Heterocyclic Chem. 18, 1213 (1981), Hideaki Sasaki "Synthesis of a novel bis(2,4'-bithiazole) derivative as a Co(II)-activated DNA cleaving agent"; Chem. Pharm. Bull. 42(8) 1685-1687 (1994), и Ballell et al. "Fueling open-source drug discovery. 177 small-molecule leads against tuberculosis"; ChemMedChem 2013, 8, 313-321 описаны соединения для различных медицинских применений и имеющие различные механизмы действия.

Цель изобретения

Целью настоящего изобретения является разработка, в частности, новых терапевтически эффективных соединений, которые могут применяться для эффективной терапии в целях профилактики и лечения нарушений метаболизма железа, связанных с повышенным уровнем железа, таких как, в частности, перенасыщение железом. В рамках другой цели изобретения, указанные новые соединения должны демонстрировать мало побочных эффектов и иметь очень низкую токсичность и хорошую биодоступность и совместимость. Кроме того, данные новые соединения, в отличие от известных железо-хелатирующих соединений, должны быть подходящими для предотвращения повышения уровня железа и, тем самым, для профилактики соответствующих заболеваний, а не удаления избытка железа из организма, когда повышение уровня железа уже произошло. В рамках другой цели изобретения, указанные новые соединения должны иметь определенную структуру (стехиометрию), их получение должно происходить с применением простых методик синтеза, они должны проявлять меньшую сензитивность и улучшенную продолжительную эффективность по сравнению с известными биомолекулярными соединениями, такими как антитела.

В другом аспекте настоящего изобретения, новые соединения должны иметь оптимальную стабильность своих физических, химических и физикохимических

характеристик. В частности, для фармацевтического применения хорошая или улучшенная долговременная стабильность (стабильность при хранении) является важным аспектом для разработки новых фармацевтически активных соединений, сохраняющих свои физические, химические и физикохимические свойства в течение длительного времени. Также стабильность растворимости (т.е. стабильный профиль растворимости) важна для применения в фармацевтике. Поэтому другой целью настоящего изобретения является разработка новых соединений, описанных в настоящем тексте, имеющих хорошую или улучшенную долговременную стабильность, включая, например, уменьшенную потерю растворителя или ее полное отсутствие, и/или уменьшенную потерю массы при повышенных температурах или ее полное отсутствие, пониженную гигроскопичность или ее отсутствие, сохранение твердотельной структуры даже при длительном хранении при разных значениях температуры и влажности, устойчивость кристаллической формы к вакуумной сушке, высокую воспроизводимость с высокой чистотой и малым количеством побочных продуктов или продуктов разложения в способе получения, сохранение профиля растворимости даже в условиях длительного хранения при разных значениях температуры и влажности, а также комбинации перечисленных характеристик.

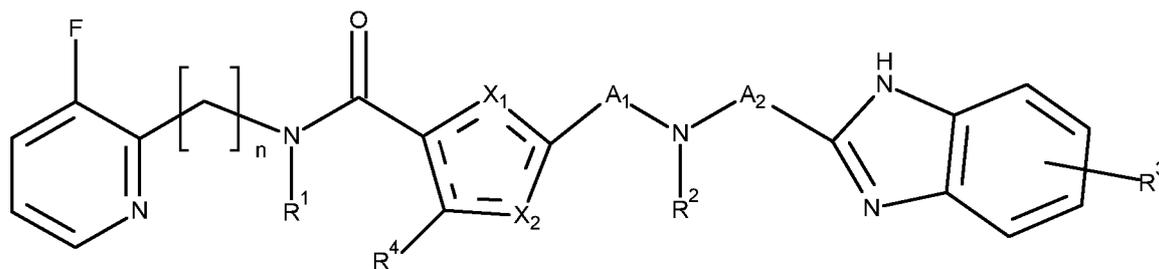
Указанная цель была достигнута путем разработки новых солей соединений, имеющих указанную в настоящем тексте формулу (I), которые, как было обнаружено, работают в качестве ингибиторов ферропортина, и благодаря этому могут применяться для подавления транспорта железа, и могут эффективно применяться в профилактике и лечении нарушений метаболизма железа, связанных с повышенным уровнем железа, таких как, в частности, перенасыщение железом, а также в профилактике и лечении заболеваний, вызванных недостатком гепсидина, заболеваний, связанных или вызванных повышенным уровнем железа или перенасыщением железом, и заболеваний, связанных с неэффективным эритропозом.

Описание изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что определенные соли соединений, имеющих общую структурную формулу (I), работают как ингибиторы ферропортина, тем самым эффективно подавляя транспорт железа, и могут применяться в качестве лекарственных средств, в частности для лечения и/или профилактики заболеваний, вызванных недостатком гепсидина, заболеваний, связанных с неэффективным эритропозом, или нарушений метаболизма железа, приводящих к повышению уровня железа, таких как, в частности, состояния перенасыщения железом, такие как, в частности, талассемия, серповидноклеточная анемия и гемохроматоз. В

особенности, новые соединения оказались подходящими для лечения талассемии, серповидноклеточной анемии и гемохроматоза. Указанные новые соединения также могут применяться для лечения заболеваний, вызванных патологически низким уровнем гепсидина, и для подавления транспорта железа.

Соответственно, настоящее изобретение касается новых солей соединений, имеющих общую формулу (I)



где

X_1 представляет собой N или O; и

X_2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X_1 и X_2 разные;

R^1 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода и
- необязательно замещенного алкила;

n представляет собой целое число от 1 до 3;

A^1 и A^2 независимо выбраны из группы, состоящей из алкандиила;

R^2 представляет собой

- атом водорода или
- необязательно замещенный алкил;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют необязательно замещенное 4-6-членное кольцо;

R^3 обозначает 1, 2 или 3 опциональных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена,
- циано-группы,
- необязательно замещенного алкила,
- необязательно замещенной алкокси-группы и
- карбоксильной группы;

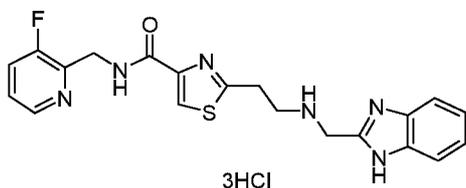
R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода,
- галогена,
- C₁-C₃-алкила, и
- галоген-замещенного алкила;

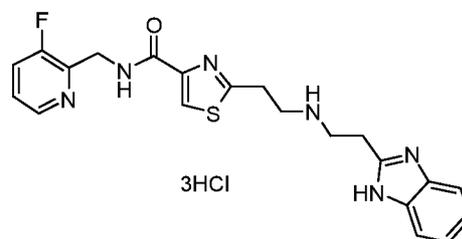
где указанные соли выбраны из солей соединений, имеющих формулу (I), с кислотами, выбранными из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислоты, метансульфокислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и толуолсульфокислоты, отличающихся тем, что соотношение соединение (I) : кислота составляет от 1 : 2 до 1 : 3; и

где исключены следующие 3HCl-соли:

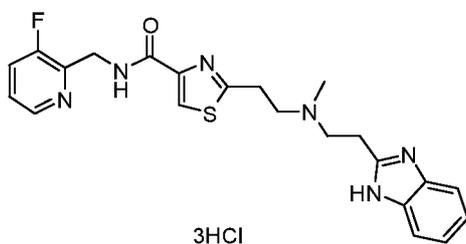
Прим. 40:



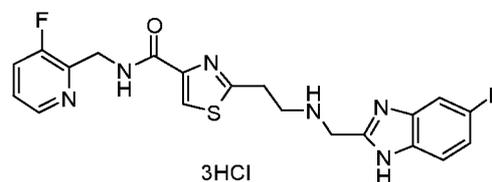
Прим. 94:



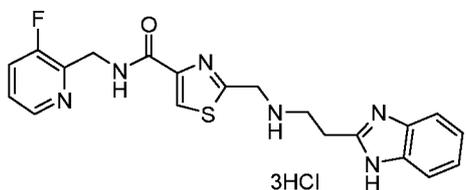
Прим. 112:



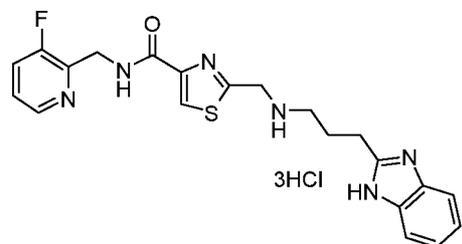
Прим. 114:



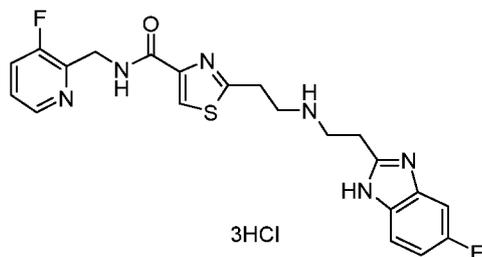
Прим. 118:



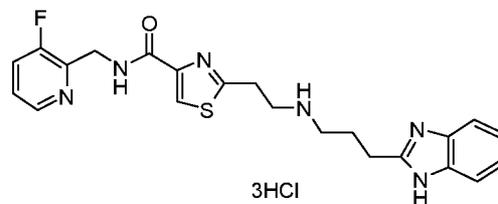
Прим. 119:



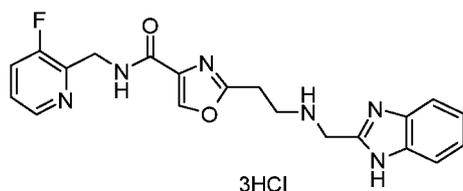
Прим. 120:



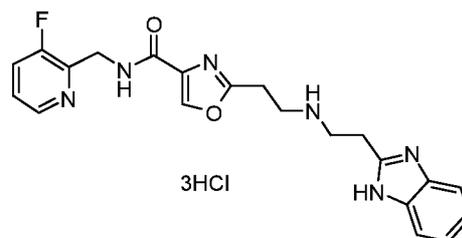
Прим. 125:



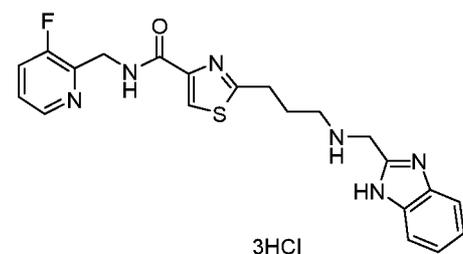
Прим. 126:



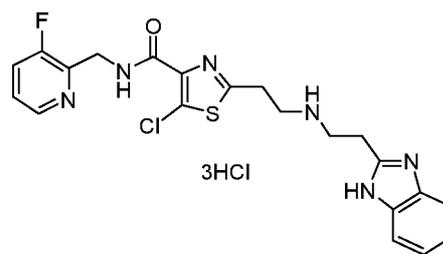
Прим. 127:



Прим. 134:



Прим. 154:



В контексте настоящего изобретения, указанные выше группы-заместители имеют указанные ниже определения:

Необязательно замещенный алкил предпочтительно включает:

линейный или разветвленный алкил, предпочтительно содержащий 1 - 8, более предпочтительно 1 - 6, особенно предпочтительно 1 - 4, еще более предпочтительно 1, 2 или 3 атомов углерода, обозначаемый также как C₁-C₄-алкил или C₁-C₃-алкил.

Необязательно замещенный алкил включает также циклоалкил, содержащий предпочтительно 3 - 8, более предпочтительно 5 или 6 атомов углерода.

Примеры алкильных остатков, содержащих 1 - 8 атомов углерода, включают: метильную группу, этильную группу, н-пропильную группу, изопропильную группу, н-бутильную группу, изобутильную группу, втор-бутильную группу, трет-бутильную группу, н-пентильную группу, изопентильную группу, втор-пентильную группу, трет-пентильную группу, 2-метилбутильную группу, н-гексильную группу, 1-метилпентильную группу, 2-метилпентильную группу, 3-метилпентильную группу, 4-метилпентильную группу, 1-этилбутильную группу, 2-этилбутильную группу, 3-

этилбутильную группу, 1,1-диметилбутильную группу, 2,2-диметилбутильную группу, 3,3-диметилбутильную группу, 1-этил-1-метилпропильную группу, н-гептильную группу, 1-метилгексильную группу, 2-метилгексильную группу, 3-метилгексильную группу, 4-метилгексильную группу, 5-метилгексильную группу, 1-этилпентильную группу, 2-этилпентильную группу, 3-этилпентильную группу, 4-этилпентильную группу, 1,1-диметилпентильную группу, 2,2-диметилпентильную группу, 3,3-диметилпентильную группу, 4,4-диметилпентильную группу, 1-пропилбутильную группу, н-октильную группу, 1-метилгептильную группу, 2-метилгептильную группу, 3-метилгептильную группу, 4-метилгептильную группу, 5-метилгептильную группу, 6-метилгептильную группу, 1-этилгексильную группу, 2-этилгексильную группу, 3-этилгексильную группу, 4-этилгексильную группу, 5-этилгексильную группу, 1,1-диметилгексильную группу, 2,2-диметилгексильную группу, 3,3-диметилгексильную группу, 4,4-диметилгексильную группу, 5,5-диметилгексильную группу, 1-пропилпентильную группу, 2-пропилпентильную группу и т.д. Группы, содержащие 1 - 4 атомов углерода (C₁-C₄-алкил), такие как, в частности, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил, являются предпочтительными. C₁-C₃ алкил, в частности, метил, этил, пропил и изопропил, являются более предпочтительными. Наиболее предпочтительны C₁ и C₂ алкил, такие как метил и этил.

Циклоалкильные остатки, содержащие 3 - 8 атомов углерода, предпочтительно включают: циклопропильную группу, циклобутильную группу, циклопентильную группу, циклогексильную группу, циклогептильную группу и циклооктильную группу. Циклопропильная группа, циклобутильная группа, циклопентильная группа и циклогексильная группа являются предпочтительными. Циклопропильная группа особенно предпочтительна.

Заместители в описанном выше необязательно замещенном алкиле предпочтительно включают 1, 2 или 3 одинаковых или разных заместителей, выбранных, например, из группы, состоящей из: описанного выше галогена, такого как предпочтительно F, описанного выше циклоалкила, такого как предпочтительно циклопропил, описанного ниже необязательно замещенного гетероарила, такого как предпочтительно бензимидазолильная группа, описанной ниже необязательно замещенной аминогруппы, такой как предпочтительно аминогруппа или бензилоксикарбониламино-группа, карбоксильной группы, описанной ниже аминокарбонильной группы, а также из алкиленовой группы, такой как, в частности, метиленовая группа, формирующая, например, метилен-замещенную этильную группу

(CH₃-(C=CH₂)- или , где * обозначает точку присоединения).

В контексте настоящего изобретения, галоген включает фтор, хлор, бром и иод, предпочтительно фтор или хлор, наиболее предпочтительно фтор.

Примеры линейного или разветвленного алкильного остатка, замещенного галогеном и содержащего 1 - 8 атомов углерода, включают:

фторметильную группу, дифторметильную группу, трифторметильную группу, хлорметильную группу, дихлорметильную группу, трихлорметильную группу, бромметильную группу, дибромметильную группу, трибромметильную группу, 1-фторэтильную группу, 1-хлорэтильную группу, 1-бромэтильную группу, 2-фторэтильную группу, 2-хлорэтильную группу, 2-бромэтильную группу, дифторэтильную группу, такую как 1,2-дифторэтильную группу, 1,2-дихлорэтильную группу, 1,2-дибромэтильную группу, 2,2-дифторэтильную группу, 2,2-дихлорэтильную группу, 2,2-дибромэтильную группу, 2,2,2-трифторэтильную группу, гептафторэтильную группу, 1-фторпропильную группу, 1-хлорпропильную группу, 1-бромпропильную группу, 2-фторпропильную группу, 2-хлорпропильную группу, 2-бромпропильную группу, 3-фторпропильную группу, 3-хлорпропильную группу, 3-бромпропильную группу, 1,2-дифторпропильную группу, 1,2-дихлорпропильную группу, 1,2-дибромпропильную группу, 2,3-дифторпропильную группу, 2,3-дихлорпропильную группу, 2,3-дибромпропильную группу, 3,3,3-трифторпропильную группу, 2,2,3,3,3-пентафторпропильную группу, 2-фторбутильную группу, 2-хлорбутильную группу, 2-бромбутильную группу, 4-фторбутильную группу, 4-хлорбутильную группу, 4-бромбутильную группу, 4,4,4-трифторбутильную группу, 2,2,3,3,4,4,4-гептафторбутильную группу, перфторбутильную группу, 2-фторпентильную группу, 2-хлорпентильную группу, 2-бромпентильную группу, 5-фторпентильную группу, 5-хлорпентильную группу, 5-бромпентильную группу, перфторпентильную группу, 2-фторгексильную группу, 2-хлоргексильную группу, 2-бромгексильную группу, 6-фторгексильную группу, 6-хлоргексильную группу, 6-бромгексильную группу, перфторгексильную группу, 2-фторгептильную группу, 2-хлоргептильную группу, 2-бромгептильную группу, 7-фторгептильную группу, 7-хлоргептильную группу, 7-бромгептильную группу, перфторгептильную группу и т.д. особенно следует отметить фторалкил, дифторалкил и трифторалкил, а трифторметил и моно- и ди-фторэтил являются предпочтительными. Особенно предпочтителен трифторметил.

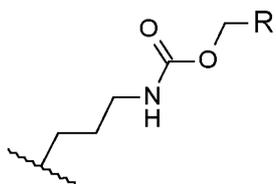
Примеры циклоалкил-замещенной алкильной группы включают перечисленные выше алкильные остатки, содержащие от 1 до 3, предпочтительно 1 циклоалкильную

группу, такие как, например: циклопропилметил, циклобутилметил, циклопентилметил, циклогексилметил, 2-циклопропилэтил, 2-циклобутилэтил, 2-циклопентилэтил, 2-циклогексилэтил, 2- или 3-циклопропилпропил, 2- или 3-циклобутилпропил, 2- или 3-циклопентилпропил, 2- или 3-циклогексилпропил и т.д. Предпочтительным является циклопропилметил.

Примеры гетероарил-замещенной алкильной группы включают указанные выше алкильные остатки, содержащие от 1 до 3, предпочтительно 1 (необязательно замещенную) гетероарильную группу, такую как, например, пиридинильную, пиридазинильную, пиримидинильную, пиазанильную, пиазолильную, имидазолильную, бензимидазолильную, тиофенильную или оксазолильную группу, такие как пиридин-2-ил-метил, пиридин-3-ил-метил, пиридин-4-ил-метил, 2-пиридин-2-ил-этил, 2-пиридин-1-ил-этил, 2-пиридин-3-ил-этил, пиридазин-3-ил-метил, пиримидин-2-ил-метил, пиримидин-4-ил-метил, пиазин-2-ил-метил, пиазол-3-ил-метил, пиазол-4-ил-метил, пиазол-5-ил-метил, имидазол-2-ил-метил, имидазол-5-ил-метил, бензимидазол-2-ил-метил, тиофен-2-ил-метил, тиофен-3-ил-метил, 1,3-оксазол-2-ил-метил.

Предпочтительной является алкильная группа, которая замещена бензимидазолильной группой, такая как бензимидазол-2-ил-метил и бензимидазол-2-ил-этил.

Примеры amino-замещенного алкильного остатка включают указанные выше алкильные остатки, содержащие 1 - 3, предпочтительно 1 (необязательно замещенную) описанную ниже аминогруппу, такую как, например, aminoалкил (NH_2 -алкил) или моно- или диалкиламино-алкил, такой как aminoметил, 2-aminoэтил, 2- или 3-aminoпропил, метиламинометил, метиламиноэтил, метиламинопропил, 2-этиламинометил, 3-этиламинометил, 2-этиламиноэтил, 3-этиламиноэтил и т.д., из которых предпочтительным является 3-aminoпропил, или алкильную группу, которая может быть замещена необязательно замещенной алкилоксикарбониламиногруппой, такую как группа, имеющая следующую формулу



, где R означает фенильную группу, формирующую бензилоксикарбониламинопропильную группу.

Необязательно замещенная aminoгруппа по настоящему изобретению предпочтительно включает: aminoгруппу ($-\text{NH}_2$), необязательно замещенную моно- или диалкиламино-группу (алкил-NH-, (алкил) $_2$ N-), где “алкил” имеет определение, указанное

выше для необязательно замещенного алкила. Предпочтительна моно- или диметиламино-группа, моно- или диэтиламино-группа и монопропиламино-группа. Наиболее предпочтительна аминогруппа (-NH₂) и монопропиламино-группа.

Кроме того, в контексте настоящего изобретения, карбоксильная группа означает группу [-(C=O)-OH], и аминокарбонильная группа означает группу [NH₂-(C=O)-].

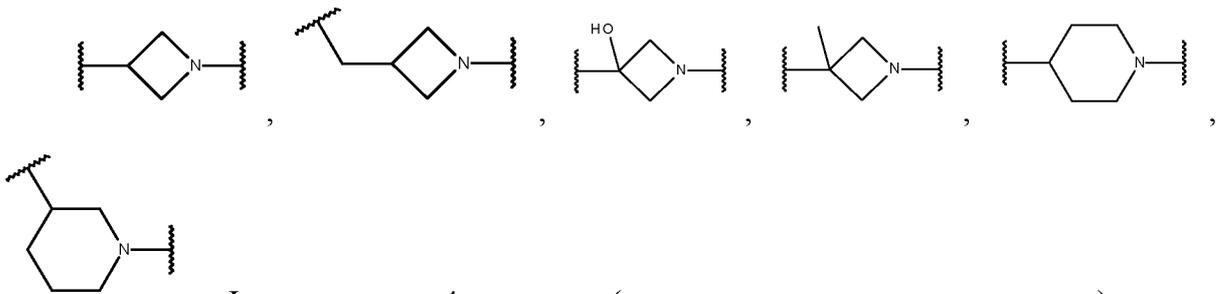
Необязательно замещенная алкокси-группа включает необязательно замещенную алкил-О-группу, где определение алкильной группы соответствует данному выше. Предпочтительными алкокси-группами являются линейные или разветвленные алкокси-группы, содержащие до 6 атомов углерода, такие как метокси-группа, этокси-группа, н-пропилокси-группа, изопрпилокси-группа, н-бутилокси-группа, изобутилокси-группа, втор-бутилокси-группа, трет-бутилокси-группа, н-пентилокси-группа, изо-пентилокси-группа, втор-пентилокси-группа, трет-пентилокси-группа, 2-метилбутокси-группа, н-гексилокси-группа, изо-гексилокси-группа, трет-гексилокси-группа, втор-гексилокси-группа, 2-метилпентилокси-группа, 3-метилпентилокси-группа, 1-этилбутилокси-группа, 2-этилбутилокси-группа, 1,1-диметилбутилокси-группа, 2,2-диметилбутилокси-группа, 3,3-диметилбутилокси-группа, 1-этил-1-метилпропилокси-группа, а также циклоалкилокси-группы, такие как циклопентилокси-группа или циклогексилокси-группа. Метокси-группа, этокси-группа, н-пропилокси-группа и изопрпилокси-группа являются предпочтительными. Метокси и этокси-группа более предпочтительны. Особенно предпочтительной является метокси-группа.

В контексте настоящего изобретения, необязательно замещенный алкандиил предпочтительно представляет собой двухвалентный линейный или разветвленный алкандиильный радикал, содержащий от 1 до 6, предпочтительно от 1 до 4, более предпочтительно 1, 2 или 3 атомов углерода, который может необязательно иметь 1 - 3, предпочтительно 1 или 2 заместителей, выбранных из группы, состоящей из галогена, гидроксила (-OH), оксо-группы (=O; формируя карбонильную или ацильную группу [-(C=O)-]) и алкильной группы, определение которой дано выше, например предпочтительно метил. Следующие группы можно указать в качестве предпочтительных примеров: метилен, этан-1,2-диил, этан-1,1-диил, пропан-1,3-диил, пропан-1,1-диил, пропан-1,2-диил, пропан-2,2-диил, бутан-1,4-диил, бутан-1,2-диил, бутан-1,3-диил, бутан-2,3-диил, бутан-1,1-диил, бутан-2,2-диил, бутан-3,3-диил, пентан-1,5-диил и т.д. Особенно предпочтительными являются метилен, этан-1,2-диил, этан-1,1-диил, пропан-1,3-диил, пропан-2,2-диил и бутан-2,2-диил. Наиболее предпочтительны метилен, этан-1,2-диил и пропан-1,3-диил.

Предпочтительным замещенным алкандиильным радикалом является гидрокси-

замещенный алкандиил, такой как гидроксизамещенный этандиил, оксозамещенный алкандиил, такой как оксозамещенный метилен или этандиильный радикал, формирующий карбонильную или ацильную (ацетильную) группу, галогензамещенная алкандиильная группа, такая как алкандиильная группа, замещенная одним или двумя атомами галогена, выбранными из F и Cl, предпочтительно 2,2-дифторэтандиил, или алкандиильная группа, замещенная метильной группой.

Согласно настоящему изобретению, возможно также, что A^1 , представляющий собой линейную или разветвленную алкандиильную группу, определение которой дано выше, и R^2 , представляющий собой необязательно замещенную алкильную группу, определение которой дано выше, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют необязательно замещенное 4-6-членное кольцо, которое может быть замещено 1 - 3 заместителями, указанными выше. Соответственно, A^1 и R^2 могут совместно формировать группу, имеющую одну из перечисленных ниже формул



и . Формирование 4-членного (замещенного или незамещенного) кольца

является предпочтительным, например, в особенности группа  . Точка связывания в левой части формулы указывает на место прямого связывания с гетероциклическим 5-членным кольцом между положениями X^1 и X^2 в формуле (I) по настоящему изобретению. Точка связывания в правой части формулы указывает точку присоединения к группе A^2 , представляющей собой алкандиильную группу, определение которой дано в настоящем тексте.

В формуле (I) по настоящему изобретению, n представляет собой целое число от 1 до 3, включая 1, 2 или 3, таким образом соответствуя метиленовой группе, этан-1,2-диильной группе или пропан-1,3-диильной группе. Более предпочтительно, n равен 1 или 2, и еще более предпочтительно n равен 1, соответствуя метиленовой группе.

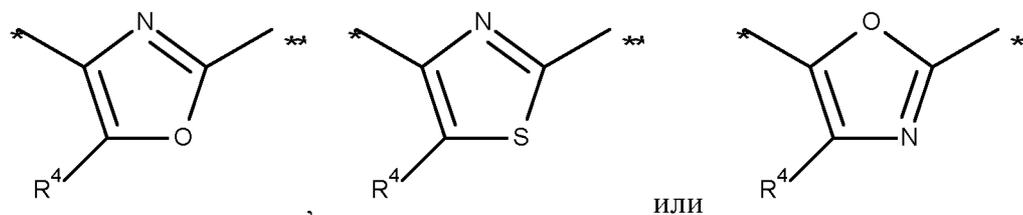
В настоящем изобретении отдельные заместители в приведенной выше формуле (I) могут иметь следующее значение:

A) X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 разные;

формируя тем самым 5-членные гетероциклы, имеющие формулы



где * указывает точку присоединения к аминокарбонильной группе, и ** указывает точку присоединения к A^1 -группе.

B) n представляет собой целое число, равное 1, 2 или 3; предпочтительно n равен 1 или 2, более предпочтительно n равен 1.

C) R^1 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода и

- необязательно замещенного алкила (определение дано выше);

предпочтительно R^1 представляет собой атом водорода или метил, более предпочтительно R^1 представляет собой атом водорода.

D) R^2 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода, и

- необязательно замещенного алкила (определение дано выше);

предпочтительно R^2 представляет собой атом водорода или C_1 - C_4 -алкил, более предпочтительно R^2 представляет собой атом водорода или метил, еще более предпочтительно R^2 представляет собой атом водорода.

E) R^3 обозначает 1, 2 или 3 опциональных заместителя, которые могут

быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена (определение дано выше),

- циано-группы,

- необязательно замещенного алкила (определение дано выше),

- необязательно замещенной алкокси-группы (определение дано выше), и

- карбоксильной группы (определение дано выше);

предпочтительно R^3 обозначает 1 или 2 опциональных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена,

- циано-группы,

- алкила (определение дано выше), который может быть замещен 1, 2 или 3 атомами галогена (определение дано выше),

- необязательно замещенной алкокси-группы (определение дано выше), и

- карбоксильной группы (определение дано выше);
 более предпочтительно R^3 обозначает 1 или 2 опциональных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- F и Cl,
- циано-группы,
- трифторметила,
- метокси-группы и
- карбоксильной группы;

еще более предпочтительно R^3 представляет собой атом водорода, что означает незамещенный терминальный бензимидазолильный цикл в формуле (I)

F) R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода,
- галогена (определение дано выше),
- C_1 - C_3 -алкила, и
- галоген-замещенного алкила (определение дано выше);

предпочтительно R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода
- Cl,
- метила, этила, изопропила и
- трифторметила;

более предпочтительно R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода,
- Cl,
- метила и
- трифторметила;

более предпочтительно R^4 выбран из группы, состоящей из

- атом водорода,
- Cl и
- метила,

еще более предпочтительно R^4 представляет собой атом водорода.

G) A^1 представляет собой алкандиил,

предпочтительно A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил, более предпочтительно A^1 представляет собой этан-1,2-диил.

H) A^2 представляет собой алкандиил,

предпочтительно A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-

диил,

более предпочтительно A^2 представляет собой метилен или этан-1,2-диил, еще более предпочтительно A^2 представляет собой этан-1,2-диил.

I) или A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют необязательно замещенное 4-6-членное кольцо, определение которого дано выше;

где A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, предпочтительно формируют необязательно замещенное 4-членное кольцо, определение которого дано выше,

где A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, более предпочтительно формируют незамещенное 4-членное кольцо (азетидинильное кольцо).

В перечисленных вариантах заместители в соединениях, имеющих формулу (I), могут в частности иметь следующие значения:

n имеет любое из значений, указанных выше в B), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A) и C) - I).

R^1 имеет любое из значений, указанных выше в C), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A), B) и D) - I).

R^2 имеет любое из значений, указанных выше в D), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A) - C) и E) - H) или I).

R^3 имеет любое из значений, указанных выше в E), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A) - D) и F) - I).

R^4 имеет любое из значений, указанных выше в F), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A) - E) и G) - I).

A^1 имеет любое из значений, указанных выше в G), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A) - F) и H) или I).

A^2 имеет любое из значений, указанных выше в H), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A) - G) и I).

R^2 и A^1 имеют любое из значений, указанных в I), и остальные заместители могут иметь любое из значений, указанных в A) - C), E), F) и H).

Предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается новых солей соединений, имеющих приведенную выше общую формулу (I), где

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 разные;

R^1 представляет собой атом водорода;

n равен 1, 2 или 3;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой атом водорода или C_1 - C_4 -алкил;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют необязательно замещенное 4-членное кольцо;

R^3 обозначает 1 или 2 опциональных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена,
- циано-группы,
- алкила, который может быть замещен 1, 2 или 3 атомами галогена,
- необязательно замещенной алкокси-группы и
- карбоксильной группы;

R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода
- Cl ,
- метила, этила, изопропила, и
- трифторметила;

где указанные соли выбраны из солей соединений, имеющих формулу (I), с кислотами, выбранными из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, fumarовой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислоты, метансульфокислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и толуолсульфокислоты, отличающихся тем, что соотношение соединения (I) : кислота составляет от 1 к 2 до 1 к 3; и

где исключены указанные выше $xHCl$ соли.

Другой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается новых солей соединений, имеющих приведенную выше общую формулу (I), где

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 разные;

R^1 представляет собой атом водорода;

n равен 1 или 2;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой атом водорода или метил;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют незамещенное 4-членное кольцо;

R^3 обозначает 1 или 2 опциональных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- F и Cl,
- циано-группы,
- трифторметила,
- метокси-группы, и
- карбоксильной группы;

R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода,
- Cl,
- метила, и
- трифторметила;

где указанные соли выбраны из солей соединений, имеющих формулу (I), с кислотами, выбранными из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, fumarовой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, maleиновой кислоты, метансульфоkислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и toлуолсульфоkислоты, отличающихся тем, что соотношение соединения (I) : кислота составляет от 1 к 2 до 1 к 3; и

где исключены указанные выше $x\text{HCl}$ соли.

Другой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается новых солей соединений, имеющих приведенную выше общую формулу (I), где

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 разные;

R^1 представляет собой атом водорода;

n равен 1;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой атом водорода;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют

незамещенное 4-членное кольцо;

R^3 означает атом водорода, что соответствует формированию незамещенного терминального бензимидазолильного кольца;

R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода,
- Cl, и
- метила;

где указанные соли выбраны из солей соединений, имеющих формулу (I), с кислотами, выбранными из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, fumarовой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислоты, метансульфокислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и толуолсульфокислоты, отличающихся тем, что соотношение соединения (I) : кислота составляет от 1 к 2 до 1 к 3; и

где исключены указанные выше $x3HCl$ соли.

Другой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается новых солей соединений, имеющих приведенную выше общую формулу (I), где

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 разные;

R^1 представляет собой атом водорода;

n равен 1;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой атом водорода;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют незамещенное 4-членное кольцо;

R^3 означает атом водорода, что соответствует формированию незамещенного терминального бензимидазолильного кольца; и

R^4 представляет собой атом водорода;

где указанные соли выбраны из солей соединений, имеющих формулу (I), с кислотами, выбранными из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, fumarовой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислоты, метансульфокислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и толуолсульфокислоты, отличающихся тем,

что соотношение соединения (I) : кислота составляет от 1 к 2 до 1 к 3; и

где исключены указанные выше $x\text{HCl}$ соли.

Другой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается новых солей соединений, имеющих приведенную выше общую формулу (I), где

$n = 1$;

$R^3 =$ атом водорода;

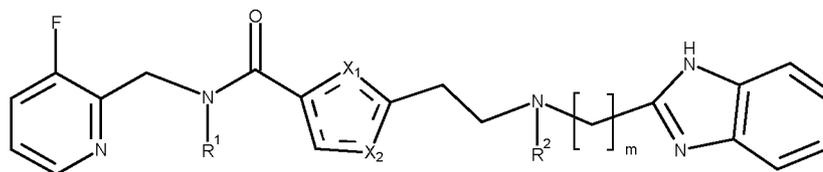
$R^4 =$ атом водорода;

$A^1 =$ этан-1,2-диил;

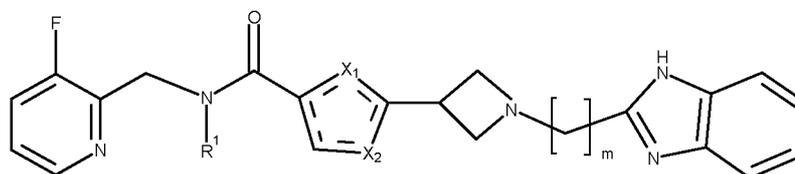
$A^2 =$ метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

$R^2 =$ атом водорода;

или A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют необязательно замещенное 4-членное кольцо, формируя соединения, имеющие приведенную ниже формулу (II) или (III):



(II)



(III),

где в формуле (II) и (III)

m представляет собой целое число 1, 2 или 3 и

X^1 , X^2 , и R^1 имеют значения, указанные выше в любом варианте осуществления настоящего изобретения, включающем соединения, имеющие формулу (I).

В частности, в формулах (II) и (III), X^1 и X^2 имеют значение, указанное выше в А).

В формуле (II), R^1 и R^2 предпочтительно представляют собой атом водорода.

В формуле (III), R^1 предпочтительно представляет собой атом водорода, и m предпочтительно равен 2.

Другой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается новых солей соединений, имеющих приведенную выше общую формулу (II), где

X^1 и X^2 выбраны из N и O, и отличаются друг от друга;

$R^1 =$ атом водорода;

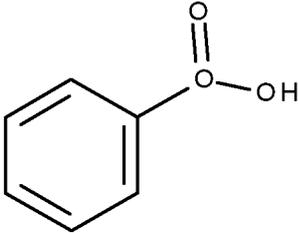
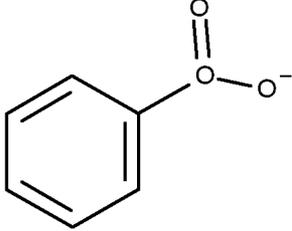
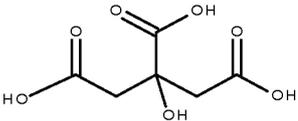
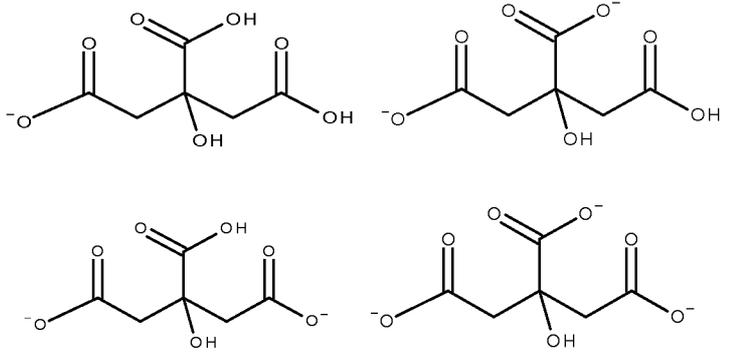
R^2 = атом водорода; и

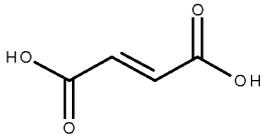
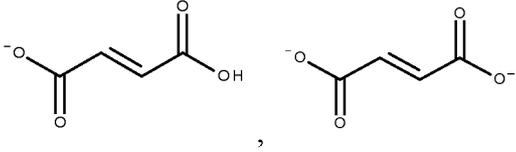
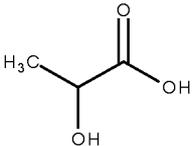
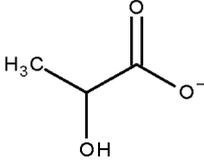
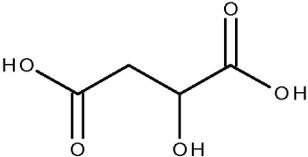
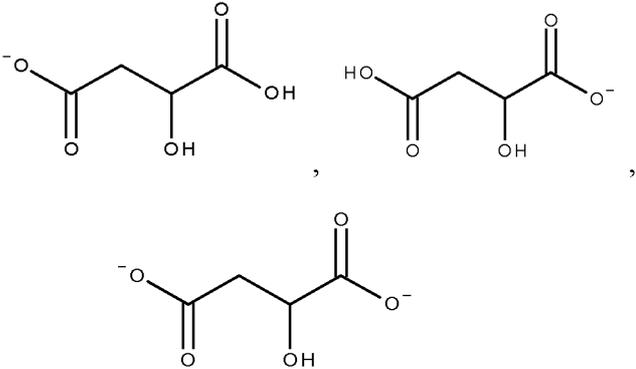
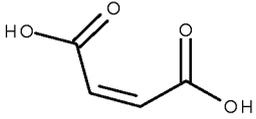
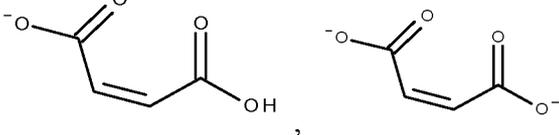
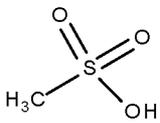
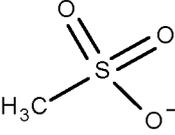
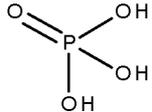
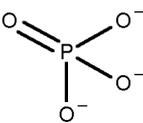
$m = 2$.

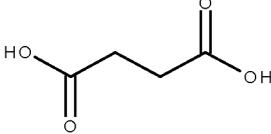
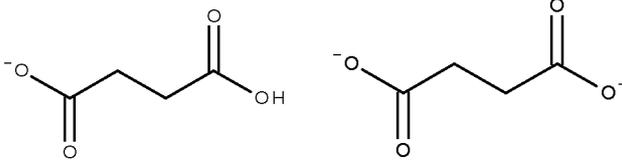
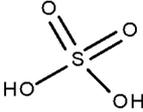
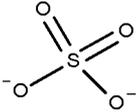
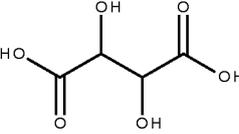
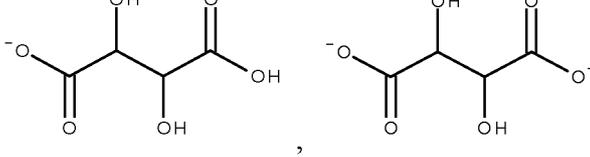
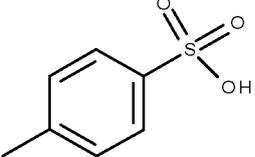
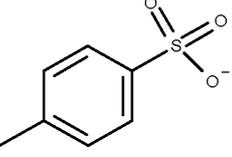
Далее в тексте соединения (I), (II) или (III), образующие соли по настоящему изобретению, именуется также “основание” или “свободное основание”. Соединения, имеющие формулу (I), (II) или (III), в форме свободного основания содержат по меньшей мере одну основную группу, такую как аминогруппы, с которыми могут связываться кислотные группы.

Согласно настоящему изобретению, соли соединений, имеющих формулу (I), (II) или (III) по любому из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, могут быть выбраны из солей, имеющих соотношение основание (соединение (I), (II) или (III)) : кислота от 1:2 до 1:3, где солеобразующие кислоты соответствуют перечисленной выше выборке.

Настоящее изобретение охватывает также смешанные соли основания (соединение (I), (II) или (III)) с одной или больше из перечисленных выше кислот, которые могут иметь одинаковое или разные соотношения основание/кислота согласно настоящему изобретению. Кислоты предоставляют протиовион для катионной формы соединения (I), (II) или (III). Соответственно, выбранные кислоты по настоящему изобретению предоставляют следующие протиовионы:

кислота (аббревиатура)	анион(ы)
Бензойная кислота (BNZ) 	
Лимонная кислота (CIT) 	

кислота (аббревиатура)	анион(ы)
Фумаровая кислота (FUM) 	
Соляная кислота (HCL) HCl	Cl^-
молочная кислота/L-молочная кислота (LAC или LLAC) 	
яблочная кислота/L-яблочная кислота (MLA) 	
малеиновая кислота (MLE) 	
метансульфокислота (MES) 	
фосфорная кислота (PO4) 	PO_4^{3-} 

кислота (аббревиатура)	анион(ы)
янтарная кислота (SUC) 	
серная кислота (SO4) 	SO_4^{2-} 
винная кислота/L-винная кислота (TAR или LTAR) 	
толуолсульфокислота (TOS) 	

Согласно настоящему изобретению, соли соединений (I), (II) или (III) отличаются выбранным соотношением основание : кислота, т.е. соединение (I), (II) или (III) : перечисленные выше кислоты, в диапазоне 1.0 - 2.0 (моль основания) : 1.0 - 3.0 (моль кислоты). В частном варианте осуществления, выбранное соотношение кислота : основание составляет 1.0 - 2.0 (моль основания) : 1.0 - 2.0 (моль кислоты).

Частные примеры включают следующие соотношения основание : кислота, т.е. соединение (I), (II) или (III) : перечисленные выше кислоты:

- 1.0 (моль основания) : 1.0 (моль кислоты);
- 1.0 (моль основания) : 1.25 (моль кислоты);
- 1.0 (моль основания) : 1.35 (моль кислоты);
- 1.0 (моль основания) : 1.5 (моль кислоты);
- 1.0 (моль основания) : 1.75 (моль кислоты);
- 1.0 (моль основания) : 2.0 (моль кислоты); и
- 2.0 (моль основания) : 1.0 (моль кислоты).

В контексте настоящего изобретения, соль с соотношением кислота : основание = 1

: 1, называют также “моно-соль” или “1 : 1 соль”. Например, моно-HCl соль обозначается также как 1HCl или 1HCl соль.

В контексте настоящего изобретения, соль с соотношением кислота : основание = 1 : 2, называют также “ди-соль” или “1 : 2 соль”. Например, ди-HCl соль обозначается также как 2HCl или 2HCl соль.

В контексте настоящего изобретения, соль с соотношением кислота : основание = 1 : 3, называют также “три-соль”, “тройная соль” или “1 : 3 соль”. Например, три-HCl соль обозначается также как 3HCl или 3HCl соль.

Соль, имеющую соотношение основание:кислота = 1 : 1.25, называют также “1 : 1.25 соль”.

Соль, имеющую соотношение основание:кислота = 1 : 1.35, называют также “1 : 1.35 соль”.

Соль, имеющую соотношение основание:кислота = 1 : 1.5, называют также “1 : 1.5 соль”.

Соль, имеющую соотношение основание:кислота = 1 : 1.75, называют также “1 : 1.75 соль”.

Соль, имеющую соотношение основание:кислота = 2 : 1, называют также “геми-соль” или “2 : 1 соль”.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соли соединений, имеющих приведенную выше формулу (I), выбраны из моно-солей (1 : 1 солей) с одной или больше из перечисленных выше кислот.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения касается описанных выше солей соединений, имеющих формулу (I), (II) или (III), где кислоты выбраны из группы, состоящей из лимонной кислоты, соляной кислоты, малеиновой кислоты, фосфорной кислоты и серной кислоты.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения касается описанных выше солей соединений, имеющих формулу (I), (II) или (III), где кислоты выбраны из группы, состоящей из фосфорной кислоты и серной кислоты.

Соли соединений по настоящему изобретению могут присутствовать в аморфной, полиморфной, кристаллической и/или полукристаллической (частично кристаллической) форме, а также в форме сольвата соли.

Предпочтительно, соли по настоящему изобретению присутствуют в кристаллической и/или полукристаллической (частично кристаллической) форме и/или в форме их сольватов.

Предпочтительную кристалличность солей или сольватов солей по настоящему

изобретению можно определить с помощью стандартных аналитических методов, например, в особенности, с помощью различных рентгеновских методик, которые позволяют провести четкий и простой анализ солей соединений. В частности, степень кристалличности можно определить или подтвердить с помощью методик порошковой рентгеновской дифракции (отражения), как описано, например, ниже в Примерах, или с помощью методик порошковой рентгеновской дифракции (пропускания), как описано, например, ниже в Примерах (оба метода в настоящем тексте обозначаются аббревиатурой PXRD). Для кристаллических твердых веществ, имеющих одинаковый химический состав, разные характеристики кристаллов в общем называют термином полиморфизм.

Предпочтительно, соли по настоящему изобретению имеют степень кристалличности выше 30%, более предпочтительно выше 40%, еще более предпочтительно выше 50%, например, по меньшей мере 55-60%, согласно определению, описанному в настоящем тексте методом PXRD.

Соли по настоящему изобретению могут присутствовать в виде сольватов и/или гидратов, которые могут образовываться путем притяжения, ассоциации, адсорбции, адгезии, объединения или комплексообразования молекул растворителя в кристаллической решетке солей по настоящему изобретению. Молекулы растворителя, которые могут входить в кристаллическую решетку, могут представлять собой молекулы растворителей, применявшихся для кристаллизации, а также молекулы воды из окружающей среды.

Растворители, применяемые для кристаллизации, включают ацетонитрил, дихлорметан, спирты, такие как, в частности, метанол, этанол, 2-пропанол (изо-пропанол), альдегиды, кетоны, в особенности ацетон, простые эфиры, например, тетрагидрофуран (ТГФ) или диоксан, сложные эфиры, например, этилацетат, или алканы, такие как, в особенности, пентан, гексан, гептан или циклогексан, и воду, а также их смеси. Предпочтительные растворители, применяемые для кристаллизации, выбраны из группы, состоящей из ацетонитрила, дихлорметана, метанола, этанола, 2-пропанола, этилацетата, ТГФ, воды и их смесей.

Особенно предпочтительные растворители, применяемые для кристаллизации, выбраны из группы, состоящей из ацетонитрила, метанола, этанола, 2-пропанола, этилацетата, ТГФ, воды и их смесей. Предпочтительные смеси вода/растворитель включают смеси воды и ацетона, смеси воды и этанола, и смеси воды и метанола, где предпочтительными являются смеси воды и этанола, а также смеси воды и метанола.

Особенно предпочтительные растворители, применяемые для кристаллизации, выбраны из группы, состоящей из ацетонитрила, дихлорметана, этанола, 2-пропанола

(изо-пропанола), ацетона и этилацетата, а также их смеси с водой, такие как, в частности, смеси этанола и воды, и смеси ацетона и воды. Особенно предпочтительными смесями являются следующие смеси растворителя и воды (все приведенные в настоящем тексте соотношения в смесях растворителей представляют собой соотношения по объему):

- ацетон : вода = 9 : 1 (об : об)
- ацетон : вода = 95 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 4 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 3 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 8 : 2 (об : об).

Степень, в которой выбранный растворитель или вода склонны к образованию сольвата или гидрата при кристаллизации и на последующих стадиях процесса, или они дают свободное основание, в целом не поддается предсказанию и зависит от комбинации условий процесса и различных взаимодействий между конкретным соединением (I), противоионом из выбранной кислоты и выбранным растворителем или влагой окружающей среды. Сольваты или гидраты солей могут быть предпочтительны, поскольку молекулы растворителя или воды в кристаллической структуре связаны сильными межмолекулярными силами и поэтому могут представлять собой структурный элемент таких кристаллов, что, в свою очередь, может улучшать стабильность соли. Однако, молекулы растворителя и/или воды тоже находятся в определенных кристаллических решетках, которые связаны довольно слабыми межмолекулярными силами. Такие молекулы более или менее интегрированы в образующуюся кристаллическую структуру, но с меньшим энергетическим эффектом. Содержание растворителя и/или воды в сольватах зависит также от условий сушки и от условий окружающей среды (т.е. относительной влажности). В случае стабильных сольватов или гидратов, обычно имеют место четкие стехиометрические соотношения между действующим веществом (т.е. солью по настоящему изобретению) и растворителем или водой. Во многих случаях эти соотношения неполностью соответствуют стехиометрическим соотношениям, обычно оно несколько меньше теоретического из-за определенных дефектов кристаллов. Соотношение органических молекул и молекул растворителя или воды для более слабо связанной воды может варьироваться в заметной степени, например, вплоть до ди-, три- или тетра-гидратов. С другой стороны, в аморфных твердых веществах содержание растворителя и/или воды в молекулярной структуре не стехиометрическое; оно может оказаться стехиометрическим только случайно. В некоторых случаях невозможно определить точную стехиометрию содержания молекул растворителя или воды, поскольку образуется слоистая структура, и нельзя с

уверенностью определить содержание включенных молекул растворителя или воды.

Содержание растворителя и/или воды в аморфных твердых веществах, а также в кристаллических сольватах, можно в целом определить общеизвестными методами, такими как, например, хорошо известный метод титрования по Карлу Фишеру, метод динамической сорбции паров (ДСП), метод термогравиметрического анализа (ТГ-ИК-Фурье), как описано, например, ниже в Примерах. Кроме того, элементный анализ или методы структурного анализа, такие как ^1H -ЯМР спектроскопия или Рамановская спектроскопия (Фурье-Рамановская спектроскопия) могут дать информацию о степени образования сольвата или гидрата, и/или их можно использовать для подтверждения или валидации результатов измерений методом титрования по Карлу Фишеру, ДСП или ТГ-ИК-Фурье.

Примеры сольватов и/или гидратов по настоящему изобретению включают, например, полу- (0.5), моно-, сескви- (1.5), ди-, три-, тетра-, пента-, гекса-, гепта-, окта-, нона-, дека- и т.д. сольваты или гидраты, соответственно. Может иметь место также промежуточная степень сольватации, такая как сольватация с 2.5, 3.5, 4.5 и т.д. молекулами растворителя и/или воды.

Предпочтительные примеры сольватов и/или гидратов включают гидраты, содержащие примерно 1.5, 2.5, 3, 4 и 7 молекул воды. Более предпочтительные примеры сольватов и/или гидратов включают гидраты, содержащие примерно 0.5, 1.5, 2.5, 3, 4, 6 и 7 молекул воды. Безводные соли также являются предпочтительными. Возможно также, что молекулы растворителя и/или воды присутствуют в соли в нестехиометрических количествах.

Кроме того, возможно присутствие в соли смесей воды и растворителя, что дает так называемые смешанные гидрат/сольватные формы. Примеры таких смешанных гидрат/сольватных форм включают, в частности

ацетон/вода, предпочтительно с соотношением 1 - 4 : 1; например, в частности 4 : 1;
метанол/вода, предпочтительно с соотношением 3 - 9 : 1; например, в частности 3 : 1, 4 : 1 и 9 : 1;

этанол/вода, предпочтительно с соотношением 1 - 4 : 1; например, в частности 3 : 1 и 4 : 1.

Любое упоминание солей по настоящему изобретению выше или ниже по тексту следует понимать как включающее также соответствующие сольваты, такие как гидраты, сольваты и смешанные гидрат/сольватные формы, и полиморфные модификации, а также аморфные формы, где это применимо и применимо.

Новые соли по настоящему изобретению демонстрируют хорошую растворимость,

они стабильны и сохраняют хорошее качество также при хранении и дистрибуции.

Соответствующую стабильность получаемых кристаллических или аморфных твердых соединений в форме солей, сольватов и гидратов (включая смешанные гидрат/сольватные формы), а также соответствующих сольватов солей или гидратов солей, можно определить стандартными экспериментальными методами. Улучшенная стабильность может включать улучшенные гигроскопические свойства, улучшенную энтальпию плавления. Важной характеристикой качества чистого действующего вещества, как для физико-химических процедур, таких как сушка, просеивание, размалывание, так и для процессов по приготовлению готовых фармацевтических форм, которые проводятся с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, а именно для процессов смешивания, гранулирования, сушки распылением, таблетирования, является поглощение воды или потеря воды этим действующим веществом в зависимости от температуры и относительной влажности окружающей среды. В случае некоторых готовых форм, свободная и связанная вода несомненно вводится вместе с вспомогательными веществами, и/или воду добавляют в обрабатываемую массу согласно процессу приготовления такой готовой формы. В этом случае фармацевтическое активное вещество контактирует с несвязанной водой в течение довольно длительного промежутка времени, в зависимости от температуры при различных процессах (парциальное давление паров). Поэтому очевидно, что особенно стабильные чистые вещества являются предпочтительными с точки зрения приготовления готовых фармацевтических форм и с точки зрения их применимости для всех стадий процессов приготовления готовых форм и для введения в состав различных дозированных форм.

Соли по настоящему изобретению могут существовать в выделенном и практически чистом виде, например, со степенью чистоты $\geq 65\%$, предпочтительно $\geq 70\%$, более предпочтительно $\geq 75\%$, более предпочтительно $\geq 80\%$.

В контексте настоящего изобретения, термин “соли” включает соответствующие сольваты, гидраты и смешанные гидрат/сольватные формы и т.д., а также их различные полиморфы, такие как, в частности, частные примеры полиморфов, описанные в настоящем тексте.

Соли по настоящему изобретению можно структурно характеризовать общепринятыми методами, таким как, например, элементный анализ, термогравиметрический анализ (ТГ-ИК-Фурье), ^1H -ЯМР спектроскопия и Рамановская спектроскопия (Фурье-Рамановская спектроскопия), дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для определения температуры плавления, как описано, например,

ниже в Примерах, а также комбинацией перечисленных методов, и в частности в комбинации с другими упомянутыми методами определения степени формирования сольвата/гидрата.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения касается способа получения описанных в настоящем тексте солей. Способ получения таких солей можно описать следующим образом:

Формирование солей проводят в системе растворителей, в которой два реагента, а именно соединение (I), (II) или (III) в форме основания и соответствующая кислота, в заметной степени растворимы. Удобно применять растворитель или смесь растворителей, в которой получаемая соль слабо растворима или совсем нерастворима, чтобы обеспечить кристаллизацию и выпадение соли в осадок. Одним из вариантов формирования соли по настоящему изобретению может быть применение растворителя, в котором соответствующая соль очень хорошо растворима, и затем добавление в полученный раствор анти-растворителя, то есть растворителя, в котором полученная соль имеет очень низкую растворимость. Другой вариант формирования соли включает концентрирование раствора соли, например, при нагревании, при необходимости в условиях пониженного давления, или медленным упариванием растворителя, например, при комнатной температуре, или путем добавления затравочных кристаллов, или достижением активности воды, необходимой для формирования гидрата. В этих случаях можно применять указанные выше растворители.

Для получения гидратов можно применять процессы растворения и кристаллизации или кристаллизационные процессы с уравниванием воды.

Процессы растворения и кристаллизации можно описать следующими стадиями:

- (i) соединение (I), (II) или (III) в виде свободного основания растворяют в органическом растворителе,
- (ii) выбранную кислоту из перечисленных выше, предпочтительно в виде водного раствора, добавляют в раствор, приготовленный на стадии (i),
- (iii) полученный раствор оставляют стоять для начала кристаллизации,
- (iv) выпавшие кристаллы отфильтровывают и сушат, получая соль.

В процессе растворения (i), применяемый растворитель предпочтительно представляет собой ацетонитрил, дихлорметан, метанол, этанол, 2-пропанол, этилацетат, ТГФ, воду и их смеси, более предпочтительно ацетонитрил, метанол, этанол, 2-пропанол, этилацетат, ТГФ, воду или их смеси, например, в частности смесь с водой, например, смесь этанола и воды, смесь метанола и воды, или смесь ацетона и воды. При необходимости растворитель можно нагревать до температуры выше комнатной,

например, 25-60°C, более предпочтительно 30-50°C.

На стадии (ii), применяемый водный раствор кислоты предпочтительно представляет собой 5-30%-ный, более предпочтительно 5-25%-ный, например, 10%-ный раствор соответствующей кислоты. В частности, соотношение кислота : основание составляет 1:1 (моль : моль). В случае применения фосфорной кислоты или серной кислоты можно также применять соотношение основание : кислота = 10 : 1 (моль : моль).

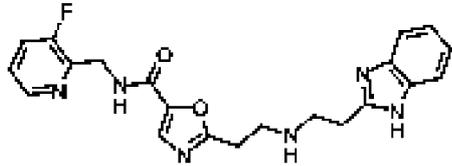
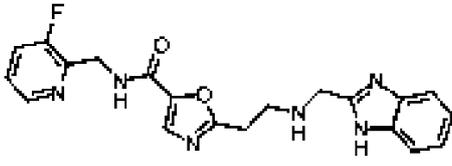
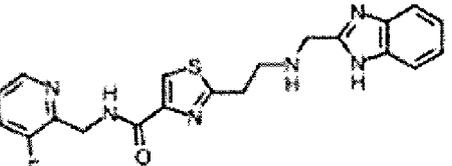
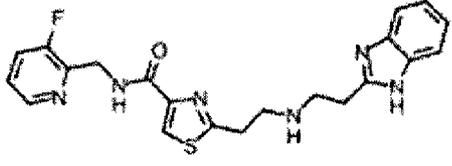
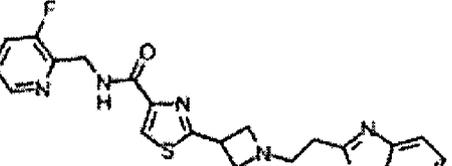
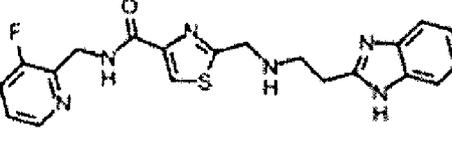
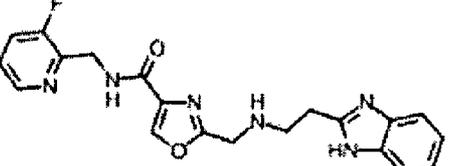
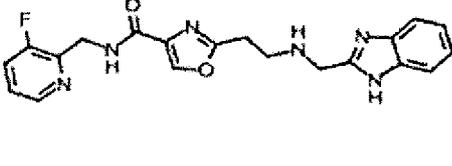
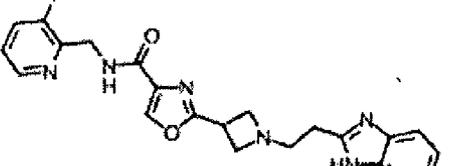
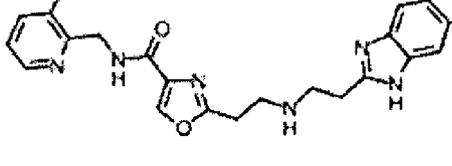
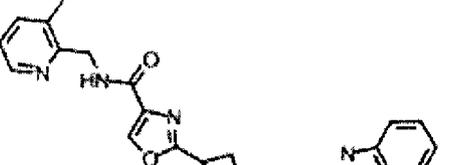
На стадии (iii), полученный раствор предпочтительно оставляют стоять для медленного испарения растворителя. Это предпочтительно осуществляют посредством охлаждения до комнатной температуры или ниже, более предпочтительно до температуры от -10 до 20°C, еще более предпочтительно до температуры от -5 до 10°C, наиболее предпочтительно от 0 до 5 °C. Альтернативно, концентрирование раствора может также происходить при нагревании до температуры выше комнатной, например, до температуры от >25 до 100°C, более предпочтительно от 30 до 70°C. Обычно оставляют на 8 - 48 часов, предпочтительно на 17 - 36 часов, более предпочтительно на 20 - 30 часов.

На стадии (iv), сушку предпочтительно проводят при повышенной температуре, более предпочтительно при 20 - 50°C, наиболее предпочтительно при 30 - 40°C. В любом случае сушку необходимо проводить при температурах ниже температуры плавления соответствующей соли. Давление предпочтительно выбирают в интервале от 1 до 100 мбар, предпочтительно от 10 до 50 мбар, более предпочтительно от 20 до 40 мбар, например, 30 мбар. Сушку обычно проводят до достижения постоянной массы. В зависимости от условий проведения сушки, сушка может занимать от 5 до 48 часов, предпочтительно от 10 до 24 часов, например, от 15 до 20 часов.

Можно также ускорить кристаллизацию путем добавления инициатора кристаллизации, такого как, например, по меньшей мере один затравочный кристалл.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, исключены 3HCl ($x3\text{HCl}$) соли соединений, подпадающих под приведенные выше общие формулы (I), (II) или (III).

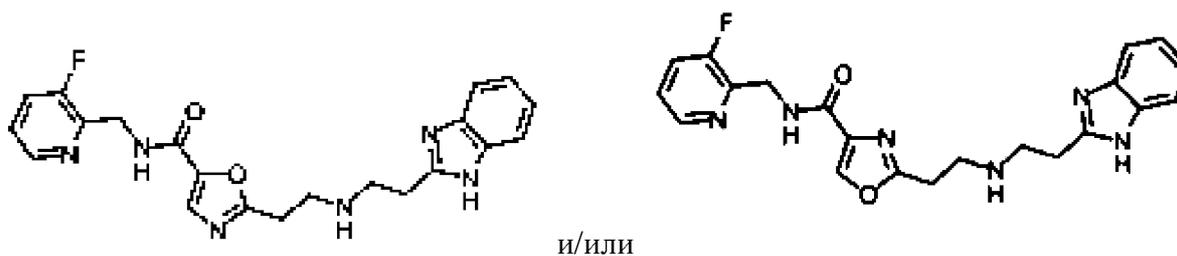
Частный вариант осуществления настоящего изобретения касается солей соединений, имеющих формулу (I), описанных в любом из приведенных выше вариантов осуществления, где соединения, имеющие формулу (I), выбраны из группы, состоящей из следующих соединений:

Прим.	Структура	Прим.	Структура
1		4	
2		40	
94		193	
118		206	
126		208	
127		233	

Более предпочтительно, соединения, имеющие формулу (I), выбраны из группы, состоящей из следующих соединений:

Прим.	Структура	Прим.	Структура
1		127	
40		208	
94			

Еще более предпочтительно, настоящее изобретение касается солей, описанных в любом из приведенных выше вариантов осуществления, где соединение, имеющее формулу (I), представляет собой



Другой особенно предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается солей соединений, имеющих формулу (I), описанных в любом из приведенных выше вариантов осуществления, где кислоты выбраны из группы, состоящей из фосфорной кислоты и серной кислоты.

Другой особенно предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается солей соединений, имеющих формулу (I), описанных в любом из приведенных выше вариантов осуществления, где растворители для кристаллизации выбраны из группы, состоящей из ацетонитрила, дихлорметана, этанола, 2-пропанола

(изопропанола), ацетона и этилацетата, а также из их смесей с водой, таких как, в частности, смеси этанола и воды и смеси ацетона и воды. Особенно предпочтительными смесями являются следующие смеси растворителя и воды:

- ацетон : вода = 9 : 1 (об : об)
- ацетон : вода = 95 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 4 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 3 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 8 : 2 (об : об).

Другой особенно предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается солей соединений, имеющих формулу (I), описанных в любом из приведенных выше вариантов осуществления, где кислота представляет собой фосфорную кислоту, и фосфатная соль отличается соотношением соединения (I) : кислота = 1-2 : 1, предпочтительно соотношением соединения (I) : кислота = 1 : 1 или 2 : 1.

Более предпочтительно, такие предпочтительные фосфатные соли получают кристаллизацией с применением растворителя из группы, состоящей из ацетонитрила, этанола, 2-пропанола (изо-пропанола), ацетона и этилацетата, а также их смесей с водой, таких как, в частности, смеси этанола и воды, и смеси ацетона и воды. Особенно предпочтительной смесью является смесь этанол : вода = 8 : 2.

Другой особенно предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается солей соединений, имеющих формулу (I), описанных в любом из приведенных выше вариантов осуществления, где кислота представляет собой серную кислоту, и сульфатная соль отличается соотношением соединения (I) : кислота = 1 : 1.

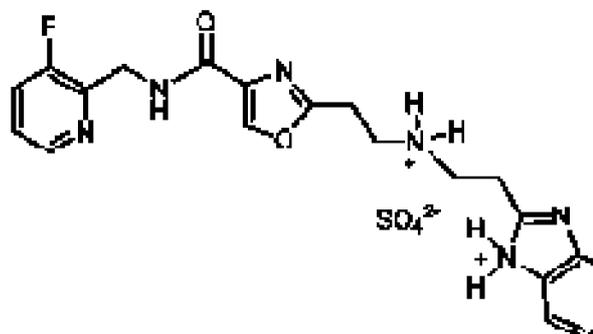
Более предпочтительно, такие предпочтительные сульфатные соли получают кристаллизацией с применением растворителя из группы, состоящей из ацетонитрила, дихлорметана, этанола, 2-пропанола (изо-пропанола) и ацетона, а также их смесей с водой, таких как, в частности, смеси этанола и воды, и смеси ацетона и воды. Особенно предпочтительная смесь выбрана из следующих смесей:

- ацетон : вода = 9 : 1 (об : об)
- ацетон : вода = 95 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 4 : 1 (об : об)
- этанол : вода = 3 : 1 (об : об).

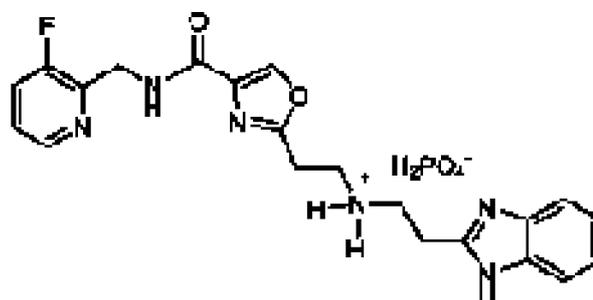
Также особенно предпочтительно, когда описанные выше предпочтительные фосфатные и сульфатные соли представляют собой соли соединений, имеющих формулу (I), выбранных из Примеров соединений № 1, 2, 4, 40, 94, 118, 126, 127, 193, 206, 208, 233, показанных выше в Таблице. Более предпочтительно, соединения, имеющие формулу (I),

выбраны из Примеров соединений № 1, 40, 94, 127, 208. Еще более предпочтительно, соединения, имеющие формулу (I), выбраны из Примеров соединений № 1 и 127, где соединение 127 является наиболее предпочтительным.

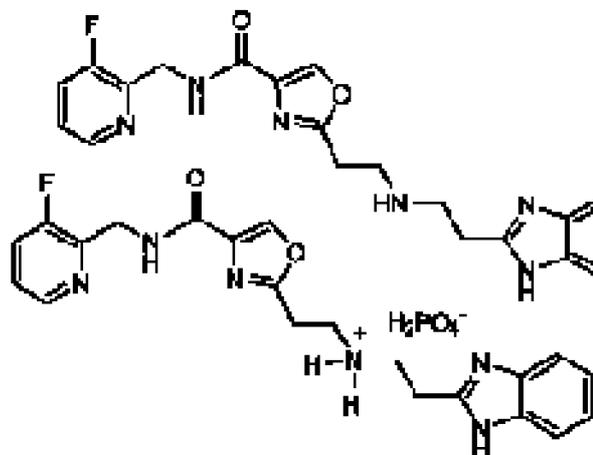
Соответственно, особенно предпочтительны следующие соли:



Сульфатная соль соединения 127
(1:1 соль)



Фосфатная соль соединения 127
(1:1 соль)



Фосфатная соль соединения 127
(2 : 1 соль, гемифосфат)

Другой особенно предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается фосфатных солей соединений, соответствующих соединению 127, с соотношением соединение (I) : кислота = 1 : 1, которое характеризуется полиморфной формой PM2, подробно описанной ниже в Примерах.

Другой особенно предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения касается сульфатных солей соединений, соответствующих соединению 127, с соотношением соединение (I) : кислота = 1 : 1, которое характеризуется полиморфной формой PM1, подробно описанной ниже в Примерах.

Неожиданно было обнаружено, что описанные в настоящем изобретении соединения имеют хорошую и даже улучшенную долговременную стабильность, включая

снижение или полное отсутствие высвобождения растворителя и/или потери массы при повышении температуры, эти соединения оказались менее гигроскопичными или негигроскопичными, они сохраняют свою твердотельную структуру даже при продолжительном хранении при различной температуре и/или влажности окружающей среды, кристаллическая форма устойчива к сушке в вакууме, соединения демонстрируют хорошую воспроизводимость с высокой чистотой и низким количеством побочных продуктов или продуктов разложения в применяемом методе получения, и сохраняют свой профиль растворимости даже при продолжительном хранении при различной температуре и/или влажности окружающей среды. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что, в частности, описанные выше предпочтительные сульфатные и фосфатные соли соединения 127 (1:1 соли), в частности подробно описанные в настоящем тексте полиморфы РМ1 (сульфатная соль) и РМ2 (фосфатная соль), имели указанные характеристики, обеспечивающие преимущество. Это делает данные полиморфы особенно хорошо подходящими в качестве действующих веществ в фармацевтических препаратах для описанных выше профилактики и лечения. Указанные частные предпочтительные полиморфы РМ1 (1:1 сульфатная соль) и РМ2 (1:1 фосфатная соль) содержат меньше воды по сравнению с другими полиморфами, протестированным в настоящей заявке, что обеспечивает преимущество в плане достижения долговременной стабильности.

В зависимости от своей структуры, соли по настоящему изобретению могут существовать в стереоизомерных формах (энантиомеры, диастереомеры) в случае присутствия асимметрических атомов углерода. Настоящее изобретение включает все энантиомеры и диастереомеры, а также их смеси. Энантиомерно-чистые формы можно опционально получить общеизвестными методами оптического расщепления, такими как дробная кристаллизация их диастереомеров, получаемых реакцией с оптически активными соединениями. Поскольку соединения по настоящему изобретению могут существовать в таутомерных формах, настоящее изобретение охватывает применение всех таутомерных форм. Соли по настоящему изобретению могут присутствовать в виде смесей различных возможных изомерных форм, в частности таких стереоизомеров, как E- и Z-, син- и анти-, а также оптических изомеров. Настоящее изобретение включает E-изомеры и Z-изомеры, а также оптические изомеры и любые смеси этих изомеров.

Настоящее изобретение касается также новых полиморфов новых солей соединений, имеющих приведенные выше формулы (I), (II) или (III).

Полиморфные формы образуются тогда, когда одни и те же композиции кристаллизуются с различными характеристиками кристаллических решеток, что

приводит к разным термодинамическим свойствам и стабильности, специфическим для конкретной полиморфной формы.

Один частный вариант осуществления настоящего изобретения касается полиморфов соли соединения 127 с лимонной кислотой, которая характеризуется диаграммой порошковой рентгеновской дифракции (PXRD диаграмма), содержащей характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, 4.5 и 5.3 ± 0.25 градусов, или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов. Предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 24.3, 21.6, 17.1, 5.9, 25.3, 8.1, 15.1, 20.1 или 12.6 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 24.3, 21.6, 17.1, 5.9, 25.3, 8.1, 15.1, 20.1 или 12.6.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, при каждом из значений 24.5, 5.3, 24.3, 21.6, и 17.1, и опционально один или больше, два или больше, три или больше при каждом из значений 5.9, 25.3, 8.1, 15.1, 20.1 или 12.6 ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Предпочтительно, указанные полиморфы соли соединения 127 с лимонной кислотой имеют форму 1:1 соли.

Другой частный вариант осуществления настоящего изобретения касается полиморфов соли соединения 127 с малеиновой кислотой, которая характеризуется диаграммой порошковой рентгеновской дифракции (PXRD диаграмма), содержащей характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, 19.0 и 24.5 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов. Предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 25.1, 17.5, 18.7, 25.7, 18.3, 21.9, 9.6 или 6.1 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 25.1, 17.5, 18.7, 25.7, 18.3, 21.9, 9.6 или 6.1.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, при каждом из

значений 19.0, 24.5, 25.1, 17.5 и 18.7, и опционально один или больше, два или больше, три или больше при каждом из значений 25.7, 18.3, 21.9, 9.6 или 6.1 ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Предпочтительно указанные полиморфы соли соединения 127 с малеиновой кислотой имеют форму 1:1.75 соли.

Другой частный вариант осуществления настоящего изобретения касается полиморфов соли соединения 127 с фосфорной кислотой, которая характеризуется диаграммой порошковой рентгеновской дифракции (PXRD диаграмма), содержащей характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, 27.2 и 4.6 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов. Предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 16.8, 22.0, 24.5, 5.4, 8.9, 13.1, 12.3, 19.7 или 15.9 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 16.8, 22.0, 24.5, 5.4, 8.9, 13.1, 12.3, 19.7 или 15.9.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, при каждом из значений 27.2, 4.6, 16.8, 22.0 и 24.5, и опционально один или больше, два или больше, три или больше при каждом из значений 5.4, 8.9, 13.1, 12.3, 19.7 или 15.9 ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Предпочтительно указанные полиморфы соли соединения 127 с фосфорной кислотой имеют форму 2:1 соли.

Другой частный вариант осуществления настоящего изобретения касается полиморфов соли соединения 127 с фосфорной кислотой, которая характеризуется диаграммой порошковой рентгеновской дифракции (PXRD диаграмма), содержащей характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, 26.1 и 16.5 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов. Предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 15.5, 18.4, 17.4, 14.7, 25.4, 20.4, 13.2 или 22.1 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из

значений примерно 15.5, 18.4, 17.4, 14.7, 25.4, 20.4, 13.2 или 22.1.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, при каждом из значений 26.1, 16.5, 15.5, 18.4 и 17.4, и опционально один или больше, два или больше, три или больше при каждом из значений 14.7, 25.4, 20.4, 13.2 или 22.1 ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Предпочтительно указанные полиморфы соли соединения 127 с фосфорной кислотой имеют форму 1:1 соли.

Другой частный вариант осуществления настоящего изобретения касается полиморфов соли соединения 127 с серной кислотой, которая характеризуется диаграммой порошковой рентгеновской дифракции (PXRD диаграмма), содержащей характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, 25.4 и 18.1 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов. Предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 4.5, 25.1, 16.8, 18.5, 18.6, 14.9, 15.6 или 17.6 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 4.5, 25.1, 16.8, 18.5, 18.6, 14.9, 15.6 или 17.6.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, при каждом из значений 25.4, 18.1, 4.5, 25.1 и 16.8, и опционально один или больше, два или больше, три или больше при каждом из значений 18.5, 18.6, 14.9, 15.6 или 17.6 ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Предпочтительно указанные полиморфы соли соединения 127 с серной кислотой имеют форму 1:1 соли.

Другой частный вариант осуществления настоящего изобретения касается полиморфов соли соединения 127 с серной кислотой, которая характеризуется диаграммой порошковой рентгеновской дифракции (PXRD диаграмма), содержащей характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, 25.5 и 4.5 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов. Предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 18.1, 18.4, 16.8, 6.2, 14.9, 25.2, 15.6 или 13.1 ± 0.25 градусов или ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или \pm

0.05 градусов.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит один или больше дополнительных пиков, выраженных в градусах 2-тета, выбранных из значений примерно 18.1, 18.4, 16.8, 6.2, 14.9, 25.2, 15.6 или 13.1.

Более предпочтительно, в таком варианте полиморфа диаграмма PXRD содержит характеристичные кристаллические пики, выраженные в градусах 2-тета, при каждом из значений 25.5, 4.5, 18.1, 18.4 и 16.8, и опционально один или больше, два или больше, три или больше при каждом из значений 6.2, 14.9, 25.2, 15.6 или 13.1 ± 0.20 градусов или ± 0.10 градусов или ± 0.05 градусов.

Предпочтительно указанные полиморфы соли соединения 127 с серной кислотой имеют форму 1:1 соли.

В особенности настоящее изобретение включает полиморфы указанных ниже описанных в настоящем тексте солей соединения 127, имеющих следующие пики в PXRD диаграмме:

Соль соединения 127 с лимонной кислотой (1:1 соль)

2-Тета (°)	Значение d (Å)	Относительная интенсивность (%)
5.3	16.54	87
5.9	14.91	48
8.1	10.97	42
12.2	7.26	39
12.6	7.01	40
13.1	6.77	37
15.0	5.89	41
15.6	5.67	36
16.3	5.44	39
17.1	5.18	53
18.4	4.81	32
18.8	4.71	32
20.1	4.42	41
21.6	4.12	56
23.4	3.80	29
24.3	3.65	77
24.5	3.62	100
25.3	3.52	44
25.4	3.51	39
25.9	3.44	29
26.8	3.33	24
27.4	3.25	21
36.6	2.46	14
37.2	2.41	15
37.9	2.37	14

Соль соединения 127 с малеиновой кислотой (1:1.75 соль)

2-Тета (°)	Значение d (Å)	Относительная интенсивность (%)
6.1	14.52	42
9.6	9.17	43
11.0	8.04	35
12.9	6.84	39
15.3	5.80	34
16.6	5.32	31
17.5	5.06	47
17.8	4.98	31
18.3	4.84	46
18.7	4.75	47
19.0	4.66	100
19.3	4.60	40
19.6	4.53	33
20.0	4.44	32
20.5	4.32	28
21.2	4.19	29
21.7	4.10	29
21.9	4.06	44
22.5	3.94	25
23.3	3.81	28
23.5	3.78	24
24.5	3.63	70
24.9	3.57	36
25.1	3.54	50
25.7	3.47	47
26.2	3.40	24
26.5	3.36	21
27.8	3.21	26
28.4	3.14	19
29.2	3.06	19
30.1	2.97	18
30.7	2.91	15
31.1	2.87	14
32.7	2.74	12
34.2	2.62	12
35.0	2.56	13
35.5	2.53	16
38.8	2.32	12

Соль соединения 127 с фосфорной кислотой (2:1 соль)

2-Тета (°)	Значение d (Å)	Относительная интенсивность (%)
4.6	19.39	94
5.4	16.37	38
7.8	11.36	24
8.9	9.91	38
9.1	9.68	26
10.8	8.16	24
11.0	8.07	25

11.4	7.73	24
12.3	7.19	31
13.1	6.75	35
13.7	6.46	27
13.9	6.35	24
14.0	6.30	26
14.5	6.10	23
14.7	6.03	27
15.0	5.91	23
15.5	5.72	25
15.7	5.64	28
15.9	5.58	30
16.1	5.50	27
16.8	5.27	75
17.3	5.12	23
17.9	4.96	21
18.3	4.83	24
19.4	4.58	27
19.7	4.50	31
19.9	4.46	25
20.1	4.42	24
20.2	4.40	22
20.9	4.24	21
21.2	4.19	24
21.6	4.11	22
21.7	4.09	23
22.0	4.03	44
22.8	3.89	20
23.0	3.87	17
23.4	3.79	21
24.5	3.63	39
24.9	3.58	23
25.4	3.50	17
25.6	3.47	14
26.1	3.42	13
26.4	3.37	16
27.2	3.27	100
27.6	3.23	22
28.2	3.16	29
28.5	3.13	15
29.4	3.04	12
29.8	3.00	13
30.2	2.95	14
30.3	2.94	15
30.7	2.91	10
30.8	2.90	11
31.0	2.88	11
31.2	2.87	11
31.4	2.84	11
32.3	2.77	9

32.8	2.73	11
33.2	2.70	9
34.5	2.60	8

В частности,

Соль соединения 127 с фосфорной кислотой (1:1 соль)

2-Тета (°)	Значение d (Å)	Относительная интенсивность (%)
4,90	18,02	40
6,95	12,71	30,7
11,23	7,87	30,2
12,00	7,37	39,8
13,17	6,72	50,3
14,70	6,02	65,1
15,49	5,72	86,8
15,96	5,55	27,5
16,46	5,38	93,9
16,98	5,22	47,6
17,39	5,09	76,4
18,39	4,82	77,4
19,65	4,51	39,2
20,00	4,44	26,2
20,42	4,35	57,8
21,62	4,11	30,6
22,06	4,03	50,1
22,59	3,93	23,3
23,14	3,84	28,3
23,34	3,81	23,6
24,07	3,69	26,5
24,97	3,56	38,5
25,37	3,51	60
26,06	3,42	100
26,83	3,32	42,9
27,41	3,25	17,1
27,85	3,20	14,7
28,62	3,12	30,8
29,04	3,07	24,7
30,97	2,89	13,5
31,29	2,86	12,8
31,54	2,83	11,7
33,31	2,69	13,2
33,60	2,67	11,8
33,80	2,65	9,9
34,35	2,61	9,6
35,00	2,56	12,9
35,30	2,54	10,8
35,54	2,52	16,4
35,74	2,51	10,8

36,44	2,46	9,5
-------	------	-----

Соль соединения 127 с серной кислотой (1:1 соль)

2-Тета (°)	Значение d (Å)	Относительная интенсивность (%)
4.5	19.61	62
6.1	14.38	26
11.1	7.99	17
11.8	7.49	19
13.1	6.75	26
13.9	6.35	20
14.1	6.26	18
14.9	5.96	32
15.6	5.68	31
16.1	5.50	17
16.8	5.27	41
17.6	5.04	27
18.1	4.89	77
18.5	4.80	37
18.6	4.77	34
19.3	4.59	19
19.7	4.51	18
20.1	4.42	16
20.4	4.34	19
21.1	4.22	21
22.5	3.95	20
22.7	3.91	21
22.9	3.88	18
23.4	3.79	16
25.1	3.54	45
25.4	3.50	100
25.9	3.43	18
26.4	3.37	25
26.8	3.32	26
27.5	3.24	25
28.1	3.17	16
28.6	3.11	14
29.2	3.05	12
29.6	3.01	15
31.2	2.87	16
33.3	2.69	9
33.9	2.64	9
35.4	2.54	8
36.4	2.47	7

В частности,

Соль соединения 127 с серной кислотой (1:1 соль)

2-Тета (°)	Значение d (Å)	Относительная интенсивность (%)
4,45	19,84	100
6,16	14,34	69,8
13,11	6,75	51,7
14,86	5,96	54,9
15,58	5,68	52
16,75	5,29	71,7
18,11	4,89	81,9
18,44	4,81	72,9
20,91	4,24	44,6
21,08	4,21	45,5
23,38	3,80	34,7
23,70	3,75	38,6
25,18	3,53	53,5
25,48	3,49	86,9
26,44	3,37	39,4
27,48	3,24	35,1
32,66	2,74	19,2
36,68	2,45	15,8

По настоящему изобретению особенно предпочтительно, чтобы ≥ 70 вес.%, предпочтительно ≥ 75 вес.%, ≥ 85 вес.%, ≥ 90 вес.%, ≥ 95 вес.% соответствующих новых солей по настоящему изобретению (т.е. действующего вещества) от общего веса указанной новой соли находилось в форме такого определенного полиморфа. Соответственно, частный вариант осуществления настоящего изобретения касается композиций, лекарственных средств или описанных ниже фармацевтических препаратов, где ≥ 70 вес.%, предпочтительно ≥ 75 вес.%, ≥ 85 вес.%, ≥ 90 вес.%, ≥ 95 вес.% соответствующих новых солей действующего вещества (от общего веса указанного нового действующего вещества) находится в форме определенного полиморфа.

Все соединения (свободное основание или соли, включая сольваты, гидраты, смешанные гидрат/сольватные формы и полиморфы и т.д.), описанные в настоящей заявке, являются ингибиторами ферропортина. Все описанные в настоящей заявке новые соли сохраняют свое действие как ингибитора ферропортина и могут также усиливать ингибирующее действие на ферропортин и/или улучшать фармакокинетический профиль соединений и/или улучшать физикохимические свойства соединений, облегчая их введение в готовые фармацевтические формы, и/или обладают преимуществом, позволяющим выделять их в кристаллической форме, что улучшает физикохимические свойства соединений, облегчая введение этих соединений в готовые фармацевтические формы или облегчая работу с ними или улучшая их стабильность. Таким образом, новые

соли по настоящему изобретению подходят для применения в качестве лекарственного средства, например, в частности, для применения в качестве ингибиторов ферропортина.

Как уже разъяснено выше, ферропортин представляет собой переносящий железо белок, ответственный за поглощение высвобожденного железа через кишечник и его перенос в кровеносную систему, обеспечивая поступление железа в соответствующие органы и ткани. Инактивация или подавление ферропортина делает невозможным экспорт железа, тем самым уменьшая всасывание железа в кишечнике. В контексте настоящего изобретения, подавление ферропортина включает подавление транспорта железа из клеток в кровеносную систему и подавление всасывания железа в кишечнике. Подавление транспорта железа и/или возврата железа может достигаться по различным механизмам, включая, например, подавление железотранспортной активности ферропортина и соответствующее подавление возврата железа, запуск интернализации, разложения и/или снижения уровня ферропортина, введение агонистов гепсидина, т.е. соединений, конкурирующих с гепсидином или подавляющих связывание гепсидина с ферропортином.

Ингибирование ферропортина можно оценить, измеряя ингибирование осуществляемого ферропортином транспорта железа в анализе вызванного железом ответа (BLAzer-тест), подробнее описанного ниже в Примерах. Кроме того, ингибирование ферропортина можно оценить, измеряя интернализацию и/или разложение ферропортина в ходе анализа интернализации и разложения ферропортина (Ferroportin Internalization and Degradation Assay (FACS)), или анализа убиквитинирования и разложения ферропортина (Ferroportin Ubiquitination and Degradation), каждый из которых подробнее описан ниже в Примерах. Кроме того, ингибирование ферропортина можно оценить, измеряя активность в качестве агониста гепсидина, например, оценивая способность связываться с гепсидином в тесте интернализации гепсидина (Hepcidin Internalization Assay (J774)), подробнее описанного ниже в Примерах. Кроме того, ингибирование ферропортина можно определить, подтвердив ингибирование связывания гепсидина с ферропортином, например, в биофизическом тесте связывания ферропортина с гепсидином (Biophysical Ferroportin-Hepcidin Binding Assay (Hep Bind FP)), подробнее описанном ниже в Примерах. Кроме того, ингибирование ферропортина можно оценить, измеряя активность соединения в плане его способности блокировать экспорт железа с ферропортином, например, в тесте на подавление выведения железа, подробнее описанном ниже в Примерах.

Таким образом, ингибирование ферропортина по настоящему изобретению можно, в частности, определить по проявлению ферропортин-ингибирующей активности по меньшей мере в одном из перечисленных выше тестов, а именно:

Ингибирование осуществляемого ферропортином транспорта железа в анализе вызванного железом ответа (BLAzer-тест): значение IC_{50} [мкМ] не больше 100 (≤ 100), предпочтительно не больше 50 (≤ 50), более предпочтительно ниже 50 (< 50).

Анализ интернализации и разложения ферропортина (FACS): значение EC_{50} [мкМ] не больше 100 (≤ 100), предпочтительно не больше 50 (≤ 50), более предпочтительно ниже 50 (< 50).

Анализ убиквитинирования и разложения ферропортина: визуально оцениваемый эффект в вестерн-блоттинге “+ сравнимый с гепсидином”, “+/- промежуточный эффект” и “+/- более сильный промежуточный эффект”, предпочтительным является эффект “+” или “+/-”, наиболее предпочтительным является эффект “+”.

Тест интернализации гепсидина (J774): значение IC_{50} не больше 100 (≤ 100), предпочтительно не больше 50 (≤ 50), более предпочтительно ниже 50 (< 50).

Биофизический тест связывания ферропортина с гепсидином: значение IC_{50} не больше 100 (≤ 100), предпочтительно не больше 50 (≤ 50), более предпочтительно ниже 50 (< 50).

Подавление выведения железа: значение IC_{50} не больше 100 (≤ 100), предпочтительно не больше 50 (≤ 50), более предпочтительно ниже 50 (< 50).

Ингибирование ферропортина можно также определять в моделях *in vivo*, как подробнее описано ниже в Примерах. Подходящие *in vivo* модели могут включать, например, исследование гипоферремии у интактных мышей посредством измерения снижения уровня железа в крови; исследование предотвращения всасывания железа у анемичных крыс посредством измерения ингибирования железа в крови; исследование коррекции гипоферремии у бета2-микроглобулин-дефицитных мышей посредством измерения снижения уровня железа в крови; исследование предотвращения перенасыщения железом у бета2-микроглобулин-дефицитных мышей посредством измерения общего содержания железа в селезенке или печени; исследование улучшений при анемии, неэффективном эритропоэзе и перенасыщении железом в мышечной модели средней β -талассемии.

Активность солей соединений по настоящему изобретению в качестве ингибиторов ферропортина можно, в частности, определить методами, описанными ниже в Примерах.

Как уже описано выше, ингибирование ферропортина может осуществляться, например, гепсидином, который, таким образом, является важнейшим фактором регуляции всасывания железа, ингибирования ферропортина и блокировки переноса железа из клеток в кровеносную систему. Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что несколько описанных в настоящем тексте солей соединений

выступают в роли миметиков гепсидина или агонистов гепсидина, что также входит в ингибирование ферропортина в контексте настоящего изобретения.

Соответственно, соли соединений по настоящему изобретению могут также применяться для подавления транспорта железа из клеток в кровеносную систему и ингибирования всасывания железа в кишечнике, а также в качестве миметиков гепсидина или агонистов гепсидина.

Благодаря активности описанных в настоящем изобретении солей в качестве ингибиторов ферропортина, соли по настоящему изобретению также особенно хорошо подходят для применения в ингибировании переноса железа, осуществляемого ферропортином, и благодаря этому – для применения в профилактике и/или лечении нарушений обмена железа, приводящих к повышенному уровню железа, заболеваний, связанных или вызванных повышенным уровнем железа, повышенным всасыванием железа или перенасыщения железом, например, в частности, перенасыщения тканей железом, заболеваний, связанных с неэффективным эритропоэзом, или заболеваний, вызванных пониженным уровнем гепсидина. Кроме того, соединения по настоящему изобретению подходят для применения в дополнительной терапии посредством ограничения количества железа, доступного для патогенных микроорганизмов, таких как бактерия *Vibrio vulnificus*, тем самым осуществляя профилактику или лечение инфекций, вызванных указанными патогенными микроорганизмами.

В настоящем контексте, заболевания, связанные, родственные, вызываемые или приводящие к повышению уровня железа, усилению всасывания железа, перенасыщению железом (например, перенасыщение тканей железом) или неэффективному эритропоэзу включают талассемию, гемоглинопатию, такие как болезнь гемоглобина Е (HbE), болезнь гемоглобина Н (HbH), гемохроматоз, гемолитическая анемия, такая как серповидно-клеточная анемия и врожденная дизэритропоэтическая анемия.

Активность солей по настоящему изобретению в лечении дрепаноцитарной анемии (серповидноклеточной анемии) можно определить с помощью мышинной модели, такой как, например, описанная в работе Yulin Zhao et al. в “MEK1/2 inhibitors reverse acute vascular occlusion in mouse models of sickle cell disease”; The FASEB Journal Vol. 30, No. 3, pp 1171-1186, 2016. Эту мышиную модель можно надлежащим образом адаптировать для определения активности солей по настоящему изобретению в лечении дрепаноцитарной анемии. Сходным образом, активность соединений, описанных в упомянутых выше неопубликованных международных заявках на патент PCT/EP2016/075305 и PCT/EP2016/075306, касающихся соединений, обладающих активностью в качестве ингибиторов ферропортина, в форме свободных оснований и/или в форме

фармацевтически приемлемых солей в целом, в лечении дрепаноцитарной анемии можно проверить с использованием указанной мышинной модели, вероятно с надлежащей адаптацией к оптимизированным условиям тестирования, что является рутинной задачей для квалифицированного специалиста в данной области.

Заболевания, связанные, родственные, вызываемые или приводящие к повышению уровня железа, усилению всасывания железа, перенасыщению железом (например, перенасыщение тканей железом) также включают нейродегенеративные заболевания, такие как, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, где описанные в настоящем тексте соединения рассматриваются как эффективные за счет ограничения накопления или роста содержания железа в тканях или клетках.

Соли соединений по настоящему изобретению также подходят для применения в целях профилактики и/или лечения образования радикалов, активных форм кислорода (АФК) и окислительного стресса, вызванных избытком железа или перенасыщения железом, а также для профилактики и/или лечения повреждений сердца, печени и эндокринной системы, вызванных избытком железа или перенасыщением железом, а также для профилактики и/или лечения воспаления, инициированного избытком железа или перенасыщения железом.

Заболевания, связанные с неэффективным эритропоэзом, включают, в частности, миелодиспластический синдром (MDS, миелодисплазия) и истинную полицитемию, а также врожденную дизэритропоэтическую анемию.

Другие болезни, нарушения и/или болезненные состояния включают перенасыщения железом, вызванные мутациями в генах, участвующих в регулировке работы системных депо железа, таких как гепсидин (*Hamp1*), белок гемохроматоза (*HFE*), гемоювелин (*HJV*) и трансферриновый рецептор 2 (*TFR2*), такие как, в частности, заболевания, связанные с мутациями гена *HFE* и *HJV*, заболевания, связанные с хроническим гемолизом, серповидно-клеточную анемию, нарушения мембраны эритроцитов, дефицит глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы (дефицит *G6PD*), эритропоэтическую порфирию, атаксию Фридрейха, а также такие подтипы перенасыщения железом, как трансфузионное перенасыщение железом, интоксикация железом, гемосидероз легких, остеопения, инсулинорезистентность, африканское перенасыщение железом, болезнь Галлервордена-Шпатца, гиперферритинемия, дефицит церулоплазмينا, неонатальный гемохроматоз и нарушения в эритроцитах, включающие талассемию, включая альфа-талассемию, бета-талассемию и дельта-талассемию, серповидно-клеточную анемию и миелодиспластический синдром.

Другие заболевания и/или нарушения и/или болезненные состояния, связанные с

повышенным уровнем железа, включают (но не ограничиваются только ими) заболевания, вызванные повышенным уровнем железа, включая атаксию, атаксию Фридрейха, возрастную макулодистрофию, возрастную катаракту, возрастные заболевания сетчатки и нейродегенеративные заболевания, такие как пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, синдром беспокойных ног и болезнь Хантингтона.

Соли соединений по настоящему изобретению могут также быть подходящими для применения в профилактике и лечении заболеваний, вызванных недостатком гепсидина.

В свете вышесказанного, другой предмет настоящего изобретения касается лекарственного средства, содержащего одну или больше описанных выше солей соединений, такого как, в частности, лекарственное средство для профилактики и лечения по любым из описанных выше показаний, состояний, нарушений или заболеваний.

Другой предмет настоящего изобретения касается фармацевтических композиций и лекарственных средств, содержащих одну или больше описанных выше солей соединений по настоящему изобретению, а также, необязательно, один или больше фармакологически приемлемых носителей и/или вспомогательных соединений и/или растворителей. Другой предмет настоящего изобретения касается фармацевтических композиций и лекарственных средств, содержащих одну или больше описанных выше солей соединений по настоящему изобретению, а также, необязательно, одно или больше дополнительных фармацевтически эффективных соединений. Указанные фармацевтические композиции содержат, например, до 99 вес.%, или до 90 вес.%, или до 80 вес.%, или до 70 вес.% солей соединений по настоящему изобретению, остальное количество составляют фармацевтически приемлемые носители и/или вспомогательные вещества и/или растворители и/или опциональные дополнительные фармацевтически эффективные соединения.

В контексте настоящего изобретения, фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или растворители представляют собой стандартно применяемые фармацевтические носители, вспомогательные вещества или растворители, включая различные органические или неорганические носители и/или вспомогательные вещества, обычно используемые в фармацевтике, в частности для приготовления твердых медицинских препаратов. Примеры включают наполнители (такие как сахароза, крахмал, маннит, сорбит, лактоза, глюкоза, целлюлоза, тальк, фосфат кальция, карбонат кальция; связующие вещества, такие как целлюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, полипропилпирролидон, желатин, гуммиарабик, полиэтиленгликоль, сахароза, крахмал; вещества для улучшения распадаемости таблеток, такие как крахмал, гидролизованный крахмал, карбоксиметилцеллюлоза, кальциевая соль

карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилкрахмал, натрия гликоль крахмал, бикарбонат натрия, фосфат кальция, цитрат кальция; лубриканты, такие как стеарат магния, тальк, лаурилсульфат натрия; ароматизаторы, такие как лимонная кислота, ментол, глицин, апельсиновый порошок; консерванты, такие как бензоат натрия, бисульфит натрия, парабен (например, метилапарбен, этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен); стабилизаторы, такие как лимонная кислота, цитрат натрия, уксусная кислота и многоосновные карбоновые кислоты из титриплексной серии, такие как, например, диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА); суспендирующие средства, такие как метилцеллюлоза, поливинилпирролидон, стеарат алюминия; диспергирующие средства; разбавители, такие как вода, органические растворители; воски, жиры и масла, такие как пчелиный воск, масло какао; полиэтиленгликоль; белый вазелин и т.д.

Жидкие лекарственные препараты, такие как растворы, суспензии и гели, обычно содержат жидкий носитель, такой как вода и/или фармацевтически приемлемые органические растворители. Кроме того, такие жидкие препараты могут также содержать рН-регуляторы, эмульгаторы или диспергирующие средства, буферные вещества, консерванты, увлажняющие вещества, желатинизирующие вещества (например, метилцеллюлоза), красители и/или ароматизаторы. Композиции могут быть изотоническими, то есть они могут иметь одинаковое с кровью осмотическое давление. Изотоничность композиций можно регулировать с помощью хлорида натрия и других фармацевтически приемлемых веществ, таких как, например, декстроза, мальтоза, борная кислота, тартрат натрия, пропиленгликоль и другие неорганические и органические растворимые вещества. Вязкость жидких композиций можно регулировать с помощью фармацевтически приемлемых загустителей, таких как метилцеллюлоза. Другие подходящие загустители включают, например, ксантановую камедь, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбомер и т.п. Предпочтительная концентрация загустителя зависит от выбранного вещества.

Фармацевтически приемлемые консерванты могут применяться для увеличения срока хранения жидких композиций. Подходящим средством является бензиловый спирт, хотя также могут применяться разнообразные консерванты, включая, например, парабены, тимеросал, хлорбутанол и бензалкония хлорид.

Упомянутые выше фармацевтические композиции могут применяться, например, для внутривенного, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного, интравлагинального, интрабуккального, чрезкожного, подкожного, кожно-слизистого, перорального, ректального, чрезкожного, местного, внутрикожного, внутрижелудочного введения, и выпускаться, например, в виде пилюль, таблеток, таблеток с энтеросолюбильным

покрытием, таблеток, покрытых пленкой, многослойных таблеток, препаратов с замедленным высвобождением для перорального, подкожного или накожного применения (в частности, в виде пластыря), препаратов замедленного всасывания, драже, суппозиториев, гелей, кремов, сиропа, гранулята, суппозиториев, эмульсий, дисперсий, микрокапсул, микропрепаратов, нанопрепаратов, липосомных препаратов, капсул, капсул с энтеросолюбильным покрытием, порошков, порошков для ингаляций, микрокристаллических препаратов, спреев для ингаляций, порошков, капель, назальных капель, назальных спреев, аэрозолей, ампул, растворов, соков, суспензий, растворов для вливания или растворов для инъекций и т.д.

Другой предмет настоящего изобретения касается лекарственных средств или комбинированных препаратов, содержащих одну или больше солей соединений по настоящему изобретению и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное соединение, такое как, в частности, соединение для профилактики и лечения перенасыщения железом и связанных с ним симптомов, предпочтительно железо-хелатирующее соединение, или соединение для профилактики и лечения любых описанных выше состояний, нарушений или заболеваний, такое как, в частности, фармацевтически активное соединение для профилактики и лечения талассемии, гемохроматоза, серповидноклеточной анемии, нейродегенеративных заболеваний (таких как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона) и связанных с ними симптомов.

Другой предмет настоящего изобретения касается применения описанных выше солей соединений в комбинированной терапии (доза с фиксированным соотношением компонентов или свободная комбинация дозировок для последовательного введения) с одним или двумя другими активными ингредиентами (лекарственными соединениями). Такая комбинированная терапия включает совместное введение солей соединений по настоящему изобретению и по меньшей мере одного дополнительного фармацевтически активного соединения (лекарственного средства). Комбинированная терапия дозами с фиксированным соотношением компонентов включает введение солей соединений по настоящему изобретению с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтически активным соединением в виде дозы с фиксированным соотношением компонентов. Комбинированная терапия в виде свободной комбинации дозировок для последовательного введения включает совместное введение соединений по настоящему изобретению и по меньшей мере одного дополнительного фармацевтически активного соединения с произвольными дозировками соответствующих соединений, либо одновременным введением индивидуальных соединений, или путем последовательного применения индивидуальных соединений, распределенного во времени. Указанное по

меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное соединение (лекарственное средство) включает, в частности, лекарственные средства для уменьшения перенасыщения железом (например, Tmprss6-ASO) или хелаторы железа, в частности куркумин, SSP-004184, деферитрин, деферасирокс, дефероксамин и/или деферипрон, или антиоксиданты, такие как N-ацетилцистеин, противодиабетические средства, такие как агонисты GLP-1 рецептора, антибиотики, такие как ванкомицин (Van) или тобрамицин, лекарственные средства для лечения малярии, противораковые препараты, противогрибковые средства, лекарственные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (например, агонисты допамина, такие как леводопа), противовирусные средства, такие как интерферон- α или рибавирин, или иммуносупрессанты (циклоспорин А или производные циклоспорина А), железосодержащие добавки, витаминные добавки, стимуляторы выработки эритроцитов (например, эритропоэтин, ЭПО), противовоспалительные средства, антитромболитики, статины, сосудосуживающие средства и инотропные соединения.

Другой предмет настоящего изобретения касается применения описанных выше комбинаций для профилактики и/или лечения заболеваний, вызванных недостатком гепсидина, или нарушений метаболизма железа, таких как, в частности, состояния перенасыщения железом, такие как, в частности, талассемия, серповидноклеточная анемия и гемохроматоз, и других заболеваний, как описано в настоящем тексте.

Другой предмет настоящего изобретения касается применения описанных в настоящем тексте солей соединений в отдельности или в составе описанной в настоящем тексте комбинированной терапии, в комбинации с переливанием крови.

Потенциальные синергетические или аддитивные эффекты солей по настоящему изобретению с другими терапевтическими средствами (второе средство) можно оценить в ходе комбинированных исследований в мышинных моделях средней талассемии ($Hbb^{th3/+}$ или $Hbb^{th1/th1}$, Jackson Laboratories) или большой талассемии ($C57-FLC^{th3/th3}$, в ходе которых исследуют эффект солей по настоящему изобретению в отдельности (т.е. вводя только соль) или в комбинации с дополнительным(-и) соединением(-ями) на анемию, гемопоз, перенасыщение железом, выработку активных форм кислорода (АФК), спленомегалию и другие биомаркеры в моделях талассемии. Помимо комбинированной терапии, уже описанной в предыдущем абзаце, комбинированная терапия по настоящему изобретению включает также применение солей по настоящему изобретению в комбинации с одним из следующих вторых средств:

- Гибридные белки модифицированного активинового рецептора типа IIА или IIВ (такие как описаны в работе Suragani RN, et al. "Modified activin receptor IIВ ligand trap

mitigates ineffective erythropoiesis and disease complications in murine β -thalassemia.” *Blood*. 2014 Jun 19;123(25):3864-72 и Dussiot M, et al. “An activin receptor II ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β -талассемия.” *Nat Med*. 2014 Apr;20(4):398-407), которые работают как ловушка лигандов для членов надсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGF β), таких как RAP-011 или RAP-536 (мышинные аналоги ACE-011, Sotatercept или ACE-536, Luspatercept (описаны в заявке на патент WO2010019261 или заявлены в патенте США US8361957), соответственно, Acceleron/Celgene) или другие антагонисты членов надсемейства TGF β (антитела, фрагменты антител, лекарственные средства, не являющиеся антителами, или клетки, продуцирующие ловушки лигандов активинового рецептора).

- Ингибиторы JAK1/2 или JAK2, включая (но не ограничиваясь только ими) рутоксилиниб (Novartis – заявлен в патентах США US7,598,257 и US8,415,362) или федратиниб (Sanofi), такие как описаны в работе Casu C, et al. “Short-term administration of JAK2 inhibitors reduces splenomegaly in mouse models of β -thalassemia intermedia and major.”; *Haematologica*, 2017.

- pan-HDAC ингибитор, такой как панобиностат (LC Laboratories, USA, и заявлен в патентах США US6,552,065 и US6,833,384) или HDAC3 ингибитор RGFP966 (Selleckchem – такой как описан в работе Pasricha SR et al. “Hepcidin is regulated by promoter-associated histone acetylation and HDAC3.” *Nat Commun*. 2017 Sep 1;8(1):403).

- Антагонисты матриптазы-2 (также известной как Tmprss6), такие как заключенные в липидные наночастицы (LNP) Tmprss6 мiРНК или антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), воздействующие на мышиную Tmprss6 (такие как описаны в работе Guo S et al “Reducing TMPRSS6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice.” *J. Clin Invest*. 2013 Apr;123(4):1531-41 или в работе Schmidt PJ, et al. “An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe(-/-) mice and ameliorates anemia and iron overload in murine β -thalassemia intermedia.” *Blood*. 2013 Feb 14;121(7):1200-8).

- Экзогенный апотрансферрин (такой как описан в работе Li H, et al. “Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice.” *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):177-82).

- Гепсидин-индуцирующие стероиды (HIS), такие как эпитиостанол, прогестерон и мифепристон, или антагонисты мембранного компонента-1 прогестеронового рецептора (PGRMC1), ссылка. 7.

- Антагонисты эритроферрона, такие как антитела или ловушки лигандов
- Рекombинантный эритропоэтин (ЭПО). Эритропоэтины, доступные для применения в качестве терапевтических средств по настоящему изобретению,

производятся по технологии рекомбинантной ДНК в культурах клеток и включают Erogen/Procrit (эпоэтин-альфа) и Aranesp (дарэроэтин-альфа) или Мугсера (эпоэтин-бета и метокси полиэтиленгликоль).

- Ингибиторы переносчика глицина 1 (GlyT1), такие как битопертин (Roche AG).

Соли по настоящему изобретению можно вводить перорально либо как единственное действующее вещество два раза в сутки в дозировке 10, 30 и 60 мг/кг, либо в комбинации с одним или больше из перечисленных выше соединений (вторые средства). Более конкретно, второе средство вводят как отдельную форму или вводят совместно с солями по настоящему изобретению, как описано ниже:

- RAP-011 или RAP-536 можно вводить подкожно два раза в неделю в дозировке 1, 10 или 30 мг/кг в течение периода времени до 8 недель.

- Ингибиторы JAK1/2 можно вводить перорально два раза в сутки вместе с солями по настоящему изобретению или без них.

- Рутоксилиниб (60 или 180 мг/кг) или федратиниб (40 или 120 мг/кг) можно вводить перорально один раз в сутки в течение 2 недель, вместе с солями по настоящему изобретению или без них.

- Панобиностат или RGFP966 можно вводить один раз в сутки в дозировке 10 или 20 мг/кг вместе с солями по настоящему изобретению или без них.

- Апотрансферрин вводят инъекционно интраперитонеально в дозировке 100 или 300 мг/кг в сутки в течение 8 недель.

- Мифепристон (30 или 100 мг/кг) вводят инъекционно интраперитонеально один раз в сутки в течение 2 недель.

- Антитела или ловушки лигандов, специфичные к эритроферрону, можно вводить два раза в неделю посредством подкожной инъекции.

- Эритропоэтин можно инъектировать интраперитонеально в дозировке 200 МЕ один раз в сутки в течение 2 недель.

- Ингибиторы переносчика глицина 1 (GlyT1), такие как битопертин (Roche AG), также можно вводить подходящим способом.

Соли, лекарственные средства или комбинированные препараты согласно настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, а также внутривенно.

В этих целях, соли соединений по настоящему изобретению предпочтительно вводят в состав лекарственных средств или фармацевтических композиций в форме пилюль, таблеток, таких как кишечнорастворимые таблетки, таблеток с пленочной

оболочкой и многослойных таблеток, препаратов с замедленным высвобождением для перорального введения, депонированных препаратов, драже, гранул, эмульсий, дисперсий, микрокапсул, микропрепаратов, нанопрепаратов, липосомных препаратов, капсул, таких как кишечнорастворимые капсулы, порошков, микрокристаллических препаратов, эппастических препаратов, капель, ампул, растворов, суспензий, растворов для инфузии или растворов для инъекций, или в форме препаратов, подходящих для ингаляций.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, соли соединений вводят в форме таблеток или капсул. Они могут представлять собой, например, кислотоустойчивые формы или формы с pH-зависимым покрытием.

Соли соединений по настоящему изобретению в качестве действующего вещества можно вводить, например, в составе однократной дозы от 0.001 мг/кг до 500 мг/кг веса тела, например, 1 - 4 раза в сутки. Однако, дозировку можно повышать или понижать в зависимости от возраста, веса тела, состояния пациента, степени тяжести заболевания и или способа введения.

Соответственно, другой предмет настоящего изобретения касается описанных выше солей соединений, лекарственных средств, композиций и комбинированных препаратов для приготовления лекарственных препаратов, в частности для профилактики и лечения по любым описанным выше показаниям, состояниям, нарушениям или заболеваниям, в частности для перорального или парентерального введения.

Другой предмет настоящего изобретения касается способа профилактики и лечения, в частности, для профилактики и/или лечения нарушений метаболизма железа, связанных или приводящих к повышению уровня железа, и в частности перенасыщения железом, заболеваний, связанных или приводящих к повышению уровня железа или перенасыщению железом, нарушений хранения железа, связанных или приводящих к повышению уровня железа, и заболеваний, связанных с неэффективным эритропоэзом, где указанный способ включает введение пациенту (человеку или животному), нуждающемуся в таком лечении, описанной выше соли, лекарственного средства, композиции или комбинированного препарата.

В данном контексте, заболевания, ассоциированные, связанные, вызываемые или приводящие к повышению уровня железа или перенасыщению железом, соответствуют указанным выше.

Другой предмет настоящего изобретения касается применения описанных выше солей для приготовления лекарственного препарата, в частности для профилактики и лечения по любым описанным выше показаниям, состояниям, нарушениям или заболеваниям.

Описание фигур

- Фиг. 1: Формула (I) по настоящему изобретению
- Фиг. 2: Визуализированный пример применявшейся программы динамической сорбции паров (ДСП)
- Фиг. 3.1: Структура соединения 127 в форме свободного основания с указанием вычисленных значений r_{Ka}
- Фиг. 3.2: ^1H -ЯМР спектр SP236-FB-P1 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 3.3: Вид Фурье-Рамановского спектра SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 3500 cm^{-1}
- Фиг. 3.4: Зона «отпечатков пальцев» в Фурье-Рамановском спектре соединения SP236-FB-P1, в диапазоне от 50 до 1800 cm^{-1}
- Фиг. 4: PXRD диаграмма SP236-FB-P1
- Фиг. 5.1: Сравнение PXRD диаграмм SP236-CIT-P1, SP236-CIT-P1(2), SP236-CIT-P2 и SP236-CIT-P3
- Фиг. 5.2: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-CIT-P2
- Фиг. 5.3: ДСК-термограмма SP236-CIT-P3
- Фиг. 5.4: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-CIT-P3 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 3500 cm^{-1}
- Фиг. 5.5: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-CIT-P3 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 1800 cm^{-1}
- Фиг. 5.6: ^1H -ЯМР спектр SP236-CIT-P2 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 5.7: Диаграмма массы образца (%) и относительной влажности (%) относительно времени для SP236-CIT-P3, где показана масса образца (левая ось y) и относительная влажность, устанавливаемая программой (правая ось y)
- Фиг. 5.8: Изотерма сорбции водяных паров для SP236-CIT-P3
- Фиг. 5.9: Сравнение PXRD диаграмм SP236-MLE-P1, SP236-MLE-P2 и SP236-MLE-P3
- Фиг. 5.10: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-MLE-P1
- Фиг. 5.11: ДСК-термограмма SP236-MLE-P3
- Фиг. 5.12: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-MLE-P3 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 3500 cm^{-1}
- Фиг. 5.13: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-MLE-P3 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 1800 cm^{-1}
- Фиг. 5.14: ^1H -ЯМР спектр SP236-MLE-P1 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 5.15: Диаграмма массы образца (%) и относительной влажности (%)

относительно времени для SP236-MLE-P3, где показана масса образца (левая ось y) и относительная влажность, устанавливаемая программой (правая ось y)

Фиг. 5.16: Изотерма сорбции водяных паров для SP236-MLE-P3

Фиг. 5.17: Сравнение PXRD диаграмм SP236-PO4-P1 и SP236-PO4-P2

Фиг. 5.18: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-PO4-P2

Фиг. 5.19: ^1H -ЯМР спектр SP236-PO4-P2 в ДМСО- d_6

Фиг. 5.20: ^{31}P ЯМР спектр SP236-PO4-P2 в ДМСО- d_6

Фиг. 5.21: Сравнение PXRD диаграмм SP236-PO4-P2, SP236-PO4-P5, SP236-PO4-P6, SP236-PO4-P7 и SP236-PO4-P8

Фиг. 5.22: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-PO4-P8 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 3500 cm^{-1}

Фиг. 5.23: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-PO4-P8 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 1800 cm^{-1}

Фиг. 5.24: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-PO4-P8

Фиг. 5.25: ДСК-термограмма SP236-PO4-P6

Фиг. 5.26: ДСК-термограмма SP236-PO4-P8

Фиг. 5.27: Диаграмма массы образца (%) и относительной влажности (%) относительно времени для SP236-PO4-P8, где показана масса образца (левая ось y) и относительная влажность, устанавливаемая программой (правая ось y)

Фиг. 5.28: Изотерма сорбции водяных паров для SP236-PO4-P8

Фиг. 5.29: Сравнение PXRD диаграмм SP236-SO4-P1 и SP236-SO4-P3

Фиг. 5.30: ^1H -ЯМР спектр SP236-SO4-P3 в ДМСО- d_6

Фиг. 5.31: Сравнение PXRD диаграмм SP236-SO4-P4, SP236-SO4-P5 и SP236-SO4-P6

Фиг. 5.32: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-SO4-P4

Фиг. 5.33: Диаграмма массы образца (%) и относительной влажности (%) относительно времени для SP236-SO4-P6, где показана масса образца (левая ось y) и относительная влажность, устанавливаемая программой (правая ось y)

Фиг. 5.34: Изотерма сорбции водяных паров для SP236-SO4-P6

Фиг. 5.35: ДСК-термограмма SP236-SO4-P6

Фиг. 5.36: ^1H -ЯМР спектр SP236-SO4-P4 в ДМСО- d_6

Фиг. 5.37: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-SO4-P6 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 3500 cm^{-1}

Фиг. 5.38: Сравнение Фурье-Рамановских спектров SP236-SO4-P6 и SP236-FB-P1 в диапазоне от 50 до 1800 cm^{-1}

- Фиг. 5.39: Увеличенный фрагмент ВЭЖХ-хроматограммы для SP236-FB-P1
- Фиг. 5.40: Увеличенный фрагмент ВЭЖХ-хроматограммы для SP236-CIT-P3
- Фиг. 5.41: Увеличенный фрагмент ВЭЖХ-хроматограммы для SP236-MLE-P3
- Фиг. 5.42: Увеличенный фрагмент ВЭЖХ-хроматограммы для SP236-PO4-P8
- Фиг. 5.43: Увеличенный фрагмент ВЭЖХ-хроматограммы для SP236-SO4-P6
- Фиг. 6.1: PXRD диаграмма SP236-BNZ-P2
- Фиг. 6.2: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-BNZ-P2
- Фиг. 6.3: ^1H -ЯМР спектр SP236-BNZ-P2 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 6.4: Сравнение PXRD диаграмм SP236-FUM-P1 и SP236-FUM-P2
- Фиг. 6.5: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-FUM-P2
- Фиг. 6.6: ^1H -ЯМР спектр SP236-FUM-P2 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 6.7: Сравнение PXRD диаграмм SP236-MLA-P1 и SP236-MLA-P2
- Фиг. 6.8: ^1H -ЯМР спектр SP236-MLA-P1 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 6.9: PXRD диаграмма SP236-SUC-P2
- Фиг. 6.10: ^1H -ЯМР спектр SP236-SUC-P2 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 6.11: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-SUC-P2
- Фиг. 6.12: Сравнение PXRD диаграмм SP236-LTAR-P1 и SP236-LTAR-P2
- Фиг. 6.13: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-LTAR-P1
- Фиг. 6.14: ТГ-ИК-Фурье термограмма SP236-LTAR-P2
- Фиг. 6.15: ^1H -ЯМР спектр SP236-LTAR-P1 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 6.16: ^1H -ЯМР спектр SP236-LTAR-P2 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 6.17: Сравнение PXRD диаграмм SP236-TOS-P1 и SP236-TOS-P2
- Фиг. 6.18: ^1H -ЯМР спектр SP236-TOS-P2 в ДМСО-*d*6
- Фиг. 7.1: ВЭЖХ анализ HCl-моно соли соединения 127 из Примера получения

7.2

Фиг. 7.2: ДСК термограмма HCl-моно соли соединения 127 из Примера получения 7.2

Фиг. 8.1: Свод PXRD диаграмм полиморфов PM1 - PM6 соединения PP566-SO4-P1

(снизу вверх: PP566-SO4-P2 (PM1), P5 (PM2), P6 (PM3), P8 (PM4), P10 (PM5) и P11 (PM6))

- Фиг. 8.2: PXRD диаграмма полиморфа PM1 (PP566-SO4-P2)
- Фиг. 8.3: ^1H -ЯМР спектр полиморфа PM1 (PP566-SO4-P2)
- Фиг. 8.4: ДСК термограмма PM1 (PP566-SO4-P2)
- Фиг. 8.5: ДСП поведение полиморфа PM1 соединения PP566-SO4-P1

Фиг. 9.1: Свод PXRD диаграмм полиморфов PM1 - PM11 соединения PP566-PO4-P1

(снизу вверх PP566-PO4-P4(PM1), P4-DRY(PM9), P5(PM2), P8(PM3), P10(PM4), P11(PM5), P13(PM6), P13-DRY(PM10), P15(PM7), P15-DRY (PM11) и P19(PM8))

Фиг. 9.2: PXRD диаграмма полиморфа PM2 (PP566-PO4-P5)

Фиг. 9.3: ^1H -ЯМР спектр полиморфа PM2 (PP566-PO4-P5)

Фиг. 9.4: ТГ-ИК-Фурье термограмма PM2 (PP566-PO4-P5)

Фиг. 9.5: ТГ-ИК-Фурье термограмма PM2 (PP566-PO4-P12)

Фиг. 9.6: Свод PXRD диаграмм полиморфов PM2 образцов PP566-PO4-P2, P5, P6, P9, P12 (снизу вверх: PP566-PO4-P2, P5, P6, P9 и P12)

Фиг. 9.7: ДСП поведение PP566-PO4-P2 (PP566-PO4-P12)

Фиг. 10: Иммуноблоттинг иммунопреципитатов с анти-Fpn антителом МТР1

Фиг. 11: Ингибирование оттока железа гепсидином (IC50: 0.086 мкМ) и соединением 127 (IC50: 0.080 мкМ)

Фиг. 12: Снижение уровня железа в крови, вызванное гепсидином и ингибитором ферропортина соединением 94 (соединение No. 94); с

Фиг. 12А кинетика уровня железа в крови у ранее не использовавшихся в опытах мышей C57BL/6, которым инъецировали синтетический гепсидин (5 мг/кг) интраперитонеально (i.p.) в течение указанного промежутка времени; и с

Фиг. 12В: уровень железа в крови у ранее не использовавшихся в опытах мышей C57BL/6, которым вводили указанные количества гепсидина (i.p., интраперитонеально) или соединения 94 (перорально) в течение 3 часов

Фиг. 13: Полная корректировка повышенного уровня железа у мышей b2m-/- путем введения ингибитора ферропортина соединения 40/метилцеллюлозы (А.) и соединения 94/кремофора EL (В.) в течение 3 часов.

Примеры

Настоящее изобретение более подробно проиллюстрировано в приведенных ниже примерах. Примеры служат исключительно для более полного понимания изобретения, и квалифицированный специалист в данной области может распространить данные частные примеры на другие заявленные соли, например, в частности, на другие описанные в настоящем изобретении соли, образованные с соединениями, имеющими формулу (I), изображенную на Фиг. 1.

Далее в тексте образцы указаны под идентификационными кодами в формате SP236-XYZ-Pw, где XYZ указывает соль/сообразователь кристалла (т.е. вид кислоты) и Pw указывает конкретный образец/эксперимент ($w = 1, 2, \dots, n$).

В качестве исходного соединения применялось свободное основание соединения 127.

I. Получение различных солей соединения 127

1. Аббревиатуры

ДХМ	дихлорметан
ДМСО	диметилсульфоксид
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия
ДСП	динамическая сорбция паров
EtOAc	этилацетат
EtOH	этанол
Фурье-Раман	Фурье-Рамановская спектроскопия
¹ H-ЯМР	протонный ядерный магнитный резонанс
i-PrOH	изопропанол
MeCN	ацетонитрил
MeOH	метанол
n-BuOH	1-бутанол
отн.вл./RH	относительная влажность
r.t./RT	комнатная температура (22-25°C)
T _g	температура стеклования
ТГ-ИК-Фурье	термогравиметрия в связке с ИК-Фурье спектроскопией
ТГФ	тетрагидрофуран
PXRD	порошковая рентгеновская дифракция

2. Общие детали экспериментов

ДСК: Дифференциальную сканирующую калориметрию проводили на приборе TA Instruments Q2000 (закрытые или открытые, золотые или алюминиевые ячейки для образца, с отверстием или без). Скорость нагрева обычно составляла 10 К/мин. Температуру плавления в большинстве случаев понимают как температуру начала пика.

Динамическая сорбция паров: ДСП эксперименты проводили на системе SPS11-100n “Sorptions Prüfsystem” от ProUmid (панее “Projekt Messtechnik”), August-Nagel-Str. 23, 89079 Ulm (Germany) или на приборе DVS-1 от Surface Measurement Systems. Примерно 5 - 20 мг образца помещали в алюминиевую ячейку. Применяли скорость изменения влажности 5% в час. Пример применявшейся программы эксперимента показан на Фиг. 2. Диаграммы, показывающие эффективное содержание воды, построены на основе данных потери массы из термогравиметрического анализа (ТГА). В некоторых случаях применяли двойной цикл.

В тестах исследования полиморфов образец помещали на алюминиевый держатель на микровесах и оставляли уравниваться при относительной влажности (RH) 50% перед тем как запускать предустановленные программы изменения влажности:

- (1) 2 часа при 50% RH
- (2) 50 → 0% RH (5%/час); 5 часов при 0% RH
- (3) 0 → 95% RH (5%/час); 5 часов при 95% RH
- (4) 95 → 50% RH (5%/час); 2 часа при 50% RH

Классификация гигроскопичности: Гигроскопичность классифицировали на основе увеличения массы при 85% RH относительно начальной массы, следующим образом: расплывающееся (адсорбирует столько воды, что образует жидкость), очень гигроскопичное (увеличение массы $\geq 15\%$), гигроскопичное (увеличение массы $< 15\%$, но $\geq 2\%$), слегка гигроскопичное (увеличение массы $< 2\%$, но $\geq 0.2\%$) или негигроскопичное (увеличение массы $< 0.2\%$).

Элементный анализ: Элементный анализ проводили на анализаторе 'vario EL cube' производства Elementar. В анализаторе применяется сжигание для превращения элементов в простые газы, например, CO₂, H₂O, N₂. Образующиеся газы отделяют на селективных улавливающих колонках и количественно определяют как функцию от теплопроводности. Кислород превращают в монооксид углерода методом пиролиза, и его также можно количественно определить как функцию от теплопроводности.

¹H-ЯМР: Bruker DPX300 спектрометр; рабочая частота для протонов 300.13 МГц; 30° импульс возбуждения; задержка импульса 1 сек; накопление 16 сканов; дейтерированный ДМСО в качестве растворителя; пик растворителя использовали как референс; значения химических сдвигов приведены относительно ТМС.

ВЭЖХ: ВЭЖХ система Agilent Series 1100 с дегазатором Agilent 1260 Infinity, программное обеспечение Chromeleon Version 6.8.

Титрование по Карлу Фишеру: Титрование по Карлу Фишеру проводили согласно широко известным методикам, например, в соответствии с ISO 760-1978: Определение содержания воды по методу Карла Фишера (Общий метод).

Измерение рКа: Прибор для титрования Sirius T3. Применяли фотометрический или потенциометрический анализ с использованием соразтворителей для образцов с низкой растворимостью в воде.

Порошковая рентгеновская дифракция (отражение): Эксперименты на порошковом рентгеновском дифрактометре Bruker D8 Advance проводили в режиме отражения (Bragg-Brentano). Значения 2θ обычно получали в пределах ошибки измерения $\pm 0.1-0.2^\circ$. Образцы обычно готовили без специальной обработки, кроме применения

небольшого давления для получения плоской поверхности. Кремниевый монокристаллический держатель образцов для скрининга полиморфов, ширина 0.5 мм. Обычно исследовали непокрытые образцы. Напряжение в трубке 40 кВ, сила тока 40 мА. PXRD дифрактометр оснащен детектором LynxEye. Применяли различную щель расходимости с окном 3° . Размер шага $0.02^\circ 2\theta$, время шага 37 секунд. Образцы вращали со скоростью 0.5 об/сек во время эксперимента. Приготовление образцов и эксперимент проводили в атмосфере окружающего воздуха.

Порошковая рентгеновская дифракция (пропускание): Прибор Stoe Stadi P, оснащенный детектором Mythen1K; Cu-K α 1 излучение; стандартные условия эксперимента: пропускание; параметры трубки: 40 кВ и 40 мА; изогнутый Ge монокроматор; размер шага $0.02^\circ 2\theta$, время шага 12 сек или 48 сек, диапазон сканирования $1.5-50.5^\circ 2\theta$; режим детектора: пошаговое сканирование; шаг детектора $1^\circ 2\theta$; стандартное приготовление образца: образец весом 10 - 20 мг помещали между двух листов ацетатной фольги; держатель образца: держатель образца Stoe для пропускания; образец вращали во время эксперимента. Приготовление образцов и эксперимент проводили в атмосфере окружающего воздуха.

В тестах исследования полиморфов каждый образец (25-40 мг порошка) помещали между двумя листами ацетата целлюлозы, которые были разделены металлическим разделителем (толщина 0.4 мм, внутренний диаметр 12 мм). Такой сэндвичевый элемент переносили в специальный держатель образца для высокоактивных соединений (SCell), который снова герметично закрывали ацетатной пленкой. При приготовлении образцов не применяли никакой специальной обработки. Все эксперименты и измерения проводили в атмосфере окружающего воздуха, и каждый образец вращали во время экспериментов.

Рамановская спектроскопия: Фурье-рамановские спектры записывали на Фурье-Раман системе Bruker MultiRAM с Nd:YAG лазером в ближней инфракрасной области с длиной волны 1064 нм и с германиевым детектором, охлаждаемым жидким азотом. Накапливали 64 скана с разрешением 2 см^{-1} в диапазоне от 3500 до 50 см^{-1} ; однако анализировали только данные выше 100 см^{-1} из-за эффекта отсека фильтра. Номинальное значение мощности лазера в типичном случае составляет 100 или 300 мВ.

Растворимость: Приблизительные значения растворимости определяли инкрементным добавлением растворителя примерно к 10 мг соединения. Если вещество не растворялось при добавлении суммарного количества по меньшей мере 10 мл растворителя, растворимость указывали как $<1\text{ мг/мл}$. Из-за ошибки эксперимента, присущей данному методу, показатели растворимости следует оценивать как грубое приближение и использовать только для разработки экспериментов по кристаллизации.

ТГ-ИК-Фурье: Термогравиметрические измерения проводили на приборе Netzsch Thermo-Microbalance TG 209, скомбинированном с ИК-Фурье спектрометром Bruker FTIR Spectrometer Vector 22 (ячейки для образца с отверстием, атмосфера N₂, скорость нагрева 10 К/мин).

Примерная растворимость: Примерные значения растворимости определяли инкрементным добавлением растворителя примерно к 10 мг соединения. Если вещество не растворялось при добавлении суммарного количества по меньшей мере 10 мл растворителя, растворимость указывали как <1 мг/мл. Из-за ошибки эксперимента, присущей данному методу, показатели растворимости следует оценивать как грубое приближение и использовать только для разработки экспериментов по кристаллизации.

3. Исследование исходного вещества

Исходное соединение (Свободное основание/FB):

Соединение 127 (SP236-FB-P1)

Вычисление pKa исходного соединения:

Теоретические значения pKa вычисляли с помощью программы ACD/pKa DB Vers. 10.00, Release 10.00. Полученные значения приведены вместе со структурой исходного соединения (свободное основание) на Фиг. 3.1.

¹H-ЯМР спектроскопия исходного соединения:

ЯМР спектр SP236-FB-P1 записывали в ДМСО-*d*₆, как показано на Фиг. 3.2. Спектр содержит по меньшей мере один широкий сигнал с химическим сдвигом ~δ12 м.д., однако спектр в целом выглядит соответствующим приведенной химической структуре. В ЯМР-спектре наблюдались также сигналы остаточного этанола и дихлорметана.

Рамановская спектроскопия:

Фурье-Рамановский спектр SP236-FB-P1 записывали в диапазоне от 50 до 3500 см⁻¹, как показано на Фиг. 3.3, с увеличенным видом области отпечатков пальцев от 50 до 1800 см⁻¹, как показано на Фиг. 3.4.

Порошковая рентгеновская дифракция:

Диаграмма PXRD соединения SP236-FB-P1 была записана в режиме пропускания и показана на Фиг. 4, она подтверждает, что образец (в форме свободного основания) по своей природе является аморфным.

Примерная растворимость исходного соединения:

Примерную растворимость SP236-FB-P1 определяли в ряде разных растворителей и смесей растворителей, чтобы помочь лучше спланировать эксперименты по сокристаллизации солей. Результаты приведены ниже:

Растворитель	Растворимость (мг/мл)	Смесь растворителей	Растворимость (мг/мл)
Ацетонитрил	S > 200		
Диоксан	S > 100		
ДМСО	S > 100		
Этанол	S > 100		
Этилацетат	S > 100	Этилацетат – циклогексан 3:1	5 < S < 7
Гептан	S < 1	Метанол-вода 1:1	S > 100
Метанол	S > 200		
2-пропанол	80 < S < 120	2-пропанол-вода 1:1	39 < S < 37
ТГФ	S > 200	ТГФ-гептан 3:1	S > 200
Вода	S ~ 15		

4. Эксперименты по кристаллизации

Условия кристаллизации:

Во всех экспериментах применяли соотношение свободное основание : кислота = 1:1 (моль:моль); в случае PO₄ и SO₄ два эксперимента проводили также с соотношением свободное основание : кислота = 10:1. Многие эксперименты в результате дали кристаллические продукты, как показали PXRD диаграммы, которые более подробно обсуждаются ниже. Те эксперименты, которые привели к получению только аморфных продуктов, не приведены в настоящем тексте с дополнительными подробностями (т.е. LLAC и MES).

Избранные кислоты и растворители для кристаллизации:

Кислота	Сокращение	Применяемый растворитель	Результат
Бензойная кислота	BNZ	2-пропанол Этилацетат	Аморфный Кристаллический PXRD
Лимонная кислота	CIT	Этанол Метанол	Кристаллический PXRD Кристаллический PXRD
Фумаровая кислота	FUM	ТГФ 2-пропанол	Полукристаллический PXRD Кристаллический PXRD
Молочная кислота, L-	LLAC	2-пропанол Метанол	Аморфный Аморфный
Яблочная кислота, L-	MLA	2-пропанол ТГФ	Полукристаллический PXRD Главным образом аморфный
Малеиновая кислота	MLE	2-пропанол ТГФ	Кристаллический PXRD Кристаллический PXRD
Метансульфокислота	MES	ТГФ ацетонитрил	Аморфный Аморфный
Фосфорная кислота	PO ₄	Ацетонитрил (10:1) 2-пропанол (10:1) Ацетонитрил (1:1)	Кристаллический PXRD Кристаллический PXRD Аморфный Аморфный

		2-пропанол (1:1)	
Янтарная кислота	SUC	Этанол ТГФ	Аморфный Полукристаллический PXRD
Серная кислота	SO4	2-пропанол (10:1) Ацетонитрил (10:1) 2-пропанол (1:1) Ацетонитрил (1:1)	Кристаллический PXRD Нет твердого продукта Кристаллический PXRD Кристаллический PXRD
Винная кислота, L-	LTAR	Этанол Метанол	Кристаллический PXRD Кристаллический PXRD
Толуолсульфоокислота	TOS	2-пропанол ТГФ	Полукристаллический PXRD Кристаллический PXRD

Далее подробнее описано получение и исследование избранных солей согласно указанным выше условиям.

5. Некоторые соли соединения 127

5.1 Соль соединения 127 с лимонной кислотой

Эксперимент по кристаллизации с применением лимонной кислоты в этаноле сначала привел к получению аморфного вещества, которое закристаллизовалось при нагревании до 30°C с периодической обработкой ультразвуком (SP236-CIT-P1(2)). Диаграмма PXRD отвечает кристаллическому веществу, полученному в эксперименте с метанолом (Фиг. 5.1, SP236-CIT-P2). Получение этой кристаллической формы могло быть также воспроизведено в масштабе ~600 мг в эксперименте SP236-CIT-P3. Образец -P2 содержит ~0.9% воды и метанола, которые он теряет при ~150°C (Фиг. 5.2). Еще 8.1% воды теряется при нагревании до 200°C. ДСК образца SP236-CIT-P3 показывает, что данная соль плавится с температурой начала 153°C (Фиг. 5.3). Фурье-Рамановский спектр SP236-CIT-P3 сравнивается со спектрами свободного основания на Фиг. 5.4 и Фиг. 5.5, и между этими двумя спектрами видны отчетливые различия. ¹H-ЯМР спектр SP236-CIT-P2, записанный в ДМСО-d₆, содержит дополнительный сигнал ~δ 2.6 м.д., имеющий интегральную интенсивность 3.8, который показывает формирование соли 1:1 свободное основание : кислота (Фиг. 5.6). Считая это соотношение корректным, 8.1% воды, наблюдавшиеся в эксперименте ТГ-ИК-Фурье, говорят о тригидрате 1:1 соли. Интересно, что ДСП показывает уменьшение относительного веса образца со старта измерений, и образец в конце концов становится безводным при 0% относительной влажности (Фиг. 5.7 и Фиг. 5.8). Затем он начинает адсорбировать воду, как только относительная влажность повышается, и разница между относительно массой образца при 0 и 95% относительной влажности составляет ~8%, что хорошо соответствует результатам ТГ-ИК-Фурье. Результаты элементного анализа тоже хорошо соответствуют 1:1 соли, однако

определение содержания воды методом титрования по Карлу Фишеру указывает на безводность образца:

Элемент/вещество	Теоретически для 1:1 соли	SP236-CIT-P3, найдено
C	54.0	53.0
H	4.9	5.1
N	14.0	13.7
O	24.0	24.2
H ₂ O	-	0.5 (по Карлу Фишеру)

5.2 Соль соединения 127 с малеиновой кислотой

Результаты скрининга кристаллизации с применением малеиновой кислоты в 2-пропаноле и ТГФ дали кристаллические твердые вещества, чьи PXRD диаграммы хорошо совпадают друг с другом (Фиг. 5.9). Масштабирование этого синтеза примерно на 500 мг в 2-пропаноле дало ту же самую кристаллическую форму для образца SP236-MLE-P3. ТГ-ИК-Фурье анализ показал, что образец практически безводный, но испытывает большую потерю массы и разложение, начиная примерно с 170°C (Фиг. 5.10). ДСК образца SP236-MLE-P3 в герметично закрытой золотой ячейке показал температуру плавления ~161°C (Фиг. 5.11). Был записан Фурье-Рамановский спектр SP236-MLE-P3, и он показал некоторые отличия от спектра свободного основания (Фиг. 5.12 и Фиг. 5.13). ¹H-ЯМР спектр SP236-MLE-P1 содержит сигнал, относящийся к малеиновой кислоте, при δ 6.1 с интегральной интенсивностью 3.5, что соответствует соотношению свободное основание : кислота = 1:1.75 (Фиг. 5.14). ДСП показывает потерю массы ~1%, когда относительная влажность снижается до 0%, и затем адсорбцию воды, когда относительная влажность снова повышается (Фиг. 5.15 и Фиг. 5.16). Максимальное увеличение массы ~6.5% достигается при 95% относительной влажности, что соответствует ~2.5 молекулам воды на моль соли (с расчетом на соотношение свободное основание : MLE = 1:1.75). Элементный анализ SP236-MLE-P3 хорошо соответствует соли 1:1.75, и содержание воды 0.4%, определенное титрованием по Карлу Фишеру, находится в соответствии с результатами ТГ-ИК-Фурье:

Элемент	Теоретически для свободное основание : MLE			SP236-MLE-P3, найдено
	1:1	1:1.75	1:2	
C	57.2	55.0	54.4	54.7
H	4.8	4.6	4.6	4.8
N	16.0	13.7	13.1	13.6
O	18.3	23.5	25.0	23.8
H ₂ O				0.4 (по Карлу Фишеру)

5.3 Соль соединения 127 с фосфорной кислотой

Результаты скрининга кристаллизации с применением фосфорной кислоты с

ацетонитрилом (SP236-PO4-P1) и 2-пропанолом (SP236-PO4-P2) в качестве растворителей дали два разных кристаллических твердых вещества, согласно результатам PXRD (Фиг. 5.17). Важно отметить, что в этих двух экспериментах применялось мольное соотношение свободное основание : кислота = 10:1. ТГ-ИК-Фурье образца –P2 показал потерю массы 1.0% при 130°C вследствие потери 2-пропанола, с разложением, начинающимся выше 200°C (Фиг. 5.18). Данный образец был также исследован методом ^1H и ^{31}P ЯМР, второй из которых показал наличие фосфатного иона (Фиг. 5.19 и Фиг. 5.20). Эти два эксперимента были проведены по той же методике, но с 1:1 мольным соотношением свободное основание : кислота. В этих экспериментах были получены только аморфные твердые вещества, которые далее не исследовали. Было проведено еще несколько экспериментов для дополнительного изучения этой системы и более глубокого понимания данного синтеза. В SP236-PO4-P5 был повторен эксперимент –P2 для подтверждения его воспроизводимости. Диаграмма PXRD образца –P5 совпадает с таковой для –P2 (Фиг. 5.21), а анализ на фосфор говорит о том, что образец –P5 представляет собой гемифосфат (т.е. имеет соотношение 2:1 свободное основание : фосфатная соль (Таблица 5.3). В эксперименте SP236-PO4-P6 водную фосфорную кислоту добавляли порциями по 0.1 мольному эквиваленту до достижения соотношения 2:1 свободное основание : кислота. Диаграмма PXRD подтверждает получение той же кристаллической формы, которая была получена в –P2 и –P5 (Фиг. 5.21), а наличие 2.83 массовых процентов фосфора снова подтверждает формирование гемифосфата. Эксперимент SP236-PO4-P7 проводили аналогично –P6, однако фосфорную кислоту добавляли до достижения соотношения 1:1 свободное основание : кислота, чтобы попытаться получить монофосфатную соль. PXRD анализ полученного твердого продукта снова показал получение гемифосфата (Фиг. 5.21). Масштабирование данного синтеза до ~600 мг в эксперименте SP236-PO4-P8 было также успешным и дало ту же самую кристаллическую форму. Фурье-Рамановский спектр данного образца сравнивается со спектром свободного основания на Фиг. 5.22 и Фиг. 5.23, и видны значительные отличия. Неожиданно ТГ-ИК-Фурье спектр SP236-PO4-P8 показал наличие заметно большего количества воды и 2-пропанола в образце, несмотря на ту же PXRD диаграмму (Фиг. 5.24). Таким образом, получается, что эта фосфатная соль имеет изоморфные сольватированные/гидратированные и не-сольватированные/гидратированные формы. ДСК образцов SP236-PO4-P6 и –P8 в герметично закрытых золотых ячейках показал хорошо воспроизводимые значения температуры плавления с точкой начала 79 и 80°C (Фиг. 5.25 и Фиг. 5.26). Эти значения хорошо соответствуют температуре плавления 2-пропанола и говорят об одновременно высвобождении растворителя и плавлении твердого вещества. ДСК эксперименты, скорее

всего, необходимо также провести в открытых ячейках. ДСП образца SP236-PO4-P8 показал немедленную потерю массы при снижении относительной влажности в диапазоне от 50 до 0%, которая является неполной во время первого цикла. Дополнительная потеря массы наблюдается во время второго цикла ДСП, и разница между наивысшей и наименьшей относительной массой образца, равная ~12.5%, хорошо согласуется с потерей массы, наблюдаемой методом ТГ-ИК-Фурье. Содержание воды 12.5% соответствует ~7 молекулам воды на 2:1 соль. Элементный анализ образцов SP236-PO4-P5 и -P8 во многом совпадает, хотя содержание углерода значительно варьируется:

Элемент/ вещество	Теоретически для свободное основание :		Найдено	
	PO4			
	2:1	2:1 •4H ₂ O	SP236-PO4-P5	SP236-PO4-P8
C	55.1	51.1	52.1	50.7
H	5.0	5.4	5.7	5.9
N	18.4	17.0	16.4	15.9
O	14.0	19.5	-	20.2
P	3.4	3.1	2.96	2.92
H ₂ O	-	7.3	-	8.0

Также важно отметить содержание воды 8 масс.%, которое было определено методом титрования по Карлу Фишеру. Это значение заметно ниже, чем 12 масс.% воды, адсорбированные согласно ДСП, но может говорить о том, что сохраняется некоторое количество 2-пропанола.

5.4 Соль соединения 127 с серной кислотой

Первые скрининговые эксперименты с серной кислотой проводили в мольном соотношении 10:1 свободное основание : кислота. Кристаллизация в 2-пропаноле (SP236-SO4-P1) дала кристаллическое твердое вещество, эксперимент был воспроизведен в большем масштабе (-P3), в то время как эксперимент с ацетонитрилом (-P2) не дал никаких твердых продуктов (Фиг. 5.29). ¹H-ЯМР спектр полученного кристаллического вещества показал, что молекула совсем не разложилась (Фиг. 5.30). Аналогичным образом были проведены два дополнительных эксперимента, однако в этот раз применяли мольное соотношение свободное основание : кислота = 1:1. Эти результаты более интересны, поскольку изначально использовалось желаемое соотношение исходных соединений. Кристаллизационные эксперименты в обоих растворителях дали очень похожие кристаллические формы, согласно данным PXRD, и эксперимент в 2-пропаноле воспроизводился в масштабе ~600 мг (Фиг. 5.31). ТГ-ИК-Фурье анализ показал, что образец -P4 содержит ~5.5 масс.% воды, которые он теряет в ходе двух разных поэтапных потерь 4% и 1.5%, и начинает разлагаться при температуре выше 200°C (Фиг. 5.32). Содержание воды 4% соответствует ~1 молекуле воды в соли, в то время как 1.5 масс.% соответствует 0.5 молекул воды в соли (из расчета соли с соотношением 1:1 свободное

основание : сульфат). ДСП показывает постоянное снижение массы по мере уменьшения относительной влажности в диапазоне от 50 до 0%, за которым следует немедленный набор массы, как только относительная влажность снова вырастает (Фиг. 5.33 и Фиг. 5.34). Разница между минимальным и максимальным относительным весом образца в ДСП составляет примерно от 5 до 5.5%, что хорошо согласуется с результатами ТГ-ИК-Фурье анализа и говорит об общем содержании 1.5 молекул воды на соль (из расчета на соль 1:1). Температуру начала плавления 173°C определяли для образца SP236-SO4-P6 методом ДСК в герметично закрытой золотой ячейке (Фиг. 5.35). ¹H-ЯМР спектр SP236-SO4-P4 не показывает какого-либо разложения молекулы (Фиг. 5.36), а Фурье-Рамановская спектроскопия сульфатной соли показывает значительные отличия по сравнению со спектром свободного основания (Фиг. 5.37 и Фиг. 5.38). Результаты элементного анализа, приведенные в Таблице 5.4, хорошо согласуются с содержанием 1.5 молекул воды, хотя значения содержания кислорода и воды, определенные методом титрования по Карлу Фишеру, вступают в некоторый конфликт:

Элемент	Теоретически для солей 1:1			Найдено	
	Безводн.	+1.5H ₂ O	+2.5H ₂ O	SP236-SO4-P4	SP236-SO4-P6
C	49.79	47.27	45.73	47.0	45.5
H	4.58	4.91	5.12	4.6	4.6
N	16.60	15.76	15.24	15.7	15.2
O	19.0	22.5	24.66	-	19.0
S	6.33	6.01	5.81	6.1	5.7
H ₂ O	-	5.06		5.56 (ТГ-ИК-Фурье)	8.0 (KF)

5.5 Обзор растворимости в воде и степени чистоты по ВЭЖХ для избранных солей

Определяли растворимость в воде и чистоту по ВЭЖХ для каждой из избранных солей, и результаты представлены в таблице ниже:

Образец	Растворимость (мг/мл)	pH насыщенного раствора	Чистота (отн. площадь %)
SP236-CIT-P3	23.6	4.3	88.2
SP236-MLE-P3	14.2	4.2	82.2
SP236-PO4-P8	29.8	7.0	93.1
SP236-SO4-P6	8.2	3.2	77.9

Измеренные значения растворимости в воде находятся в диапазоне от ~8 мг/мл для сульфатной соли до ~30 мг/мл для фосфатной соли. Следует отметить, однако, что SP236-PO4-P8 представляет собой соль с соотношением 2:1 свободное основание : фосфат, и поэтому дает две молекулы свободного основания. Значение pH насыщенного раствора для этого образца тоже значительно выше, чем для других солей (pH ~7 против pH 3.2-4.3). Чистоту каждой соли тоже определяли по относительному проценту площади

основного пика, в сравнении с площадью всех остальных детектированных пиков, и чистота находится в диапазоне от 78% для SP238-SO4-P6 до 93% для SP236-PO4-P8, увеличенные ВЭЖХ-хроматограммы протестированных образцов приведены на Фиг. 5.39 (SP236-FB-P1), 5.40 (SP236-CIT-P3), 5.41 (SP236-MLE-P3), 5.42 (SP236-PO4-P8) и 5.43 (SP236-SO4-P6).

6. Скрининговые эксперименты с другими солеобразователями

6.1 Бензойная кислота

Было проведено два эксперимента по кристаллизации с бензойной кислотой. Не было получено твердого продукта при использовании 2-пропанола в качестве растворителя (SP236-BNZ-P1), однако был получен кристаллический твердый продукт в эксперименте с этилацетатом (SP236-BNZ-P2, Фиг. 6.1). Образец еще содержит ~0.6% этилацетата, который виден методом ТГ-ИК-Фурье, и начинает разлагаться с потерей бензойной кислоты при температуре выше ~200°C (Фиг. 6.2). ¹H-ЯМР спектр показывает дополнительные 5 ароматических протонов и говорит о соли с соотношением 1:1 свободное основание : BNZ (Фиг. 6.3).

6.2 Фумаровая кислота

Образовывался белый осадок при кристаллизации с фумаровой кислотой при использовании ТГФ в качестве растворителя (SP236-FUM-P1), однако методом PXRD было обнаружено, что это твердое вещество является только частично кристаллическим. Эксперимент с 2-пропанолом дает намного более кристаллический образец после выдерживания реакционной смеси при температуре от 25 до 30°C (Фиг. 6.4, SP236-FUM-P2). ТГ-ИК-Фурье последнего образца показал потерю ~2.6% 2-пропанола при ~140°C (Фиг. 6.5), а ¹H-ЯМР спектр показал соотношение свободное основание : кислота = 1:1.35, судя по сигналу при δ 6.6 м.д.

6.3 L-Яблочная кислота

Кристаллизация с L-яблочной кислотой в 2-пропанолу сначала дала маслянистое твердое вещество, которое закристаллизовалось при выдерживании при температуре от 25 до 30°C (SP236-MLA-P1, Фиг. 6.7). Аналогичный эксперимент в ТГФ дал только аморфные твердые вещества (SP236-MLA-P2). ¹H-ЯМР спектр первого образца содержал сигналы, относящиеся к L-яблочной кислоте, при δ 2.4 и 3.9, которые показывают соотношение свободное основание : кислота = 1:1 (Фиг. 6.8).

6.4 Янтарная кислота

Кристаллизация с L-янтарной кислотой в ТГФ дала частично кристаллическое твердое вещество, которое показало наличие сукцината в соотношении 1:1 со свободным основанием по результатам ¹H-ЯМР (SP236-SUC-P2, Фиг. 6.9 и Фиг. 6.10). ТГ-ИК-Фурье

показывает потерю массы 3.1% при 110°C вследствие потери ТГФ, разложение начинается выше 150°C (Фиг. 6.11). Эксперимент с этанолом в качестве растворителя (SP236-SUC-P1) дал только вязкое твердое вещество, которое далее не исследовали.

6.5 L-Винная кислота

Кристаллизацию с L-винной кислотой проводили с использованием этанола (-P1) и метанола (-P2) в качестве растворителей. Диаграммы PXRD полученных твердых веществ показали, что оба образца являются кристаллическими и могут быть структурно схожими (Фиг. 6.12). Продукты этих двух кристаллизаций содержат похожие массовые проценты растворителя/воды (т.е. ~5.3%, см. Фиг. 6.13 и Фиг. 6.14), и их ¹H-ЯМР спектры показывают соотношение свободное основание : LTAR = 1:1 по сигналу при $\delta \sim 4$ м.д. (см. Фиг. 6.15 и Фиг. 6.16).

6.6 Толуолсульфокислота

Кристаллизацию с толуолсульфокислотой проводили в 2-пропаноле (-P1) и ТГФ (-P2). PXRD показал, что образующиеся твердые формы схожие, однако эксперимент с ТГФ дал намного более кристаллический образец (Фиг. 6.17). К сожалению, выходы этих кристаллизаций были очень низкими, и было получено только небольшое количество мелкодисперсного сильно электризующегося твердого вещества. Записывали ¹H-ЯМР спектр образца -P2, который показал соотношение свободное основание : TOS = 1:1.5, при этом в образце оставалось ~10 мольных процентов ТГФ (Фиг. 6.18).

7. Получение HCl-моносоли соединения 127

7.1 Солеобразование исходя из свободного основания

Моно-HCl соль демонстрирует намного более высокую растворимость в этаноле, чем 3HCl-соль (которая исключена из объема притязаний настоящего изобретения).

Соответственно, выходы моно-соли ниже. Для повышения выхода можно применять в качестве растворителя для кристаллизации смеси этанол-вода.

Для получения моно-HCl соли из свободного основания, 1.4 г (3.4 ммоль) соединения 127 в форме свободного основания растворяли в 86 мл этанола и нагревали до 50°C. Прикапывали 0.61 г (1.05 экв.) 32%-ной HCl, и раствор охлаждали до 0-5°C в течение 2 часов. Полученную суспензию фильтровали и промывали 10 миллилитрами 2-пропанола. Полученный влажный продукт сушили по меньшей мере 10 часов в вакууме (<100 мбар) при 45°C.

Выход составляет 0.51 г (34% от теоретического выхода) в форме белого твердого вещества.

7.2 Формирование соли исходя из 3HCl-соли соединения 127

Поскольку моно-HCl соль имеет пониженную растворимость в воде, она выпадает

в осадок при $\text{pH} \geq 5$.

Для получения моно- HCl соли из 3HCl соли, 5 г (9.7 ммоль) соединения 127 в форме 3HCl соли растворяли в 50 мл воды при 20-25°C. Затем pH доводили до pH 5-6 30%-ным раствором NaOH и перемешивали суспензию 10 минут. Суспензию фильтровали и промывали 10 миллилитрами 2-пропанола. Полученный влажный продукт сушили по меньшей мере 10 часов в вакууме (<100 мбар) при 45°C.

Выход 3.7 г (85% от теоретического выхода) в форме белого твердого вещества.

Продукт, представляющий собой моно-соль, характеризовали стандартным титриметрическим определением содержания Cl^- согласно внутренней методике Заявителя INS005324IPV-DE03v.2:

$$\text{Cl \% (м/м)} = \frac{V \cdot f \cdot 0.03545}{E}$$

V = объем AgNO_3 0.01 М

f = AgNO_3 стандарт 0.01 М 1.004

E = начальный вес [г]

Образец	E	V	Cl %	среднее
Образец 1-1	31.34 мг	6.9877 мл	7.94% м/м Cl	7.94% м/м
Образец 1-2	30.21 мг	6.7354 мл	7.94% м/м Cl	
Образец 2-1	31.98 мг	7.1941 мл	8.01% м/м Cl	7.99% м/м
Образец 2-2	29.55 мг	6.6148 мл	7.97% м/м Cl	

Теоретически вычисленное значение равно 7.97%, что подтверждает формирование моно-соли.

Элементный анализ:

Образец	C [%]	H [%]	N [%]	Прот [%]
Теоретически вычислено для моно-соли	56.69	4.98	18.89	
Образец 1-1	55.47	5.589	18.36	0.000
Образец 1-2	55.71	5.684	18.40	0.000
среднее	55.59	5.636	18.38	0.000
Стандартное отклонение, абс.	0.17	0.068	0.03	0.000
Стандартное отклонение, отн. [%]	0.3	1.199	0.16	0.000
Дельта [%]	0.23	0.096	0.04	0.000

Кристаллизация наблюдается при pH 5 – 5.5.

Дельта, скорее всего, является результатом присутствия остаточной воды.

На Фиг. 7.1 показано подтверждение формирования моно-соли методом ВЭЖХ

На Фиг. 7.2 показано подтверждение формирования моно-соли методом ДСК.

II. Исследование полиморфов избранных солей соединения 127

Далее образцы указаны под идентификационными кодами в форме PP566-XYZ-Pw, где XYZ обозначает соль/сообразователь кристаллов (т.е. тип кислоты), представляющий

собой либо SO₄ для сульфатной соли, либо PO₄ для фосфатной соли, и P_w обозначает конкретный образец/эксперимент (w = 1,2,...n).

Полиморфы пронумерованы как P_Mx, т.е. P_M1, P_M2, P_M3... и т.д.

1. Полиморфы солей серной кислоты с соединением 127

В приведенном ниже примере описано исследование различных полиморфов солей серной кислоты с соединением 127 и определение стабильной формы (или гидрата) сульфатной соли соединения 127 в твердом состоянии. Все исследованные в настоящем тексте полиморфы с серной кислотой представляют собой 1:1 соли соединения 127.

1.1 Характеристики исходного соединения (PP566-SO₄-P1)

Порошковая рентгеновская дифракция:

Диаграмма PXRD соединения PP566-SO₄-P1 была записана в режиме отражения (не показано) и показала, что образец имеет аморфную природу.

ТГ-ИК-Фурье анализ:

ТГ-ИК-Фурье анализ показал, что аморфная сульфатная соль PP566-SO₄-P1 содержит около 5 вес.% и начинает разлагаться при температуре около 160°C (не показано).

ДСК анализ:

Для PP566-SO₄-P1 наблюдался первый небольшой эндотермический пик при 53°C, с ΔH = 4.7 Дж/г. При 78°C наблюдался острый экзотермический пик с ΔH = 52 Дж/г, скорее всего кристаллизация. Дополнительный небольшой термический пик наблюдался при 59°C. Этот сигнал видимо отвечает переходу стеклования аморфной фракции, что, однако, не было окончательно подтверждено. При 164°C наблюдается широкий эндотермический пик, возможно связанный с плавлением новой кристаллической фазы вместе с разложением соединения.

¹H-ЯМР Спектроскопия:

Химическую структуру соединения PP566-SO₄-P1 подтверждали методом ¹H-ЯМР. В спектре наблюдался широкий пик с центром при 10 м.д., отнесенный к образователям водородной связи или, возможно, к неполностью депротонированной кислоте (скорее всего HSO₄) (спектр не показан).

ДСП исследования:

Поведение соединения было проанализировано методом ДСП. Соединение поглощает воду очень быстро при 50% RH (примерно 4.5 вес.%) и достигает плато, что говорит о формировании кристаллического гидрата. При 0% RH образец теряет около 5 вес.% начального веса (9% от веса при 50% RH), но не достигает плато, подтверждая, что некоторое количество воды может все еще присутствовать в соединении, и вещество

может в конце концов достичь безводного состояния. Однако это гипотетическое состояние чрезвычайно нестабильно, поскольку уже при 5% RH оно снова начинает поглощать воду, набирая более 10 вес.% при 55% RH, когда оно претерпевает резкое падение примерно на 3 вес.%, говоря о перекристаллизации, вызванной влажностью, в ходе которой образуется менее гидратированная структура. Этот процесс продолжается примерно до 65% RH, когда соединение достигает минимума, затем вещество медленно набирает воду до 80% RH (порядка 2 вес.%); однако когда достигается критичное значение RH, через несколько минут образец набирает более 13 вес.% и выходит на плато, которое выглядит очень стабильным, даже если относительную влажность понижать до 50% RH, и это говорит об образовании более высокогидратированного соединения, которое стабильно при влажности выше 50% (не показано).

Проводили PXRD эксперимент после цикла ДСП, результаты которого подтвердили кристалличность вещества (диаграмма не показана в настоящем тексте).

1.2 Исследование полиморфов

Спектр полиморфизма соединения PP566-SO4-P1 исследовали посредством суспендирования вещества в различных растворителях и смесях растворителей для изучения широкого ряда физических состояний и активности воды. Были идентифицированы по меньшей мере 6 кристаллических форм (от PM1 до PM6), но можно предположить существование большего их числа. Полученные твердые формы тестировали в условиях вакуумной сушки при 45°C. Обзор результатов приведен ниже в Таблице:

Образец	Растворитель/Условия	Результат
PP566-SO4-P1	Исходное соединение	аморфный
PP566-SO4-P2	MeCN	PM1
PP566-SO4-P3	диоксан	аморфный
PP566-SO4-P4	ДХМ	PM1
PP566-SO4-P5	EtOH	PM2
PP566-SO4-P5-DRY	вакуумная сушка 45°C/30 мбар	PM2
PP566-SO4-P6	EtOAc	PM3
PP566-SO4-P6-DRY	вакуумная сушка 45°C/30 мбар	PM3
PP566-SO4-P7	гептан	аморфный
PP566-SO4-P8	MeOH	PM4
PP566-SO4-P9	i-PrOH	PM1
PP566-SO4-P9-DRY	вакуумная сушка 45°C/30 мбар	PM1
PP566-SO4-P10	ТГФ	PM5
PP566-SO4-P10-DRY	вакуумная сушка 45°C/30 мбар	PM5
PP566-SO4-P11	вода	PM6
PP566-SO4-P12	ацетон	PM1
PP566-SO4-P13	MeOH:вода 3:1 $a_w=0.6$	PM4
PP566-SO4-P14	MeOH:вода 8:2 $a_w=0.4$	PM4
PP566-SO4-P15	MeOH:вода 9:1 $a_w=0.3$	PM4

Образец	Растворитель/Условия	Результат
PP566-SO4-P16	MeOH:вода 95:5 $a_w=0.2$	PM4
PP566-SO4-P16-DRY	вакуумная сушка 45°C/30 мбар	PM4
PP566-SO4-P17	ацетон:вода 8:2 $a_w=0.8$	PM6
PP566-SO4-P17-DRY	вакуумная сушка 45°C/30 мбар	аморфный
PP566-SO4-P18	ацетон:вода 9:1 $a_w=0.7$	PM1
PP566-SO4-P19	ацетон:вода 95:5 $a_w=0.5$	PM1
PP566-SO4-P1 after ДСП	Водные пары – выше/ниже	PM6
PP566-SO4-P20	EtOH:вода 4:1, 50°C $a_w=0.6$	PM1
PP566-SO4-P21	EtOH:вода 3:1, 50°C $a_w=0.7$	PM1
PP566-SO4-P22	EtOH:вода 4:1, 5°C $a_w=0.6$	PM1
PP566-SO4-P23	EtOH:вода 3:1, 5°C $a_w=0.7$	PM1

Обзор данных PXRD полученных форм PM1 - PM6 приведен на Фиг. 8.1.

1.3 Полиморфная форма PM1

Полиморфная форма PM1 была получена из MeCN, i-PrOH, ДХМ, ацетона, смеси ацетон:вода 95:5 и смеси ацетон:вода 9:1. PXRD содержит широкие пики, что говорит о низкой кристалличности (Фиг. 8.2), но ^1H -ЯМР показывает, что химическая структура сохраняется (Фиг. 8.3). ТГ-ИК-Фурье для образца PP566-SO4-P2 показывает потерю воды 2.5 вес.%, которая начинается примерно при 50°C и до 150°C, что говорит о гемигидрате (Фиг. 8.4). Тот факт, что форма PM1 была получена из образца в смеси ацетон – вода 9:1 подтверждает, что PM1 стабильна до активности воды 0.7. Неожиданно форма PM1 была получена в экспериментах с безводными растворителями. В этих случаях вода скорее всего берется из исходного соединения, которое содержит около 5% воды, что видно из соответствующих данных ТГ-ИК-Фурье (результаты в настоящем тексте не представлены). Форма PM1 устойчива к вакуумной сушке, и кристалличность сохранялась даже после сушки в течение ночи при 45°C и $p < 30$ мбар (эксперимент PP566-SO4-P9-DRY). Эта форма была также воспроизводимо и независимо получена в независимом эксперименте. Эту форму дополнительно исследовали методами ДСП, ТГ-ИК-Фурье, ДСК и ЯМР.

ДСП проводили в виде двух циклов изменения влажности (Фиг. 8.5). Как и в случае формы PM1 (как аморфного исходного вещества, результаты не показаны в настоящем тексте), данное вещество демонстрирует исключительно сложное поведение в термограмме. Несколько вес.% были потеряны при понижении влажности до 0% RH, и термограмма достигает минимума, когда RH повышается, образец возвращается к весу, близкому к изначальному, и медленно набирает воду (2-3 вес.%), однако, когда достигается 80% RH, вещество быстро адсорбирует около 15 вес.% воды, не выходя на плато, вероятно набор продолжался бы при более длительном хранении вещества примерно при 95% RH. Уровень гидратации выглядит стабильным, когда влажность возвращается к 50% и затем около 0% резко теряет 18 вес.%. Во время второго цикла

набор массы происходит быстрее и похож на такой же процесс в аморфной фазе (результаты в настоящем тексте не представлены), неожиданное резкое уменьшение говорит о перекристаллизации. Затем вещество показывает резкий набор массы почти до 20 вес.%, затем стабильно до конца цикла при 50 вес.%. Такое поведение дает некоторое понимание механизма образования гидратов и подтверждает, что когда соль достигает высокого уровня гидратации и затем подвергается условиям сушки, кристаллическая решетка разрушается и переходит в аморфную фазу; это подтверждается поведением формы РМ6 (см. ниже). Форма РМ1 выглядит стабильной также при суспендировании в смесях EtOH:вода 4:1 и 3:1 при 5°C и 50°C.

В заключение надо сказать, что форма РМ1 остается стабильной в строго контролируемых условиях влажности (около 50%, и во всяком случае ниже 70%RH), что было подтверждено выдерживанием 10 мг РМ1 при 53%RH в течение 10 дней, с последующим PXRD анализом (эксперимент PP566-SO4-P24). Сохранилась полиморфная форма РМ1.

Теоретические и экспериментальные гидраты

Степень гидратации	Содержание воды (%)
Гемигидрат	1.8
Моногидрат	3.7
найденно	2.5

1.4 Полиморфная форма РМ2

Полиморфная форма РМ2 является высококристаллической и была получена только из EtOH. ¹H-ЯМР и ТГ-ИК-Фурье соответствуют моно-EtOH-сольвату (результаты в настоящем тексте не представлены). Интересно, что только следы воды были обнаружены в ТГ-ИК-Фурье анализе, свидетельствуя о том, что EtOH (около 8.3 вес.%) заменил воду в кристаллической решетке и способствует формированию высокоупорядоченной системы. Это согласуется с резкой потерей растворителя при температуре между 120 и 150°C, сильно выше температуры кипения этанола. Эта форма также устойчива к сушке в вакууме, и PXRD остается неизменным после сушки в течение ночи при 30 мбар и 45°C, что подтверждается экспериментом PP566-SO4-P5-DRY.

1.5 Полиморфная форма РМ3

Полиморфная форма РМ3 была получена из суспензии в EtOAc и оказалась слабо кристаллической. Форма РМ3 имеет несколько общих черт в плане ширины линий с формой РМ1, но положение пиков в PXRD диаграмме существенно отличается (результаты в настоящем тексте не представлены). ¹H-ЯМР подтверждает химическую структуру данного соединения (результаты в настоящем тексте не представлены), а данные ТГ-ИК-

Фурье анализа подтверждают сольватированную природу данной формы, показывая выделение EtOAc при температуре до 150°C (результаты в настоящем тексте не представлены). Данная форма также устойчива к вакуумной сушке, и PXRD остается неизменным после сушки в течение ночи при 30 мбар и 45°C, что подтверждается экспериментом PP566-SO4-P6-DRY.

1.6 Полиморфная форма PM4

Полиморфная форма PM4 представляет собой высококристаллическую форму, которая была получена из эксперимента в суспензии MeOH и из нескольких смесей MeOH:вода. Сольватированная природа данной формы подтверждается результатами ¹H-ЯМР и ТГ-ИК-Фурье (результаты в настоящем тексте не представлены). Несмотря на присутствие некоторого количества воды, большая ее часть теряется при температуре около 100°C, и поэтому смешанный гидрат/сольват является маловероятным. С другой стороны, высвобождение MeOH начинается при температуре около 110°C, выше температуры кипения растворителя более чем на 35°C, и заканчивается при 170°C, говоря о том, что MeOH прочно связан в кристаллической решетке. Форма PM4 стабильна до активности воды по меньшей мере 0.6, что было показано в экспериментах от PP566-SO4-P13 до P16.

1.7 Полиморфная форма PM5

Полиморфная форма PM5 была получена из равновесной суспензии в ТГФ и показывает хорошую степень кристалличности с острыми отражениями (результаты в настоящем тексте не представлены). Данное соединение представляет собой ТГФ-сольват с минорным количеством воды, которое не оценивали количественно. ¹H-ЯМР анализ показал, что химическая структура данного солеобразного соединения сохраняется, и ТГФ виден также при 1.76 м.д., но сигнал при 3.63 м.д. перекрывается с другими сигналами (Фиг. 9.16). Количество ТГФ оценивали приблизительно по данным ТГ-ИК-Фурье как сигнал, перекрывающийся с водой, и его содержание составляло менее 3.9 вес.%. Сольватированная природа соединения подтверждалась тем фактом, что ТГФ наблюдается в термограмме при температуре до 160°C, и это говорит о том, что он прочно связан с кристаллической решеткой (Фиг. 9.17). Это можно подтвердить тем фактом, что соединение устойчиво также к сушке в вакууме, и PXRD диаграмма остается неизменной после сушки в течение ночи при 30 мбар и 45°C, что подтверждается экспериментом PP566-SO4-P10-DRY.

1.8 Полиморфная форма PM6

Полиморфная форма PM6 представляет собой наиболее гидратированную форму, полученную в описываемых экспериментах, и она была получена из равновесной

суспензии в воде. Данная форма демонстрирует высокую степень кристалличности (результаты в настоящем тексте не представлены) и выглядит стабильной в течение разумного периода времени даже когда pH понижается до 50%. Сходно с другими полиморфными формами, исследованными в рамках настоящей заявки, химическая структура соединения осталась неизменной (¹H-ЯМР, результаты не показаны в настоящем тексте). Вода, которая содержится в кристаллической решетке, составляет 19.6 вес.%, что близко к гексагидрату, и высвобождается до температуры примерно 150°C (результаты в настоящем тексте не представлены), что соответствует значению, полученному методом ДСП (около 19 вес.%). Эта форма претерпевает трансформацию в аморфную фазу при вакуумной сушке в течение ночи, что подтверждается экспериментом PP566-SO4-P17-DRY.

2. Полиморфы солей фосфорной кислоты с соединением 127

В приведенном ниже эксперименте описано исследование различных полиморфов солей фосфорной кислоты с соединением 127 и определение стабильной формы (или гидрата) фосфатной соли соединения 127 в твердом состоянии. Полиморфы PM1 и PM3 - PM11 с фосфорной кислотой, исследованные в рамках настоящей заявки, представляют собой 2:1 соли соединения 127. Полиморф PM2 с фосфорной кислотой, исследованный в рамках настоящей заявки, представляет собой 1:1 соль соединения 127.

2.1 Характеристика исходного соединения (PP566-PO4-P1)

Порошковая рентгеновская дифракция:

Диаграмма PXRD вещества PP566-PO4-P1 была записана в режиме отражения и подтвердила, что данный образец является частично кристаллическим или мезоморфным (результаты в настоящем тексте не представлены).

ТГ-ИК-Фурье анализ:

ТГ-ИК-Фурье анализ показал, что фосфатный комплекс содержит около 1.3 вес.% изопропанола. PP566-PO4-P1 начинает разлагаться при температуре около 120°C. (результаты в настоящем тексте не представлены).

ДСК анализ:

PP566-PO4-P1 демонстрирует сложное термическое поведение. Температура стеклования наблюдается около 47°C, с изменением теплопоглощения около 0.8 Дж/г•°C, после чего следует эндотермический пик примерно при 57°C. Образец является частично кристаллическим или состоит из мезоморфного (стеклообразный жидкий кристалл) материала (результаты в настоящем тексте не представлены).

¹H-ЯМР спектроскопия:

Химическое строение соединения PP566-PO4-P1 было подтверждено методом ¹H-

ЯМР. Небольшое количество изопропанола наблюдалось в фосфатном спектре, что соответствует данным ТГ-ИК-Фурье анализа. В спектре присутствует широкий сигнал с центром при 5.7 м.д., отнесенный к образователям водородной связи или, возможно, к неполностью депротонированным кислотам (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}).

ДСП анализ:

Поведение вещества исследовали методом ДСП. Соединение PP566-PO4-P1 формирует несколько гидратов. Образец набирает воду в течение нескольких минут и затем выходит на плато при 50% RH, за этим следует формирование возможно безводной фазы при 0% RH, очень чувствительной к воде (начинает набирать массу при 5% RH). Наконец наблюдается плато при 95% RH, но это наиболее гидратированное состояние нестабильно при более низких значениях RH и теряет воду, входя на новое плато при 50% RH (но не то же самое, как изначальное плато, наблюдавшееся в начале эксперимента). Финальное содержание воды при 50% RH составляет около 10%.

Проводили PXRD анализ после ДСП цикла, и он показал присутствие гидратной формы PM5 (результаты в настоящем тексте не представлены).

Элементный анализ:

Исходное соединение подвергали анализу на CHNF, а содержание фосфора определяли методом ICP-OES. Стехиометрия была близка к соотношению соединения 127 : PO₄ = 2:1.

Свод результатов элементного анализа

Комплекс	C (%)	H (%)	N (%)	F (%)	P (%)
1:1 (теор.)	50.1	4.2	16.7	3.6	6.1
2:1 (теор.)	55.1	4.6	18.3	3.9	3.4
Найдено	54.0	5.0	18.0	4.0	3.4

2.2 Исследование полиморфов

Спектр полиморфизма соединения PP566-PO4-P1 исследовали посредством суспендирования вещества в различных растворителях и смесях растворителей для изучения широкого ряда физических состояний и активности воды. Были идентифицированы по меньшей мере 11 кристаллических форм (от PM1 до PM11), но можно предположить существование большего их числа. Обзор результатов приведен ниже в Таблице:

Образец	Растворитель/Условия	Результат
PP566-PO4-P1	Исходное соединение	Мезоморфное вещество
PP566-PO4-P2	MeCN	смесь PM2 + неизвестные пики
PP566-PO4-P3	диоксан	аморфное
PP566-PO4-P4	ДХМ	новая фаза PM1

Образец	Растворитель/Условия	Результат
PP566-PO4-P4-DRY	Вакуумная сушка 45°C/30 мбар	новая фаза PM9
PP566-PO4-P5	EtOH	новая фаза PM2
PP566-PO4-P5-DRY	Вакуумная сушка 45°C/30 мбар	новая фаза PM2
PP566-PO4-P6	EtOAc	новая фаза PM2
PP566-PO4-P7	гептан	Мезоморфное вещество
PP566-PO4-P8	MeOH	новая фаза PM3
PP566-PO4-P8-DRY	Вакуумная сушка 45°C/30 мбар	новая фаза PM3
PP566-PO4-P9	изо-PrOH	новая фаза PM2
PP566-PO4-P10	ТГФ	новая фаза PM4
PP566-PO4-P11	вода	новая фаза PM5
PP566-PO4-P12	ацетон	новая фаза PM2
PP566-PO4-P13	MeOH:вода 3:1 $a_w=0.6$	новая фаза PM6
PP566-PO4-P13-DRY	Вакуумная сушка 45°C/30 мбар	новая фаза PM10
PP566-PO4-P14	MeOH:вода 8:2 $a_w=0.4$	новая фаза PM6
PP566-PO4-P15	MeOH:вода 9:1 $a_w=0.3$	новая фаза PM7
PP566-PO4-P15-DRY	Вакуумная сушка 45°C/30 мбар	новая фаза PM11
PP566-PO4-P16	MeOH:вода 95:5 $a_w=0.2$	смесь PM7 + PM3
PP566-PO4-P17	ацетон:вода 8:2 $a_w=0.8$	смесь PM8 + PM5
PP566-PO4-P18	ацетон:вода 9:1 $a_w=0.7$	смесь PM8 + PM5
PP566-PO4-P19	ацетон:вода 95:5 $a_w=0.5$	новая фаза PM8
PP566-PO4-P19-DRY	Вакуумная сушка 45°C/30 мбар	новая фаза PM8
PP566-PO4-P1 после ДСП	Водные пары – ниже/выше	новая фаза PM5
PP566-PO4-P20	EtOH:вода 8:2, 50°C $a_w=0.6$	аморфное
PP566-PO4-P21	EtOH:вода 3:1, 50°C $a_w=0.7$	аморфное
PP566-PO4-P22	EtOH:вода 8:2, 5°C $a_w=0.6$	новая фаза PM2
PP566-PO4-P23	EtOH:вода 3:1, 5°C $a_w=0.7$	аморфное
PP566-PO4-P24	ацетон	новая фаза PM2

Обзор данных PXRD полученных форм PM1 – PM11 приведен на Фиг. 9.1.

2.3 Полиморфная форма PM1

Полиморфная форма PM1 была получена из ДХМ и показала умеренную кристалличность (результаты в настоящем тексте не представлены), ^1H -ЯМР показывает, что химическая структура сохраняется (результаты в настоящем тексте не представлены). Сигнал в ^1H -ЯМР спектре при 5.57 м.д. показывает наличие ДХМ. ТГ-ИК-Фурье анализ показал потерю ДХМ на 14.2 вес.%, которая начинается примерно при 30°C, вероятно это физически сорбированный ДХМ; однако потеря массы продолжалась до 150°C, что свидетельствует о сольвате (результаты в настоящем тексте не представлены). Эта форма переходит в менее кристалличную форму при вакуумной сушке в течение 12 часов при 45°C.

2.4 Полиморфная форма PM2

Полиморфная форма PM2 является высококристалличной и была получена только из EtOH, а также из нескольких других растворителей, что говорит о том, что она может представлять собой безводную фазу (Фиг. 9.2 и Фиг. 9.6). даже несмотря на то, что данные ^1H -ЯМР и ТГ-ИК-Фурье для эксперимента PP566-PO4-P5 говорят о том, что это может

быть геми-EtOH-сольват (Фиг. 9.3 и 9.4, соответственно), поскольку этанол выделяется при температурах до 170°C, ТГ-ИК-Фурье анализ был проведен на другом образце, где была получена форма РМ2 (эксперимент РР566-РО4-Р12, суспензия из ацетона), и термограмма показала отсутствие высвобождения растворителя, а также отсутствие потери массы вплоть до температуры разложения около 150°C. Это свидетельствует о том, что структура данного соединения может принимать разные растворители в кристаллической решетке и сохранять ту же самую твердотельную структуру. Данная кристаллическая форма устойчива к вакуумной сушке в течение ночи при 45°C. Для этой формы был также проведен анализ методом ДСП. Вещество набирает примерно 0.7 вес.% при 95% RH, выходя на плато, и возвращается к несколько меньшему весу после завершения цикла (Фиг. 9.7). Данное вещество только немного гигроскопично.

Вещество было также подвергнуто элементному анализу, и его результаты соответствуют соли 1:1:

Результаты элементного анализа для РР566-РО4-Р24

Комплекс	С (%)	Н (%)	Н (%)	F (%)	P (%)
1:1 (теор.)	50.1	4.2	16.7	3.6	6.1
2:1 (теор.)	55.1	4.6	18.3	3.9	3.4
Найдено	49.1	4.6	16.1	3.6	5.9

2.5 Полиморфная форма РМ3

Полиморфная форма РМ3 представляет собой высококристаллическую форму, которая была получена из эксперимента в суспензии MeOH и в смеси с формой РМ7 (см. ниже) в смеси MeOH:вода = 95:5. Сольватированная природа данной формы подтверждается результатами ¹H-ЯМР и ТГ-ИК-Фурье (результаты в настоящем тексте не представлены). Высвобождение MeOH начинается при температуре около 90°C, выше температуры кипения растворителя более чем на 35°C, и заканчивается примерно при 120°C резким этапом, говоря о том, что MeOH прочно связан в кристаллической решетке. Интересно отметить, что формирование этой фазы имеет очень узкий диапазон активности воды и дает смешанную сольват/гидратную форму (форма РМ7) несколько ниже $a_w = 0.2$, и не наблюдается следов этой формы при $a_w = 0.3$.

2.6 Полиморфная форма РМ4

Полиморфная форма РМ4 была получена из равновесной суспензии в ТГФ и показала низкую степень кристалличности с широкими отражениями (результаты в настоящем тексте не представлены). Данное соединение представляет собой ТГФ сольват. Спектр ¹H-ЯМР показывает, что химическая структура активного фармацевтического ингредиента остается неизменной, и ТГФ также виден при 1.76 м.д. и при 3.63 м.д.

(результаты в настоящем тексте не представлены). Количество ТГФ можно оценить по ТГ-ИК-Фурье анализу, и оно составляет около 2.8 вес.%. Сольватная природа данной фазы подтверждается тем фактом, что ТГФ можно наблюдать в термограмме вплоть до 180°C вместе с разложением, что подтверждает, что он прочно связан в кристаллической решетке (результаты в настоящем тексте не представлены).

2.7 Полиморфная форма РМ5

Полиморфная форма РМ5 представляет собой наиболее гидратированную форму, полученную в описываемых экспериментах. Она была получена из равновесной суспензии в воде при хранении вещества при 95% RH (см. ДСП исходного вещества). Данная форма демонстрирует высокую степень кристалличности (результаты в настоящем тексте не представлены). Сходно с другими полученными формами, химическая структура активного фармацевтического ингредиента осталась неизменной (¹H-ЯМР, результаты не показаны в настоящем тексте). Воду, которая содержится в кристаллической решетке, нельзя количественно определить методом ТГ-ИК-Фурье, поскольку недостаточно материала было получено в эксперименте PP566-PO4-P11, но этот параметр можно вывести из результатов ДСП (результаты в настоящем тексте не представлены), где он составляет около 11 вес.%.

2.8 Полиморфная форма РМ6

Полиморфная форма РМ6 представляет собой гидрат с меньшим содержанием воды, чем в РМ5, полученный из смеси MeOH:вода = 3:1 и 4:1. Данная форма показывает высокую степень кристалличности (результаты в настоящем тексте не представлены). Как и в случае других полученных форм, химическая структура соединения не была модифицирована (¹H-ЯМР, результаты в настоящем тексте не представлены). Вода высвобождается в ходе ТГ-ИК-Фурье эксперимента в две стадии (результаты в настоящем тексте не представлены). Не наблюдалось следов метанола ни в ТГ-ИК-Фурье анализе, ни в ЯМР спектре. Данная форма образуется при умеренной активности воды (около 0.4 - 0.6).

2.9 Полиморфная форма РМ7

Полиморфная форма РМ7 представляет собой смешанный гидрат/сольват, полученный из смеси метанол:вода 9:1 ($a_w = 0.3$) и является чисто кристаллической фазой (результаты в настоящем тексте не представлены), в которой и метанол, и вода связаны с кристаллической решеткой. Данная форма образуется при относительно низкой активности воды. Данные ТГ-ИК-Фурье анализа показывают высвобождение обоих растворителей в две отдельные стадии (результаты в настоящем тексте не представлены).

2.10 Полиморфная форма РМ8

Полиморфная форма РМ8 судя по всему представляет собой смешанный сольват/гидрат и образуется при активности воды между 0.5 и 0.7 (результаты в настоящем тексте не представлены). Интересно, что ацетоновый сольват не наблюдается, когда соединение перемешивают в чистом ацетоне при комнатной температуре (эксперимент РР566-РО4-Р12).

2.11 Полиморфная форма РМ9

Полиморфная форма РМ9 была получена после выдерживания вещества РР566-РО4-Р4 при 30 мбар и 45°C в течение примерно 12 часов. Данная форма представляется десольватированной формой из РМ1, ДХМ-сольватом. Данная форма является чисто кристаллической и содержит широкие пики в дифрактограмме (результаты в настоящем тексте не представлены).

2.12 Полиморфная форма РМ10

Полиморфная форма РМ10 была получена после выдерживания вещества РР566-РО4-Р13 при 30 мбар и 45°C в течение примерно 12 часов (результаты в настоящем тексте не представлены). Интересно, что данная форма имеет несколько общих черт с гидратной формой РМ5, а не РМ6 (результаты в настоящем тексте не представлены), но является менее кристаллической и имеет слабый сдвиг в область больших значений 2-Тета, говоря о несколько меньших единичных ячейках (это приводит к вероятности того, что это может быть низший гидрат). Данный вывод подтверждается данными ТГ-ИК-Фурье (результаты в настоящем тексте не представлены).

2.13 Полиморфная форма РМ11

Полиморфная форма РМ11 была получена после выдерживания вещества РР566-РО4-Р15 при 30 мбар и 45°C в течение примерно 12 часов (результаты в настоящем тексте не представлены). Данная форма является чисто кристаллической, ТГ-ИК-Фурье анализ показал присутствие воды (результаты в настоящем тексте не представлены).

III. Фармакологические тесты

Описанные ниже фармакологические тесты проводили с избранными соединениями в форме соответствующего свободного основания и/или в форме тройной HCl-соли. Поскольку соединение, имеющее формулу (I), главным образом составляет действующее вещество, ожидалось сравнимые результаты активности для соответствующих солей по настоящему изобретению. Описанные ниже результаты экспериментов подтверждают, что новые соли (включая их сольваты, гидраты и полиморфы и т.д.) по настоящему изобретению сохраняют свое действие как ингибитора ферропортина и могут также усиливать ингибирующее действие на ферропортин и/или улучшать фармакокинетический профиль соединений и/или улучшать физикохимические

свойства соединений, облегчая их введение в готовые фармацевтические формы, и/или обладают преимуществом, позволяющим выделять их в кристаллической форме, что улучшает физикохимические свойства соединений, облегчая введение этих соединений в готовые фармацевтические формы или облегчая работу с ними или улучшая их стабильность.

В частности, в описанных ниже тестах соединения тестировали в форме тройной соли (ЗНСІ) и/или в форме свободного основания, как представлено ниже:

Соединение	Основание	ЗНСІ соль
1	+	+
2	+	-
4	+	-
40	+	+
94	+	+
118	-	+
126	+	+
127	+	+
193	+	-
206	+	-
233	+	-
234	+	-
208	+	-
225	+	+

1. Тест интернализации гепсидина (J774)

Этот клеточный тест позволяет количественно оценить связывание гепсидина с ферропортином (Fpn) посредством микроскопического детектирования интернализации флуоресцентно-меченого гепсидина в J774 клетках. J774 – это клеточная линия мышинных макрофагов, для которой было показано эндогенное экспрессирование Fpn при инкубировании с железом (Knutson et al, 2005). Связывание гепсидина с Fpn запускает интернализацию и разложение гепсидина и Fpn. Однако, TMR (6-карбокситетраметилродаминовый) флуорофор, присоединенный к гепсидину, остается ассоциирован с клеткой после разложения пептидного остова гепсидина. Поэтому микроскопическое детектирование флуоресценции от ассоциированного с клеткой TMR служит мерой связывания гепсидина с Fpn и интернализации гепсидина и Fpn. Если предотвращается связывание комплекса TMR-гепсидин с Fpn, то клеточная TMR-флуоресценция остается низкой (Dürrenberger et al, 2013). Влияние низкомолекулярных Fpn-ингибирующих соединений в данном тесте оценивали *in vitro*, как описано ниже.

J774 клетки, которые собирали из культур с конfluenceностью около 80%, высевали в концентрации 8×10^5 клеток/мл в полной среде (DMEM, 10% FBS, 1%

пенициллин-стрептомицин), содержащей 200 мкМ Fe(III)NTA (нитрилотриуксусная кислота), 100 мкл на лунку в 96-луночных планшетах MicroClear (Greiner; Cat. 655090), и выращивали при 37°C с 5% CO₂. После инкубирования в течение ночи, клетки 4 раза промывали предварительно подогретым DMEM без фенолового красного, 30 мкл/лунку DMEM без фенолового красного добавляли после финальной промывки, и добавляли 10 мкл/лунку серийных разбавлений тестируемых соединений в трех повторах. J774 клетки пре-инкубировали с тестируемыми соединениями при 37°C с 5% CO₂ в течение 15 минут, после чего добавляли TMR-гепсидин до финальной концентрации 25 нМ. Клетки инкубировали в общем объеме 50 мкл при 37°C с 5% CO₂ в течение 2 часов, затем добавляли краситель Hoechst 33342 в финальной концентрации 0.5 мкг/мл для окраски ядер, и далее инкубировали 10 минут при 37°C с 5% CO₂. Клетки 3 раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и фиксировали в 100 мкл 4%-ного раствора параформальдегида в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре. После удаления раствора параформальдегида, клетки 3 раза промывали фосфатно-солевым буферным раствором, оставляя 100 мкл на лунку, и планшеты закрывали пленкой. Регистрировали картины флуоресценции TMR (530-550 нм возбуждение/575-625 нм испускание/400 мс время экспозиции) и Hoechst 33342 (360-370 нм возбуждение/420-460 нм испускание/10 мс время экспозиции) с помощью спектрофотометра ScanR (Olympus) для считывания планшетов, оснащенного 20x светосильным объективом. Регистрировали четыре изображения на лунку, покрывающие около 1500 клеток на лунку. Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ScanR для анализа изображений. Анализ изображений включал детектирование ядер (Hoechst 33342 флуоресценция), идентификацию ассоциированных с клеткой регионов, применение виртуального канала и определение порога для уменьшения фона по типу катящегося шара, после чего применяли алгоритм средней суммы для измерения TMR флуоресценции, связанной с клетками, как количественного параметра оценки интернализованного TMR-гепсидина. Значения IC₅₀ вычисляли по полученным данным средней суммы с использованием статистической обработки кривых “log(ингибитор) vs. ответ” в программе Prism 5 (GraphPad Software Inc., версия 5.02). Для каждого набора данных сравнивали соответствие модели “log(ингибитор) vs. ответ (три параметра)” и соответствие модели “log(ингибитор) vs. ответ – Изменяемый наклон (четыре параметра)”, и использовали данные IC₅₀ для предпочтительной модели. IC₅₀ данные для ингибиторов Fpn, протестированных в тесте интернализации гепсидина, перечислены в Таблице 1. Значение IC₅₀ для немеченого гепсидина в этом тесте составляет 0.015 ± 0.011 мкМ.

Таблица 1. Показаны средние данные IC₅₀ для ингибиторов Fpn, протестированных в тесте интернализации гепсидина, для нескольких измерений.

Таблица 1

Соед.	J774 IC ₅₀ (мкМ)
1	0.012
2	0.035
4	0.155
40	0.049
94	0.012
118	0.103
126	0.096
127	0.009
193	0.287
206	0.18
208	0.012
233	16

2. Биофизический тест связывания ферропортина с гепсидином

Этот биофизический тест был разработан для более прямого подтверждения ингибирования связывания гепсидина с ферропортином (Fpn). Инкубирование TMR-гепсидина с очищенным человеческим Fpn, выделенным из дрожжевых клеток *Pichia pastoris*, экспрессирующих человеческий Fpn с С-терминальным аффинным маркером FLAG (Bonaccorsi di Patti, 2014), приводит к увеличению флуоресцентной поляризации (ФП) TMR-гепсидинового лиганда. Низкомолекулярные ингибиторы Fpn тестировали на предмет ингибирования связывания TMR-гепсидина с Fpn, детектируя по дозозависимому снижению TMR ФП сигнала, как подробно описано ниже.

Смесь 1.3 мкМ человеческого Fpn и 30 нМ TMR-гепсидина в буфере для ФП анализа, содержащем 50 mM Tris-HCl pH 7.3, 200 mM NaCl, 0.02% DDM, 0.1% BSA, распределяли в 384-луночный черный планшет с круглодонными лунками малого объема (Corning, Cat. 3677) по 16 мкл на лунку. Добавляли по 8 мкл серийных разведений тестируемых соединений в дубликатах, с финальными концентрациями Fpn и TMR-гепсидина 1 мкМ и 20 нМ, соответственно. Планшеты инкубировали 90 минут при комнатной температуре и измеряли параллельную (S) и перпендикулярную (P) флуоресценцию с помощью спектрофотометра для чтения планшетов для визуализации флуоресценции Synergy H1 (BioTek). Значения ФП вычисляли как mP по приведенной ниже формуле.

$$mP = \frac{F_{\text{паралл}} - F_{\text{перпенд}}}{F_{\text{паралл}} + F_{\text{перпенд}}} \times 100$$

Значения IC₅₀ определяли по вычисленным значениям mP как описано для теста интернализации гепсидина и заносили в Таблицу 2. Значение IC₅₀ для немеченого гепсидина в данном тесте составляет 0.37 ± 0.067 мкМ.

Таблица 2. Приведены средние (AVE) для нескольких измерений данные IC₅₀ для ингибиторов Fpn, протестированных в биофизическом тесте связывания ферропортина с гепсидином.

Таблица 2

Соед.	FP IC50 (мкМ)
1	0.016
2	0.017
40	0.068
94	0.044
118	0.25
126	0.12
127	0.023
193	0.074
206	0.036
208	0.019
233	6.776

3. Ингибирование осуществляемого ферропортином транспорта железа в анализе вызванного железом ответа.

Внутриклеточные концентрации железа в данном тесте косвенно измеряют путем мониторинга активности репортерного гена бета-лактамазы (BLA), гибридизированного с промотером человеческого ферритина и связанного с ним регулирующего элемента фактора, контролирующего содержание железа (IRE), содержащегося в 5' нетранслируемой области мРНК ферритина. Экспрессирование ферропортина (Fpn) в такой линии клеток приводит к оттоку железа и пониженному уровню железа, что отражается пониженной активностью репортерного гена. С другой стороны, ингибирование Fpn-опосредованного оттока железа приводит к повышению концентрации железа в клетке, что детектируется как повышенная активность репортерного гена. Низкомолекулярные соединения, являющиеся ингибиторами Fpn, тестировали на предмет дозозависимых эффектов в таком *in vitro* анализе вызванного железом ответа, как описано ниже.

НЕК-293 линию клеток #354 генерировали путем устойчивого интегрирования (i) химерной конструкции человеческий Fpn-GFP, вставленной в производное доксициклин-индуцируемой pTRE-Tight-BI плазмиды (Clontech, Cat. 631068), и (ii) конструкции промотер человеческого ферритина-BLA репортерный ген в производное НЕК-293 Tet-

ON Advanced линии клеток (Clontech). Для создания конструкции ферритин-BLA репортерный ген, 1.4 kb фрагмент промотера человеческого ферритина Н амплифицировали методом ПЦР из человеческой геномной ДНК (прямой праймер 5'-CAGGTTTGTGAGCATCCTGAA-3'; обратный праймер 5'-GGCGGCGACTAAGGAGAGG-3') и вводили перед BLA геном, присутствующим в pcDNA™6.2/cGeneBLAzer™-DEST плазмиде (Invitrogen, Cat. 12578-043), тем самым замещая оригинальный CMV промотер, и помещали IRE, регулирующий трансляцию гена ферритина, примерно на 170 пар оснований выше иницирующего кодона репортерного гена. #354 клетки собирали из культур с примерно 80%-ной конfluence, высевали в концентрации 1.8×10^5 клеток/мл в среде DMEM/F12 GlutaMAX™ (Invitrogen, Cat. 31331-028), содержащей 10% FBS (Clontech, Cat. 631106), 1% пенициллин-стрептомицин, 200 мкг/мл Гигромицин В (Invitrogen, Cat. 10687-010), бластицидин 5 мкг/мл (Invitrogen, Cat. R210-01), 4 мкг/мл доксициклин (Clontech, Cat. 631311), в объеме 50 мкл на лунку в 384-луночные планшеты, покрытые поли-d-лизином (PDL), и инкубировали при 37°C с 5% CO₂. После инкубирования в течение ночи, добавляли серийные разведения тестируемых соединений (10 мкл/лунку) в четырех повторах, и планшеты далее инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Клетки промывали 3 раза сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS), оставляя 25 мкл на лунку. Активность BLA определяли путем добавления к клеткам 5 мкл/лунку GeneBlazer реагента CCF4-AM (Invitrogen, Cat. K1085). После инкубирования планшетов в темноте при 18°C в течение 60 минут, измеряли сигналы синей и зеленой флуоресценции на сканирующем спектрофотометре для чтения планшетов Safire2 (Tecan) с длиной волны возбуждающего луча 410 нм и испусканием при 458 нм (синий) и 522 нм (зеленый). Вычисляли соотношение интенсивности синей/зеленой флуоресценции как критерий активности BLA, и определяли значение EC₅₀ по вычисленному соотношению синей/зеленой флуоресценции, как описано для анализа интернализации гепсидина. Данные EC₅₀ для протестированных ингибиторов Frp приведены в Таблице 3. Значение EC₅₀ для гепсидина в этом тесте составляет 0.096 ± 0.063 мкМ (n = 37).

Таблица 3. Средние (AVE) значения EC₅₀ для ингибиторов Frp, протестированных в анализе вызванного железом ответа, приведены для нескольких измерений.

Таблица 3

Соед.	BLAzer EC50 (мкМ)
1	0.93
2	1.03
4	1.259
40	1.45

Соед.	BLAzer EC50 (мкМ)
94	0.53
118	2.69
126	1.26
127	0.42
193	3.64
206	3.26
208	0.50

4. Анализ интернализации и разложения ферропортина

НЕК-293 линию клеток #354 (описана в Примере 3) использовали для измерения способности соединений вызывать интернализацию и разложение ферропортина (Fpn) методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Инкубирование НЕК-293 #354 клеток в доксициклин-содержащих средах индуцировало экспрессию химерного белка человеческий Fpn-GFP на поверхности клеток. Данные 10 независимых экспериментов показали, что выращивание НЕК#354 клеток в течение 48 часов в присутствии 4 мкг/мл доксициклина индуцировало в среднем $42.6\% \pm 6.4\%$ Fpn-GFP-положительных клеток. Низкомолекулярные Fpn-ингибирующие соединения тестировали на предмет дозозависимого влияния на Fpn-GFP среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) на линии клеток НЕК-293 #354, как описано ниже.

НЕК#354 клетки собирали из культур с конfluenceностью около 80%, высевали в концентрации 0.6×10^6 клеток/мл в среде DMEM/F12 GlutaMAX™ (Invitrogen, Cat. 31331-028), содержащей 10% FBS (Clontech, Cat. 631106), 1% пенициллин-стрептомицин (Invitrogen, Cat. 15140-122), 200 мкг/мл Гигромицин В (Invitrogen, Cat. 10687-010), Бластицидин 5 мкг/мл, (Invitrogen, Cat. R210-01), 4 мкг/мл доксициклин (Clontech, Cat. 631311), в количестве 50 мкл на лунку в 384-луночных планшетах (Greiner; Cat. 781091) и выращивали при 37°C с 5% CO₂. После инкубирования в течение ночи, добавляли 10 мкл/лунку серийных разбавлений тестируемых соединений в четырех повторах, и планшеты инкубировали далее при 37°C с 5% CO₂ в течение ночи. Клетки один раз промывали FACS-буфером (фосфатно-буферный солевой раствор, содержащий 1% FBS, 2 mM EDTA и 0.05% NaN₃), собирали в FACS-буфере с 0.5 мкг/мл иодида пропидия (Sigma, Cat. P4864) и анализировали на проточном цитометре (CANTO™ II, BD Biosciences), оснащенном высокопроизводительным сэмплером. Живые НЕК#354 клетки отделяли как отрицательную по иодиду пропидия популяцию и анализировали на предмет экспрессирования Fpn-GFP. Вычисляли значение MFI Fpn-GFP для >2000 живых клеток для каждого разведения соединения, используя FlowJo (Tree Star's, Oregon), и вычисляли потенциал Fpn-ингибиторов к индуцированию интернализации и разложения Fpn-GFP,

как описано для анализа интернализации гепсидина. Значения EC_{50} для ингибиторов Fpn, протестированных в анализе интернализации и разложения ферропортина методом FACS, приведены в Таблице 4. Среднее значение EC_{50} для гепсидина в этом анализе составляет 0.004 ± 0.002 мкМ.

Таблица 4. Средние (AVE) значения EC_{50} для ингибиторов Fpn, протестированных в анализе интернализации и разложения ферропортина, приведены для нескольких измерений.

Таблица 4

Соед.	EC_{50} (мкМ)
1	0.22
2	0.63
4	1.198
40	0.81
94	0.22
118	4.908
126	0.757
127	0.081
193	3.946
193-B	1.391
206	2.072
208	0.15

5. Анализ убиквитинирования и разложения ферропортина

Известно, что контакт клеток, экспрессирующих ферропортин (Fpn), с гепсидином инициирует убиквитинирование и последующие интернализацию и разложение Fpn (Qiao, 2012). Способность ингибиторов Fpn вызывать убиквитинирование и разложение Fpn исследовали путем анализа иммунопреципитации с использованием J774 линии клеток мышинных макрофагов, которая экспрессирует Fpn при обработке железом.

J774 клетки (DSMZ, Cat. ACC170) высевали в концентрации 0.8×10^6 клеток/мл в 15 мл среды (DMEM Gibco Cat. 11971-025, 10% инактивированной нагреванием FBS Gibco Cat. 10500-064, 1% пенициллин-стрептомицин Gibco Cat. 15140-122), содержащей 200 мкМ Fe(III)-NTA, в чашках Петри диаметром 10 см (Greiner Cat. 664160) и инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Клетки инкубировали с синтетическим человеческим гепсидином (Bachem, Cat. H-5926) или Fpn-ингибирующими соединениями 10 минут или 120 минут. Клетки промывали и лизировали ледяным лизирующим буфером (Pierce, Life Technologies, Cat. 87787), включающим смесь ингибиторов протеаз 1X HALT (Life technologies, Cat. 78429) и 10 мМ иодацетамид (Sigma, Cat. I6125) для стабилизации убиквитинированных белков. Иммунопреципитацию проводили с помощью Pierce Classic IP Kit (Life Technologies, Cat. 26146) согласно методике производителя. Вкратце, 2 мг

белка в 1.25 мл IP лизисного буфера инкубировали посредством перемешивания в течение 1 часа при 4°C с контрольным агарозными бусинами для предварительной очистки лизата и уменьшения неспецифичного сигнала. Несвязанный лизат затем инкубировали в течение ночи с 12 мкг (на реакцию) аффинно-очищенного анти-Fpn антитела F308, которое выращивали против GST химерного белка аминокислот 224-308 мышинового Fpn. Иммунные комплексы улавливали путем прикапывания бусин Pierce Protein A/G Plus Agarose (Life Technologies, Cat. 20423) из расчета 14 мкл на реакцию, и полученную суспензию инкубировали 1.5 часа при 4°C с аккуратным перемешиванием переворачиванием. Бусины промывали, и иммунные комплексы напрямую элюировали 75 мкл буфера SDS NuPAGE LDS (Life Technologies, Cat. NP0007), содержащего DTT (Life Technologies, Cat. NP0009).

После иммунопреципитации образцы анализировали методом Вестерн-блоттинга с применением сыворотки, содержащей кроличьи антитела к мышинному MTP1 (Alpha Diagnostic International, Cat. MTP11-A), и моноклональных мышинных антител к моно- и полиубиквитинированным конъюгатам (Enzo Lifesciences, Cat. BML-PW8810) для детектирования ферропортина и убиквитина, соответственно. Конъюгированные с пероксидазой хрена мышинные моноклональные антитела к легкой цепи IgG кролика (Abcam, Cat. ab99697) и к мышинному IgG H&L (Abcam, Cat. ab6789) использовали в качестве вторичных антител.

Ряд из одиннадцати ингибиторов Fpn тестировали этим методом и сравнивали с гепсидином. Как показано на Фиг. 10 и в Таблице 5, обработка клеток ингибиторами Fpn приводит к быстрому убиквитинированию в течение 10 минут (Фиг. 10 верхняя часть) и разложению Fpn через 2 часа (Фиг. 10 нижняя часть). Степень разложения Fpn ингибиторами Fpn была сравнима с эффектом гепсидина. Однако, обработка гепсидином давала убиквитинированный Fpn с более высоким молекулярным весом, по сравнению с обработкой ингибитором Fpn, свидетельствуя о поли-убиквитинировании при воздействии гепсидина, в отличие от моно-убиквитинирования при воздействии ингибитора Fpn.

Таблица 5. Свод результатов по ингибиторам Fpn, протестированным в анализе убиквитинирования и разложения Fpn. Эффект от обработки ингибиторами Fpn в отношении разложения Fpn и убиквитинирования Fpn оценивали визуально по Вестерн-блоттингу (+ сравнимый с гепсидином; - нет эффекта; +/- средний эффект).

Таблица 5

Соед.	Концентрация (мкМ)	Убиквитинирование Fpn (10 мин.)	Разложение Fpn (120 мин.)
1	0.12	+	+
40	1.9	+	+
94	0.3	+	+
126	0.8	+/-	+
127	0.1	+	+
208	0.2	+	+
Гепсидин	0.15	+	+

Фиг. 10. Ингибитор Fpn инициирует убиквитинирование и разложение Fpn, экспрессируемого в линии клеток мышинных макрофагов. J774 клетки инкубировали в течение ночи с Fe(III)-НТА для инициирования выработки Fpn. Затем клетки обрабатывали 10-кратными IC₅₀ концентрациями, определенными в анализе интернализации гепсидина (см. Таблицу 1), гепсидином (Гепсидин, 150 нМ) или ингибиторами Fpn: Соединение № 208 (210 нМ), Соединение № 167 (1.5 мкМ), Соединение № 127 (120 нМ), Соединение № 152 (40 нМ) в течение 10 или 120 минут перед сбором и иммунопреципитацией анти-Fpn антителом F308. Клетки, обработанные без добавления активных веществ, собирали через 120 минут (Контроль).

Иммуноблоттинг иммунопреципитатов с анти-Fpn антителом МТР1 выявил исчезновение ферропортина через 120 минут после обработки ингибиторами Fpn, в сопоставимой с образцом, обработанным гепсидином, степени (верхняя часть). Быстрое убиквитинирование Fpn наблюдалось через 10 минут после обработки клеток ингибиторами Fpn и гепсидином. Белковые стандарты молекулярных весов приведены слева в кДа.

6. Подавление выведения железа ингибиторами ферропортина

Активность гепсидина и соединений-ингибиторов ферропортина в плане способности блокировать экспорт железа посредством ферропортина тестировали на клетках T47D (ECACC, Cat. 85102201), как описано ниже.

Клетки размещали в 24-луночных планшетах (Greiner, Cat. 662160) по 350000 клеток в лунку и инкубировали в течение ночи с 100 мкМ ⁵⁸Fe (⁵⁸Fe(II)-сульфат, Vifor Pharma Batch No. ROR 3085) в среде, содержащей 500 мкМ L-аскорбиновой кислоты (Sigma Aldrich, Cat. 795437). Клетки один раз промывали 500 мкл буфером захвата железа (IUB; PIPES 40мМ, Cat. P1851, глюкоза моногидрат 10 мМ, Cat. 49158, хлорид натрия 260 мМ, Cat. 71379, хлорид калия 20 мМ, Cat. P9541, сульфат магния 2 мМ, Cat. 63138, Sigma Aldrich), затем один раз удаляющим буфером (2 минуты инкубирования, BPDS 100 мкМ, Cat. 11890 и Na₂S₂O₄ 500 мкМ, Cat. 157953, Sigma Aldrich, в IUB), и снова два раза IUB.

Серийные разведения гепсидина (Bachem) или ингибиторов ферропортина (4 мкМ-0.0064 мкМ, 5-кратное разведение) добавляли в общем объеме 0.6 мл на лунку. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 20 часов. Собирали надосадочные растворы и определяли содержание ⁵⁸Fe с применением масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2). Отделяли пеллеты для измерения концентрации белков. Результаты наносили на диаграмму, выражая их в нанограммах ⁵⁸Fe в надосадочном растворе на миллиграмм белка в клеточных лизатах. Соединение 127 подавляло выведение железа в близкой степени с эндогенным Fpn лигандом гепсидином (Фиг. 11).

Фиг. 11. Репрезентативный пример подавления выведения железа гепсидином (IC₅₀: 0.086 мкМ) и соединением 127 (IC₅₀: 0.080 мкМ).

7. Гипоферремия у интактных мышей

Инъектирование синтетического гепсидина интактным мышам (дикий тип) приводило к понижению уровня железа в плазме крови (на 40-50% относительно контрольной группы) с максимальным эффектом через 3-4 часа после введения (Rivera, 2005; Фиг. 12A). Эти данные говорят о том, что вводимый инъекционно гепсидин связывается и инициирует интернализацию ферропортина (Fpn) в дуоденальных энтероцитах и спленоцитах, вызывая быстрое падение уровня железа в плазме крови. Аналогично, вводимые перорально низкомолекулярные ингибиторы Fpn понижали уровень железа в плазме крови у WT C57BL/6 мышей дозозависимым образом, с эффективностью, сравнимой с гепсидином. Эти данные показывают, что интактных мышей можно использовать в качестве простой и надежной модели для тестирования острой эффективности ингибиторов Fpn *in vivo*.

Самок C57BL/6 мышей (Janvier, France) в возрасте 9 недель держали на стандартной диете (Harlan ProVimi Kliba 3436) и вводили перорально (р.о.) соединения или соответствующее количество носителя в объеме 10 мл/кг веса тела. Ингибиторы Fpn вводили в виде препарата в 0.5%-ном растворе метилцеллюлозы в воде или 20% stromphor EL/ вода и вводили перорально мышам в дозировке 10, 30 или 100 мг/кг веса тела. Через 3 часа мышей претерминально усыпляли в камерах с изофлураном и брали образцы крови из ретроорбитального сплетения. Мышей умерщвляли цервикальной дислокацией и отбирали селезенку, печень и двенадцатиперстную кишку, используя их в дальнейшем для биомаркерного анализа. Все эксперименты проводили в соответствии с лицензией, подтвержденной компетентными ветеринарными службами. Плазму отделяли центрифугированием крови в гель-содержащих микроконтейнерах, и уровень железа в

плазме определяли с помощью теста MULTIGENT Iron assay (Abbott Diagnostics, 6K95). В каждой группе было по восемь мышей, и применяли однонаправленный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений для анализа статистических различий между экспериментальными группами. Эффективность некоторых ингибиторов Fpn для WT C57BL/6 мышей приведена в Таблице 6.

Фиг. 12. Снижение уровня железа в плазме крови, вызываемое гепсидином и ингибитором ферропортина соединением 94 (Соединение 94).

А Кинетика уровня железа у нативных мышей C57BL/6, которым инъецировали синтетический гепсидин (5 мг/кг) интраперитонеально (i.p.) в течение указанного времени. * - ***- показывает статистически значимое снижение уровня железа в плазме крови по сравнению с мышами, которым вводили фосфатно-солевой буфер (PBS).

В Уровень железа в плазме крови у нативных мышей C57BL/6, которым вводили указанные количества гепсидина (i.p.) или соединения 94 (p.o.) в течение 3 часов.

Таблица 6. Эффективность ингибиторов Fpn, протестированных в модели гипоферремии у нативных мышей.

Снижение уровня железа в плазме крови, индуцируемое некоторыми ингибиторами ферропортина, вводимыми p.o. нативным WT C57BL/6 мышам в дозировке 10, 30 и 100 мг/кг. Относительное снижение уровня железа в плазме крови через 3 часа после введения вычисляли вычитанием средних значений концентрации железа в плазме крови у животных, которым вводили ингибитор Fpn, из значения для животных, которым вводили только носитель. Полученную разницу в средних значениях содержания железа между контрольной группой и группой, которой вводили тестируемое соединение, затем делили на среднее содержание железа в плазме для контрольной группы (которой вводили только носитель) и вносили в таблицу в виде процентов.

Таблица 6

Соед.	Снижение уровня железа в плазме через 3 часа (%)		
	Доза 10 мг/кг	Доза 30 мг/кг	Доза 100 мг/кг
1	0	28	51
2	9	26	50
40	10	30	50
94	30	50	80
118	8	24	49
126	7	23	62
127	17	47	54
193	13	11	31
208	50	65	73

8. Предотвращение всасывания железа у анемичных крыс

Для оценки эффективности *in vivo* ингибиторов ферропортина (Fpn) в отношении блокирования всасывания железа, серию ингибиторов Fpn протестировали в крысиной модели анемии на всасывание железа. Крыс линии Wistar (возраст 3-4 недели, n=5, Janvier Labs) держали на диете с низким содержанием железа (Provimi-Kliba, Cat. 2039) до момента, когда их показатель гемоглобина (Hb) достигал 7 - 8 г/дл за один день до введения ингибиторов Fpn. За один час до перорального введения 0.5 мг/кг сульфата железа, перорально вводили тестируемые соединения в виде препарата в растворе метилцеллюлозы или Stemophor. Брали образцы крови из хвостовой вены за один час до введения железа (-1ч), сразу после введения ингибиторов Fpn (0ч) и через 1 час (1ч), три часа (3ч) и иногда вплоть до 6 часов (6ч) после введения тестируемых соединений. Измеряли содержание железа в плазме крови (Abbott Diagnostics, Cat. 6K95) и вычисляли подавление роста содержания железа в плазме крови через три часа после введения тестируемых соединений, как критерий эффективности ингибиторов Fpn в блокировании всасывания железа (Таблица 7). Как показано на Фиг. 4, пероральное введение ингибитора Fpn – Иллюстративного Примера № 55 – в дозировке 3 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг снижало содержание железа в плазме крови на 54%, 72% и 89%, соответственно, через три часа после введения железа, по сравнению с содержанием железа в плазме крови у контрольных животных перед введением железа, с корректировкой на фоновую концентрацию железа в плазме крови у контрольных животных, которым не вводили дозу железа.

Таблица 7. Ингибиторы Fpn, протестированные в крысиной модели анемии на предмет подавления всасывания железа. Показаны значения относительного подавления (%) роста концентрации железа в плазме крови, скорректированные на средние фоновые значения концентрации железа в плазме крови в контрольной группе, которой не вводили дозу железа, в сравнении с контрольными группами, которым вводили только носитель перед введением железа. Показаны средние значения для групп (n=5), которым вводили указанные дозировки ингибитора Fpn. Показаны статистически значимые (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием Бонферрони) различия между тестовой группой (вводили тестируемое соединение) и контрольной группой (вводили только носитель) (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Таблица 7

Соед.	Подавление роста концентрации железа в крови (%) через 3 часа				
	Доза 1 мг/кг	Доза 3 мг/кг	Доза 10 мг/кг	Доза 30 мг/кг	Доза 100 мг/кг
1	н.о.	2.1	42.6**	64.9***	н.о.
2	н.о.	-3	29**	57***	н.о.

40	н.о.	н.о.	32**	53***	97***
94	59***	0	70***	н.о.	н.о.
127	н.о.	-8	47***	79***	н.о.
208	н.о.	59***	86***	109***	н.о.

9. Коррекция гиперферремии у мышей с дефицитом бета2-микроглобулина

Мутации в генах, участвующих в регулировке работы системных депо железа, таких как гепсидин (*Hamp1*), вызывают перенасыщение железом у мышей и людей. HFE, HJV и TFR2 молекулы на гепатоцитах необходимы для сигнализации об адекватной выработке гепсидина, и их дефицит приводит к патофизиологически низким концентрациям гепсидина и избыточному всасыванию железа. HFE мутации являются наиболее частой причиной врожденного гемохроматоза (НН) у людей европеоидной расы. HFE является представителем МНС-класса изо-мембранной молекулы, которая связывается с бета2-микроглобулином и участвует в транскрипционной регулировке гепсидина через рецептор костного морфогенетического белка (BMPR). HFE^{-/-} мыши имеют пониженный уровень гепсидина, у них развивается гиперферремия и высокое содержание железа в печени, что делает их подходящей животной моделью для изучения перенасыщения железом у людей (Zhou, 1998). У мышей с дефицитом бета2-микроглобулина (*b2m*^{-/-}) развивается гиперферремия и гемохроматоз, аналогично HFE^{-/-} животным, поскольку бета2-микроглобулин необходим для экспрессирования HFE на поверхности клеток и функционирования HFE (Rothenberg and Volland, 1996). Вследствие недоступности HFE^{-/-} мышей, использовали *b2m*^{-/-} мышей в качестве модели перенасыщения железом. Пилотное исследование подтвердило, что мыши HFE^{-/-} и *b2m*^{-/-} имеют сходные параметры, имеющие отношение к обмену железа.

Самок и самцов гомозиготных *b2m*^{-/-} мышей получали от Jackson Laboratories (B6.129P2-B2mtm1Unc/J, Stock Number: 002087) в возрасте от 6 до 7 недель и держали на стандартной диете (Harlan Provimi Kliba 3436) без ограничения доступа к пище и воде. Мышей WT C57BL/6 соответствующего возраста и пола получали от Charles River. Для изучения острых эффектов ингибиторов ферропортина (Fpn) на перенасыщение железом, *b2m*^{-/-} мышам вводили тестируемые соединения или соответствующее количество носителя в объеме 10 мл/кг веса тела. Соединения-ингибиторы Fpn вводили в виде препарата в 0.5% метилцеллюлоза/вода или 20% cremophor EL/вода, и вводили мышам перорально в дозировке 50 мг/кг веса тела. WT контрольные животные получали только носитель. Через три часа мышей претерминально усыпляли в камерах с изофлураном и брали образцы крови из ретроорбитального сплетения. Мышей умерщвляли цервикальной

дислокацией и отбирали селезенку, печень и двенадцатиперстную кишку, используя их в дальнейшем для биомаркерного анализа. Все эксперименты проводили в соответствии с лицензией, подтвержденной компетентными ветеринарными службами. Плазму отделяли центрифугированием крови в гель-содержащих микроконтейнерах (BD Biosciences), и уровень железа в плазме определяли с помощью теста MULTIGENT Iron assay (Abbott Diagnostics, 6K95). В каждой группе было по 4-9 мышей, и применяли однонаправленный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони для множественных сравнений для анализа статистических различий между экспериментальными группами.

Для исследования эффекта ингибиторов Fpn – Соединения 40 и Соединения 94 – в условиях перенасыщения железом, b2m^{-/-} мышам или WT контрольным животным вводили ингибиторы Fpn или носитель в течение 3 часов. Вследствие своей генетически обусловленной недостаточности, b2m^{-/-} мыши, которым вводили только носитель, показывали существенно более высокий уровень железа в плазме крови, по сравнению с WT мышами (Фиг. 13, среднее для группы 60 мкМ в А и 56 мкМ в В). Введение b2m^{-/-} мышам Соединения 40 или Соединения 94 в дозировке 50 мг/кг в течение 3 часов корректировало повышенный уровень железа в плазме крови до значений, наблюдаемых у контрольных WT животных. Эти данные демонстрируют острую эффективность низкомолекулярных ингибиторов ферропортина в релевантной модели заболевания. Коррекция содержания железа в плазме крови наблюдалась в дополнительных исследованиях, как кратко резюмировано в Таблице 8.

Фиг. 13. Полная корректировка повышенного содержания железа в плазме крови у b2m^{-/-}-мышей при введении ингибиторов ферропортина – Соединение 40/метилцеллюлоза (А.) и Соединение 94/stemorphor EL (В.) – в течение 3 часов.

Таблица 8. Ингибиторы Fpn, протестированные в мышинной модели дефицита бета2-микроглобулина на предмет снижения повышенного содержания железа в плазме крови.

Кровь брали через 1 (#) или 3 (##) часа после перорального введения указанных дозировок ингибиторов Fpn мышам с дефицитом бета2-микроглобулина и определяли концентрации железа в плазме крови. Показано относительное уменьшение (%) содержания железа в плазме крови, которое вычисляли путем вычитания средних значений содержания железа у животных, которым вводили ингибитор Fpn, из значений, найденных для животных, которым вводили только носитель. Разницу в средних значениях содержания железа между контрольной (вводили только носитель) и тестовой (вводили тестируемые соединения) группой затем делили на среднее содержание железа в контрольной группе и выражали в процентах. Значения для самок (♀) и самцов (♂)

приведены отдельно, поскольку было отмечено выраженное половое различие в эффективности. Показаны обнаруженные статистически значимые (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием Бонферрони) различия между группами, которым вводили тестируемое соединение, и контрольными группами (вводили только носитель) (** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Таблица 8

Соед.		Снижение содержания железа в крови (%)	
		Доза 20 мг/кг	Доза 60 мг/кг
1	♀	31**	52**
	♂	31**	59**
2	♀	27	57**
	♂	29	66**
40 [#]	♀	0	13
	♂	35**	32**
40 [#]	♀	н.о.	10
	♂	н.о.	58**
94 ^{##}	♀	н.о.	47
	♂	н.о.	67
127	♀	47***	74***
	♂	21	83**
208 ^{##}	♀	9	49***
	♂	44	67**

10. Предотвращение перенасыщения железом у мышей с дефицитом бета2-микроглобулина

Как результат пониженного содержания гепсидина и усиленного всасывания железа, мыши с дефицитом бета2-микроглобулина (b2m^{-/-}), находящиеся на стандартной диете, аккумулируют избыточные количества железа в печени, сердце и поджелудочной железе. Пилотное исследование показало, что накопление железа в печени у мышей b2m^{-/-} начинается в возрасте 3-4 недель, и что содержание железа в печени достигает 4-кратного значения по сравнению с мышами дикого типа (WT) в возрасте 6 недель. Кроме того, перевод 3-недельных b2m^{-/-} мышей на диету с низким содержанием железа (LID) сразу после завершения грудного вскармливания предотвращало накопление железа в печени в возрасте 6-7 недель. Исследовали эффективность ингибиторов Frp в предотвращении накопления железа в печени у b2m^{-/-} мышей. Мышам b2^{-/-} в возрасте 3 недель, содержащимся на диете с низким содержанием железа (LID), вводили ингибитор Frp или только носитель (метилцеллюлоза; 10 мл/кг). У мышей был доступ к питьевой воде с добавкой 1 мМ ⁵⁸Fe(II)-сульфата и 10 мМ аскорбиновой кислоты. Введение ингибитора Frp или носителя с последующим доступом к железосодержащей воде продолжали в течение 14 дней. Мышей усыпляли и анализировали содержание железа в

печени и селезенке методом ICP-OES (определяли все изотопы железа), а ткани печени дополнительно анализировали на предмет концентрации ^{58}Fe (ICP-MS). Данные, резюмированные в Таблице 9, показывают, что пероральное введение ингибиторов Fpn в течение двух недель предотвращало накопление железа в печени у b2m^{-/-} мышей и повышало концентрацию железа в селезенке, что указывает на ингибирование ферропортина как в кишечнике, так и в селезенке.

Приведенные данные демонстрируют эффективность низкомолекулярного ингибитора ферропортина в предотвращении накопления железа в печени у b2^{-/-} мышей, что подтверждает правильность концепции в соответствующей модели заболевания.

Таблица 9. Ингибиторы Fpn, протестированные в мышинной модели дефицита бета2-микроглобулина на предмет подавления перенасыщения железом в печени.

Печень и селезенку отбирали после 14 дней введения (перорально; 2 раза в день) указанных дозировок ингибиторов Fpn мышам с дефицитом бета2-микроглобулина. Общую концентрацию железа в тканях печени и селезенки определяли с помощью метода ICP-OES, а концентрацию ^{58}Fe в печени определяли с помощью метода ICP-MS. Относительные изменения (%) содержания железа в тканях были вычислены нормализацией разницы между средними значениями содержания железа в тканях для животных, которым вводили ингибиторы Fpn, и для животных, которым вводили только носитель, по среднему значению для контрольной группы (которой вводили только носитель). Значения для самок (♀) и самцов (♂) приведены отдельно, поскольку было отмечено выраженное половое различие в эффективности. Показаны обнаруженные статистически значимые (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием Бонферрони) различия между группами, которым вводили тестируемое соединение, и контрольными группами (вводили только носитель) (***) $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). н.о. = не определено; н.д. = недоступно.

Таблица 9

Соед.		Увеличение общего уровня железа в селезенке (%)		Снижение общего уровня железа в печени (%)		Снижение уровня ⁵⁸ Fe в печени (%)	
		Доза (мг/кг)					
		20	60	20	60	20	60
1	HO	21	65	-1	15	4	59
	HO ₂	28	49	16	25	-8	22
2	HO	13	1	26	45	60**	77***
	HO ₂	18	-20	10	28	24	70
40	HO	50*	85***	32	67*	44	80*
	HO ₂	25	24	31	69***	53*	81***
40	HO	н.о.	9	н.о.	66	н.о.	67
	HO ₂	н.о.	36	н.о.	85**	н.о.	95**
94	HO	н.о.	65	н.о.	57	н.о.	н.д.
	HO ₂	н.о.	41	н.о.	79	н.о.	н.д.
127	HO	71*	51	-38	2	34	63***
	HO ₂	-7	-16	50**	65***	71***	73***
208	HO	56**	150***	15	8	71*	87**
	HO ₂	21	43	41	84**	58	94**

11. Улучшение при анемии, неэффективном эритропоэзе и перенасыщении железом в мышинной модели средней β -талассемии

β -талассемия – это наследственная анемия, вызванная мутациями гена β -глобина гемоглобина, приводящая к появлению атипичных красных кровяных телец с сокращенным временем жизни. Наиболее тяжелая форма, большая талассемия, требует переливаний крови, которые приводят к развитию вторичного перенасыщения железом. У пациентов со средней талассемией наблюдается независимая от переливаний крови анемия средней тяжести, но у них все же развивается перенасыщение железом из-за неэффективного эритропоэза и хронического подавления выработки гепсидина.

Как показано в предшествующих примерах, пероральные ингибиторы ферропортина (Fpn) аналогично гепсидину блокируют осуществляемый ферропортином экспорт железа из клеток *in vitro*, и при введении мышам дикого типа временно понижают уровень железа в плазме крови. Основываясь на этих результатах и опубликованных исследованиях (Schmidt PJ, et al, Blood 2013, Guo S, et al, JCI, 2013 и Casu C. et al, Blood, 2016), ингибиторы Fpn тестировали в отношении их способности предотвращать накопление железа и улучшать эритропоэз при средней талассемии посредством ограничения всасывания железа и повторного использования железа из стареющих эритроцитов. Эффективность ингибиторов Fpn исследовали с помощью мышинной модели независимой от переливаний крови β -талассемии. У мышей с гетерозиготной делецией генов $\beta 1$ и $\beta 2$ глобина (называемых Hbb th3/+ мышами) развивается независимая от

переливаний крови β -талассемия, неэффективный эритропоэз, спленомегалия и вторичное перенасыщение железом в селезенке, печени и почках. Гетерозиготных Hbb th3/+ мышей получали от Jackson Laboratories (B6;129P-Hbb-b1tm1Unc Hbb-b2tm1Unc/J, Stock Number: 002683) в возрасте 8-18 недель, и во время эксперимента держали на диете с низким содержанием железа (Harlan Provimin Kliba 2039, 13.4 м.д. Fe) без ограничения доступа к пище. Hbb th3/+ мышам вводили два раза в сутки либо тестируемое соединение в дозировке 20 или 60 мг/кг, либо метилцеллюлозу (10 мл/кг, Sigma, Cat. 274429) в качестве носителя. В промежутках между введениями указанных доз, мыши имели доступ к питьевой воде с добавкой 1 мМ $^{58}\text{Fe}(\text{II})$ -сульфата (Vifor Pharma, Batch No. ROR 3096) и 10 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma, Cat. 795437) в течение 6 часов. Концентрацию $^{58}\text{Fe}(\text{II})$ -сульфата, добавляемого в питьевую воду, подбирали таким образом, чтобы заместить потребление железа со стандартным кормом для грызунов, где содержание железа составляет 250 м.д. Доступ к воде без $^{58}\text{Fe}(\text{II})$ -сульфата и аскорбиновой кислоты предоставляли во время остальных 18 часов. Введение ингибиторов Fpn или носителя с последующим доступом к железосодержащей воде повторяли на протяжении 20-46 дней.

Аналогично показанному ранее для мышей дикого типа и b2m-/- мышей, ингибиторы Fpn, вводимые в течение 3 часов, эффективно снижали уровень железа в плазме крови также у Hbb th3/+ мышей (Таблица 10), демонстрируя способность данных малых молекул вызывать ограничение уровня железа.

Hbb th3/+ мыши являются анемичными, с уровнем гемоглобина в диапазоне 70-80 г/л. Пероральное введение ингибиторов Fpn мышам Hbb th3/+ в течение двух недель значительно повышало уровень гемоглобина по сравнению с контрольной группой, которой вводили только растворитель (Таблица 10). Изменение уровня гемоглобина у группы, которой вводили тестируемые соединения, по сравнению с контрольной группой, достигало 19-22 г/л к концу исследования. Дополнительно измеряли также гематологические параметры в периферической крови с помощью автоматического анализатора кровяных телец. Введение Hbb th3/+ мышам ингибиторов Fpn повышало число красных кровяных телец, увеличивало гематокрит и уменьшало концентрацию ретикулоцитов и ширину распределения эритроцитов по объему (RDW), что свидетельствует об улучшении эритропоэза. Кроме того, Hbb th3/+ мыши, получавшие ингибиторы Fpn, имели значительно более низкое число лейкоцитов в крови в сравнении с контрольной группой, что дополнительно демонстрирует благоприятное воздействие ингибиторов Fpn на корректировку патологически измененных параметров в данной модели заболевания. Таким образом, ингибиторы Fpn оказывали значительное улучшающее действие при анемии и корректировали состав крови в мышинной модели

средней талассемии.

Неэффективный эритропоэз у Hbb th3/+ мышей вызывает избыточное разрастание эритроидных предшественников в селезенке, приводя к спленомегалии. Введение Hbb th3/+ мышам ингибиторов Fpn приводило к значительному снижению веса селезенки, демонстрируя потенциал ингибиторов Fpn обеспечивать реверсию спленомегалии (Таблица 10).

Влияние ингибиторов Fpn на эритропоэз исследовали, анализируя процент дифференцирующихся эритроидных предшественников в костном мозге и селезенке с помощью проточной цитометрии и маркеров Ter119 (eBioscience, Cat. 17-5921) и CD44 (BioLegend, Cat. 103028). Клетки костного мозга или селезенки, выделенные из Hbb th3/+ мышей, которым вводились ингибиторы Fpn, содержали значительно меньший процент ранних эритроидных предшественников проэритробластов, базофильных и пролихроматических эритробластов, и более высокий процент зрелых эритроцитов, по сравнению с контрольной группой Hbb th3/+ мышей, которым вводили только носитель (Таблица 10). Эти данные показали, что ингибиторы Fpn снижали выраженность неэффективного эритропоэза у Hbb th3/+ мышей, и эти результаты согласуются с улучшением гематологических параметров крови.

Содержание эритропоэтина в плазме крови у Hbb th3/+ мышей и пациентов, страдающих талассемией, повышено вследствие ответной реакции на анемию, гипоксию и неэффективный эритропоэз (Guo et al. JCI, 2013). У Hbb th3/+ мышей, которым вводили ингибиторы Fpn, наблюдалось значительно меньшее содержание эритропоэтина в плазме крови (DuoSet ELISA R&D Systems, Cat. DY959) по сравнению с контрольной группой, которой вводили только носитель, вероятнее всего вследствие частично скорректированной анемии и улучшенного эритропоэза (Таблица 10).

Повышенный уровень эритропоэтина у Hbb th3/+ мышей вызывал усиление выработки эритроферрона – эритроид-регулирующего гормона, для которого известна способность подавлять гепсидин (Kautz L. et al, Nat. Genet., 2014). В соответствии с пониженным содержанием эритропоэтина в плазме крови, экспрессия мРНК эритроферрона была значительно понижена в селезенке Hbb th3/+ мышей, которым вводили ингибитор Fpn, по сравнению с мышами, которым вводили только носитель (Таблица 10). Эритроферрон вырабатывается предшественниками эритроцитов, массово разрастающихся в селезенке Hbb th3/+ мышей вследствие экстремедуллярного эритропоэза. Таким образом, влияние ингибиторов Fpn на экспрессию эритроферрона в селезенке осуществляется через улучшение эритропоэза.

Повышенная потребность в железе из-за неэффективного эритропоэза и

хронически низкого уровня гепсидина у пациентов, страдающих талассемией, вызывает накопление железа в органах и соответствующие патологические проявления, такие как гепатоцеллюлярная карцинома и сердечная недостаточность (Rivella S. *Haematologica*, 2015). У Hbb th3/+ мышей всасывается избыточное количество железа как следствие неадекватно низкого уровня гепсидина в сопоставлении с высоким содержанием железа в печени, селезенке и почках, и повышенной экспрессией ферропортина в двенадцатиперстной кишке (Gardenghi S., *Blood*, 2007). Общее содержание в печени железа и ^{58}Fe в органах Hbb th3/+ мышей, которым вводили носитель или ингибиторы Fpn, анализировали методом эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-OES) и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS), соответственно. Концентрации ^{58}Fe в печени и селезенке Hbb th3/+ мышей, которым вводили ингибиторы Fpn, были значительно ниже, чем у мышей, которым вводили только носитель, демонстрируя, что ингибиторы Fpn предотвращают накопление железа в органах (Таблица 10).

Поскольку ингибиторы Fpn системно доступны, они способны блокировать экспорт железа во всех ферропортин-экспрессирующих тканях, включая двенадцатиперстную кишку, селезенку и печень. Соответственно, ожидается, что ингибиторы Fpn предотвращают всасывание железа из двенадцатиперстной кишки, однако они не могут удалить уже имеющееся железо из печени и селезенки. Действительно, общее содержание железа у мышей, которым вводили ингибитор Fpn или носитель, оставалось неизменным (данные не показаны). Важно, что ингибиторы Fpn значительно уменьшали концентрацию ^{58}Fe в селезенке и печени Hbb th3/+ мышей, демонстрируя способность данных малых молекул предотвращать накопление железа.

Кроме того, были детектированы активные формы кислорода (АФК) в клетках костного мозга с помощью флуоресцентного индикатора, CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific, Cat. C6827). Проточный цитометрический анализ показал, что ингибиторы Fpn значительно уменьшали содержание АФК в зрелых эритроидных клетках, в сравнении с контрольной группой Hbb th3/+ мышей, которым вводили только носитель (Таблица 10).

Эти данные показали способность перорально принимаемых низкомолекулярных ингибиторов ферропортина влиять на течение заболевания при улучшении состояния в случае анемии и неэффективного эритропоэза, а также при смягчении спленомегалии и при предотвращении дальнейшего накопления железа в печени и селезенке в модели средней β - талассемии.

Таблица 10

Параметр	Соед. 1	Соед. 2	Соед. 40	Соед. 127
<u>Снижение железа в плазме при введении 20/ 60 мг/кг соединения</u>	<u>49/66%</u>	<u>50/69%</u>	<u>28/58%</u>	<u>68/81%</u>
<u>Коррекция анемии на день 20-48 при дозе 20/ 60 мг/кг</u>	<u>6/20 г/л</u>	<u>3/11 г/л</u>	<u>6 /13 г/л</u>	<u>12/20 г/л</u>
<u>Увеличение числа эритроцитов при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>4/8%</u>	<u>0/33%</u>	<u>2/22%</u>	<u>0/36%</u>
<u>Уменьшение числа ретикулоцитов при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>8/39%</u>	<u>0/11%</u>	<u>19/43%</u>	<u>16/61%</u>
<u>Повышение гематокрита при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>0/4%</u>	<u>0/15%</u>	<u>0/1%</u>	<u>3/20%</u>
<u>Уменьшение RDW при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>3/16%</u>	<u>0/15%</u>	<u>н.д./н.д.</u>	<u>19/25%</u>
<u>Уменьшение числа лейкоцитов при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>32/44%</u>	<u>29/55%</u>	<u>0/36%</u>	<u>46/66%</u>
<u>Уменьшение АФК в эритроцитах костного мозга</u>	<u>20/45%</u>	<u>13/65%</u>	<u>н.д./н.д.</u>	<u>н.д./ 75%</u>
<u>Уменьшение относительного веса селезенки при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>23/59%</u>	<u>16/47%</u>	<u>23/48%</u>	<u>40/61%</u>
<u>Уменьшение содержания ⁵⁸Fe в селезенке при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>14/48%</u>	<u>13/40%</u>	<u>19/51%</u>	<u>43/68%</u>
<u>Предотвращение накопления ⁵⁸Fe в печени при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>12/40%</u>	<u>14/47%</u>	<u>20/48%</u>	<u>39/59%</u>
<u>Уменьшение содержания эритропоэтина в плазме крови при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>64/78%</u>	<u>4/27%</u>	<u>6/37%</u>	<u>32/33%</u>
<u>Снижение мРНК эритроферрона в селезенке при дозе соединения 20/60 мг/кг</u>	<u>82/292%</u>	<u>461/639%</u>	<u>н.д./н.д.</u>	<u>1012/3031%</u>

Таблица 10. Эффективность ингибиторов ферропортина в мышинной модели средней талассемии (Hbb th3/+ мыши). Указанные ингибиторы Fpn вводили дважды в сутки в течение 20 дней (Соединения 1 и 2), 27 дней (Соединение 127) или 46 дней (Соединение 40). Результаты выражены в виде разницы с контрольной группой (которой вводили только носитель) в случае гемоглобина, и в виде % изменения относительно контрольной группы для всех остальных приведенных параметров.

12. Оценка активности в лечении дрепаноцитарной анемии в мышинной модели

Используя мышиную модель, описанную Yulin Zhao et al. в работе “MEK1/2 inhibitors reverse acute vascular occlusion in mouse models of sickle cell anemia”; *The FASEB Journal* Vol. 30, No. 3, pp 1171-1186, 2016, определяли активность солей по настоящему изобретению в лечении дрепаноцитарной анемии описанным ниже способом:

Ингибиторы ферропортина предотвращают острые васкулярные окклюзии и повреждение органов в мышинной модели серповидноклеточной анемии.

Васкулярные окклюзионные кризы (VOC) являются главной причиной клинических проявлений и смертности у пациентов с серповидноклеточной анемией (SCD). Гипоксия, обезвоживание, воспаление или гемолиз – все они вносят вклад в повышении адгезии серповидных эритроцитов (SSRBC), нейтрофилов и кровяных пластинок к активированному эндотелию в малых сосудах, способствуя развитию коагуляции, закупоривания сосудов, болезненных кризов и необратимых поражений различных органов. Высокое число лейкоцитов, особенно активированных нейтрофилов, коррелирует с ранней смертностью, бессимптомным инфарктом мозга, геморрагическими инсультами и острым грудным синдромом у пациентов с SCD (Platt OS, *NEJM*, 1994). Гемолиз при SCD возникает вследствие поврежденных мембран серповидных эритроцитов, что вызывает хроническую анемию и высвобождение Hb в кровеносную систему, который провоцирует воспаление вследствие истощения запасов NO, вызывания окислительного стресса и высвобождения гема. SSRBC выделяет микровезикулы, которые запускают выработку активных форм кислорода (АФК) клетками эндотелия, провоцируют адгезию лейкоцитов и вызывают фосфатидилсерин-зависимый апоптоз эндотелия, способствуя развитию васкулярных окклюзионных кризов при SCD (Camus M, *Blood*, 2012).

Хроническое ограничение содержания железа путем введения ингибиторов ферропортина уменьшает формирование ROS в эритроцитах мышей с β -талассемией, как было показано, например, для соединений, описанных в указанных выше неопубликованных международных патентных заявках PCT/EP2016/075305 и PCT/EP2016/075306, (The Jackson Laboratories, Yang B, et al, *PNAS*. 1995). На основе этих данных была выдвинута гипотеза, что ингибиторы ферропортина могут ослаблять васкулярные окклюзионные кризы (VOC) при SCD путем уменьшения гемолиза и формирования ROS в SSRBC, вследствие этого предотвращая адгезию лейкоцитов к эндотелию.

Для проверки этой гипотезы вводили носитель или ингибиторы ферропортина перорально в дозировке 30 или 100 мг/кг два раза в сутки (BID) в течение 4 недель в мышинной модели SCD по Таунсу (Ryan T, *Science*, 1990). Эти мыши были выведены

методами генной инженерии для эксклюзивной экспрессии человеческого гемоглобина ($h\alpha/h\alpha::\beta S/\beta S$, The Jackson Laboratories). Мыши Таунса имеют анемию, повышенное число ретикулоцитов, спленомегалию, воспаление сосудов и подвержены развитию VOC в ответ на гипоксию, воспаление и гемолиз. Для исследования действия ингибиторов ферропортина на лейкоциты и адгезию SSRBC к воспаленному эндотелию, мышей Таунса, которым вводили носитель или ингибитор ферропортина в течение 25 дней, усыпляли и хирургическим путем имплантировали стеклянную камеру в кожную складку на спине в стерильных условиях, как описано ранее (Kalambur VS et al., Am J Hematol. 2004; Zennadi, R et al, Blood, 2007). Через три дня после операции мышам инъецировали 0.5 мкг TNF α (R&D Systems), вызывая воспаление, приводящее к VOC. Через 90 минут после введения TNF α , лейкоциты и эритроциты метили *in vivo* посредством внутривенной инъекции родамин-конъюгированного Ly6G (Sigma) и фикоэритрин-конъюгированного анти-TER119 mAb (BioLegend), соответственно. Адгезию лейкоцитов и эритроцитов к эндотелию микрососудов отслеживали в течение последующих 90 минут методом флуоресцентной прижизненной микроскопии, как описано ранее (Zhao et al, FASEB J, 2016). Вкратце, усыпленных животных со стеклянными камерами держали при 37°C, записывали параметры кровотока и события адгезии клеток с помощью цифровой видеокамеры C2400 (Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu City, Japan), соединенной с флуоресцентным микроскопом (микроскоп Axoplan, Carl Zeiss). Исследовали от двадцати до тридцати сегментов микрокапилляров у каждой мыши, и адгезию клеток количественно оценивали на неподвижных кадрах путем замера интенсивности флуоресценции сцепившихся флуоресцентно-меченых клеток с применением программы ImageJ. Результаты выражали в единицах флуоресценции на миллион клеток.

13. Исследование фармакокинетики соединения 127 в виде моносолей с H₂SO₄ или HCl при однократном введении внутривенно и перорально самцам крыс линии Sprague Dawley

Для исследования фармакокинетики (ПК) соединения 127 в виде моносоли с H₂SO₄ (мол.вес 604.6 г/моль) или HCl (мол.вес 444.9 г/моль), однократную дозу этих солей вводили самцам крыс линии Sprague Dawley (n=3 на каждый путь введения) внутривенно (1 мг/кг) или перорально (30 мг/кг). Эти дозировки были скорректированы на вес соединения в виде свободного основания (мол.вес 408.43 г/моль).

Крыс содержали в вентилируемых клетках при температуре от 22 до 25°C, влажности 40-70% RH, в режиме 12 часов свет/12 часов темнота, предоставляя стандартное для грызунов питание и воду без ограничений. Перед исследованием фармакокинетики крыс не кормили в течение ночи и затем кормили за 4 часа после

введения вещества. Данная методика была изучена и одобрена Комитетом по контролю этических норм обращения с животными в контрактных исследовательских организациях (GVK Biosciences Pvt. Ltd. Hyderabad, India).

Моносолевое соединение 127 с H_2SO_4 или моносолевое соединение 127 с HCl , введенные в фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 5% ДМСО и 10% солютола, вводили внутривенно в хвостовую вену крыс с помощью иглы 27-gauge в количестве 5 мл/кг и в концентрации 0.2 мг/мл.

Для перорального введения в дозировке 30 мг/кг, соли использовали в концентрации 6 мг/мл в растворе 0.5% метилцеллюлозы, содержащем 5% ДМСО, и вводили перорально в дозировке 5 мл/кг.

Образцы крови по 0.20-0.30 мл брали из яремной вены крыс в преднаполненные литий-гепарином пробирки в следующие моменты времени: 5, 15, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч и 24 ч после введения средства. Плазму отделяли центрифугированием при $2500 \times g$ в течение 15 минут при $4^\circ C$. Концентрацию соединений в плазме определяли методом жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией (LC-MS/MS), и определяли стандартные фармакокинетические параметры, такие как C_0 , C_{max} , T_{max} , Cl , Vd , AUC_{last} , $T_{1/2}$, MRT , %F, по некомпартментной модели с помощью программы Phoenix версия 6.4.

Полученные результаты подтвердили хороший/улучшенный профиль фармакокинетики.

III. Исследование комбинированной терапии

Что касается упомянутых ранее возможных вариантов комбинированной терапии с другими действующими веществами для описанных в настоящем изобретении солей, обладающих активностью в качестве ингибиторов ферропортина, то такую комбинированную терапию можно исследовать в мышинной модели средней бета-талассемии.

Потенциальные синергетические или аддитивные эффекты солей по настоящему изобретению с другими терапевтическими средствами (второе средство) оценивают в ходе комбинированных исследований в мышинных моделях средней талассемии ($Hbb^{th3/+}$ или $Hbb^{th1/th1}$, Jackson Laboratories) или большой талассемии ($C57-FLC^{th3/th3}$, такая как описано в работе Casu C, et al. "Short-term administration of JAK2 inhibitors reduces splenomegaly in mouse models of β -thalassemia intermedia and major."; Haematologica, 2017, в ходе которых исследуют эффект солей по настоящему изобретению в отдельности (т.е. вводя только соль) или в комбинации с дополнительным(-и) соединением(-ями) на анемию, гемопоз, перенасыщение железом, выработку активных форм кислорода (АФК), спленомегалию и другие биомаркеры в моделях талассемии. Мыши обоих полов в возрасте 12 недель

получали соли по настоящему изобретению в отдельности или в комбинации с одним из следующих вторых средств:

- Гибридные белки модифицированного активинового рецептора типа IIA или IIB (такие как описаны в работе Suragani RN, et al. “Modified activin receptor IIB ligand trap mitigates ineffective erythropoiesis and disease complications in murine β -thalassemia.” *Blood*. 2014 Jun 19;123(25):3864-72 и Dussiot M, et al. “An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β -талассемия.” *Nat Med*. 2014 Apr;20(4):398-407), которые работают как ловушка лигандов для членов надсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGF β), таких как RAP-011 или RAP-536 (мышинные аналоги ACE-011, сотатерцепт или ACE-536, луспатерцепт (описаны в заявке на патент WO2010019261 или заявлены в патенте США US8361957), соответственно, Acceleron/Celgene) или другие антагонисты членов надсемейства TGF β (антитела, фрагменты антител, лекарственные средства, не являющиеся антителами, или клетки, продуцирующие ловушки лигандов активинового рецептора).

- Ингибиторы JAK1/2 или JAK2, включая (но не ограничиваясь только ими) рутоксилениб (Novartis – заявлен в патентах США US7,598,257 и US8,415,362) или федратиниб (Sanofi), такие как описаны в работе Casu C, et al. “Short-term administration of JAK2 inhibitors reduces splenomegaly in mouse models of β -thalassemia intermedia and major.”; *Haematologica*, 2017.

- пан-HDAC ингибитор, такой как панобиностат (LC Laboratories, USA, и заявлен в патентах США US6,552,065 и US6,833,384) или HDAC3 ингибитор RGFP966 (Selleckchem – такой как описан в работе Pasricha SR et al. “Hepcidin is regulated by promoter-associated histone acetylation and HDAC3.” *Nat Commun*. 2017 Sep 1;8(1):403).

- Антагонисты матриптазы-2 (также известной как Tmprss6), такие как заключенные в липидные наночастицы (LNP) Tmprss6 мiPНК или антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), воздействующие на мышиную Tmprss6 (такие как описаны в работе Guo S et al “Reducing TMPRSS6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice.” *J. Clin Invest*. 2013 Apr;123(4):1531-41 или в работе Schmidt PJ, et al. “An RNAi therapeutic targeting Tmprss6 decreases iron overload in Hfe(-/-) mice and ameliorates anemia and iron overload in murine β -thalassemia intermedia.” *Blood*. 2013 Feb 14;121(7):1200-8).

- Экзогенный апотрансферрин (такой как описан в работе Li H, et al. “Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice.” *Nat Med*. 2010 Feb;16(2):177-82).

- Гепсидин-индуцирующие стероиды (HIS), такие как эпитиостанол, прогестерон и мифепристон, или антагонисты мембранного компонента-1

прогестеронового рецептора (PGRMC1), ссылка. 7.

- Антагонисты эритроферрона, такие как антитела или ловушки лигандов
- Рекомбинантный эритропоэтин (ЭПО). Эритропоэтины, доступные для применения в качестве терапевтических средств по настоящему изобретению, производятся по технологии рекомбинантной ДНК в культурах клеток и включают Erogen/Procrit (эпоэтин-альфа) и Aranesp (дарэроэтин-альфа) или Mucsera (эпоэтин-бета и метокси полиэтиленгликоль).
- Ингибиторы переносчика глицина 1(GlyT1), такие как битопертин (Roche AG).

Соли по настоящему изобретению вводят перорально мышам с талласемией либо как единственное действующее вещество два раза в сутки в дозировке 10, 30 и 60 мг/кг, либо в комбинации с одним или больше из перечисленных выше соединений (вторые средства). Контрольная группа мышей с талласемией получала только второе средство. В качестве контрольной группы использовали мышей с талласемией и дикого типа (WT), совпадающих по возрасту и полу. В некоторых экспериментах, соли по настоящему изобретению можно было также дозированно вводить в питьевой воде, что облегчает совместное введение других лекарственных средств, вводимых перорально.

Более конкретно, второе средство вводят как отдельный вид лечения или вводят совместно с солями по настоящему изобретению, как описано ниже:

- RAP-011 или RAP-536 можно вводить подкожно два раза в неделю в дозировке 1, 10 или 30 мг/кг в течение периода времени до 8 недель.
- Ингибиторы JAK1/2 можно вводить перорально два раза в сутки вместе с солями по настоящему изобретению или без них, разводя в питьевой воде.
- Рутоксилиниб (60 или 180 мг/кг) или федратиниб (40 или 120 мг/кг) можно вводить перорально один раз в сутки в течение 2 недель, вместе с солями по настоящему изобретению или без них, разводя в питьевой воде.
- Панобиностат или RGFP966 можно вводить один раз в сутки в дозировке 10 или 20 мг/кг вместе с солями по настоящему изобретению или без них, разводя в питьевой воде.
- Апотрансферрин вводят инъекционно интраперитонеально в дозировке 100 или 300 мг/кг в сутки в течение 8 недель.
- Мифепристон (30 или 100 мг/кг) вводят инъекционно интраперитонеально один раз в сутки в течение 2 недель.
- Антитела или ловушки лигандов, специфичные к эритроферрону, можно вводить два раза в неделю посредством подкожной инъекции.

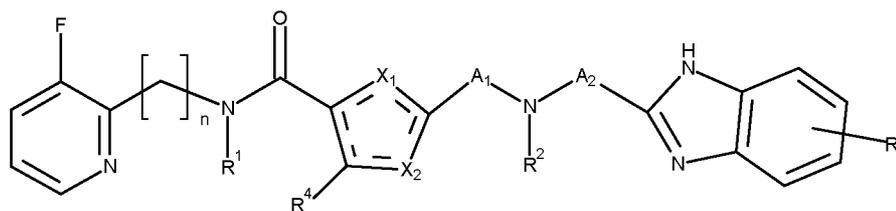
- Эритропоэтин можно инъектировать интраперитонеально в дозировке 200 МЕ один раз в сутки в течение 2 недель.

- Ингибиторы переносчика глицина 1 (GlyT1), такие как битопертин (Roche AG), также можно вводить подходящим способом.

Изменение уровня гемоглобина у мышей отслеживали раз в неделю, и в конце теста брали на исследование кровь и органы. Вес селезенки нормализовали по весу тела и оценивали как влияние введения на экстрамедуллярный эритропоэз. Концентрации железа в печени, селезенке, почках и сердце определяли методом индуктивно-связанной плазмы (ИСП) на оптическом эмиссионном спектрометре (OES). Проводили полный анализ крови на автоматическом приборе. Оценивали эритропоэз в костном мозге и селезенке путем метки клеток антителами CD71, CD44 и Ter119 и детектирования эритроидных клеток методом проточной цитометрии. Связанную с мембраной фракцию альфа-глобулина на красных кровяных тельцах количественно оценивали методом ВЭЖХ. Присутствие активных форм кислорода (АФК) в красных кровяных тельцах определяли окрашиванием с флуоресцентным индикатором хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом. Уровень железа в крови измеряли колориметрическим анализом с применением реагента на основе Ferene-S (Abbott). Уровень эритропоэтина в крови количественно определяли методом ИФА (ELISA) (R&D, duo set). Уровень гепсидина в крови измеряли методом ИФА (ELISA) (Intrinsic Lifesciences). Уровень гепсидина в печени, экспрессирование гена эритроферона в костном мозге и селезенке количественно определяли методом qRT-PCR.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соль соединения формулы (I),



где

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 разные;

R^1 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода и
- необязательно замещенного алкила;

n представляет собой целое число от 1 до 3;

A^1 и A^2 независимо выбраны из группы, состоящей из алкандиила;

R^2 представляет собой

- атом водорода или
- необязательно замещенный алкил;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют необязательно замещенное 4-6-членное кольцо;

R^3 обозначает 1, 2 или 3 опциональных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена,
- циано-группы,
- необязательно замещенного алкила,
- необязательно замещенной алкокси-группы и
- карбоксильной группы;

R^4 выбран из группы, состоящей из

- атома водорода,
- галогена,
- C_1 - C_3 -алкила и
- галоген-замещенного алкила;

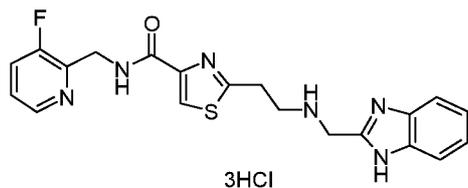
где указанная соль выбрана из солей соединения формулы (I), с кислотами,

выбранными из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, fumarовой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, maleиновой кислоты, метансульфокислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и toлуолсульфокислоты, отличающихся тем, что соотношение соединения (I) : кислота составляет от 1 : 2 до 1 : 3; и

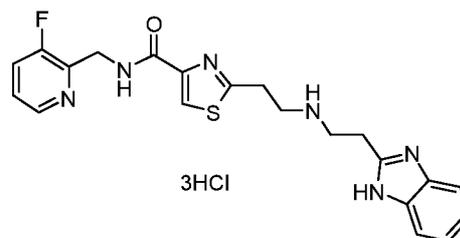
ее сольваты, гидраты и полиморфы; и

где исключены следующие 3HCl-соли:

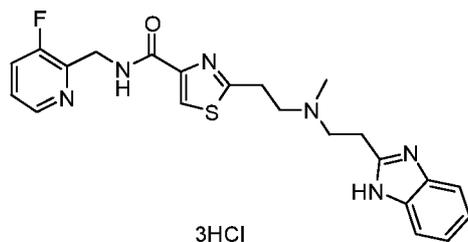
Прим. 40:



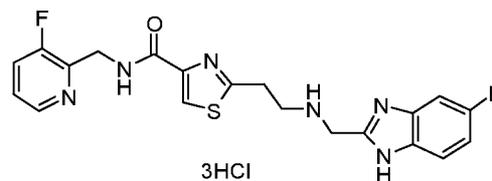
Прим. 94:



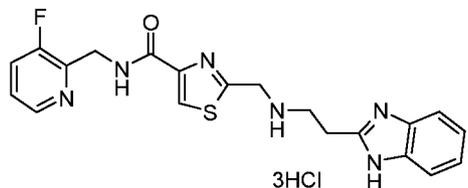
Прим. 112:



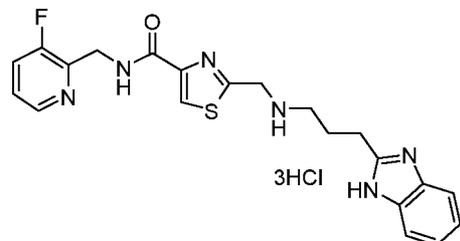
Прим. 114:



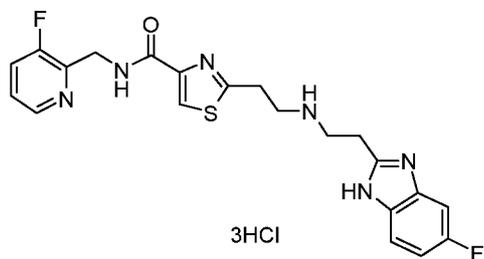
Прим. 118:



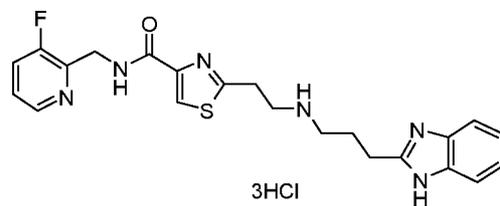
Прим. 119:



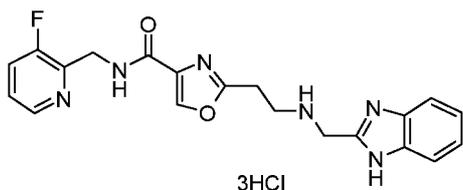
Прим. 120:



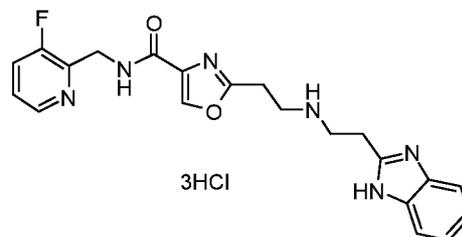
Прим. 125:



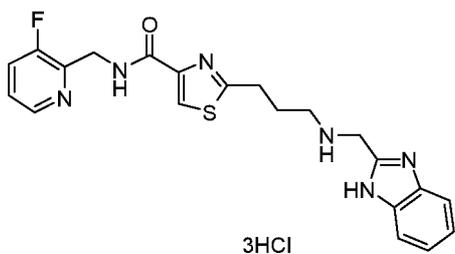
Прим. 126:



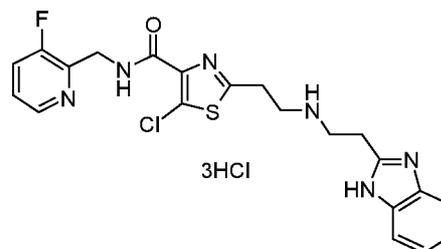
Прим. 127:



Прим. 134:



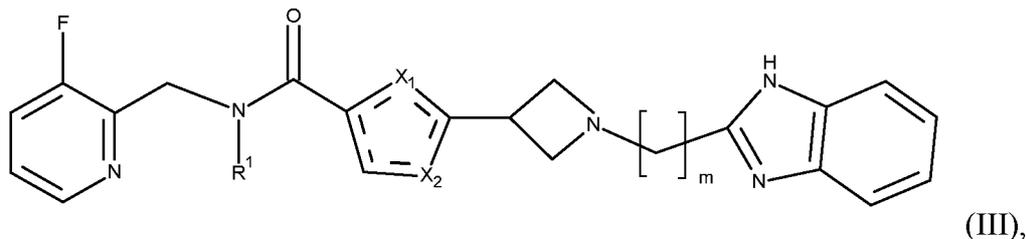
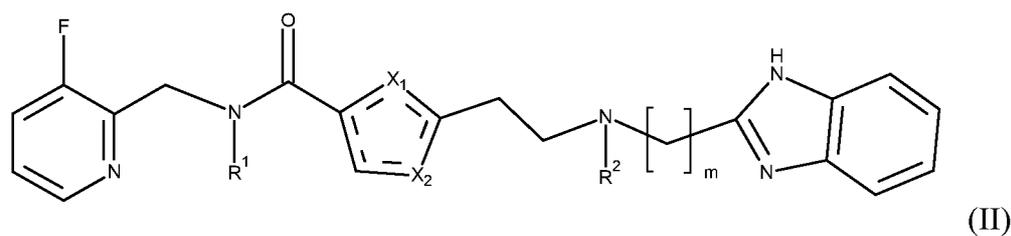
Прим. 154:



2. Соль соединения формулы (I) по п. 1, где

 $n = 1$; R^2 = атом водорода; R^3 = атом водорода; R^4 = атом водорода; A^1 = метилен или этан-1,2-диил; A^2 = метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

или A^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют необязательно замещенное 4-членное кольцо, образуя соединение формулы (II) или (III):



где в формуле (II) и (III)

 m представляет собой целое число 1, 2 или 3 и X^1 , X^2 и R^1 имеют значения, указанные в п. 1,

и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

3. Соль соединения формулы (I) по п. 1 или 2, где указанные соли выбраны из моно-солей, и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

4. Соль соединения формулы (I) по любому из пп. 1 - 3, где кислоты выбраны из группы, состоящей из лимонной кислоты, соляной кислоты, малеиновой кислоты и серной кислоты, и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

5. Соль соединения формулы (I) по любому из пп. 1 - 4, где кислоты выбраны из группы, состоящей из фосфорной кислоты и серной кислоты, и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

6. Соль соединения формулы (I) по п. 1 или 2, где кислота выбрана из фосфорной кислоты, образуя соль, имеющую соотношение соединение формулы (I) : PO₄ = 2:1, и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

7. Соль соединения формулы (I) по любому из пп. 1 - 4, где исключены ZHCl-соли, и их сольваты, гидраты и полиморфы.

8. Соль соединения формулы (I) по любому из пп. 1 - 7, где соединение формулы (I) выбрано из группы, состоящей из следующих соединений:

Прим.	Структура
1	
2	
4	

Прим.	Структура
40	
94	
118	

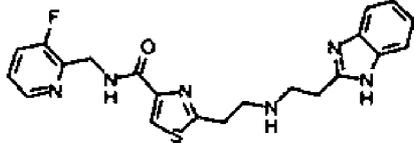
Прим.	Структура
126	
127	
193	

Прим.	Структура
206	
208	
233	

и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

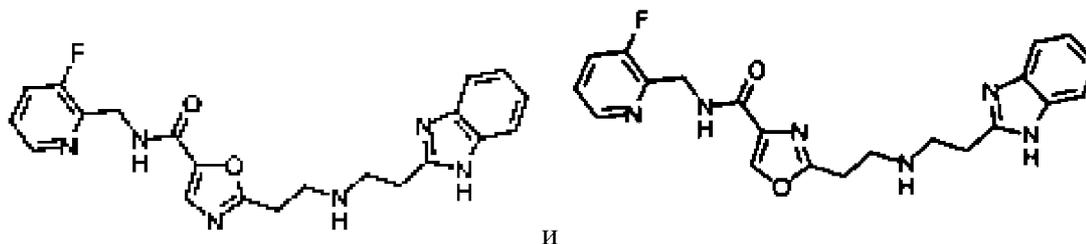
9. Соль соединения формулы (I), по п. 8, которая выбрана из группы, состоящей из следующих соединений:

Прим.	Структура	Прим.	Структура
1		127	
40		208	

Прим.	Структура	Прим.	Структура
94			

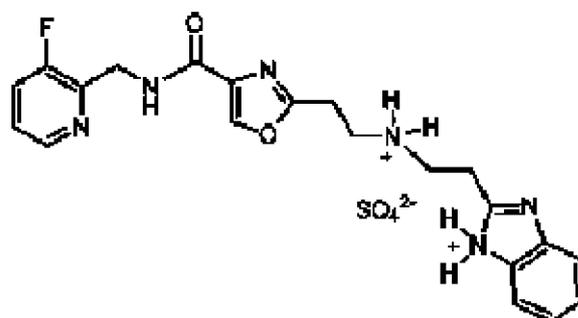
и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

10. Соль соединения формулы (I) по п. 8 или 9, которая выбрана из группы, состоящей из следующих соединений:



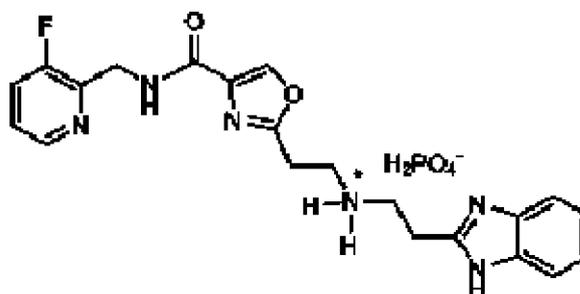
и ее сольваты, гидраты и полиморфы.

11. Соль соединения формулы (I) по любому из пп. 1 - 10, которая представляет собой 1:1 сульфатную соль, имеющую формулу:



и ее полиморфы.

12. Соль соединения формулы (I) по любому из пп. 1 - 10, которая представляет собой 1:1 фосфатную соль, имеющую формулу:



и ее полиморфы.

13. Соль по любому из предшествующих пунктов и ее сольваты, гидраты и полиморфы, для применения в качестве лекарственного средства.

14. Соль по любому из предшествующих пунктов и ее сольваты, гидраты и полиморфы, для применения в качестве ингибитора ферропортина и/или для применения в ингибировании переноса железа, осуществляемого ферропортином.

15. Соль по любому из предшествующих пунктов и ее сольваты, гидраты и полиморфы, для применения в профилактике и/или лечении нарушений обмена железа, приводящих к повышенному уровню железа, или повышенного всасывания железа, например, для применения в профилактике и/или лечении перенасыщения железом и/или для применения в профилактике и/или лечении заболеваний, связанных или вызванных повышенным уровнем железа, повышенным всасыванием железа или перенасыщения железом.

16. Соль по любому из предшествующих пунктов и ее сольваты, гидраты и полиморфы, для применения по п. 15, где заболевания, связанные или вызванные повышенным уровнем железа, повышенным всасыванием железа или перенасыщением железом, выбраны из талассемии, гемоглобинопатии, болезни гемоглобина E, болезни гемоглобина H, гемохроматоза, гемолитической анемии, талассемии, включая альфа-талассемию, бета-талассемию и дельта-талассемию, дрепаноцитарную анемию (серповидноклеточную анемию) и врожденную дизэритропоэтическую анемию.

17. Соль по любому из предшествующих пунктов и ее сольваты, гидраты и полиморфы, для применения в профилактике и/или лечении заболеваний, связанных с неэффективным эритропоэзом, таких как миелодиспластический синдром (MDS, миелодисплазия), истинная полицитемия и врожденная дизэритропоэтическая анемия, или для применения в дополнительной терапии посредством ограничения количества железа, доступного для патогенных микроорганизмов, таких как бактерия *Vibrio vulnificus*, тем самым осуществляя лечение инфекций, вызванных указанными патогенными микроорганизмами, или для применения в профилактике и/или лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, посредством ограничения отложения или увеличения количества железа в тканях или клетках, или для применения в профилактике и/или лечении формирования радикалов, активных форм кислорода (АФК) и окислительного стресса, или для применения в профилактике и/или лечении повреждений сердца, печени и эндокринной системы, вызванных перенасыщением железом, или для применения в профилактике и/или лечении воспаления, вызванного избытком железа.

18. Лекарственное средство, содержащее одну или больше солей по любому из предшествующих пунктов, включая ее сольваты, гидраты и полиморфы, такое как лекарственное средство для применения по любому из пп. 14 - 17, где лекарственное

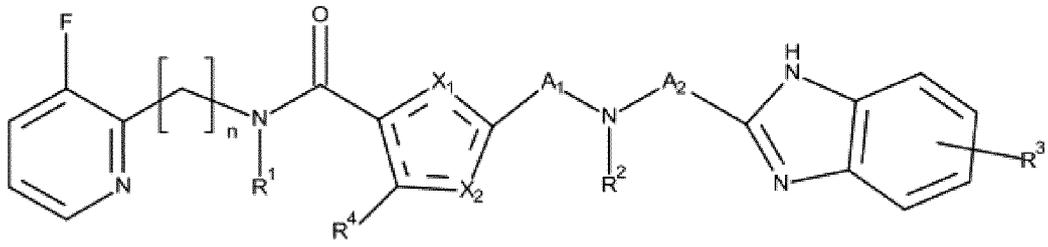
средство опционально может дополнительно содержать один или больше фармацевтически приемлемых носителей и/или вспомогательных веществ и/или растворителей, и/или по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное соединение, такое как действующее вещество для профилактики и лечения перенасыщения железом, талассемии, гемохроматоза или серповидноклеточной анемии, нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона, и связанных с ними симптомов, или железо-хелатирующее соединение.

19. Лекарственное средство по п. 18, находящееся в форме состава для перорального или парентерального введения.

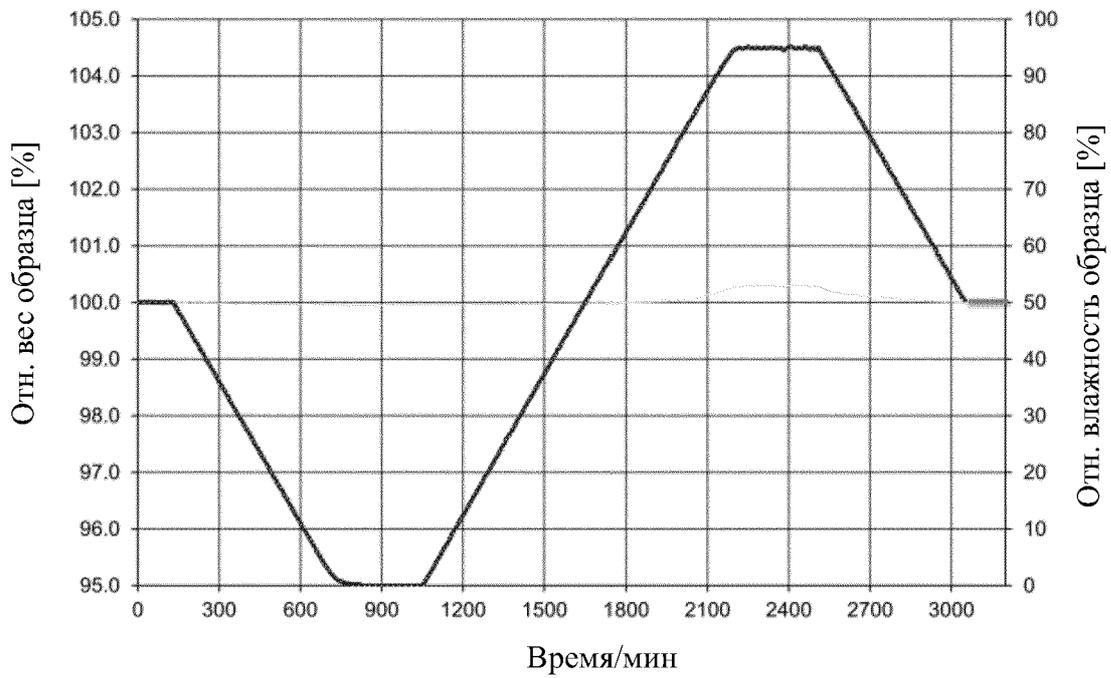
20. Соль по любому из предшествующих пунктов и ее сольваты, гидраты и полиморфы, для применения в комбинированной терапии, включающей совместное введение соли по любому из предшествующих пунктов, включая ее сольваты, гидраты и полиморфы, с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтически активным соединением, где совместное введение в рамках комбинированной терапии может осуществляться в форме комбинированной терапии с фиксированными дозировками посредством совместного введения солей по любому из предшествующих пунктов, включая их сольваты, гидраты и полиморфы, с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтически активным соединением в формате препарата с предустановленными дозировками, или где совместное введение в рамках комбинированной терапии может осуществляться в форме комбинированной терапии со свободными дозировками посредством совместного введения солей по любому из предшествующих пунктов, включая их сольваты, гидраты и полиморфы, с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтически активным соединением со свободными дозировками соответствующих компонентов, посредством одновременного введения отдельных компонентов или последовательного введения отдельных компонентов в течение определенного периода времени, и где комбинированная терапия предпочтительно включает совместное введение солей по любому из предшествующих пунктов, включая их сольваты, гидраты и полиморфы, с одним или больше другими фармацевтически активными соединениями для уменьшения перенасыщения железом, которые выбраны из Tmprss6-ASO, железо-хелатирующих соединений, куркумина, SSP-004184, деферитрина, деферасирокса, дефероксамина и/или деферипрона, и/или с одним или больше другими фармацевтически активными соединениями, которые выбраны из антиоксидантов, таких как N-ацетилцистеин; противодиабетических средств, таких как агонисты GLP-1 рецептора; антибиотиков, таких как ванкомицин (Van) или тобрамицин; лекарственных средств для лечения малярии; противораковых средств; противогрибковых средств; лекарственных

средств для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, включая допаминовые агонисты, такие как леводопа; противовирусных средств, таких как интерферон- α или рибавирин; иммунодепрессантов, таких как циклоспорин А или производные циклоспорина А; железосодержащих добавок; витаминных добавок; стимуляторов выработки красных кровяных телец (например, эритропоетин, Еро); противовоспалительных средств; противотромбозных средств; статинов; сосудосуживающих средств и инотропных соединений.

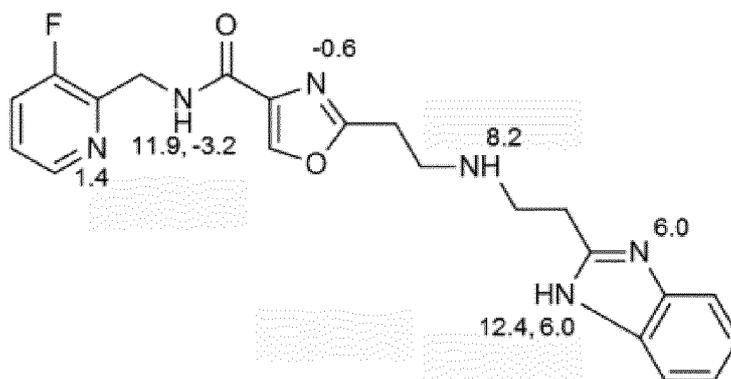
ФИГ. 1



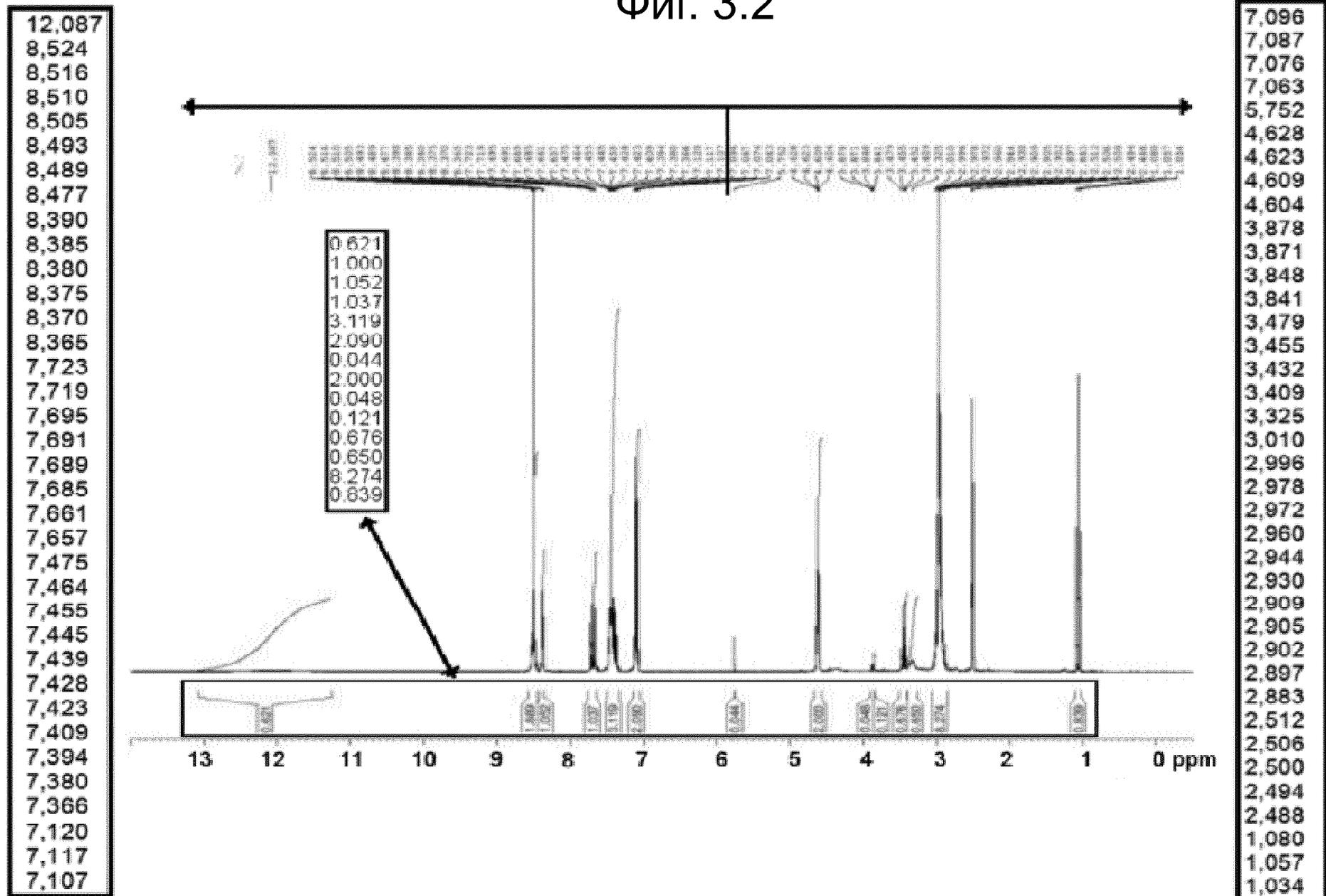
ФИГ. 2

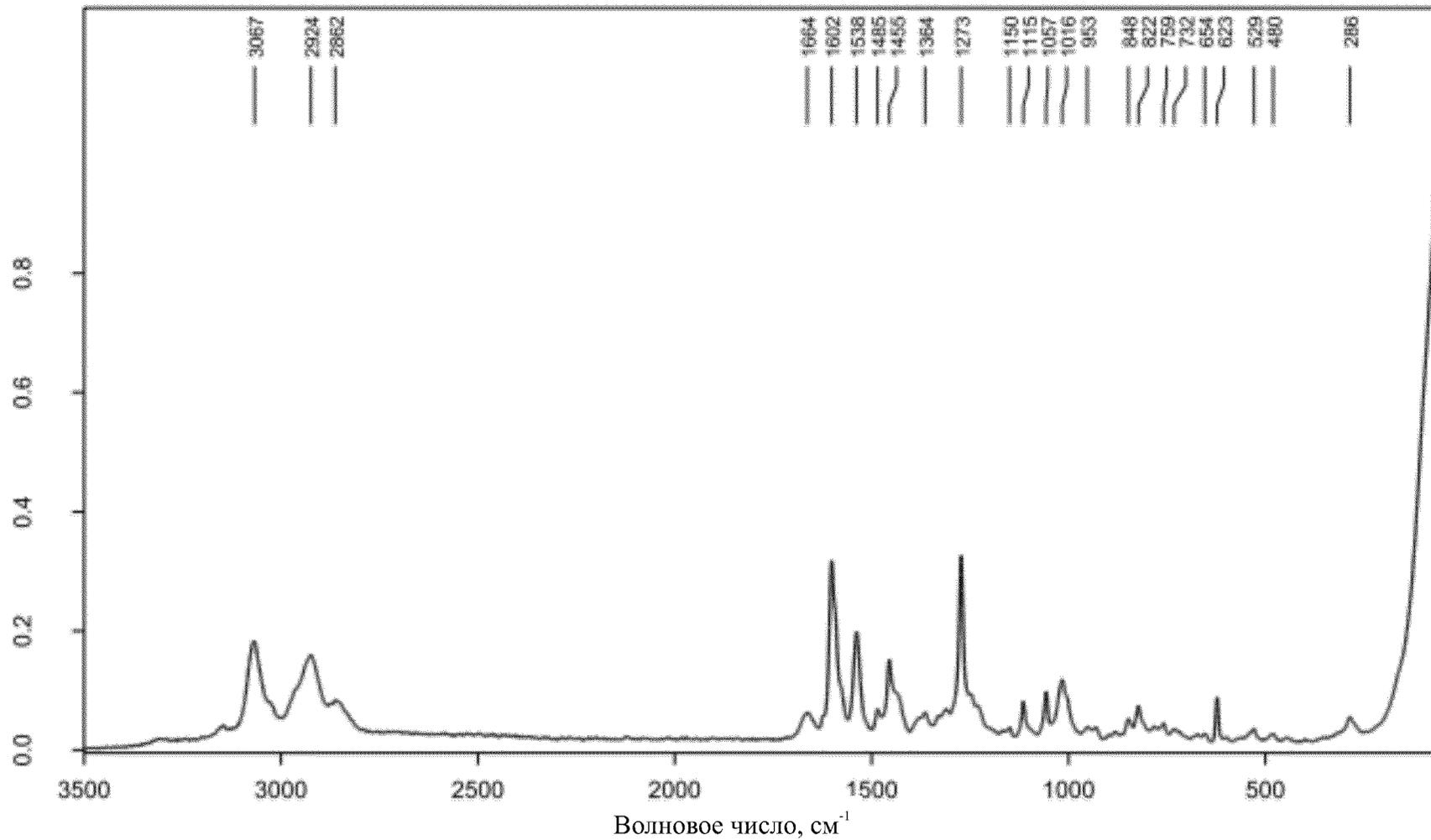


ФИГ. 3.1



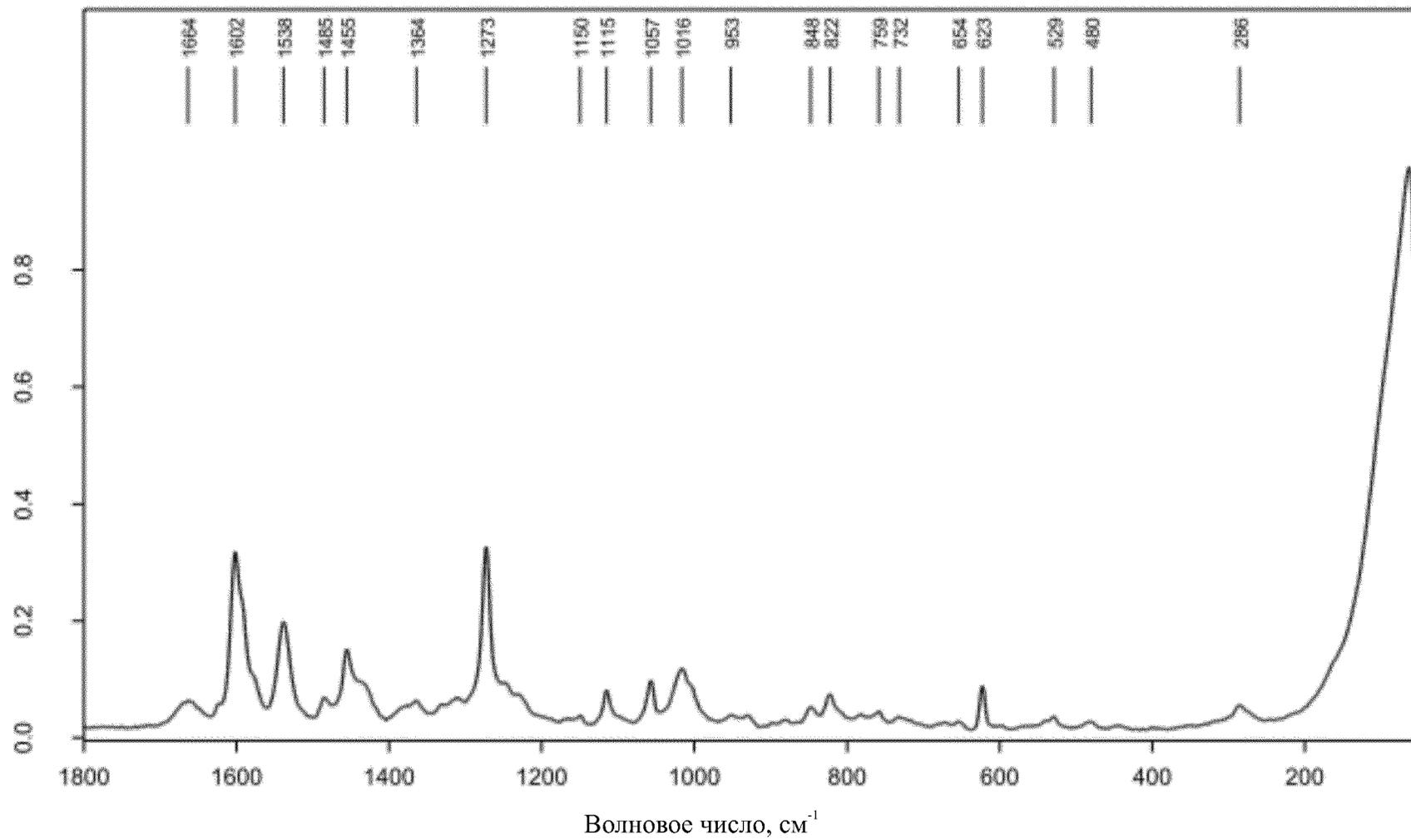
Фиг. 3.2





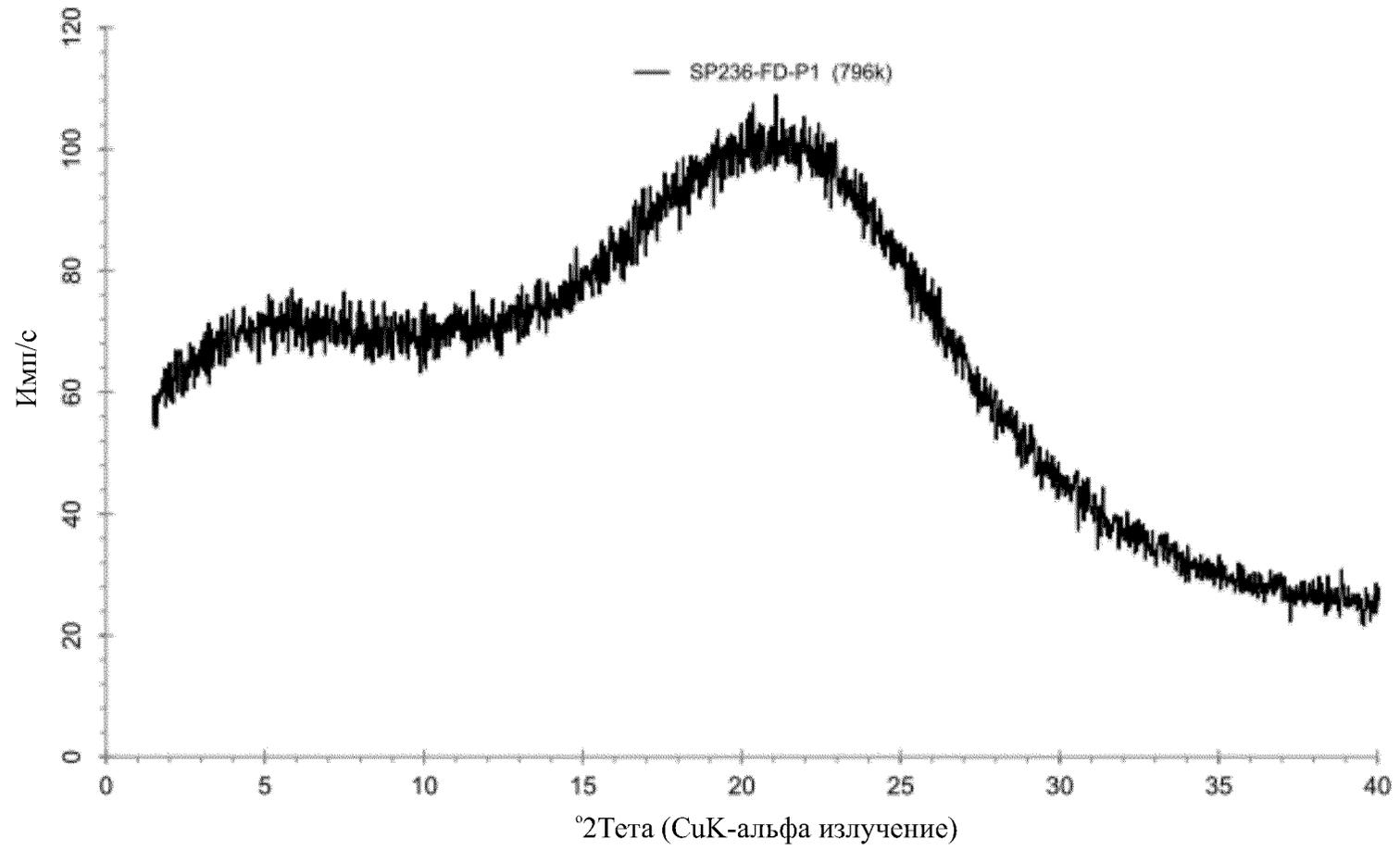
Название образца
SP236-FB-P1, 300мВт

Фиг. 3.3

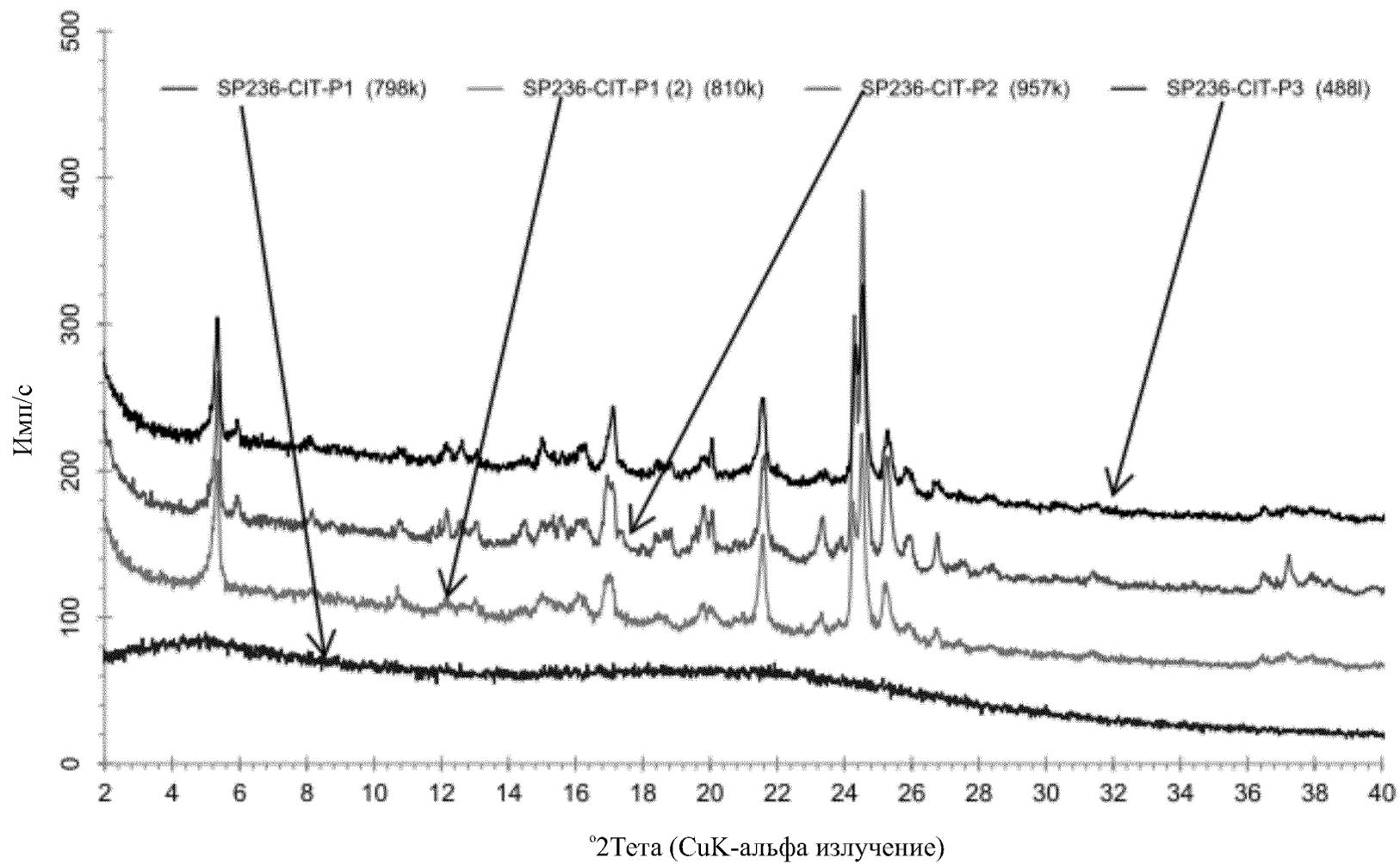


— Название образца
 SP236-FB-PI, 300мВт

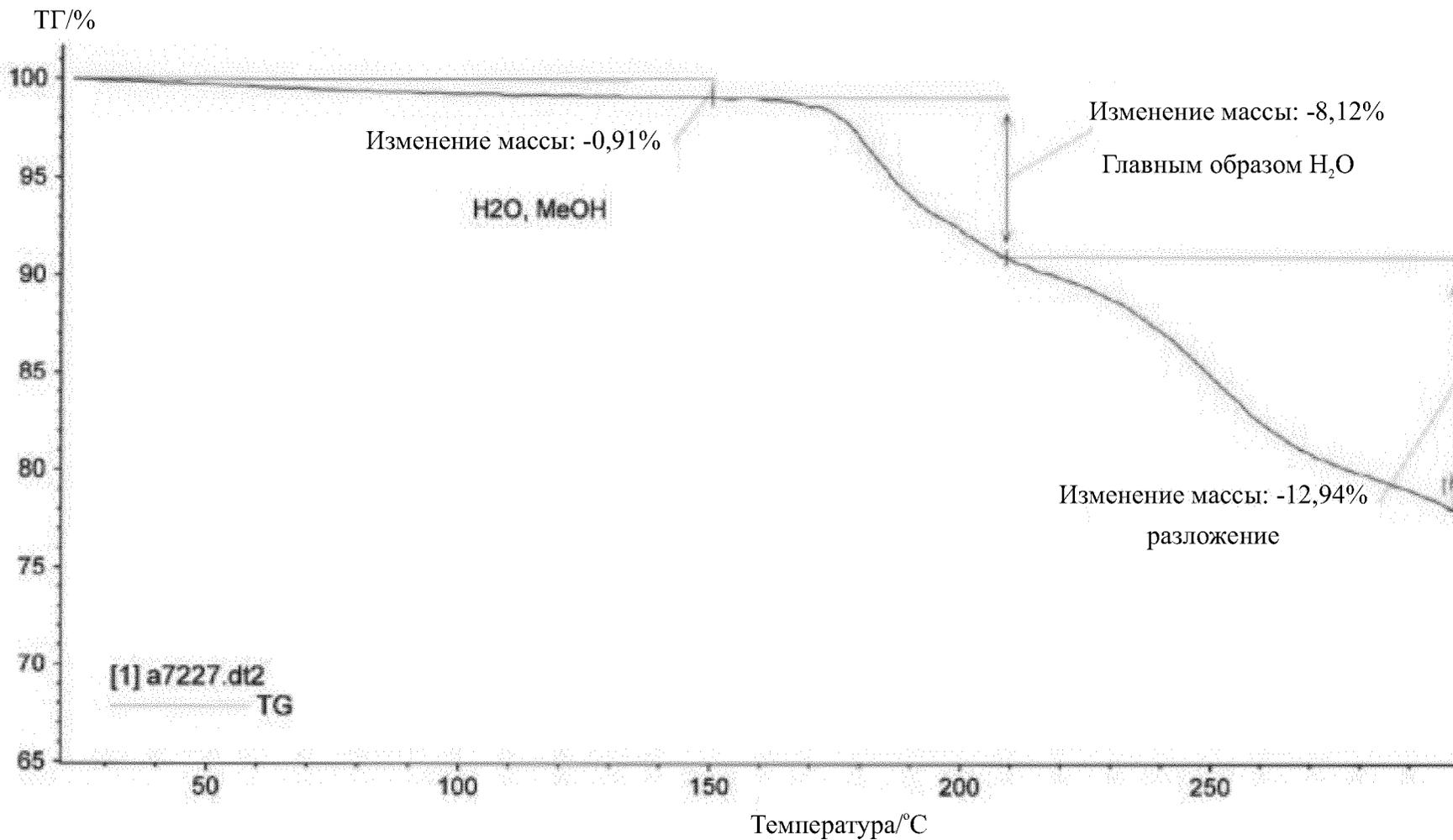
Фиг. 3.4



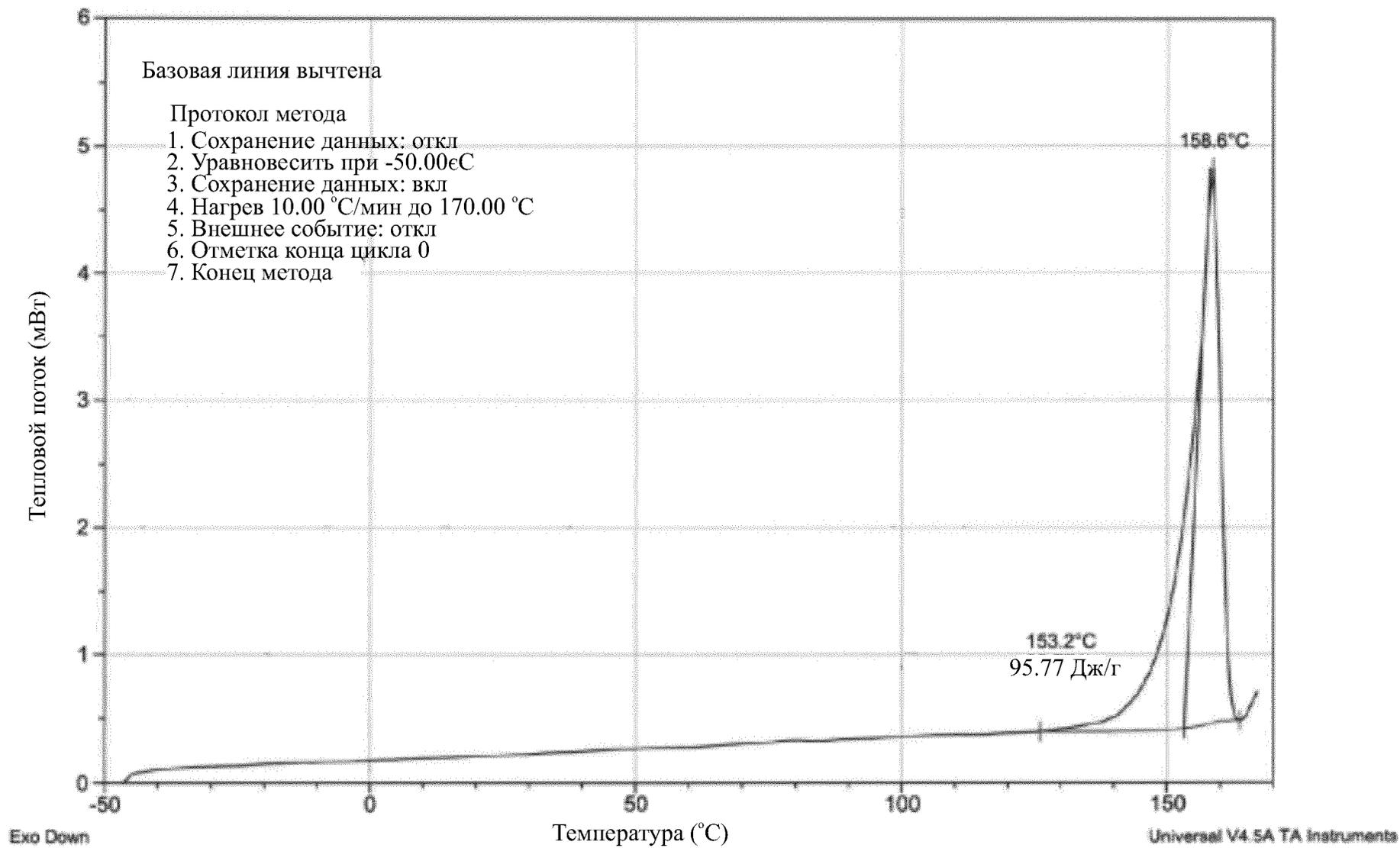
ФИГ. 4



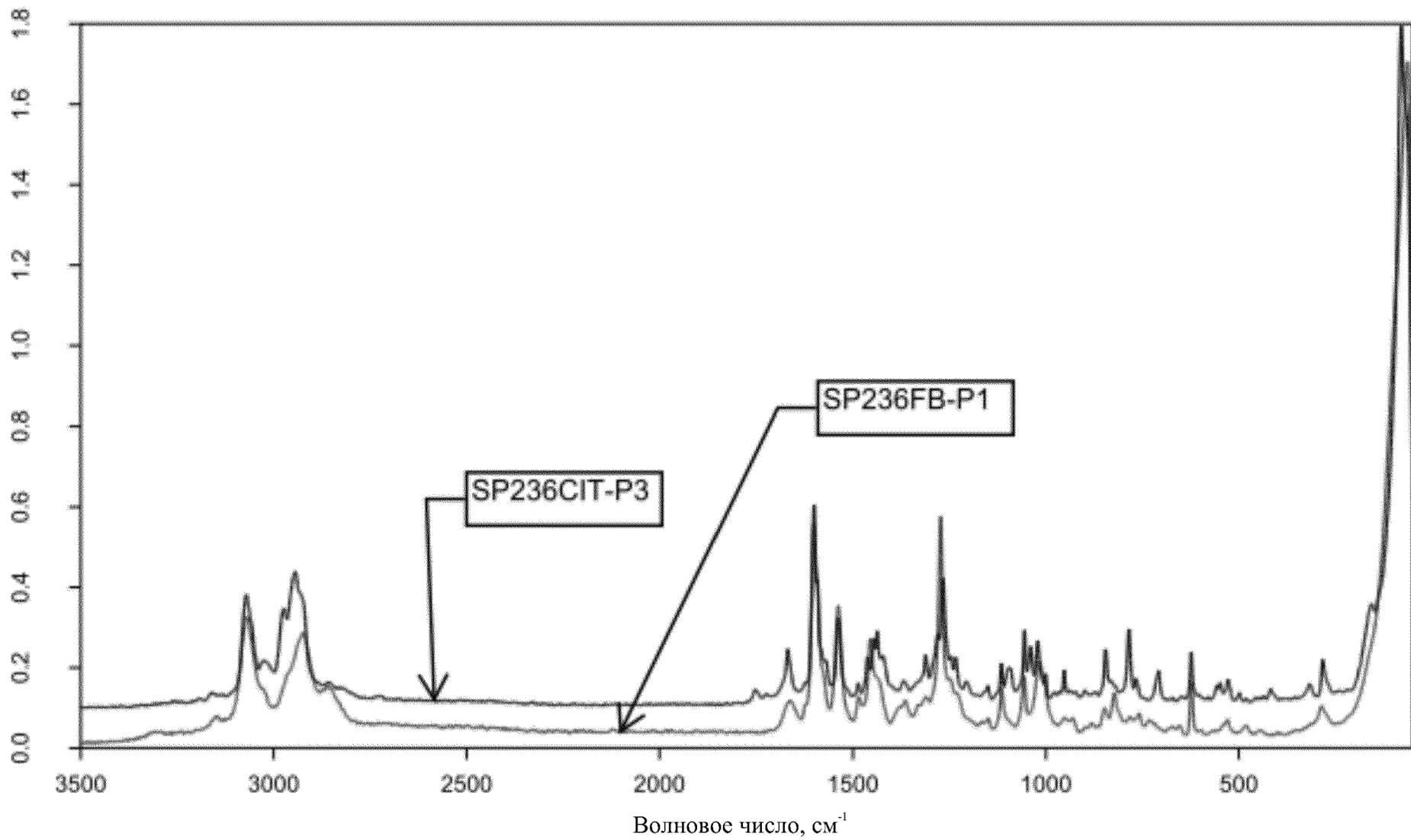
Фиг. 5.1



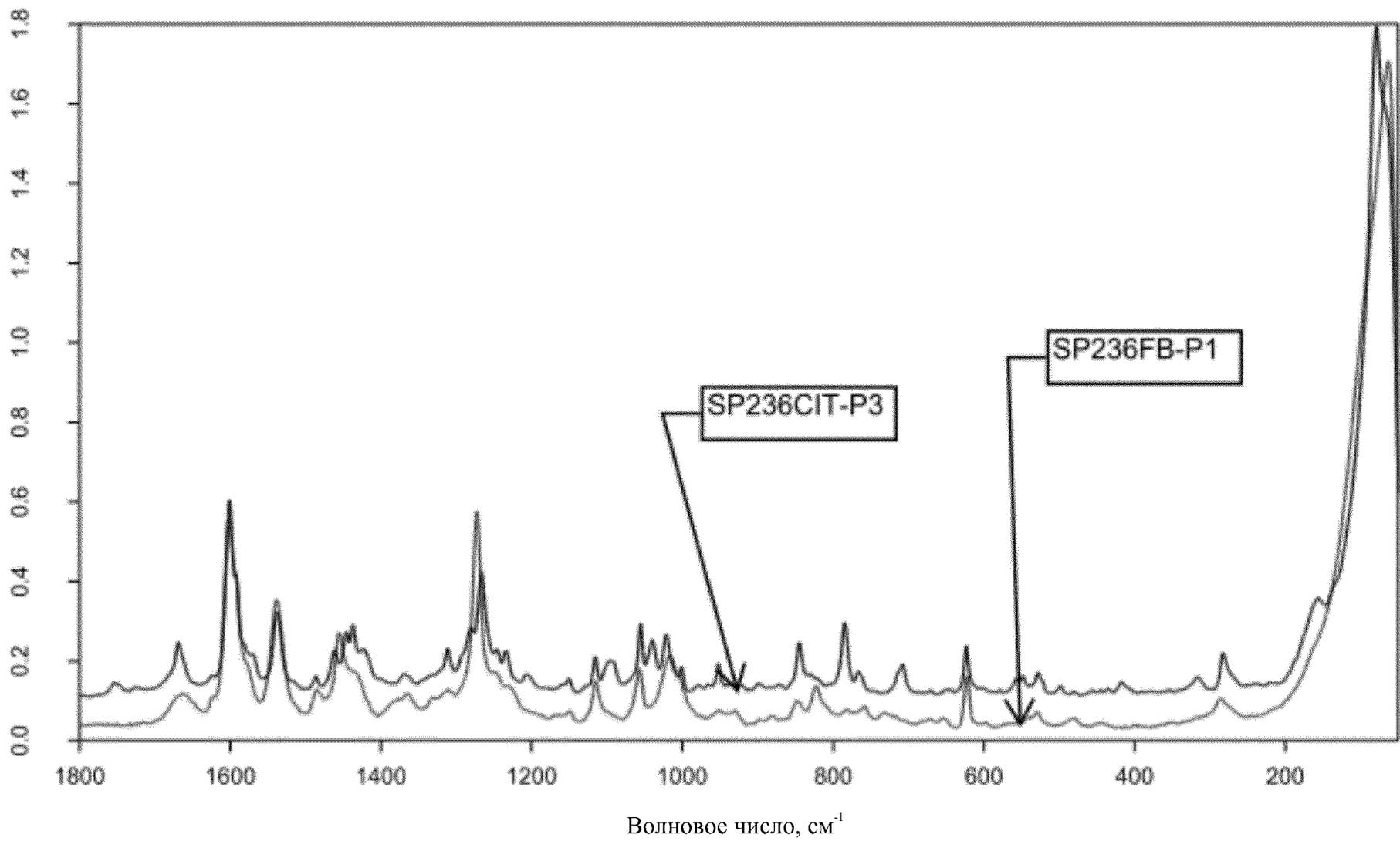
Фиг. 5.2



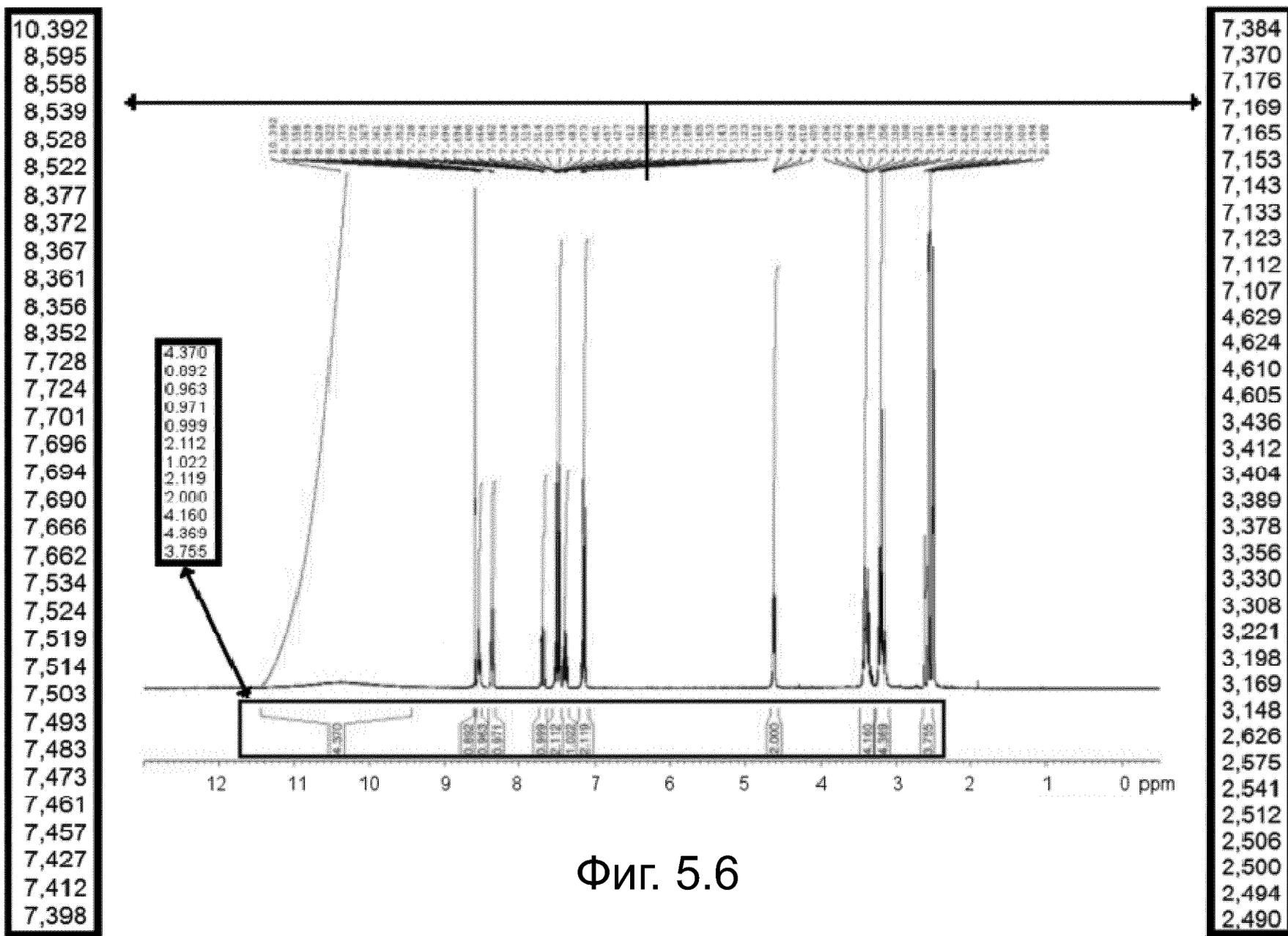
Фиг. 5.3

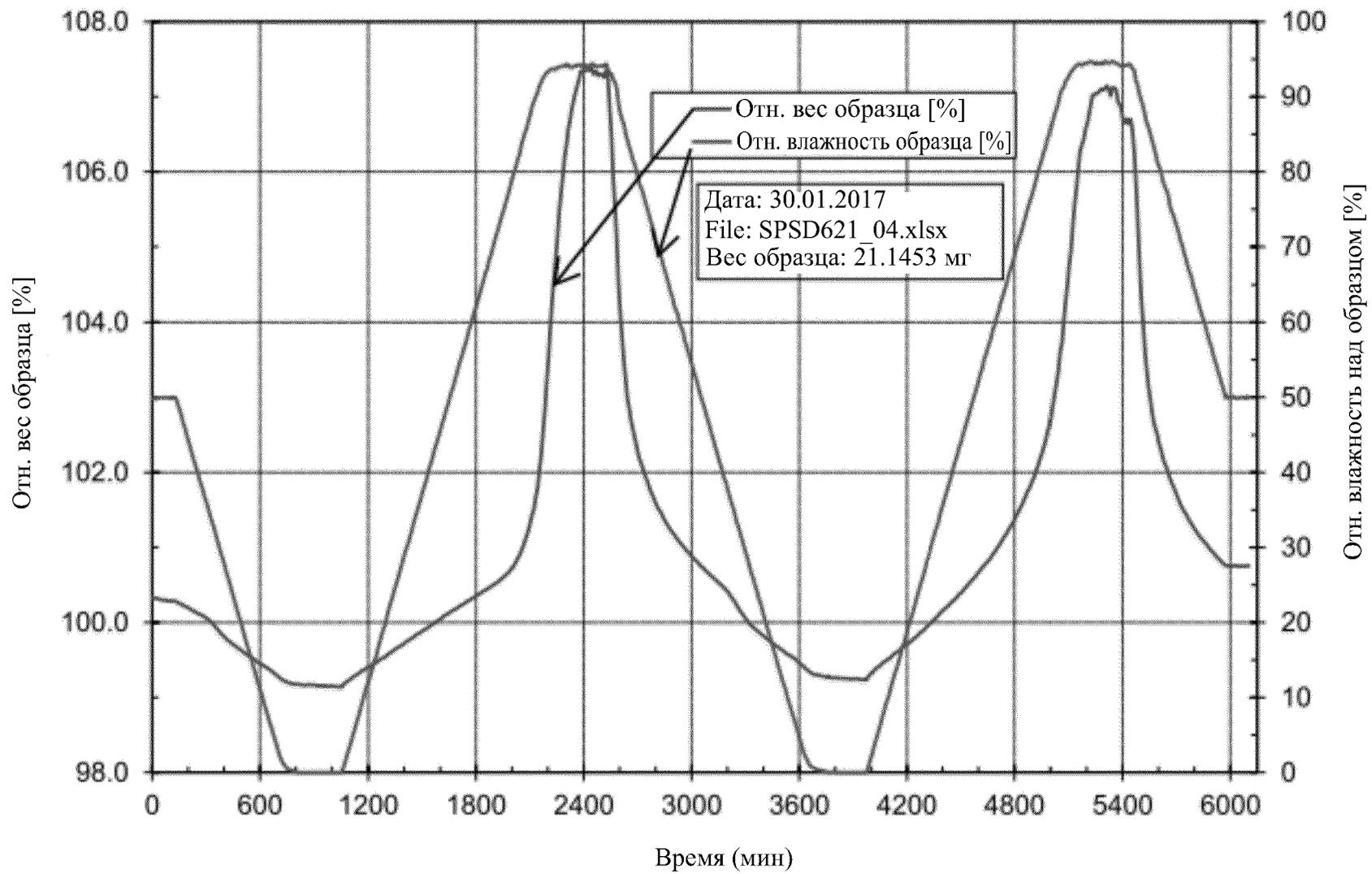


Фиг. 5.4

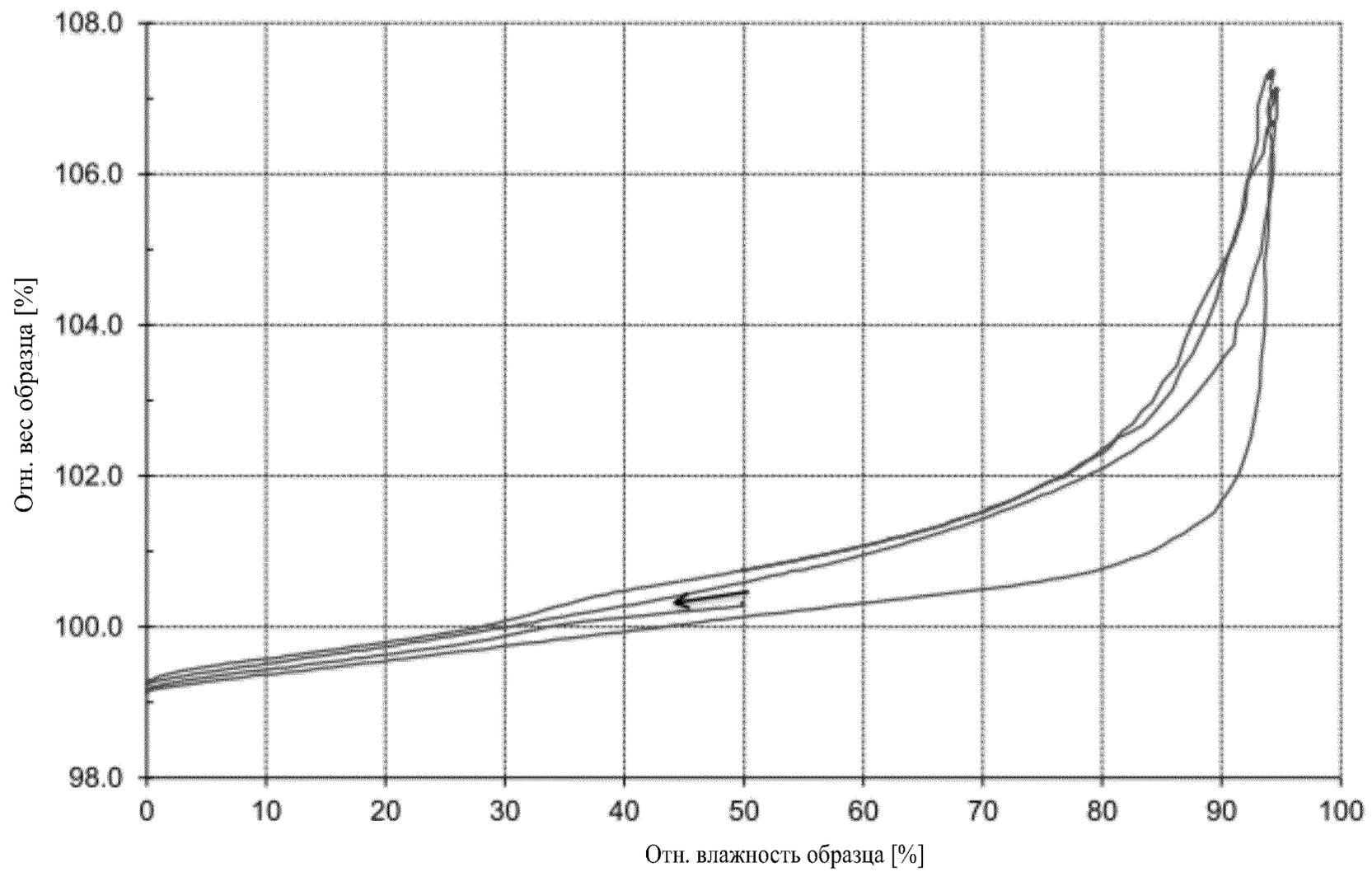


Фиг. 5.5

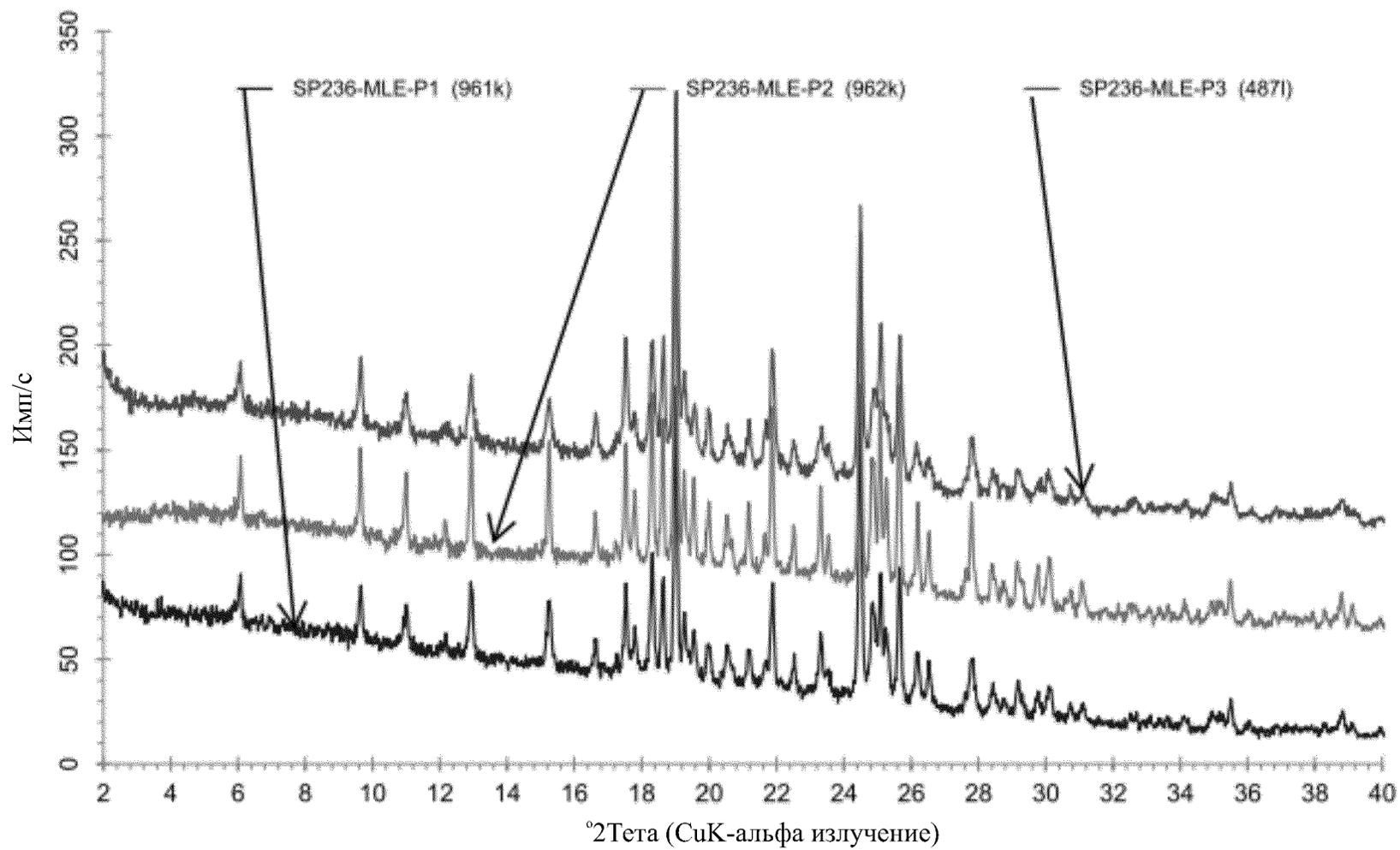




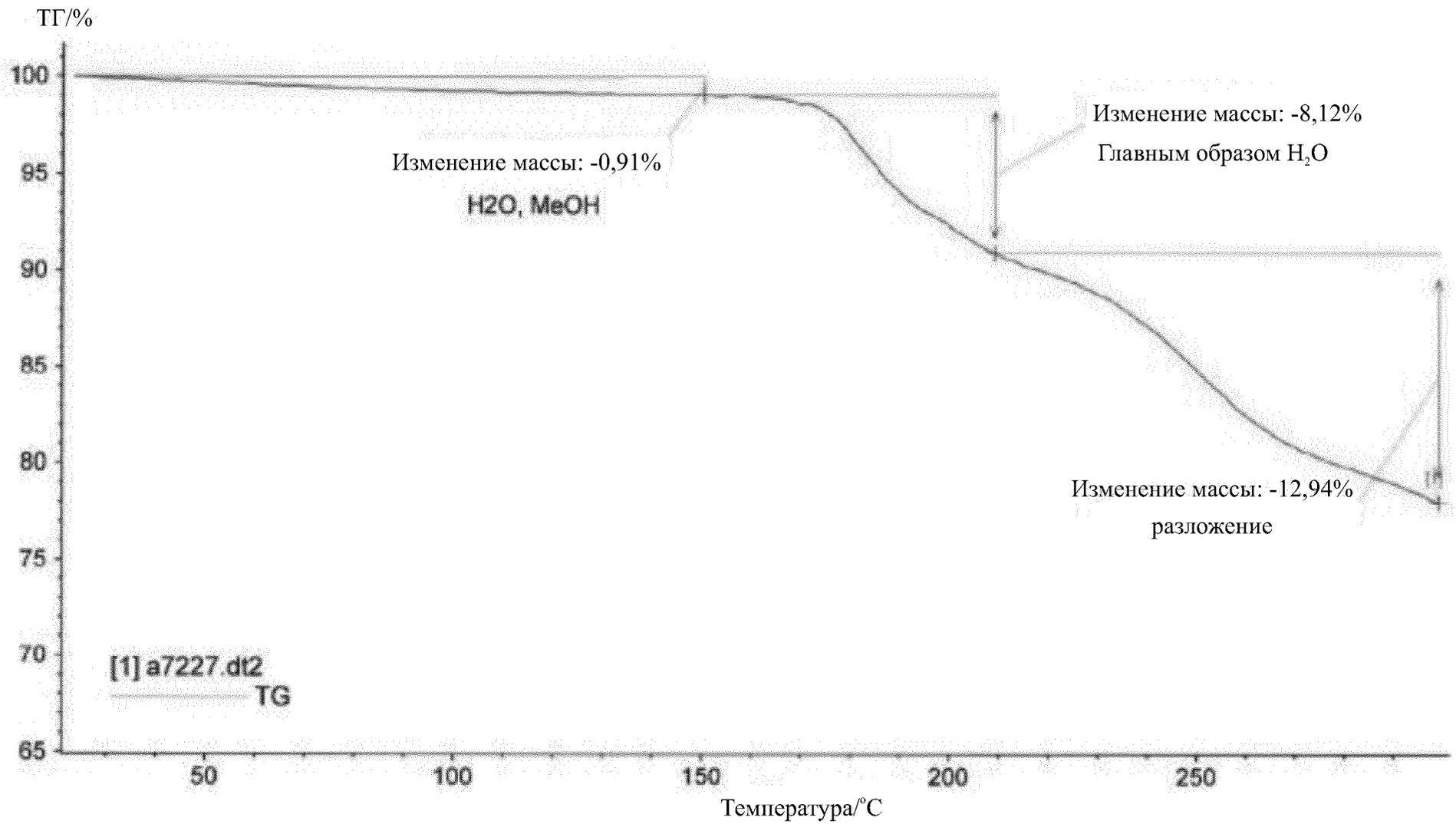
Фиг. 5.7



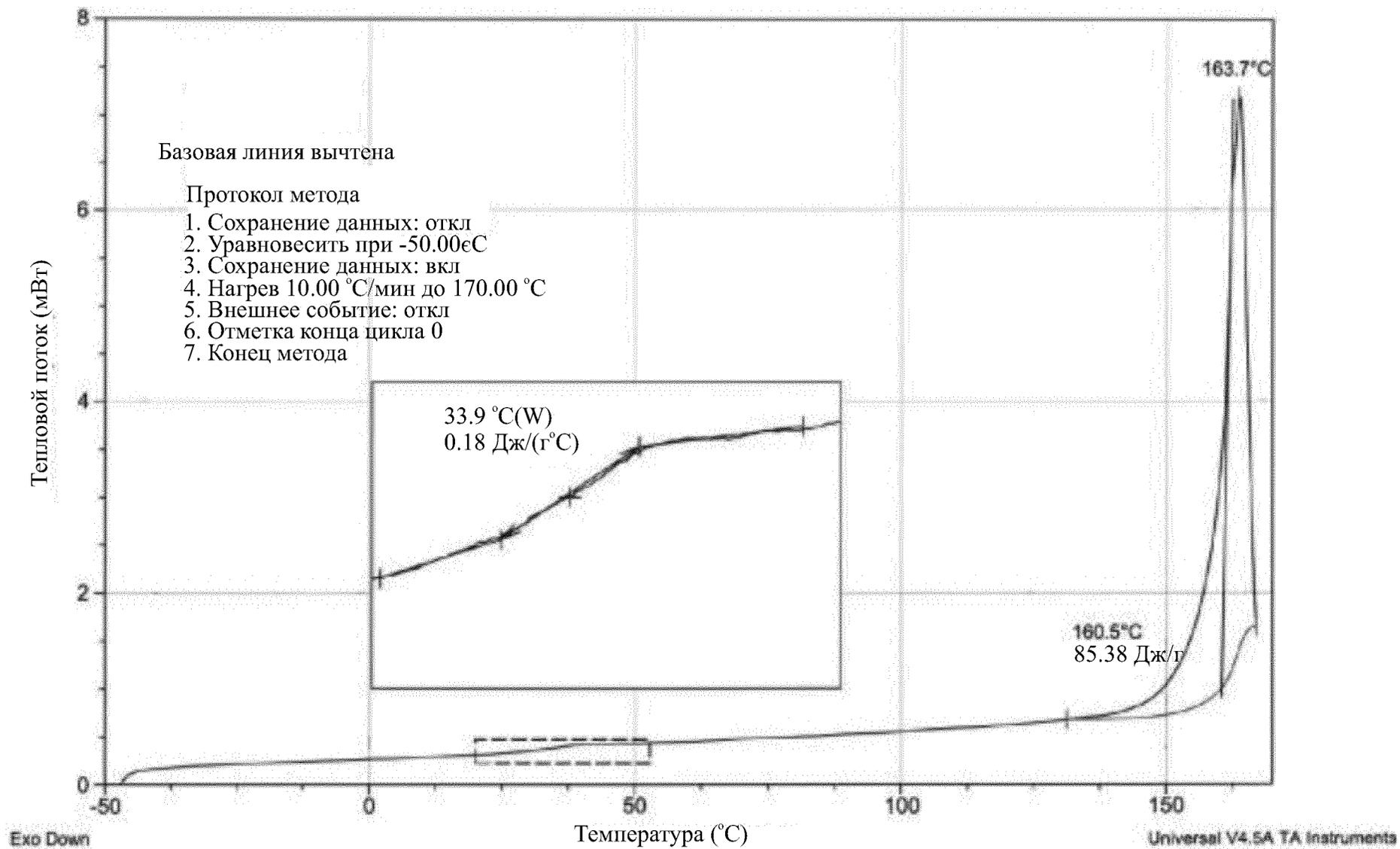
Фиг. 5.8



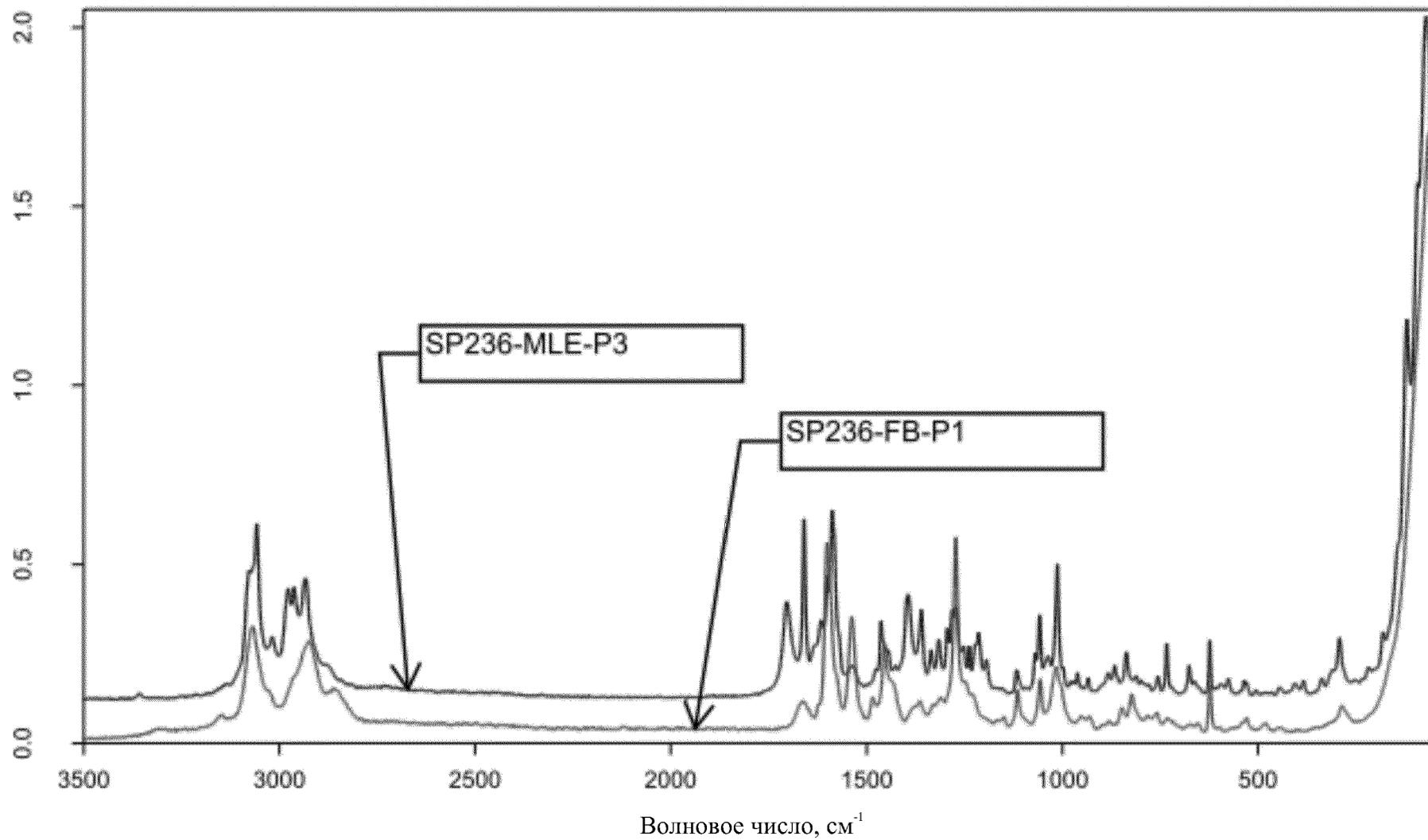
Фиг. 5.9



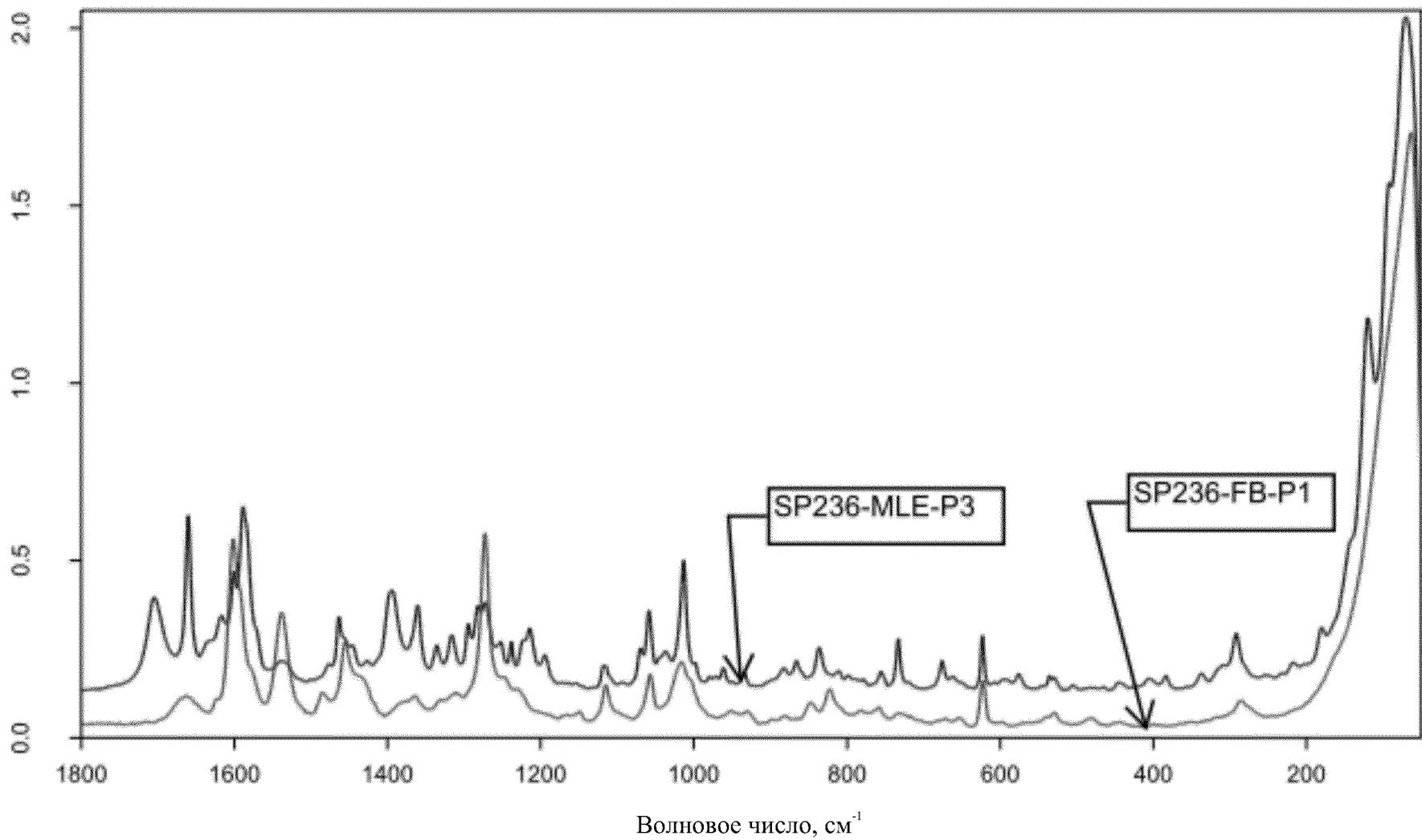
Фиг. 5.10



Фиг. 5.11

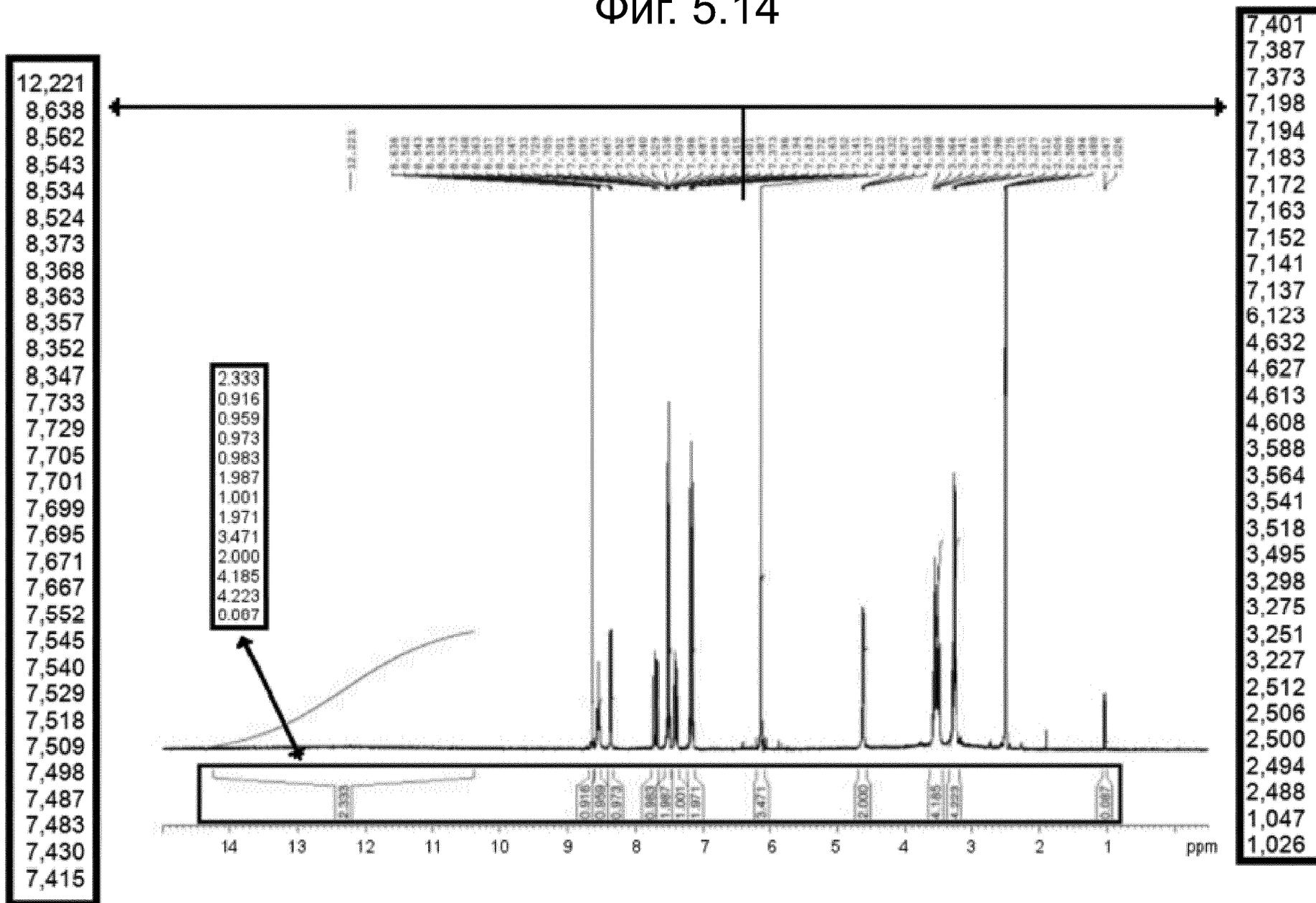


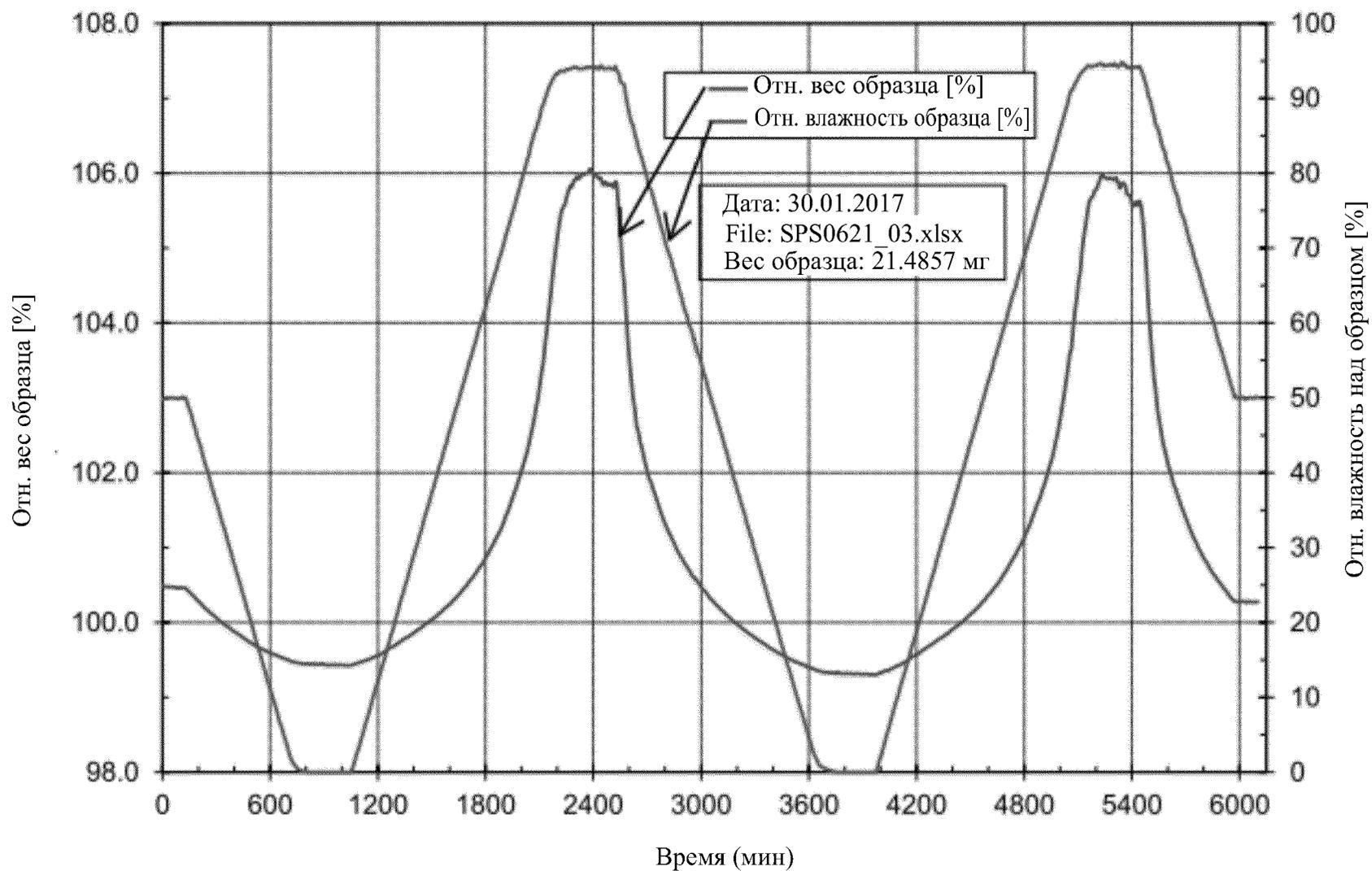
Фиг. 5.12



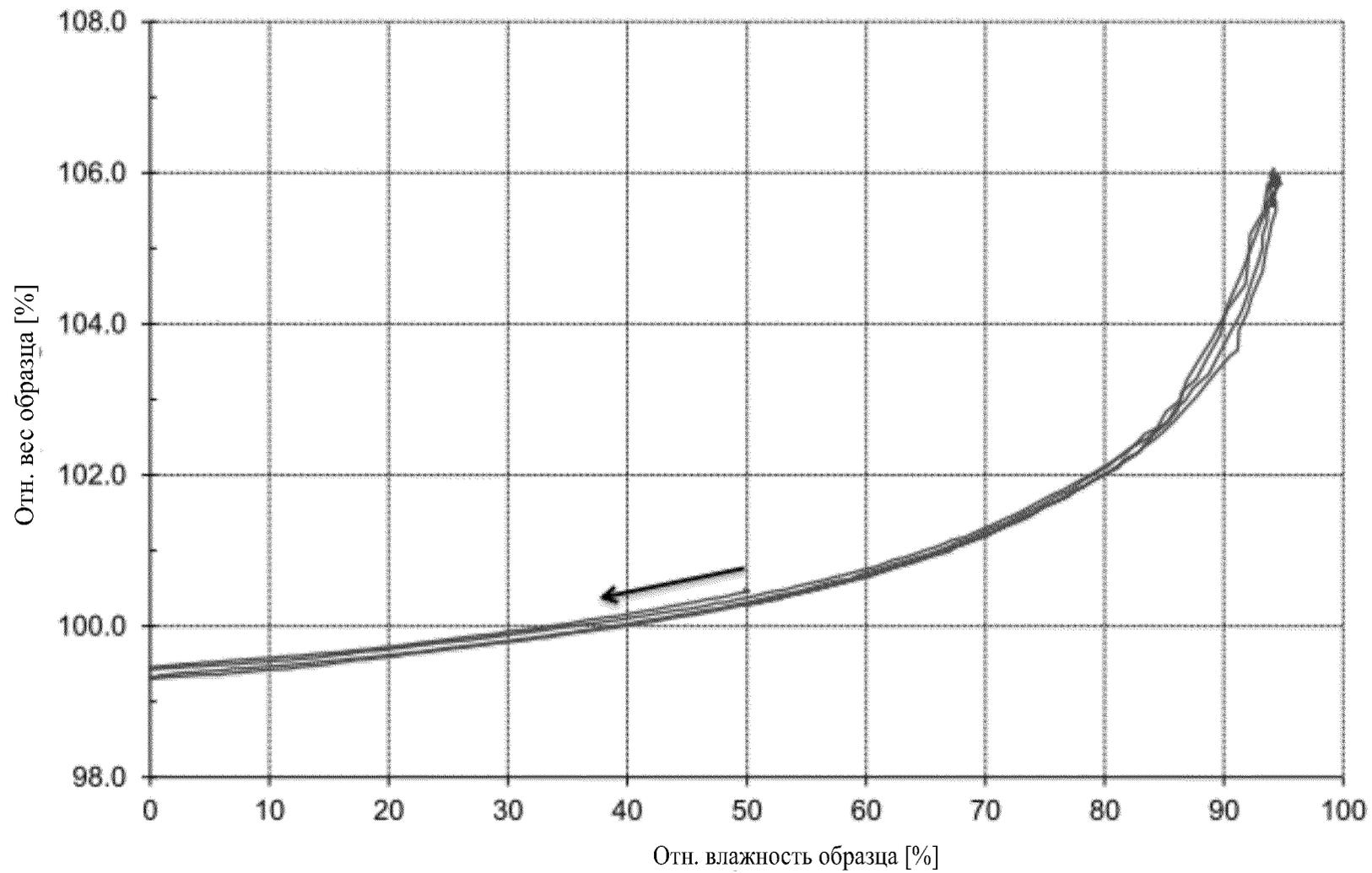
Фиг. 5.13

Фиг. 5.14

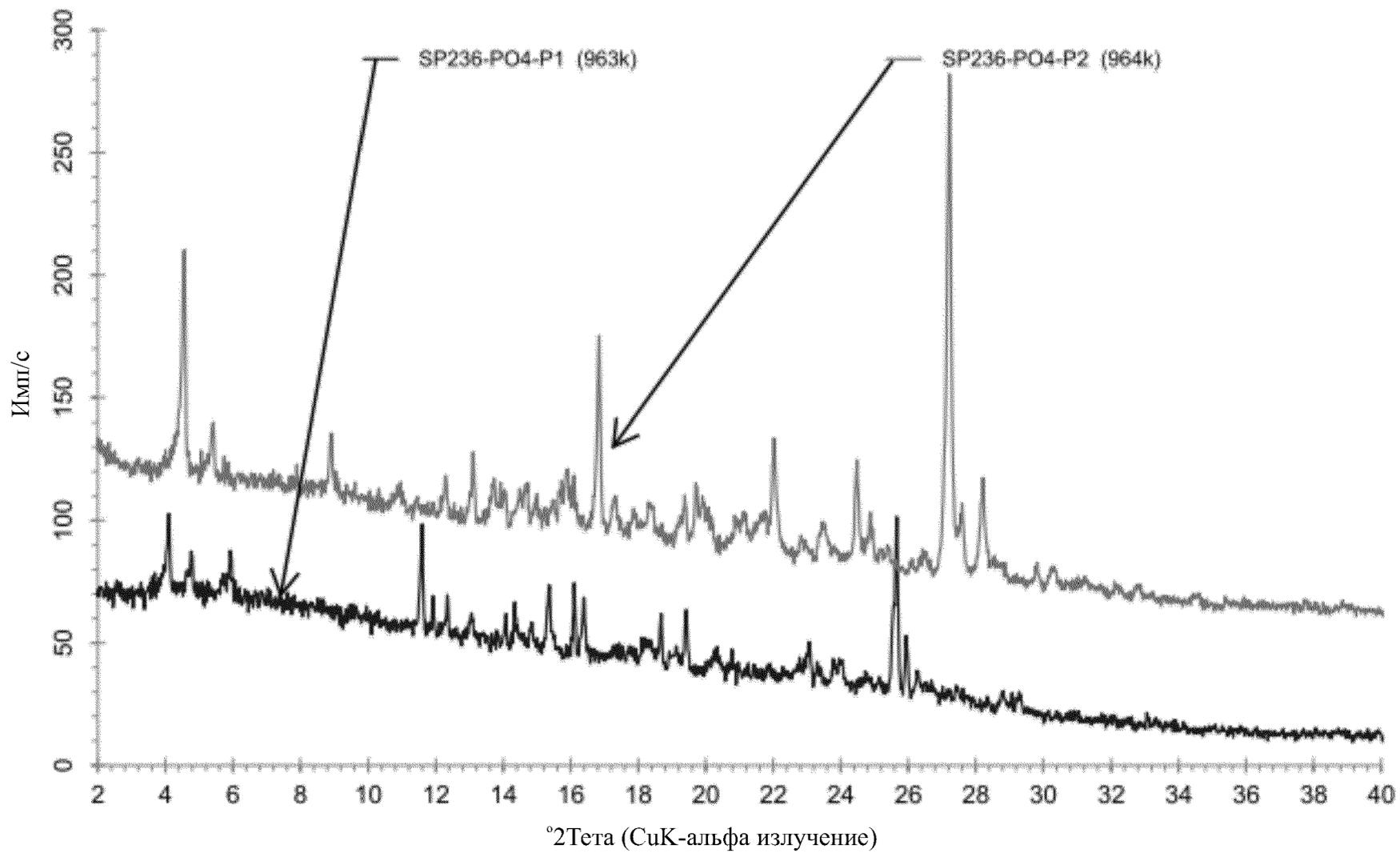




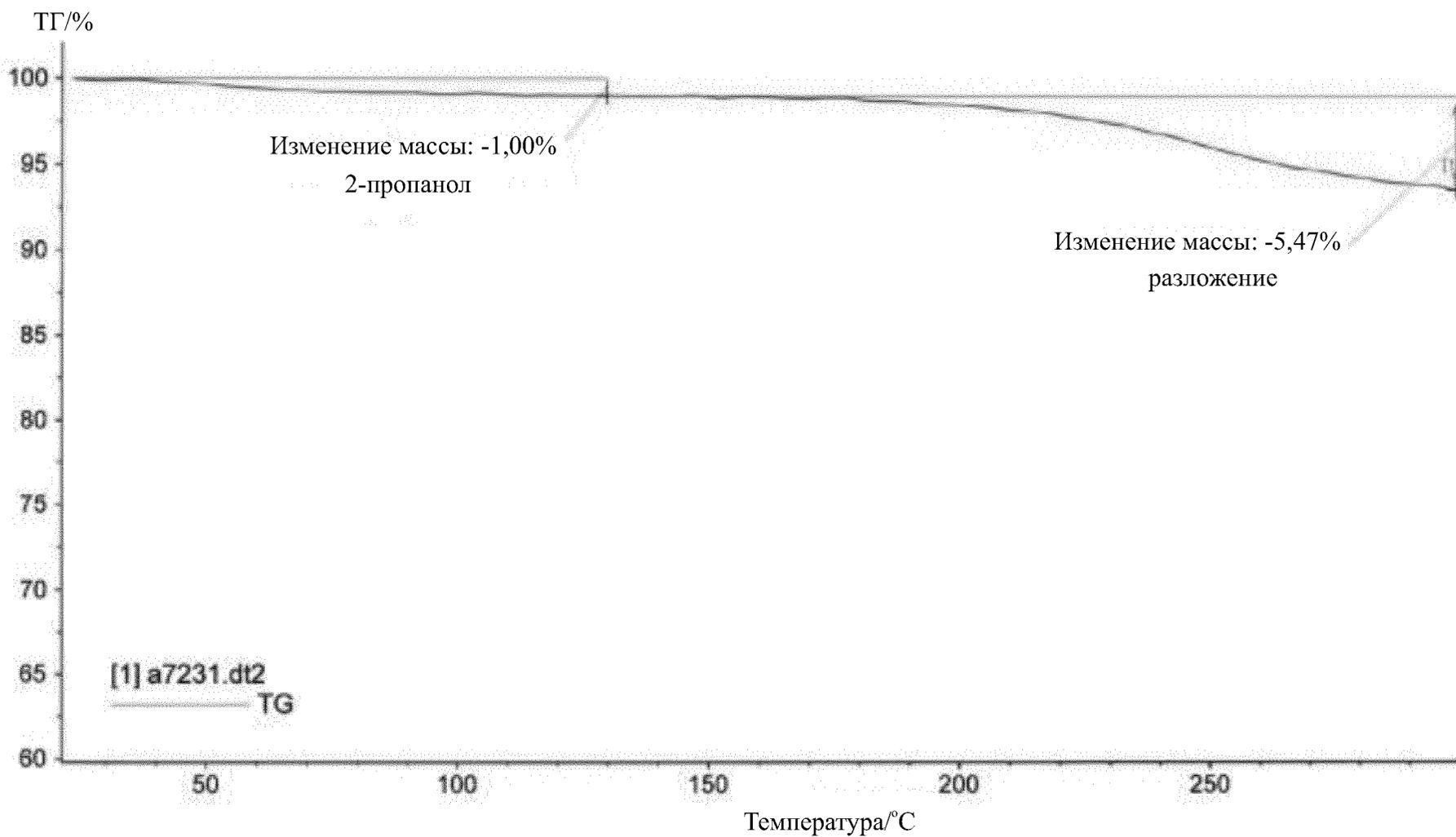
Фиг. 5.15



Фиг. 5.16

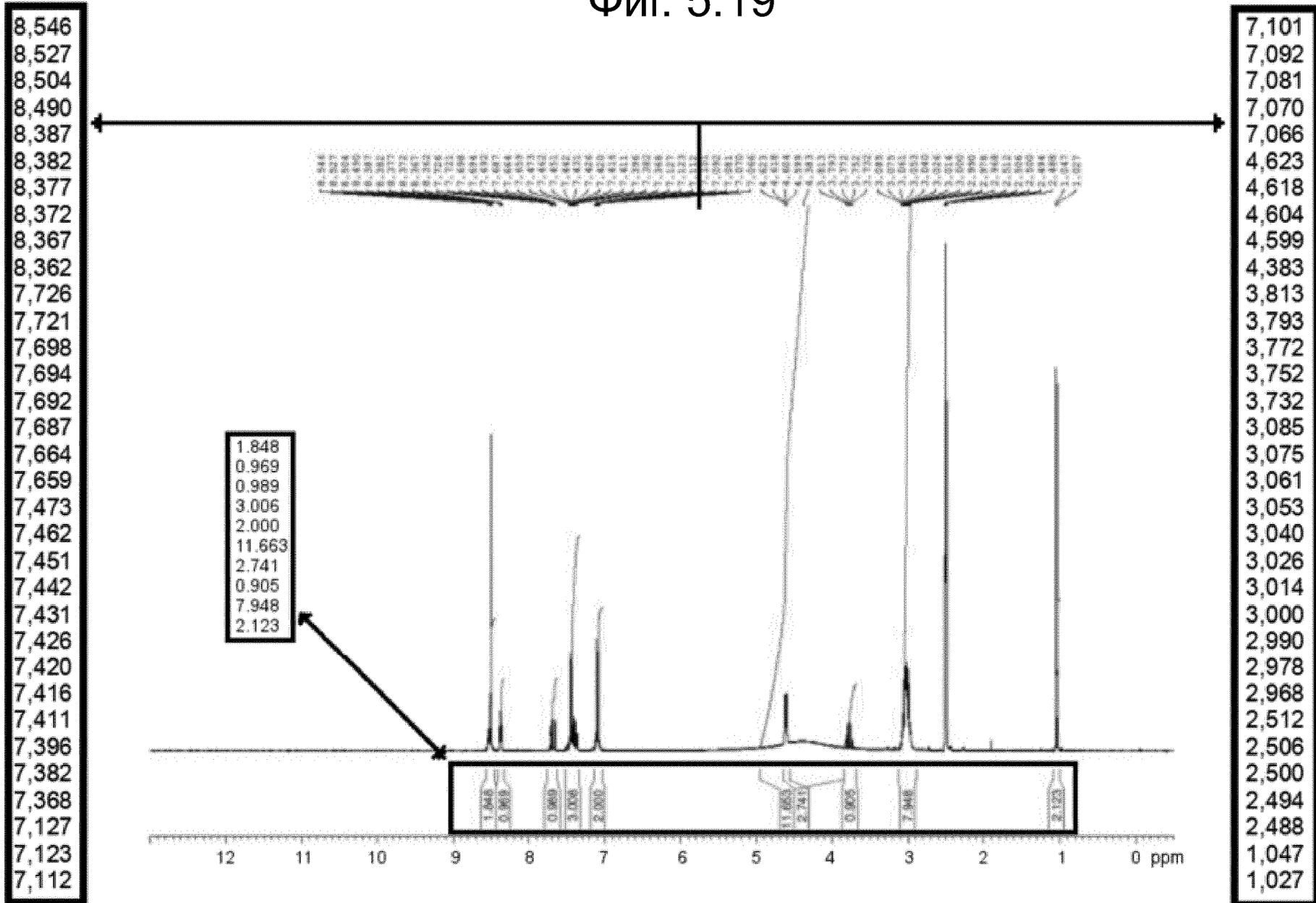


Фиг. 5.17

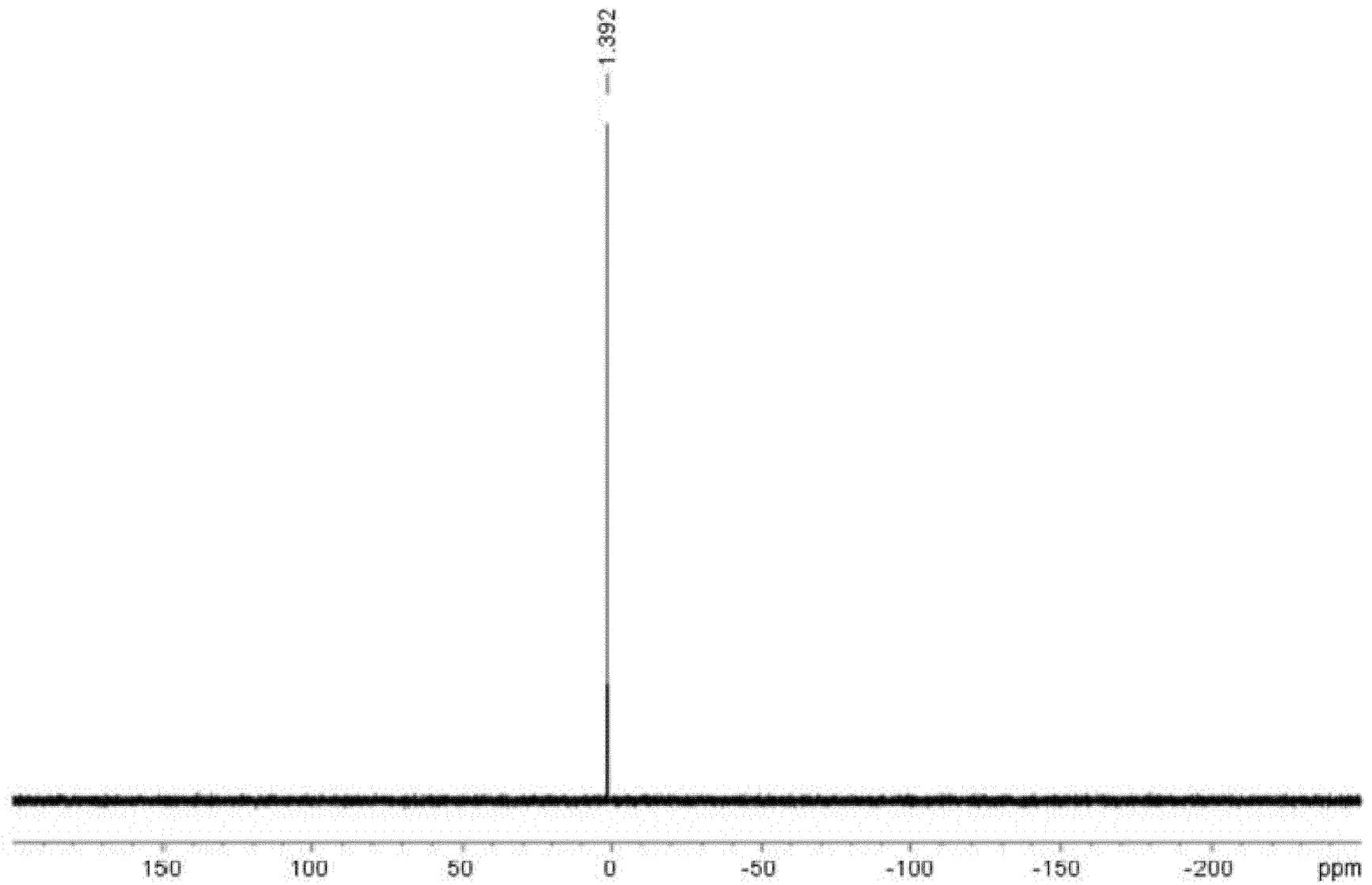


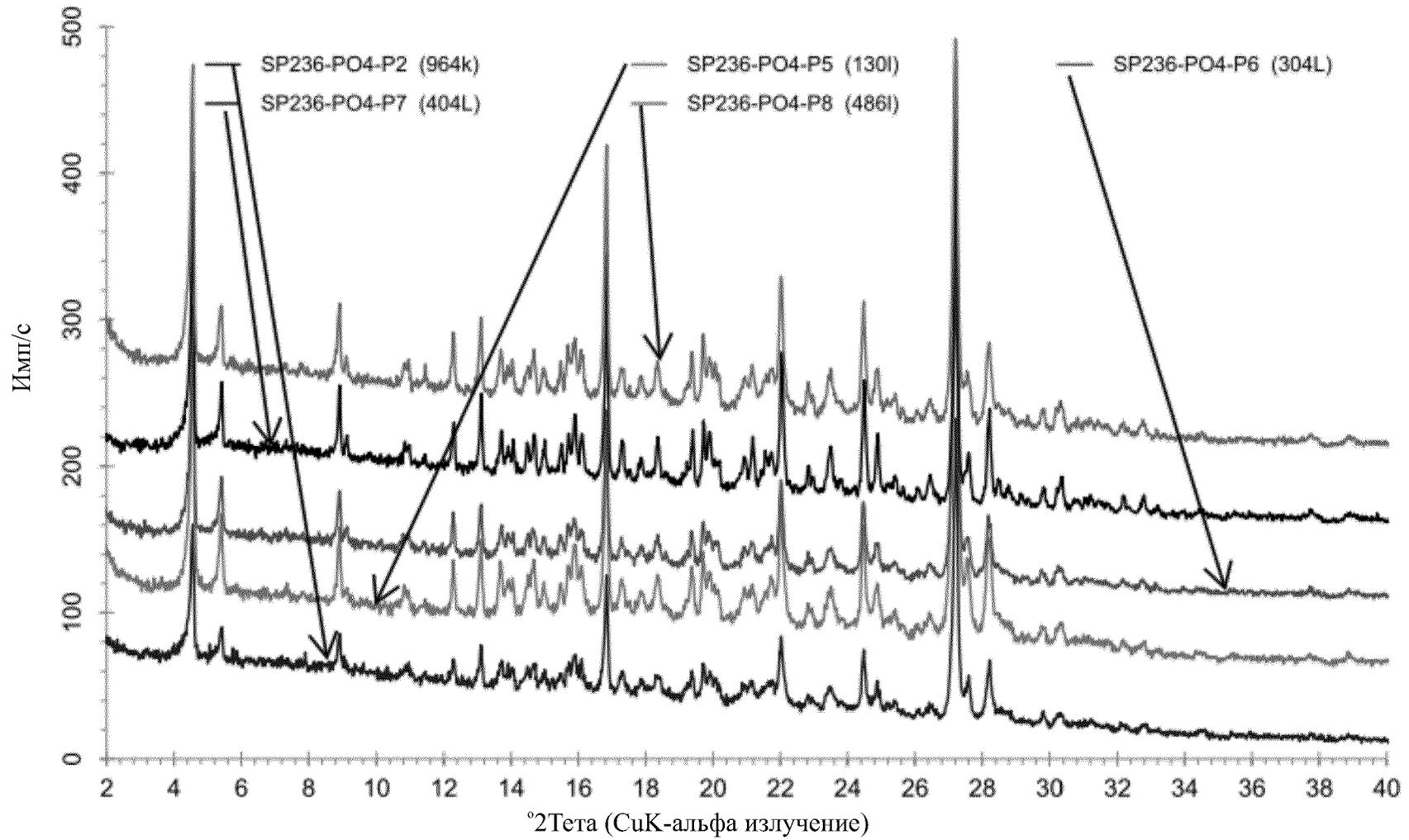
Фиг. 5.18

Фиг. 5.19

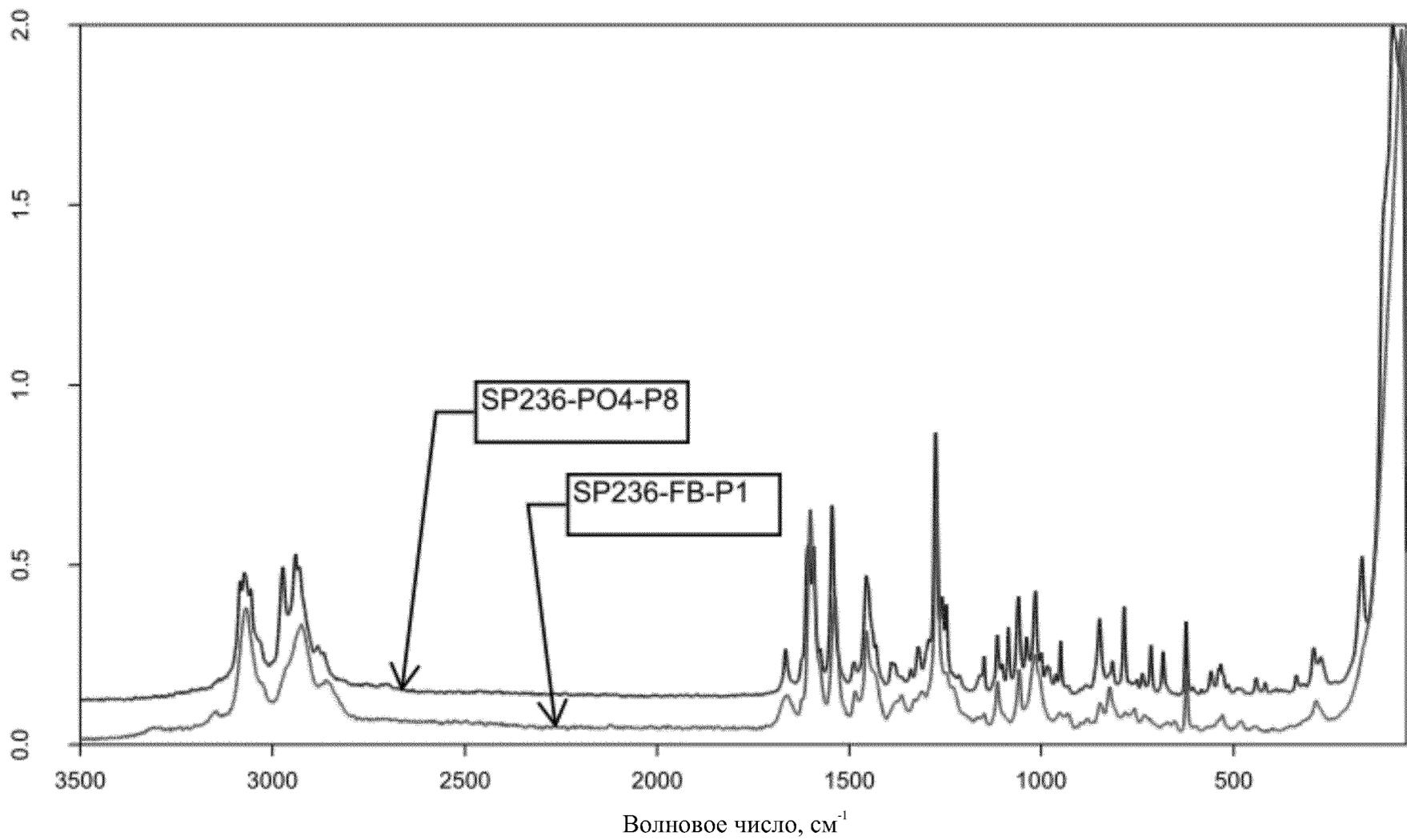


Фиг. 5.20

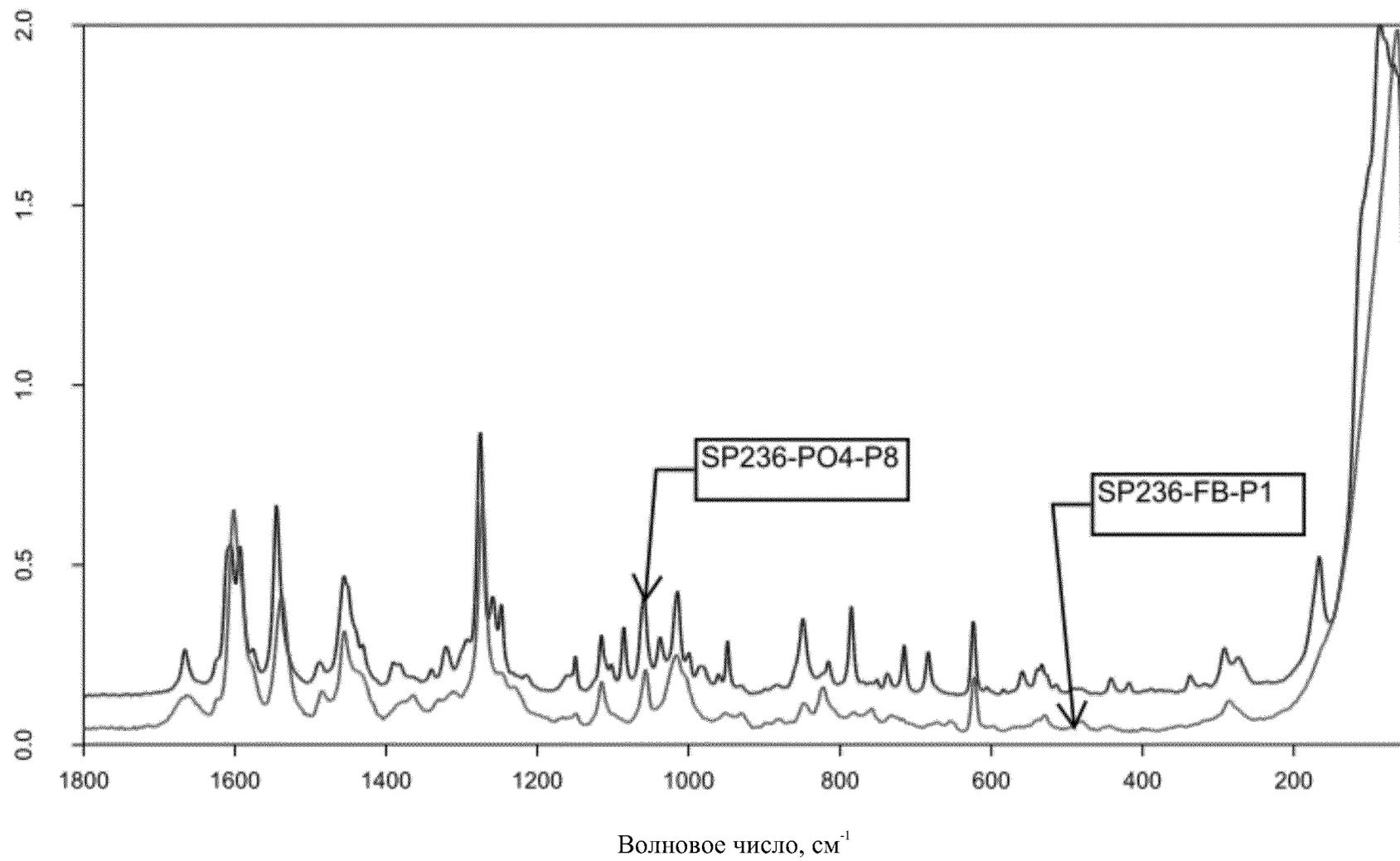




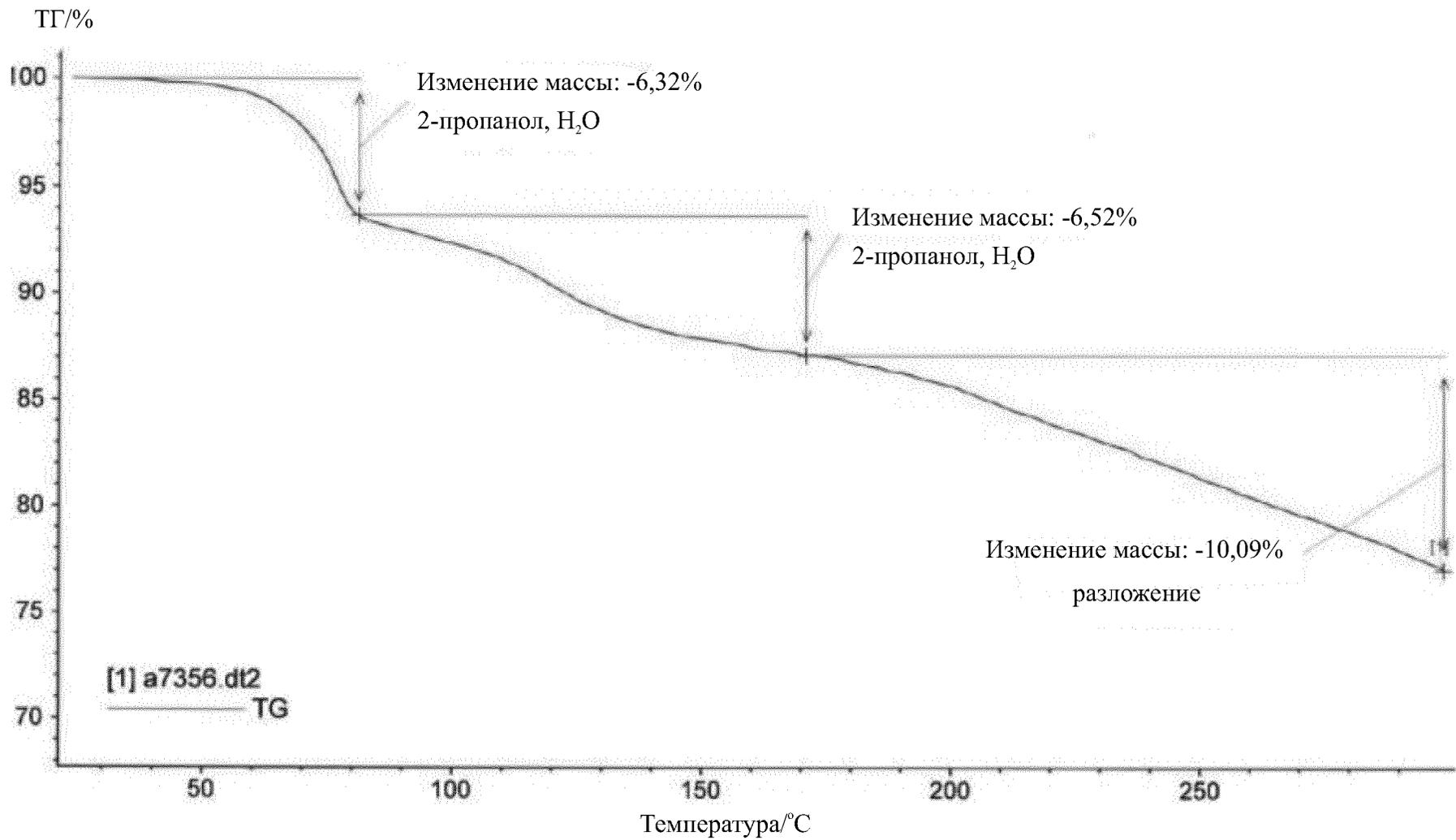
Фиг. 5.21



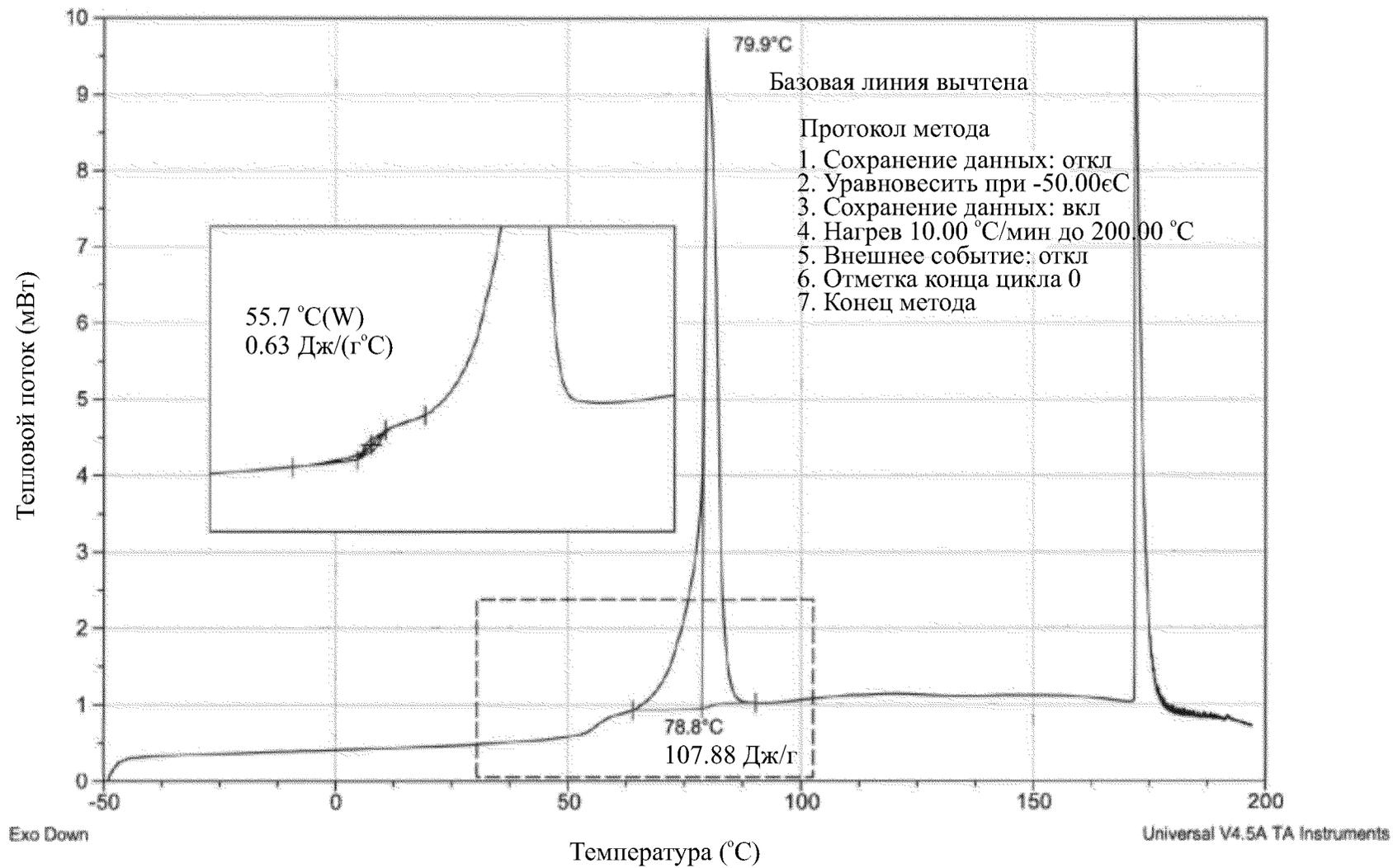
Фиг. 5.22



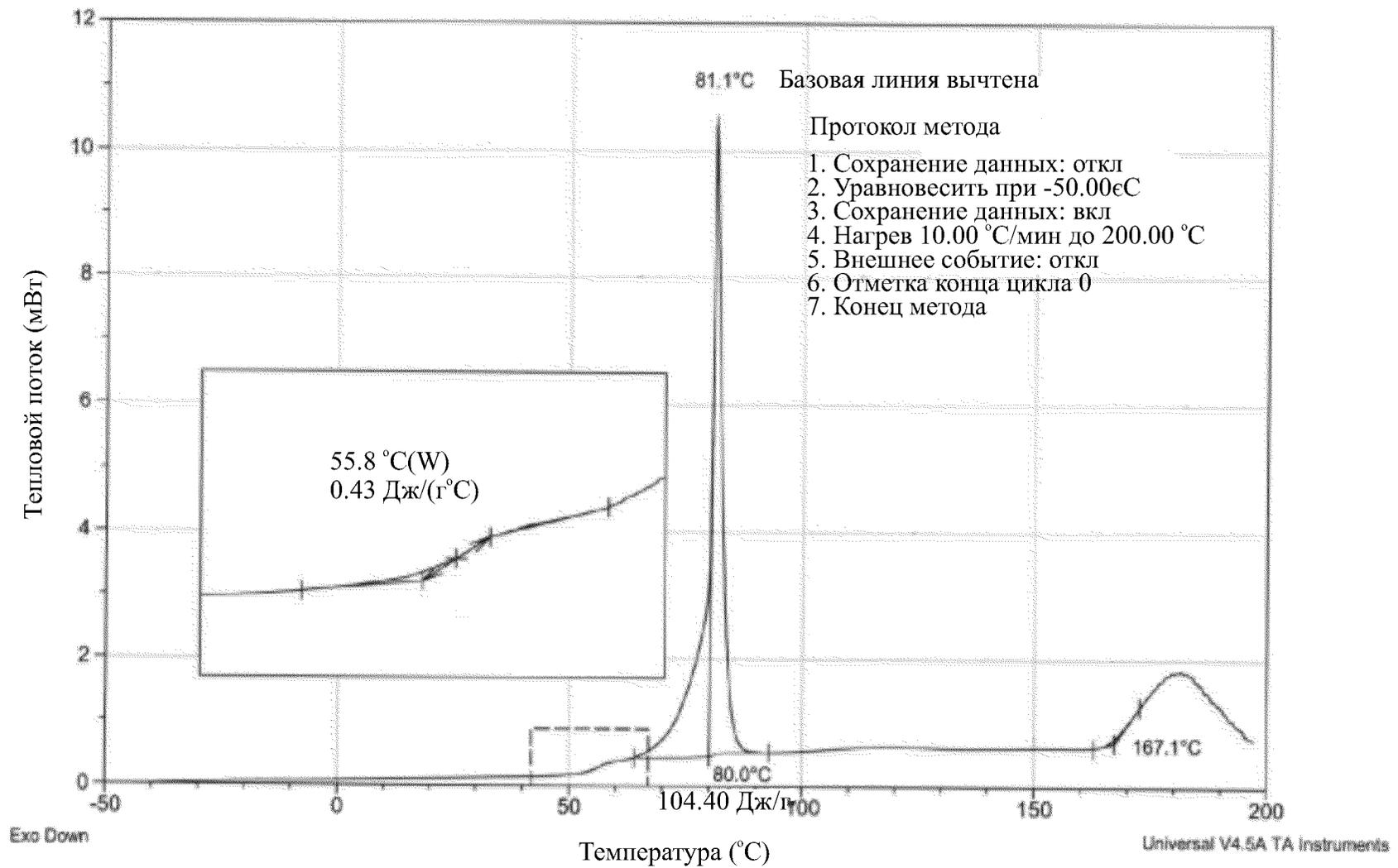
Фиг. 5.23



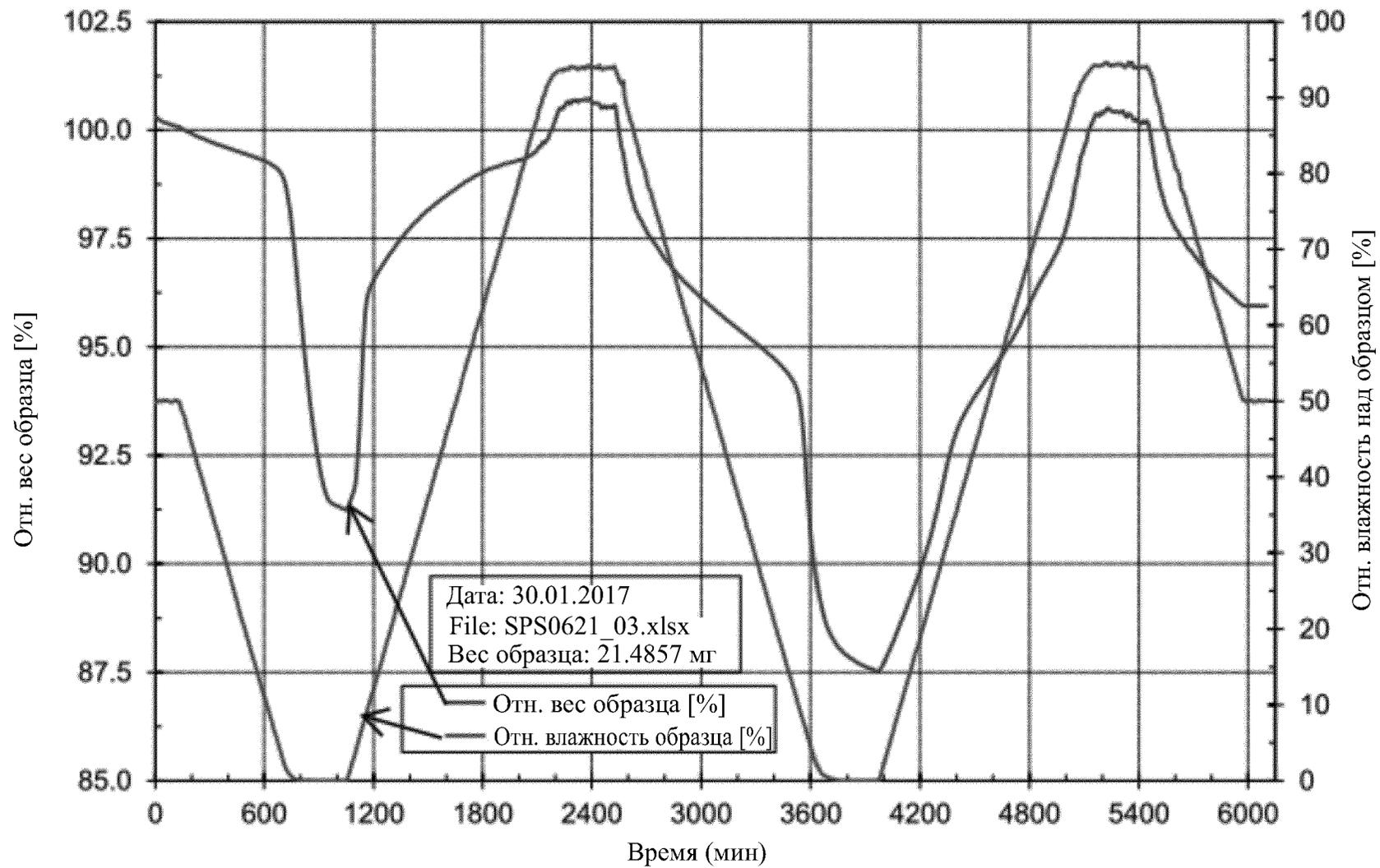
Фиг. 5.24



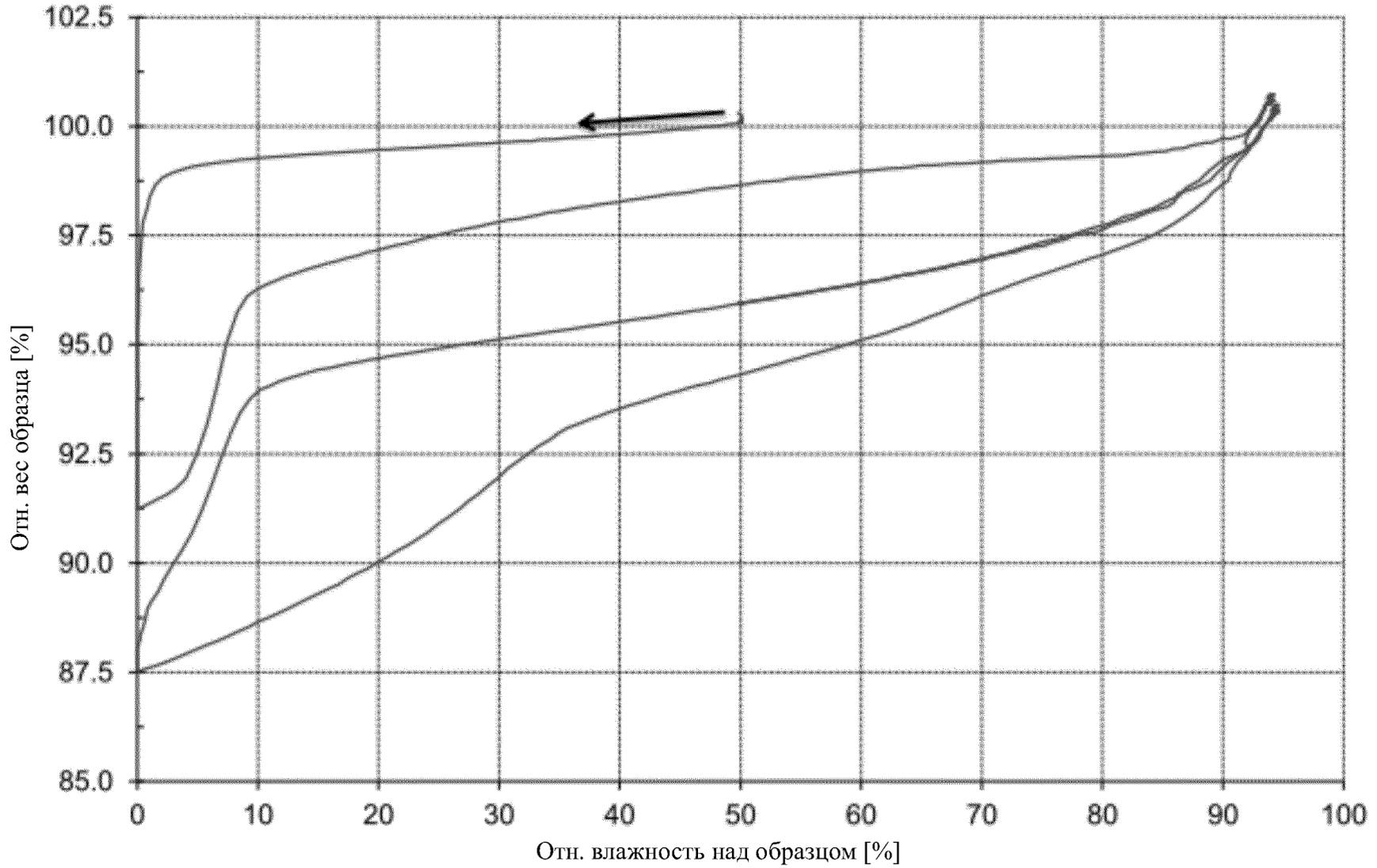
Фиг. 5.25



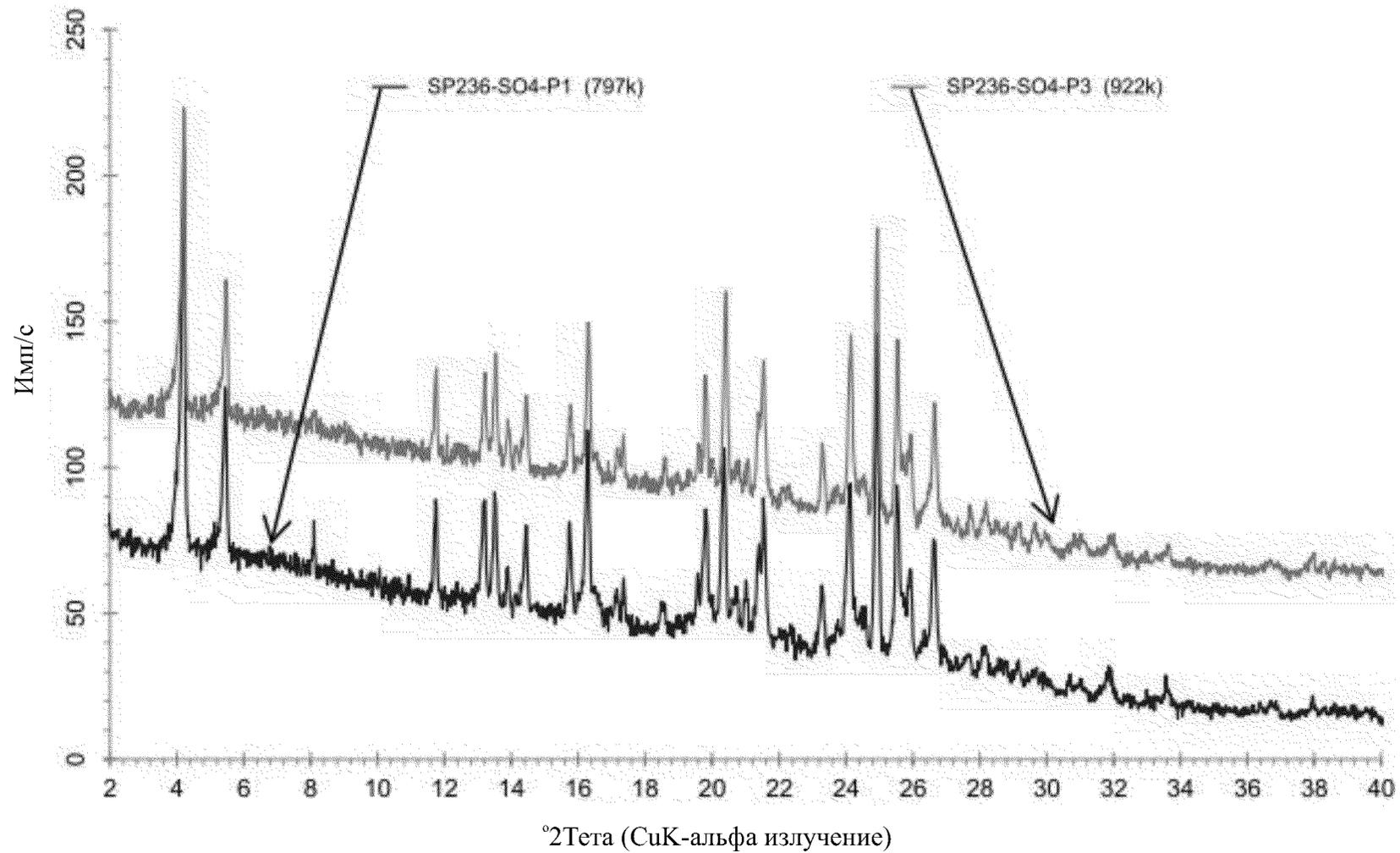
Фиг. 5.26



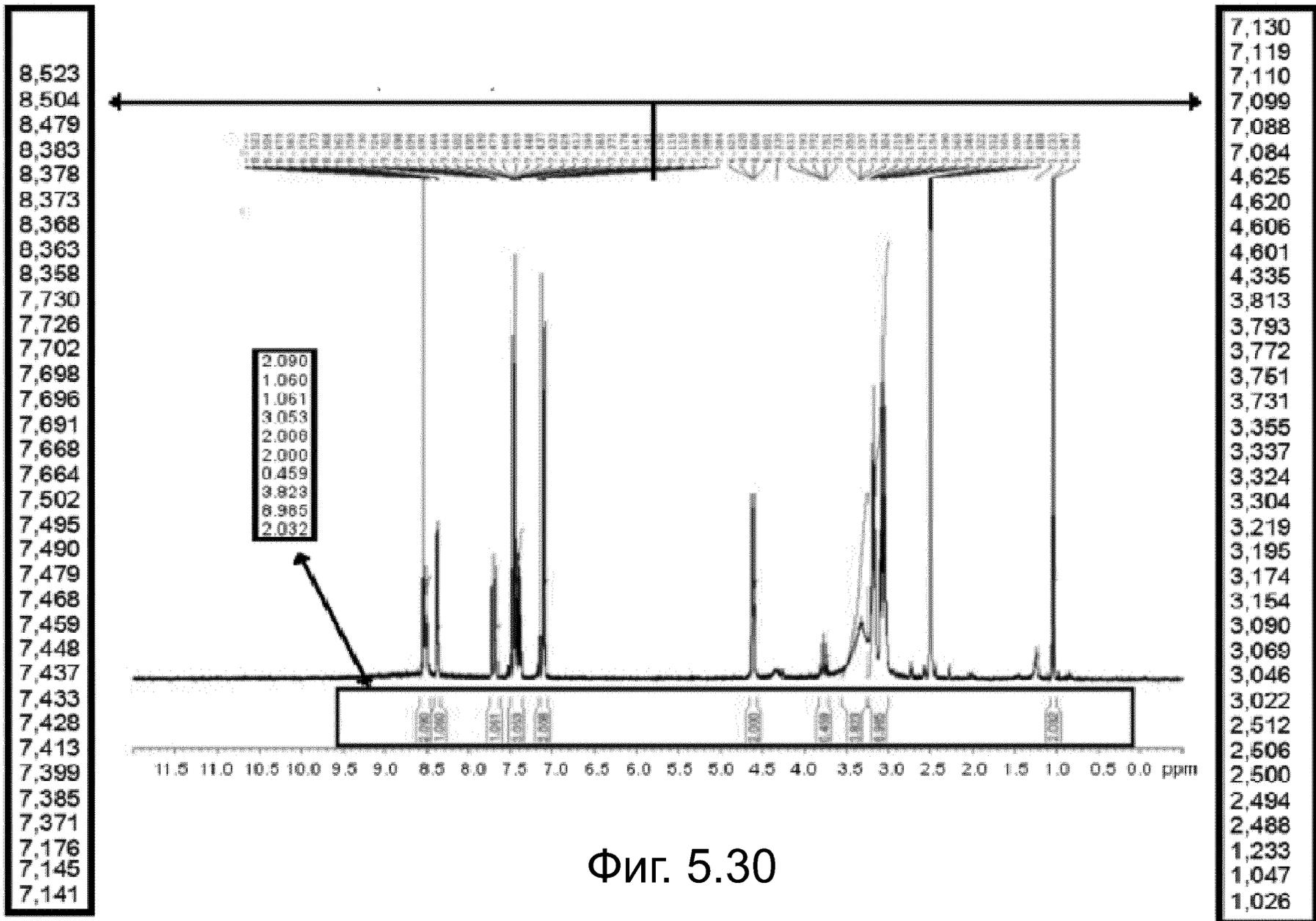
Фиг. 5.27



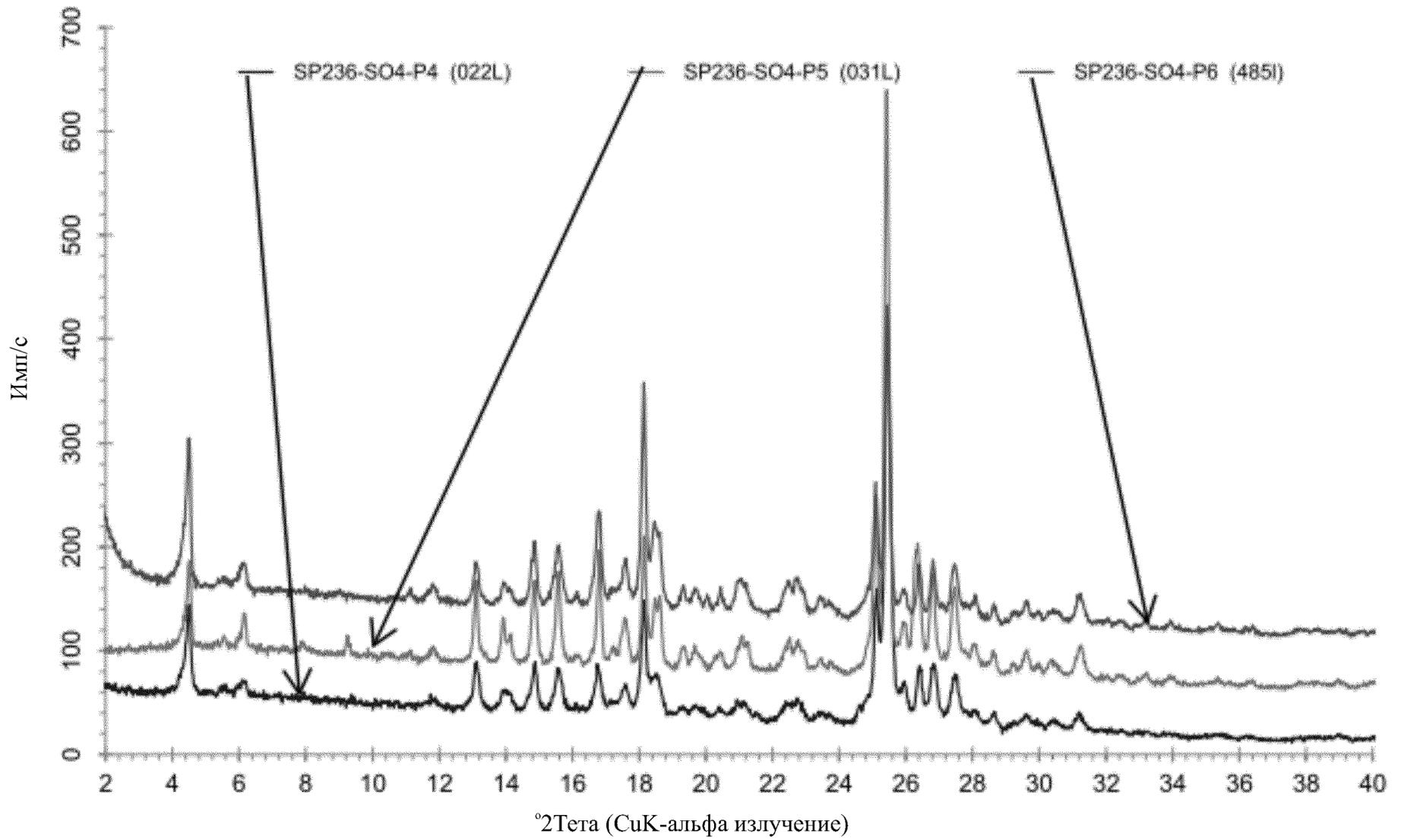
Фиг. 5.28



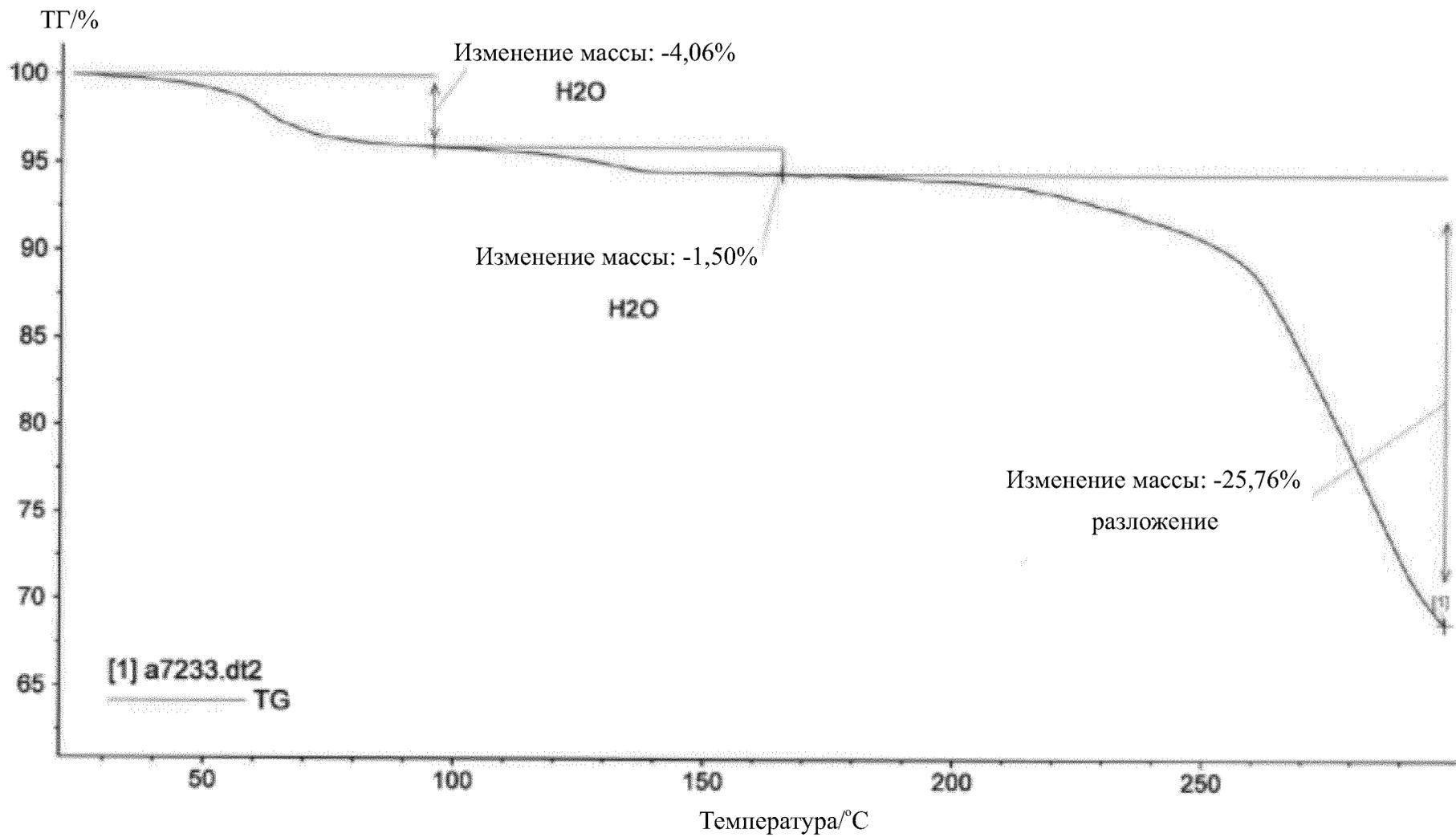
Фиг. 5.29



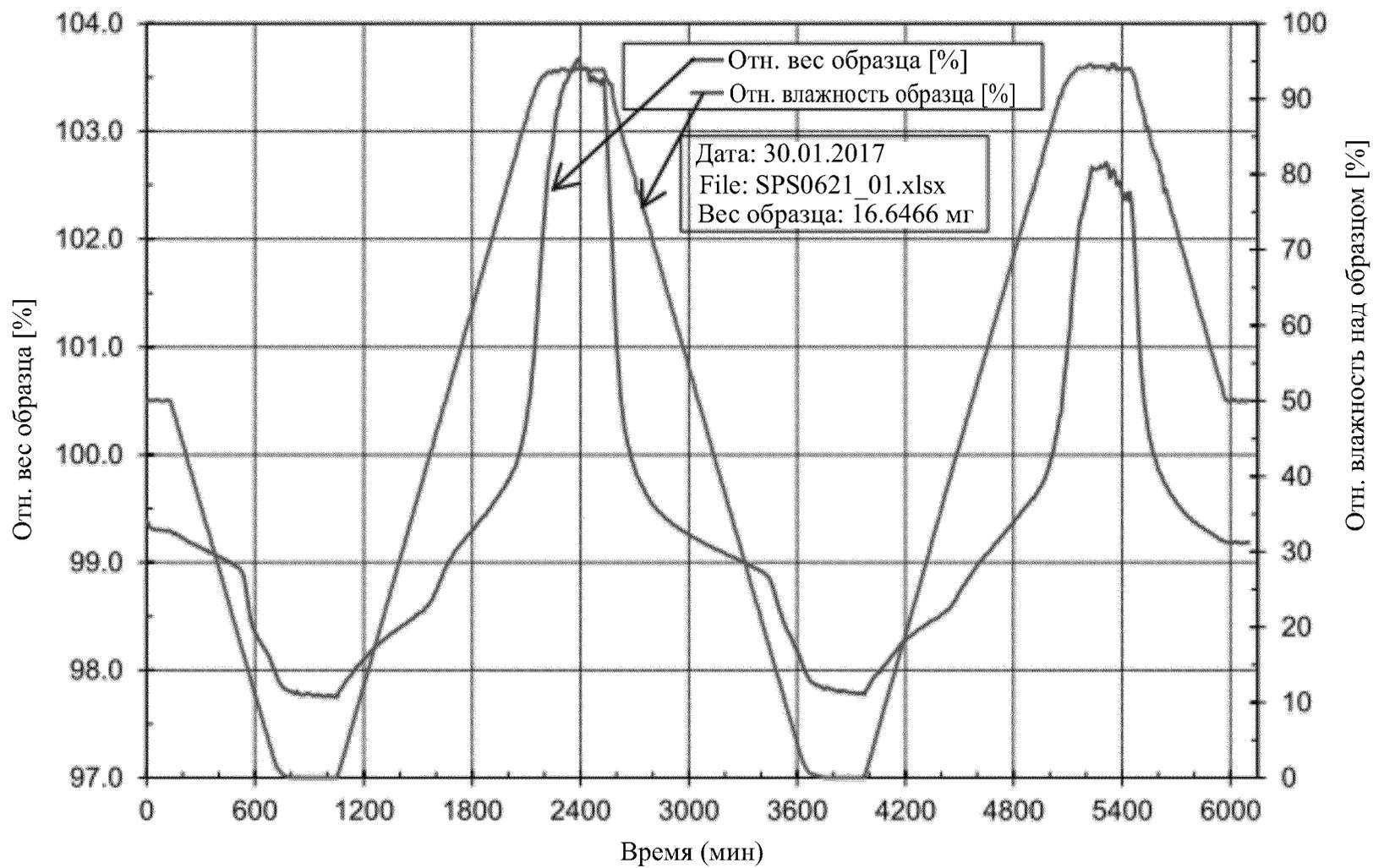
Фиг. 5.30



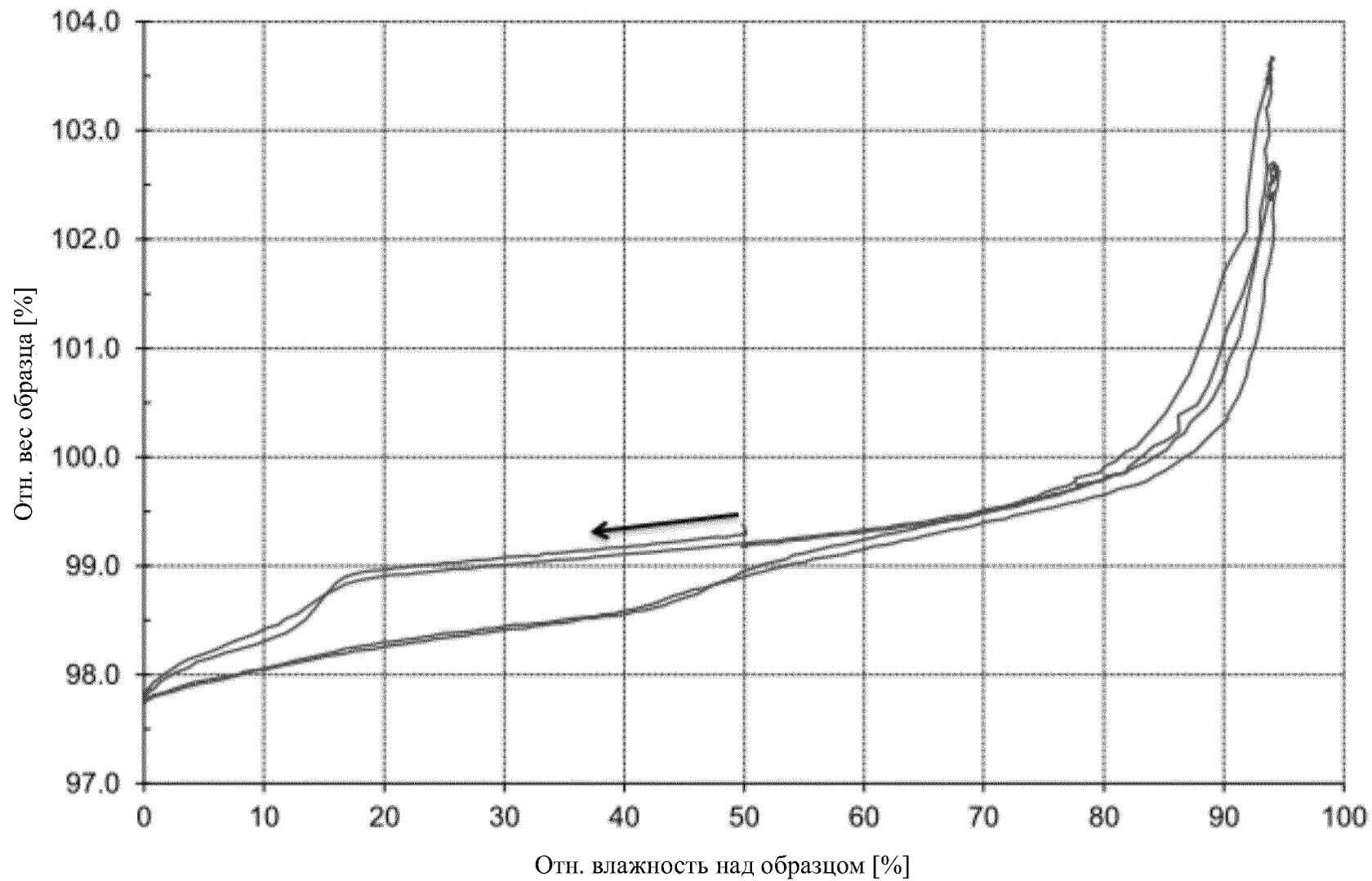
Фиг. 5.31



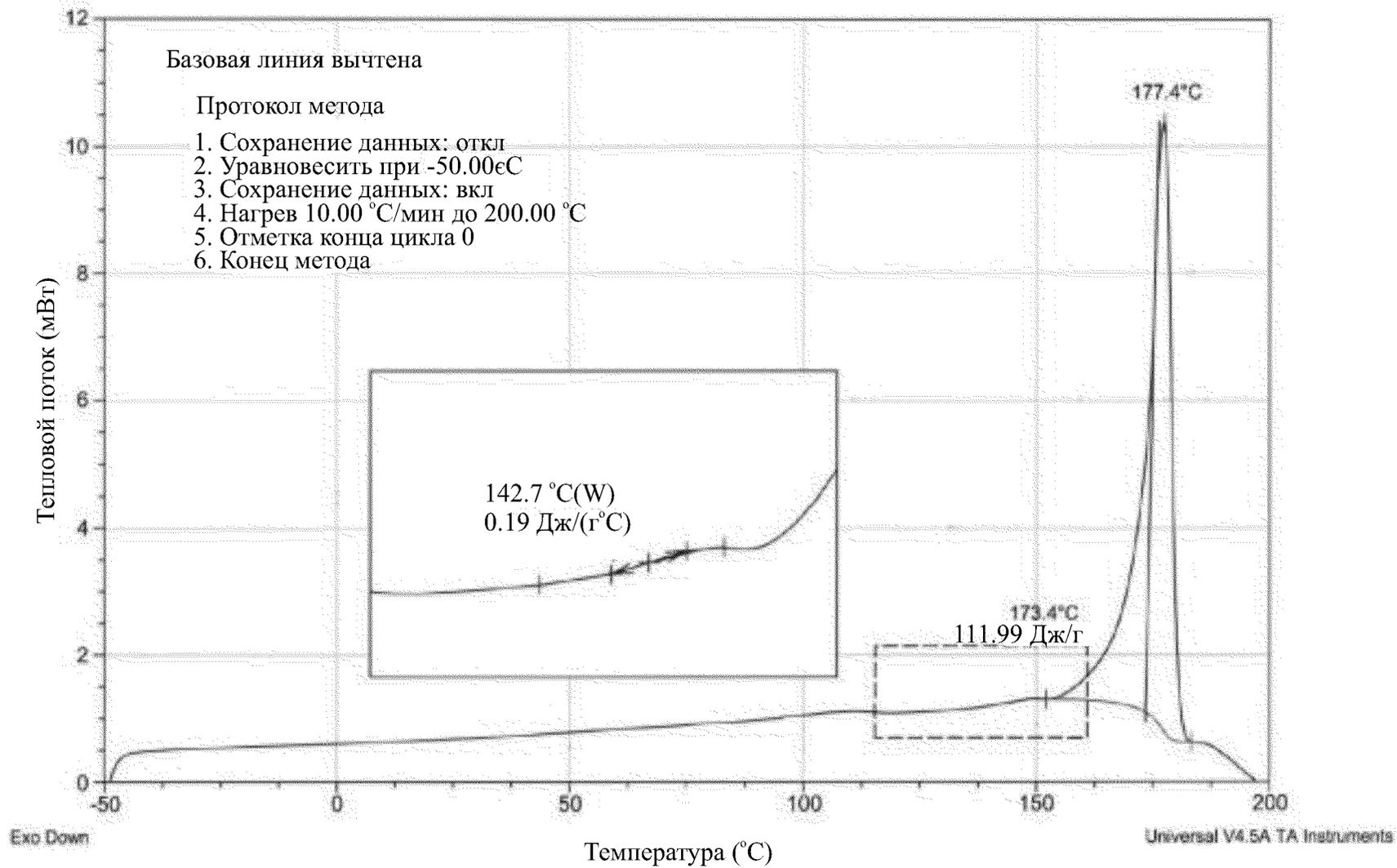
Фиг. 5.32



Фиг. 5.33

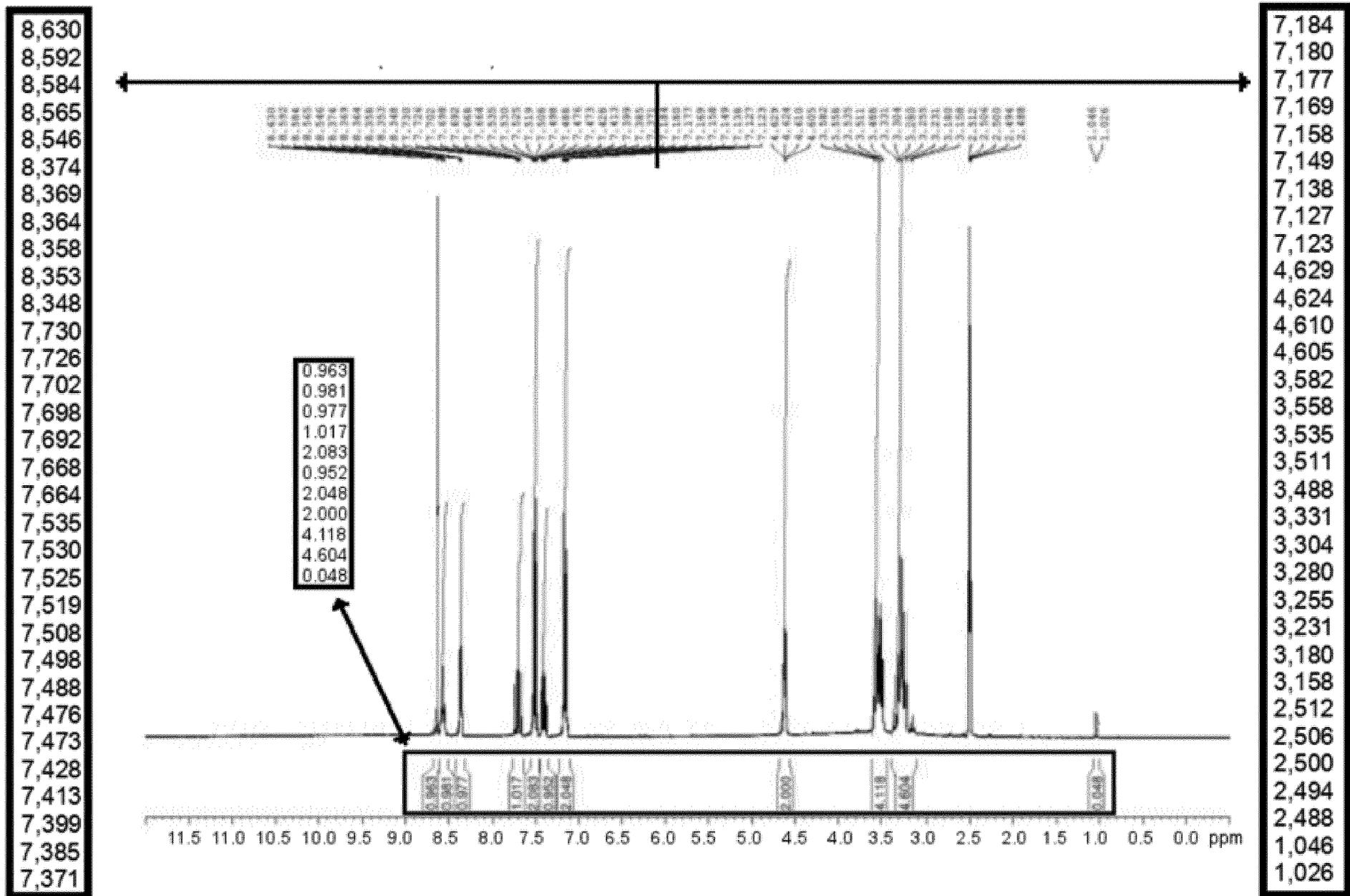


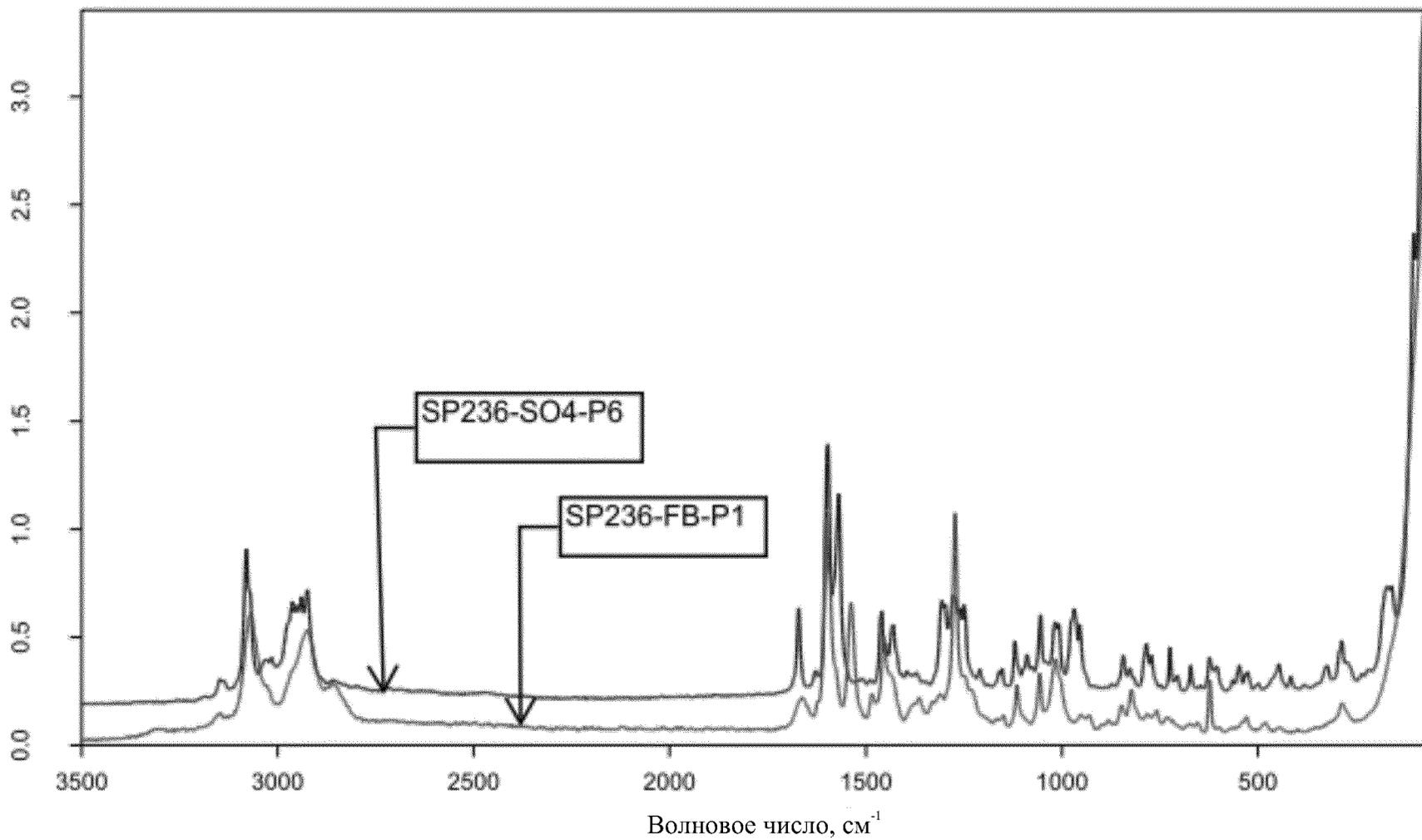
Фиг. 5.34



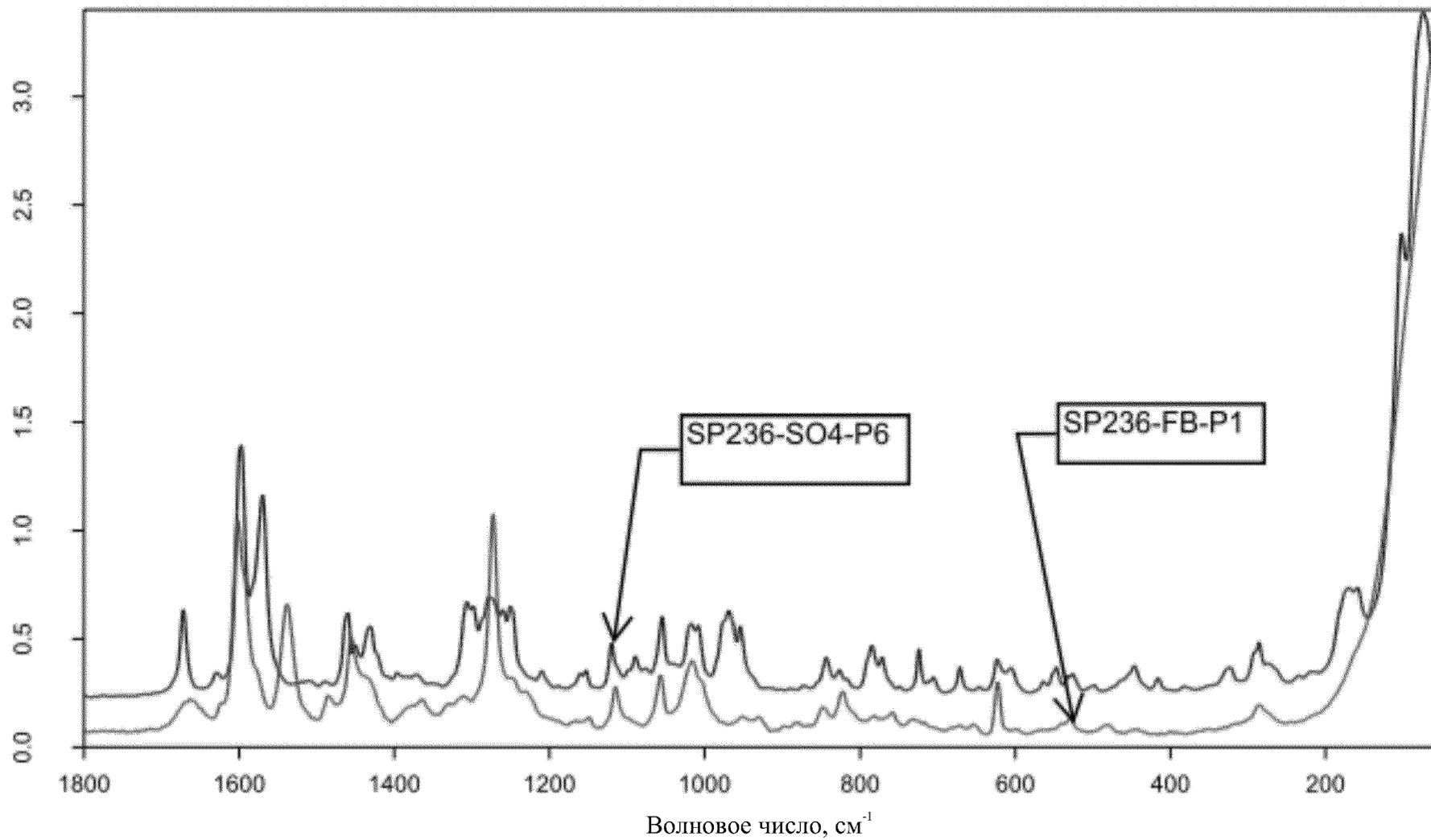
Фиг. 5.35

Фиг. 5.36

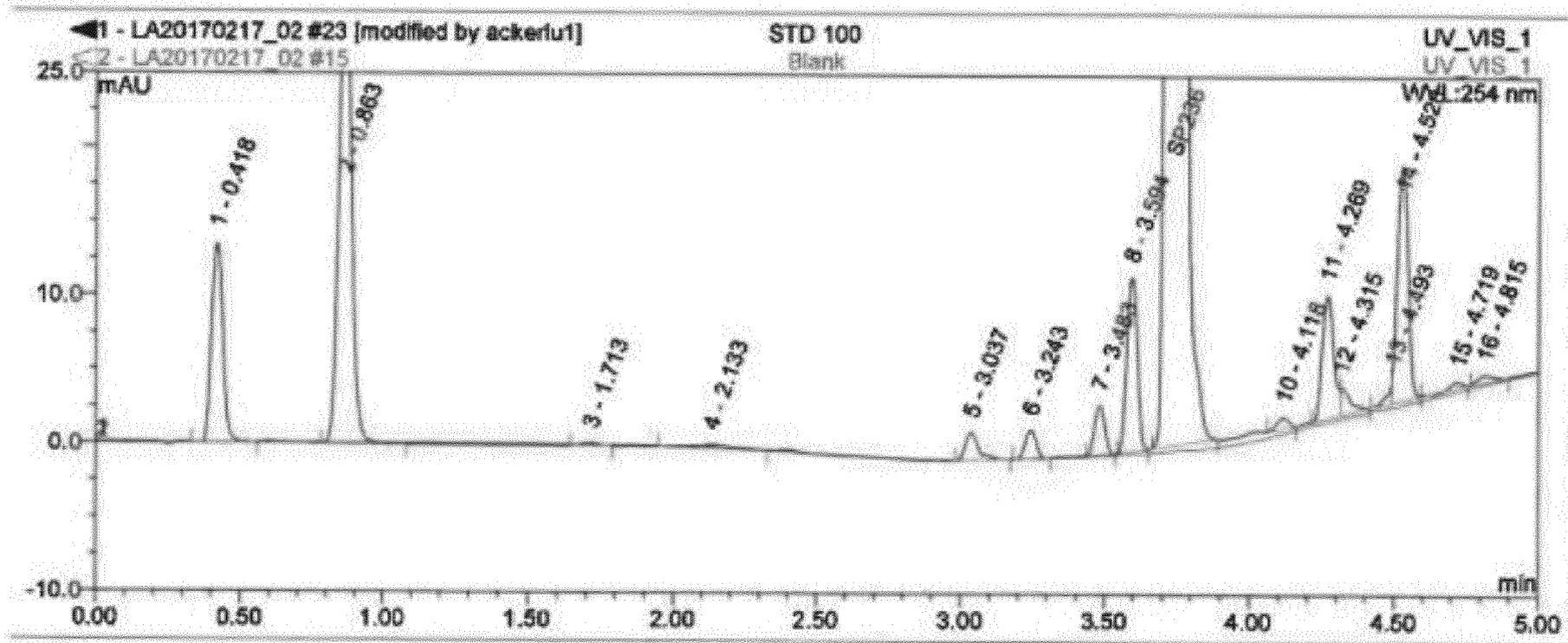




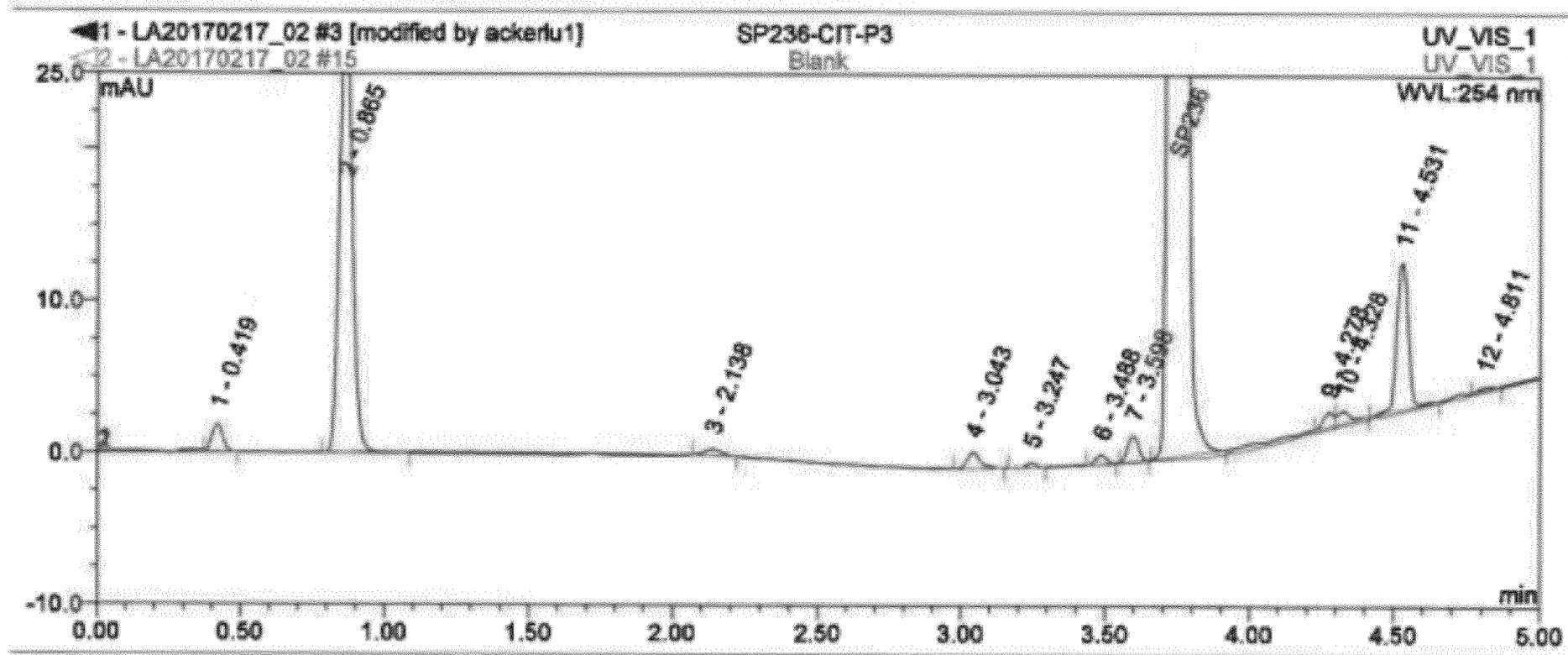
Фиг. 5.37



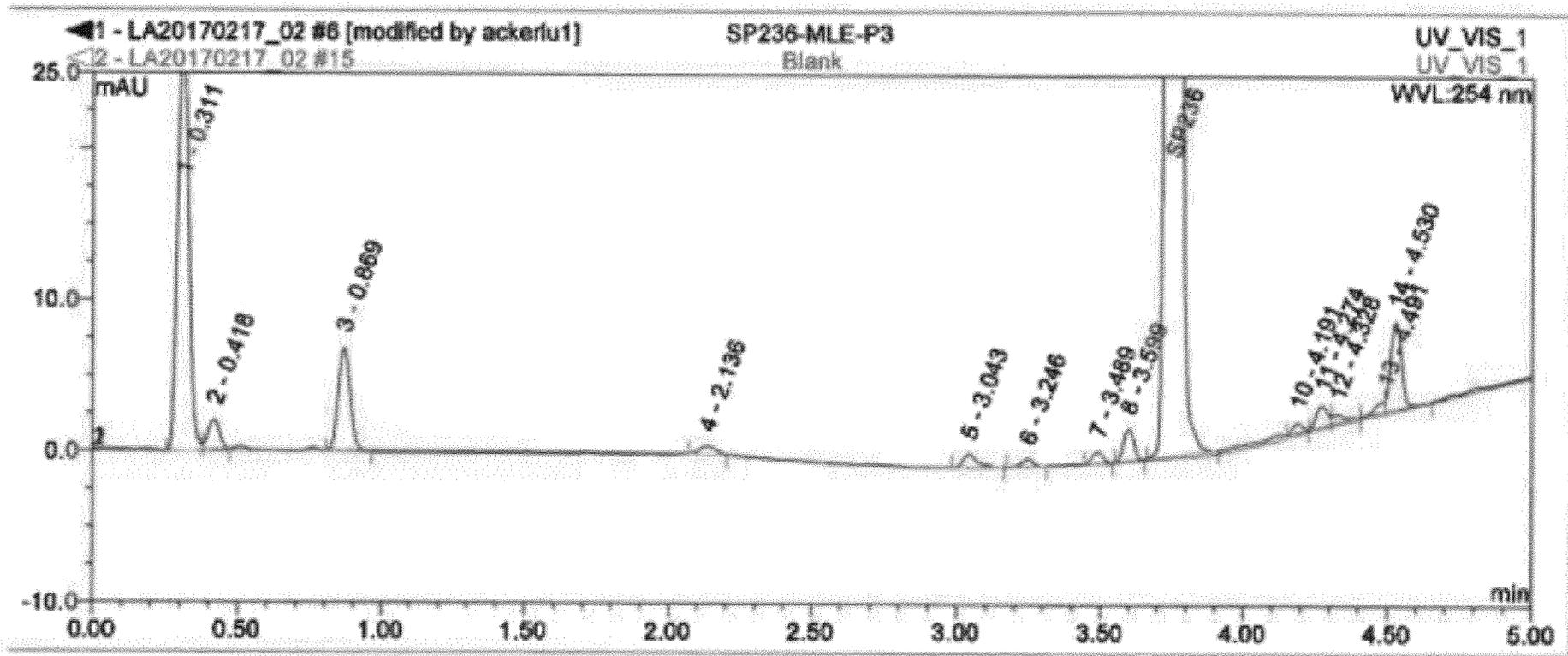
Фиг. 5.38



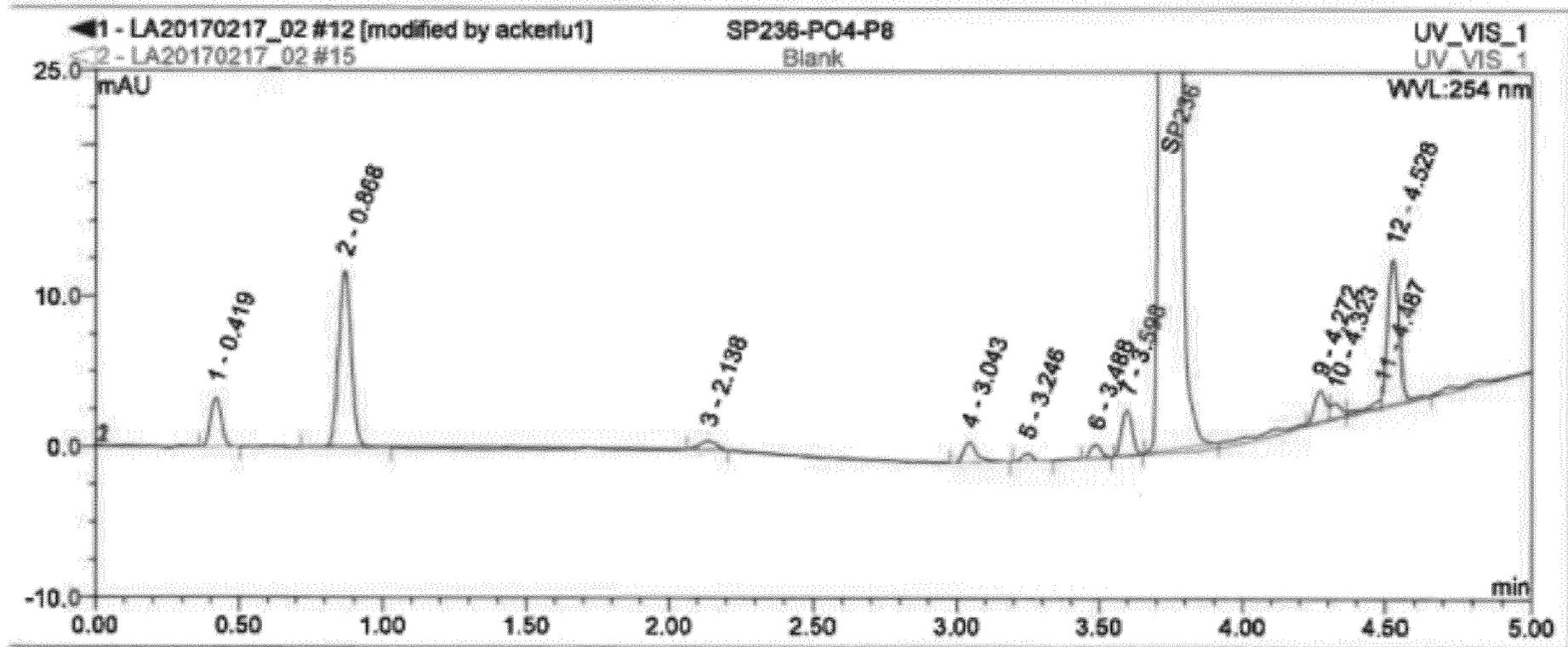
Фиг. 5.39



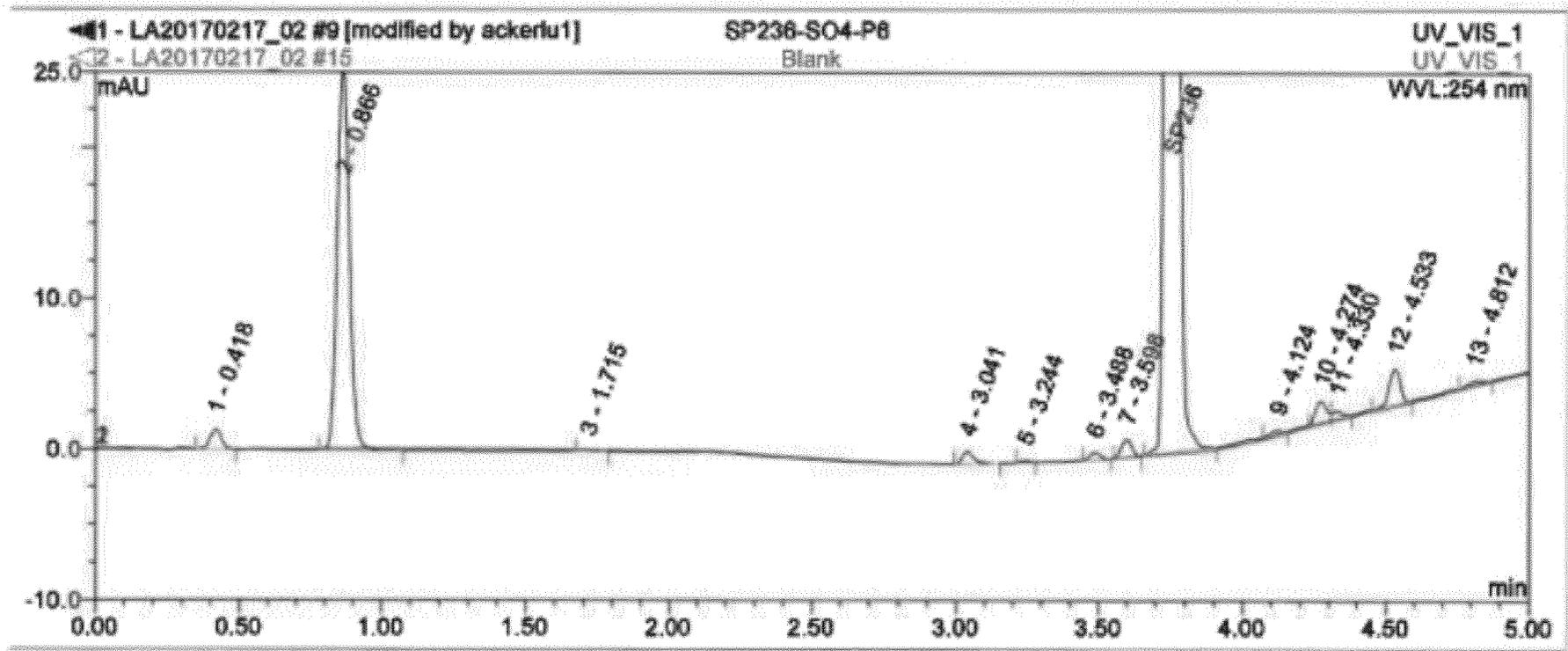
Фиг. 5.40



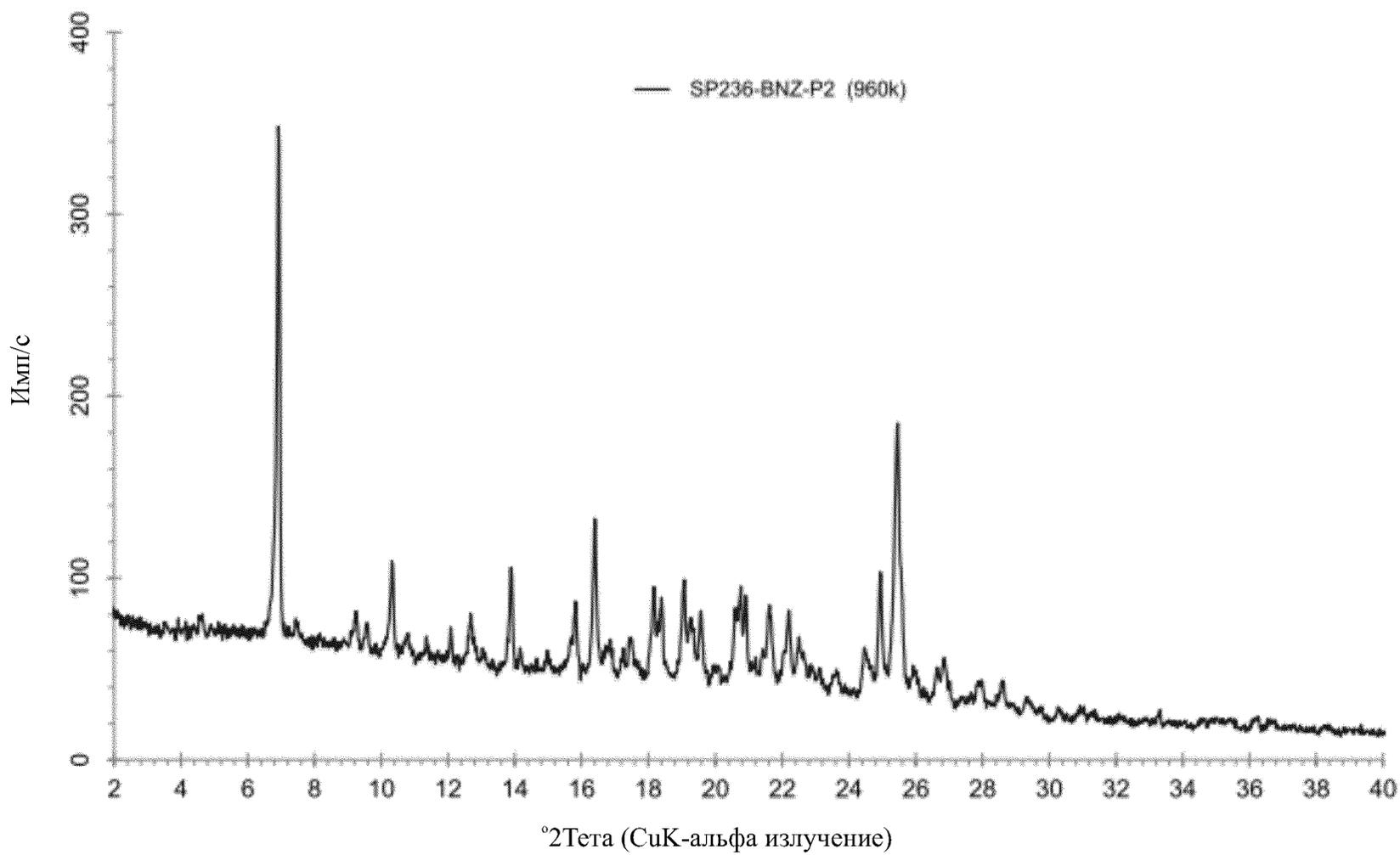
Фиг. 5.41



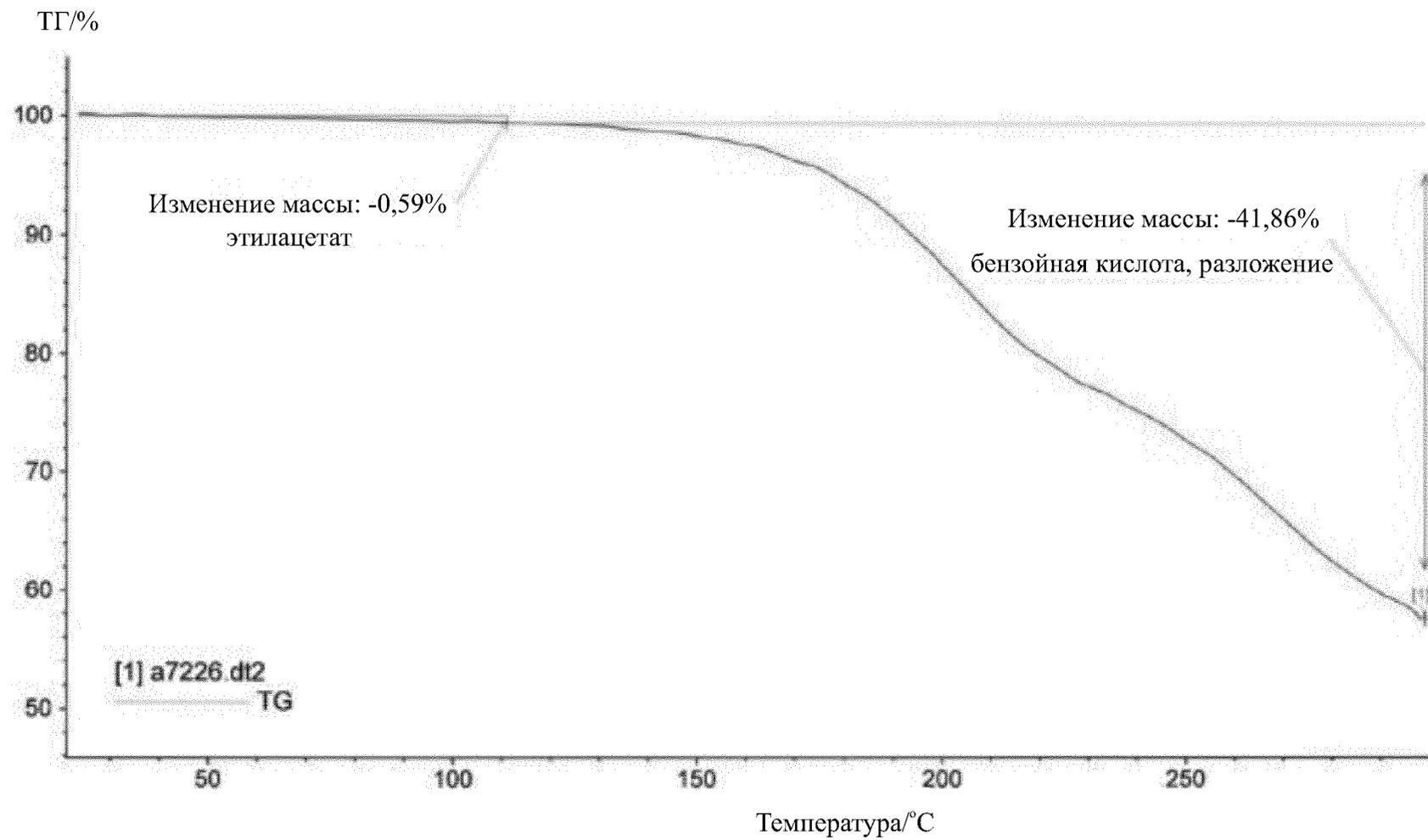
Фиг. 5.42



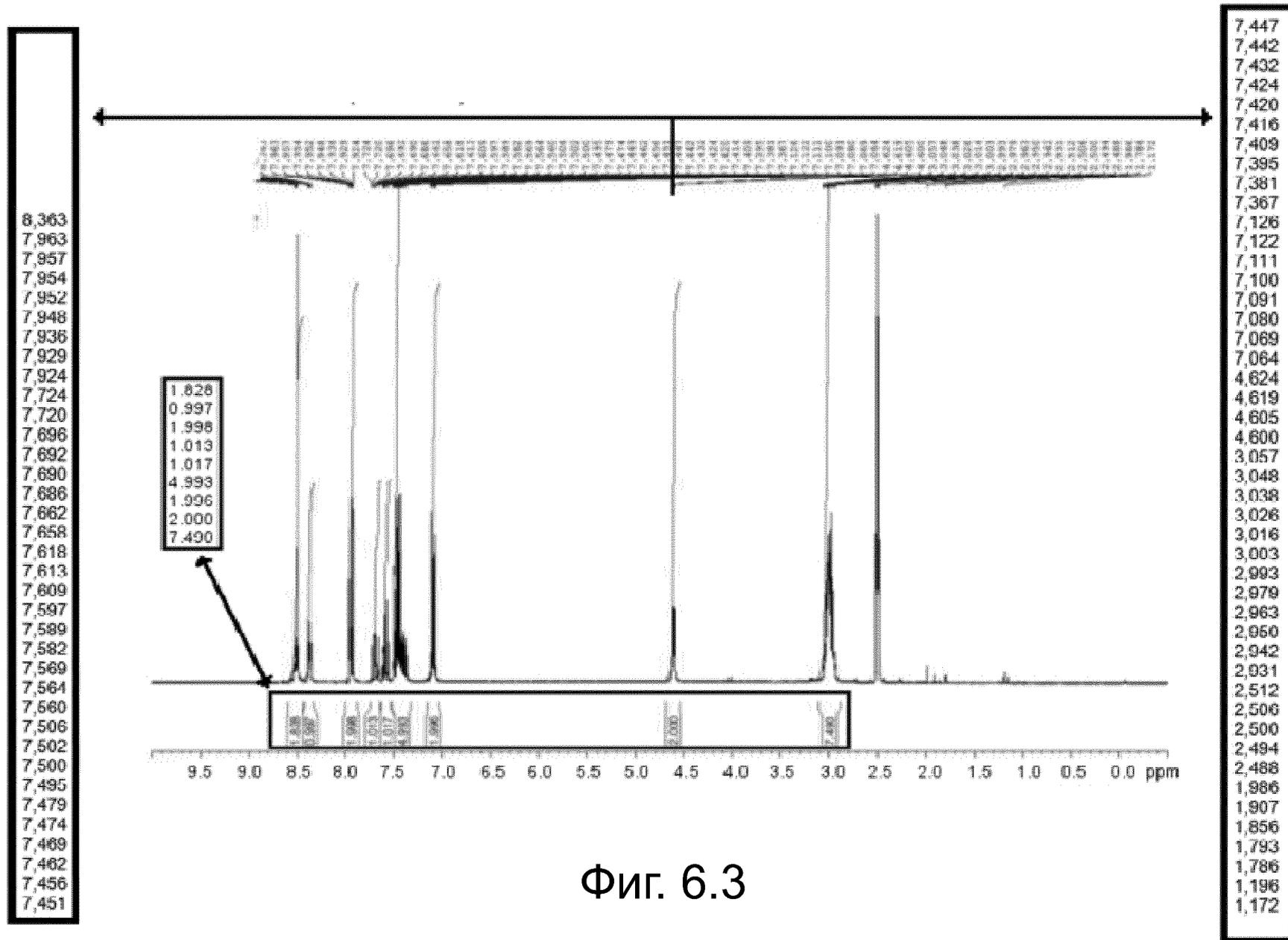
Фиг. 5.43



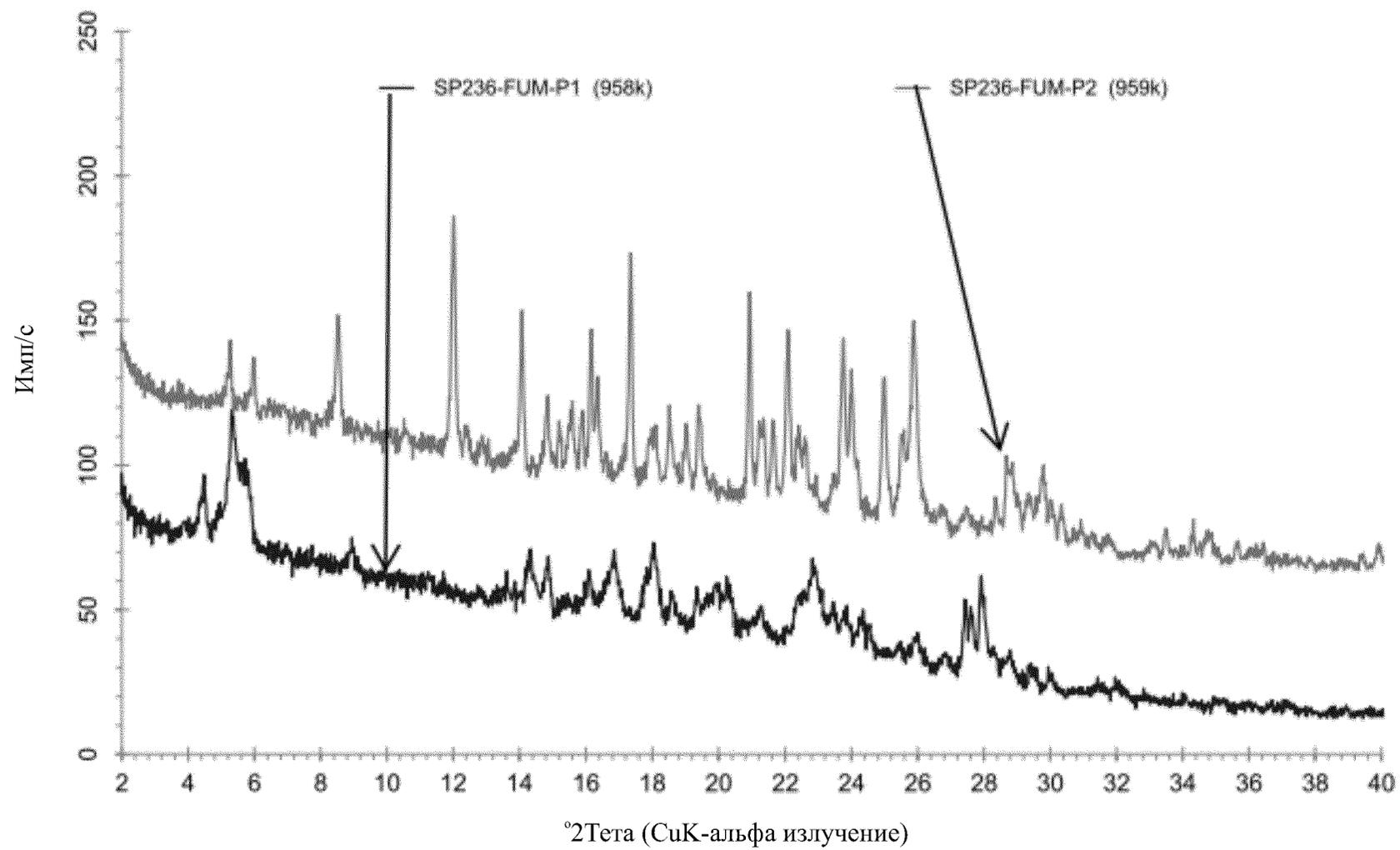
Фиг. 6.1



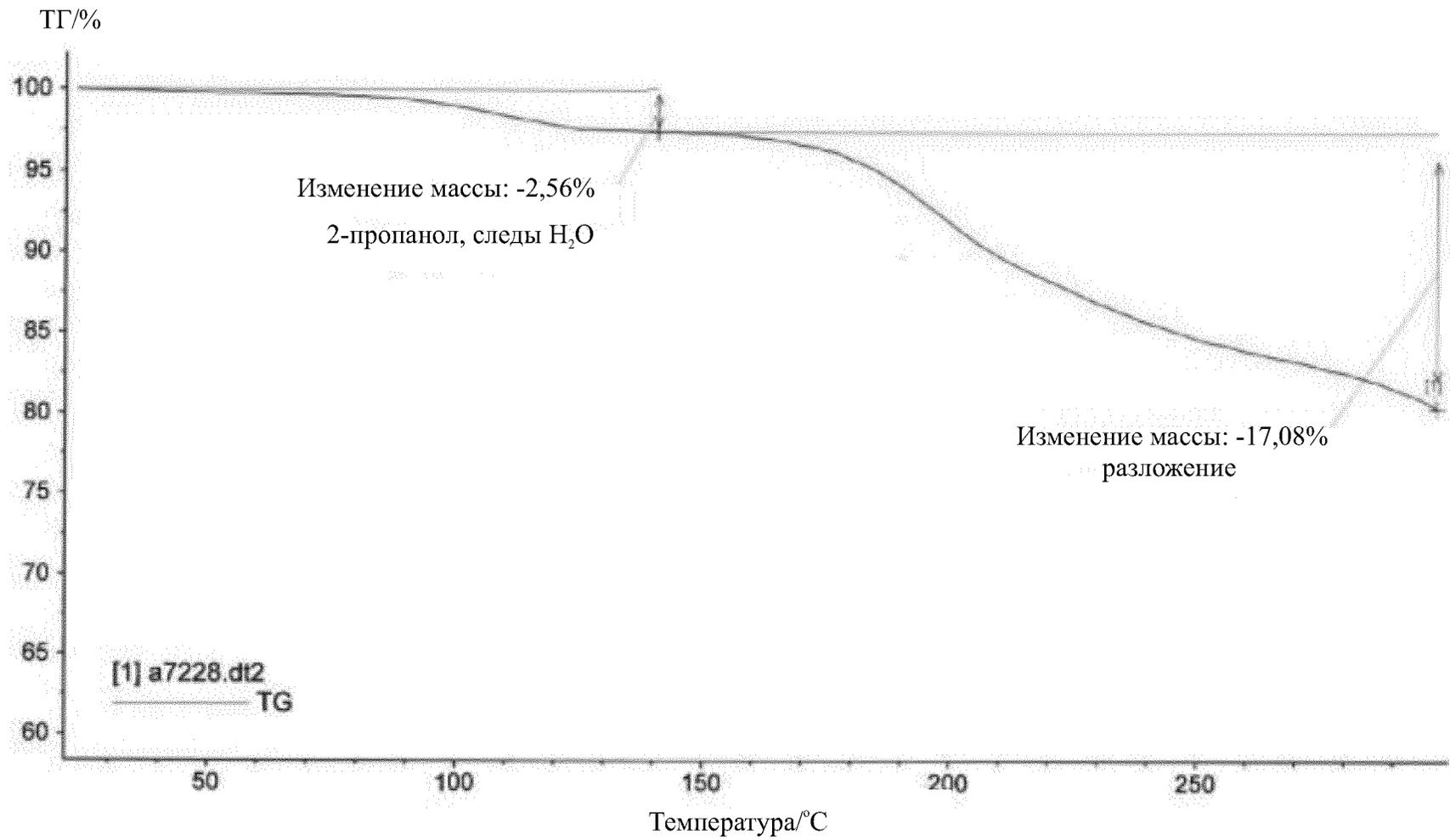
Фиг. 6.2



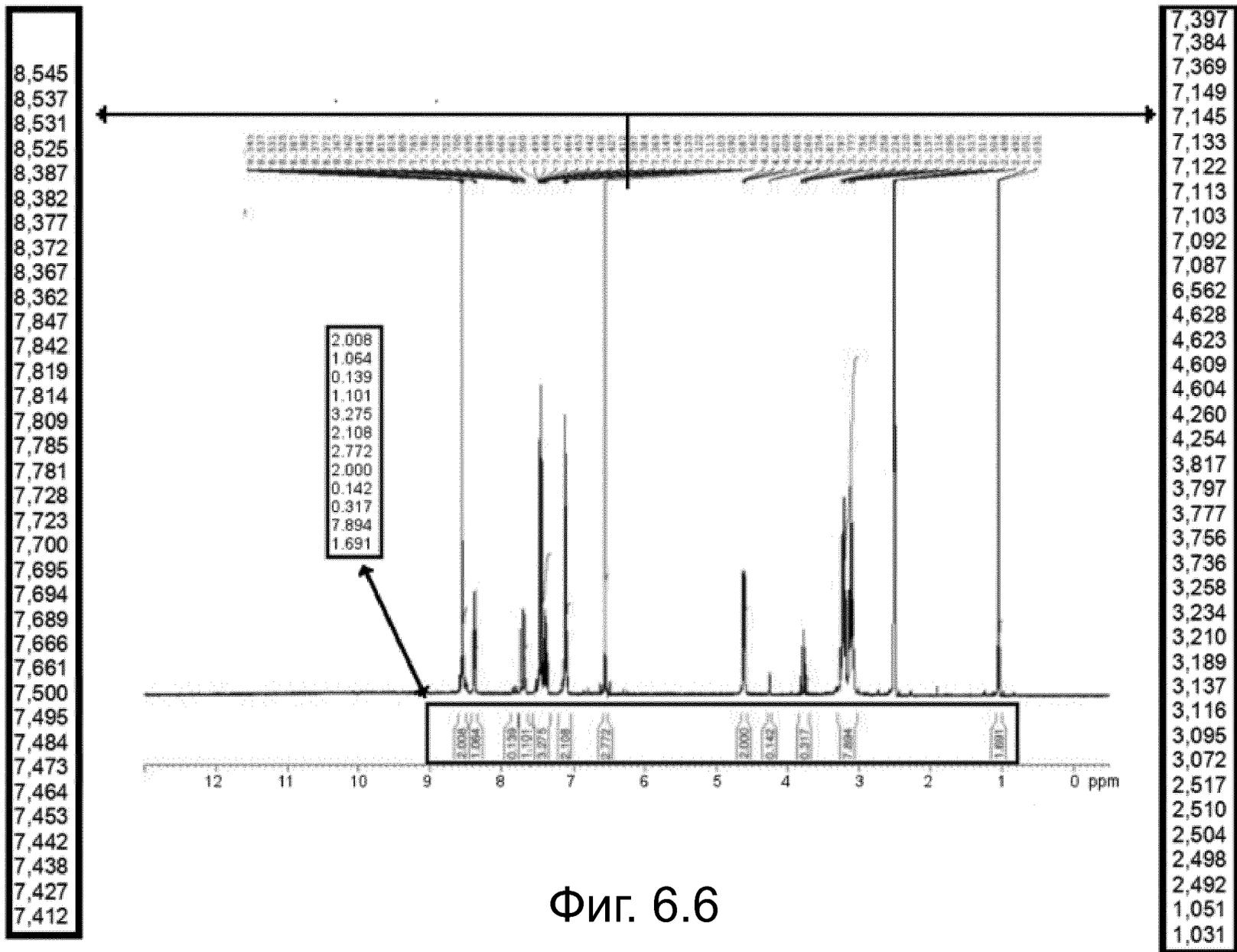
Фиг. 6.3



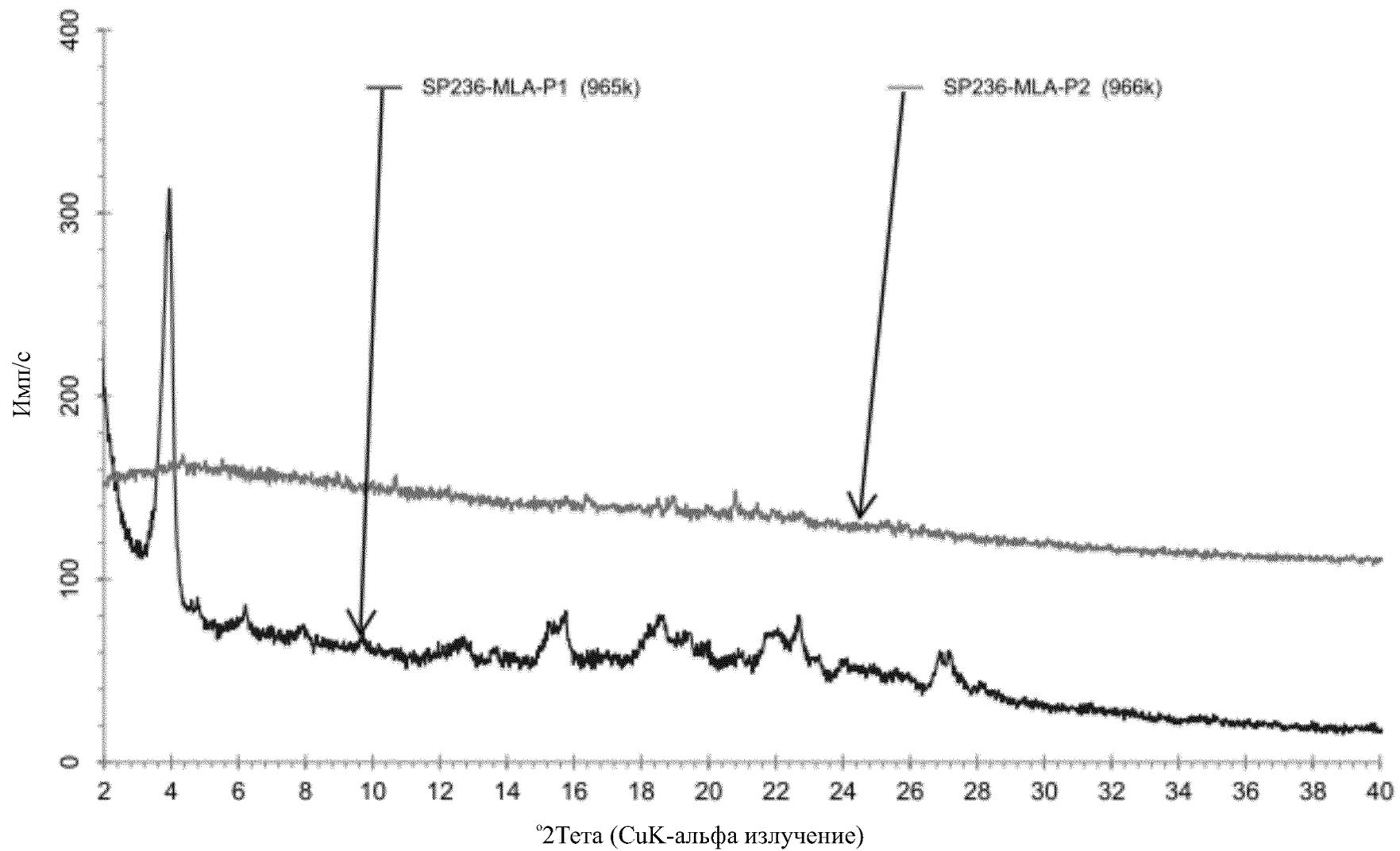
Фиг. 6.4



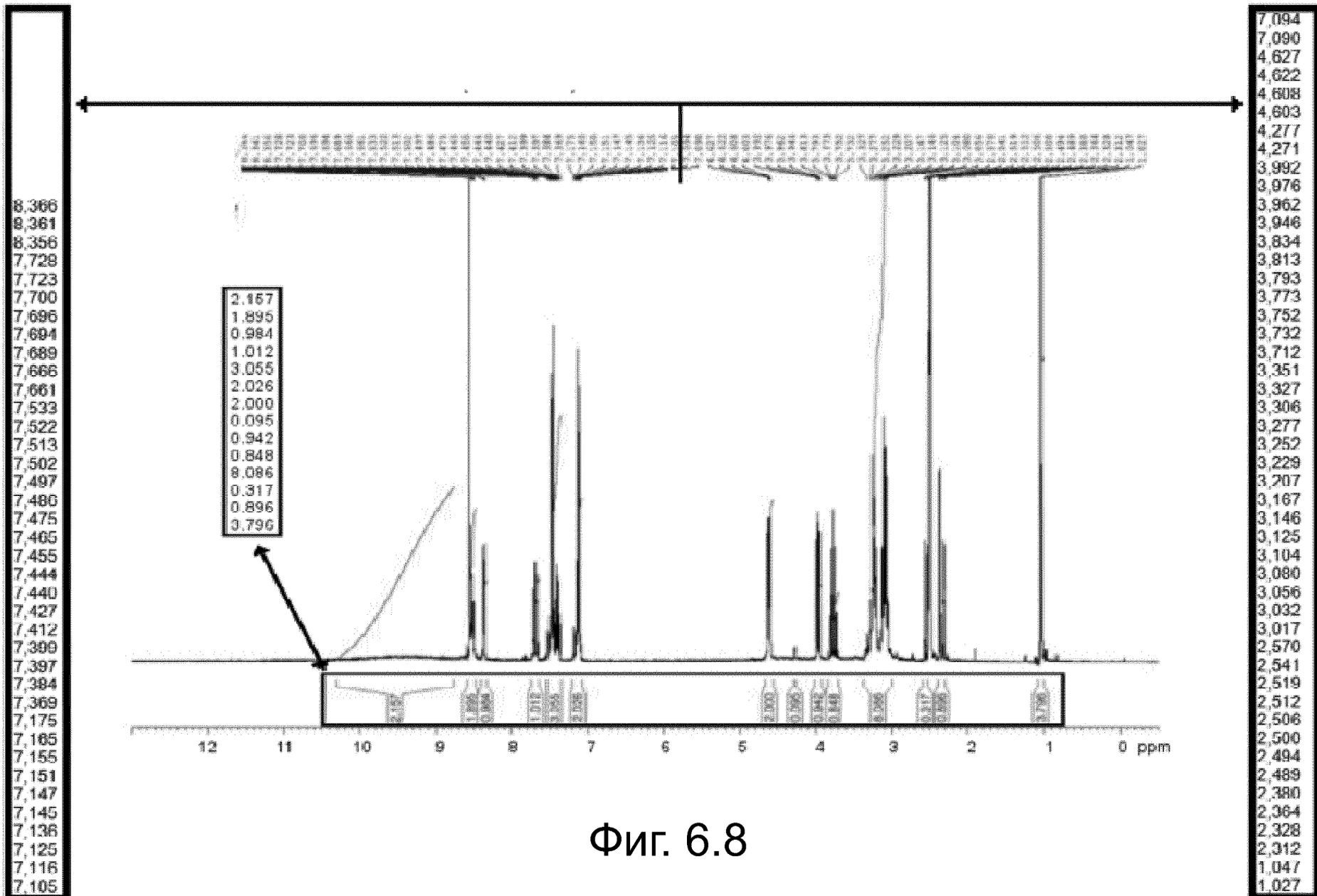
Фиг. 6.5

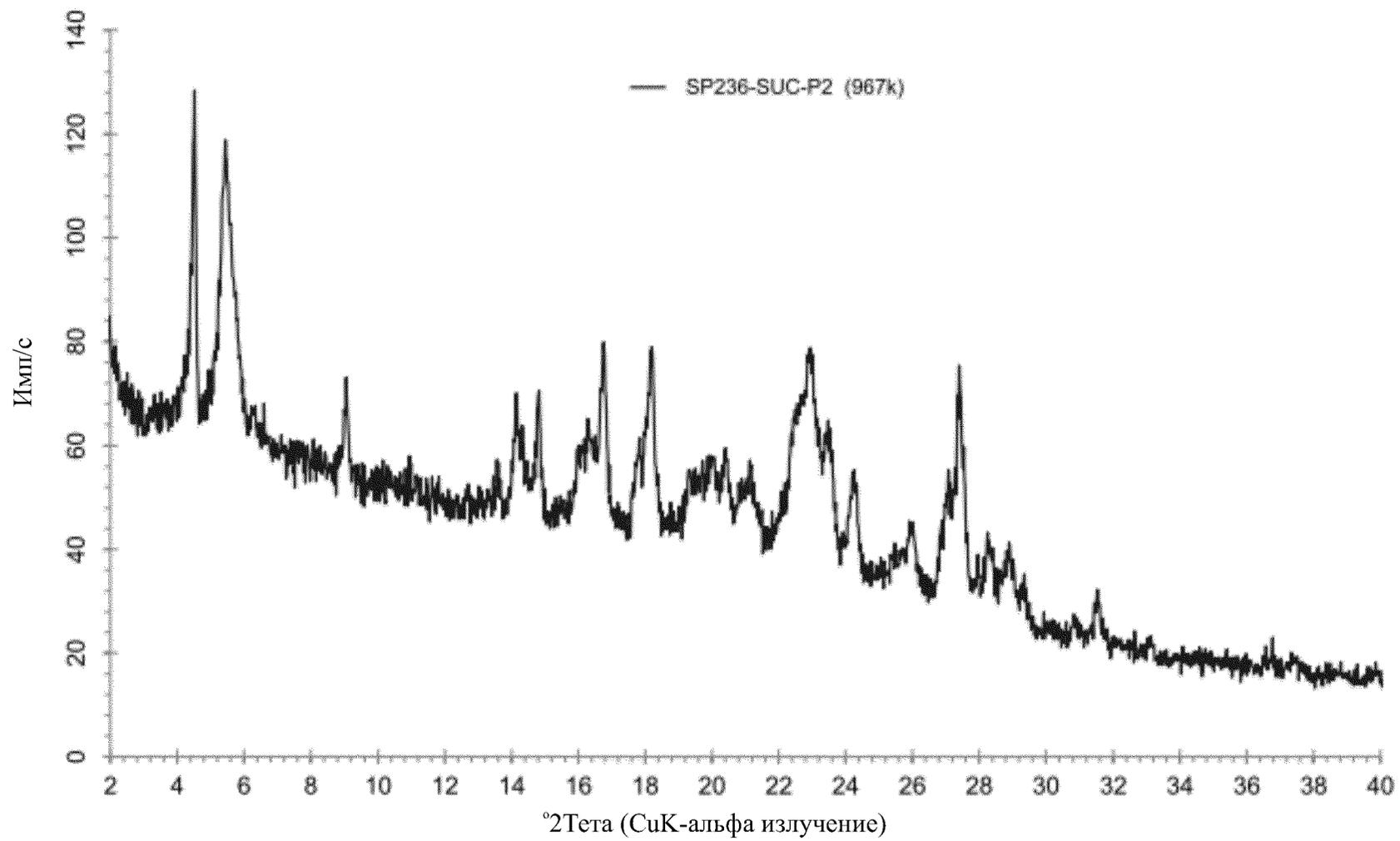


Фиг. 6.6

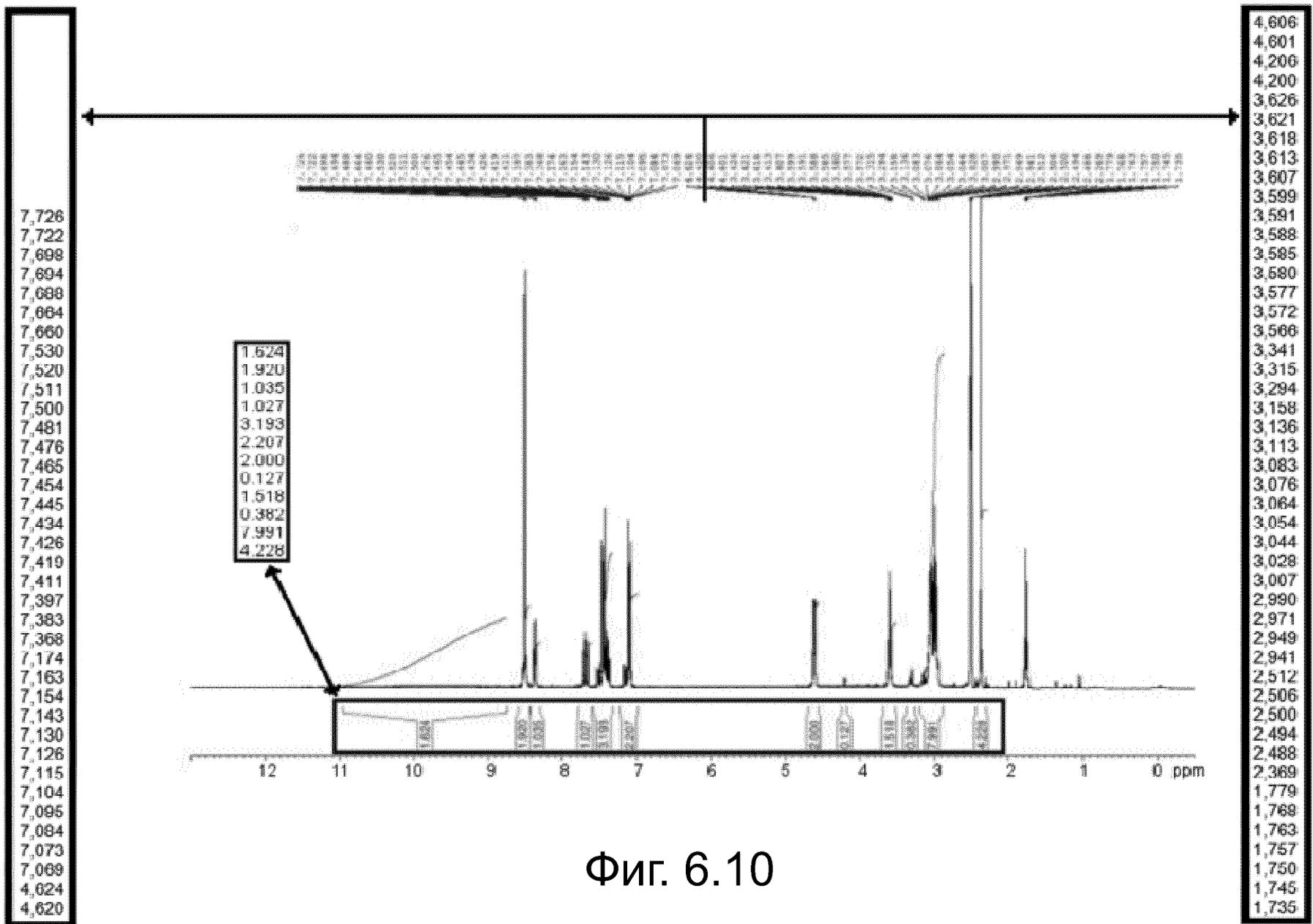


Фиг. 6.7

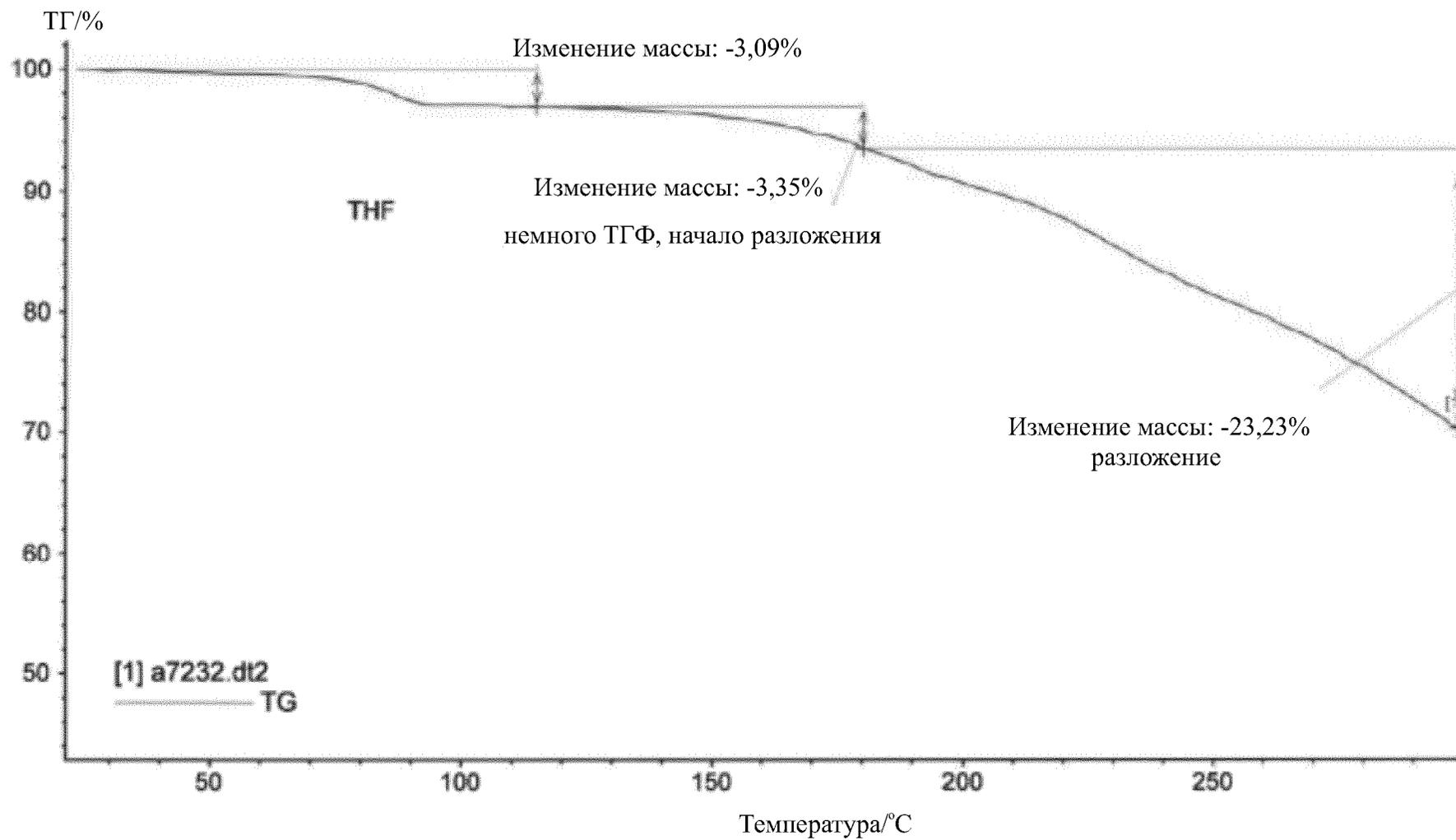




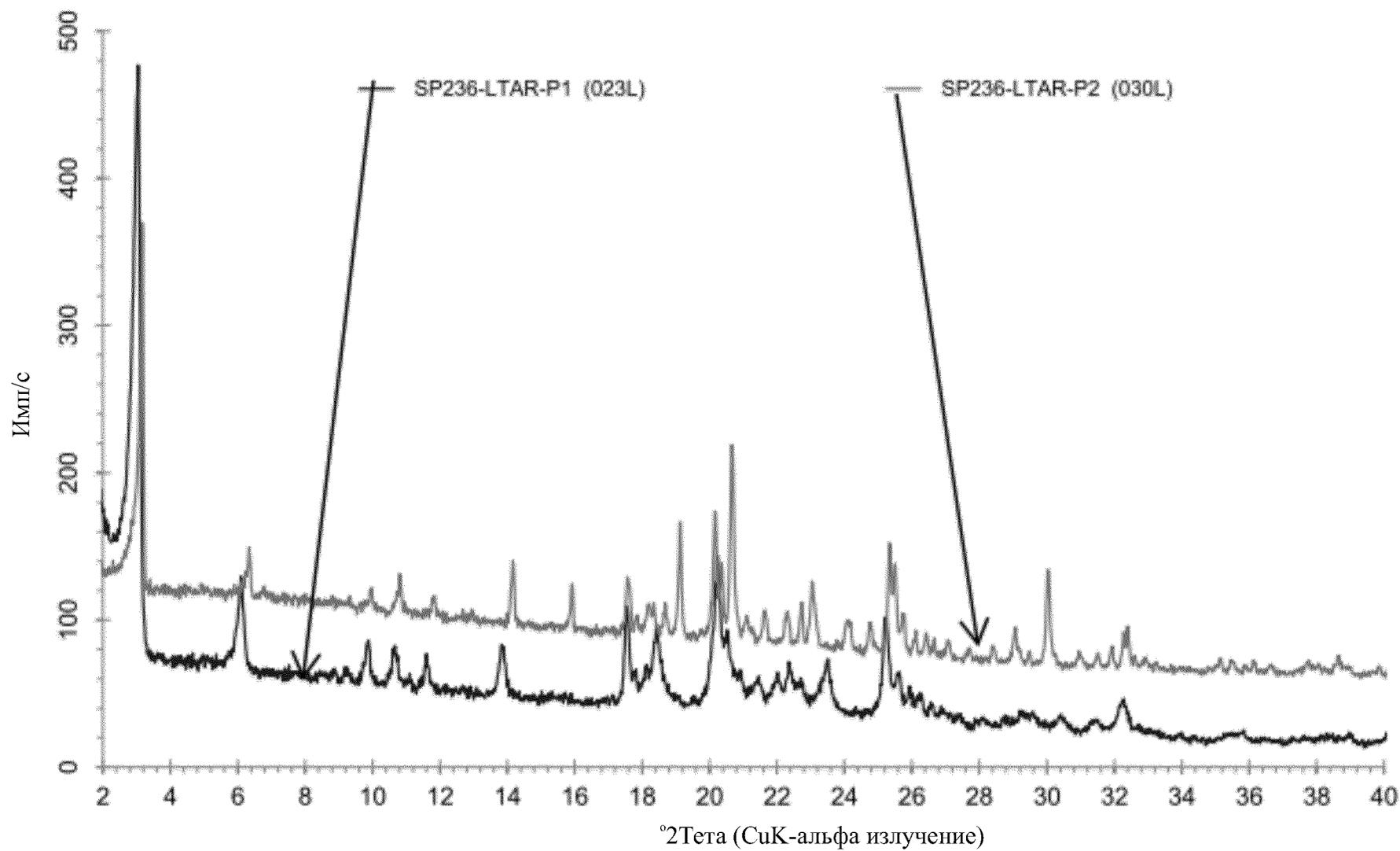
Фиг. 6.9



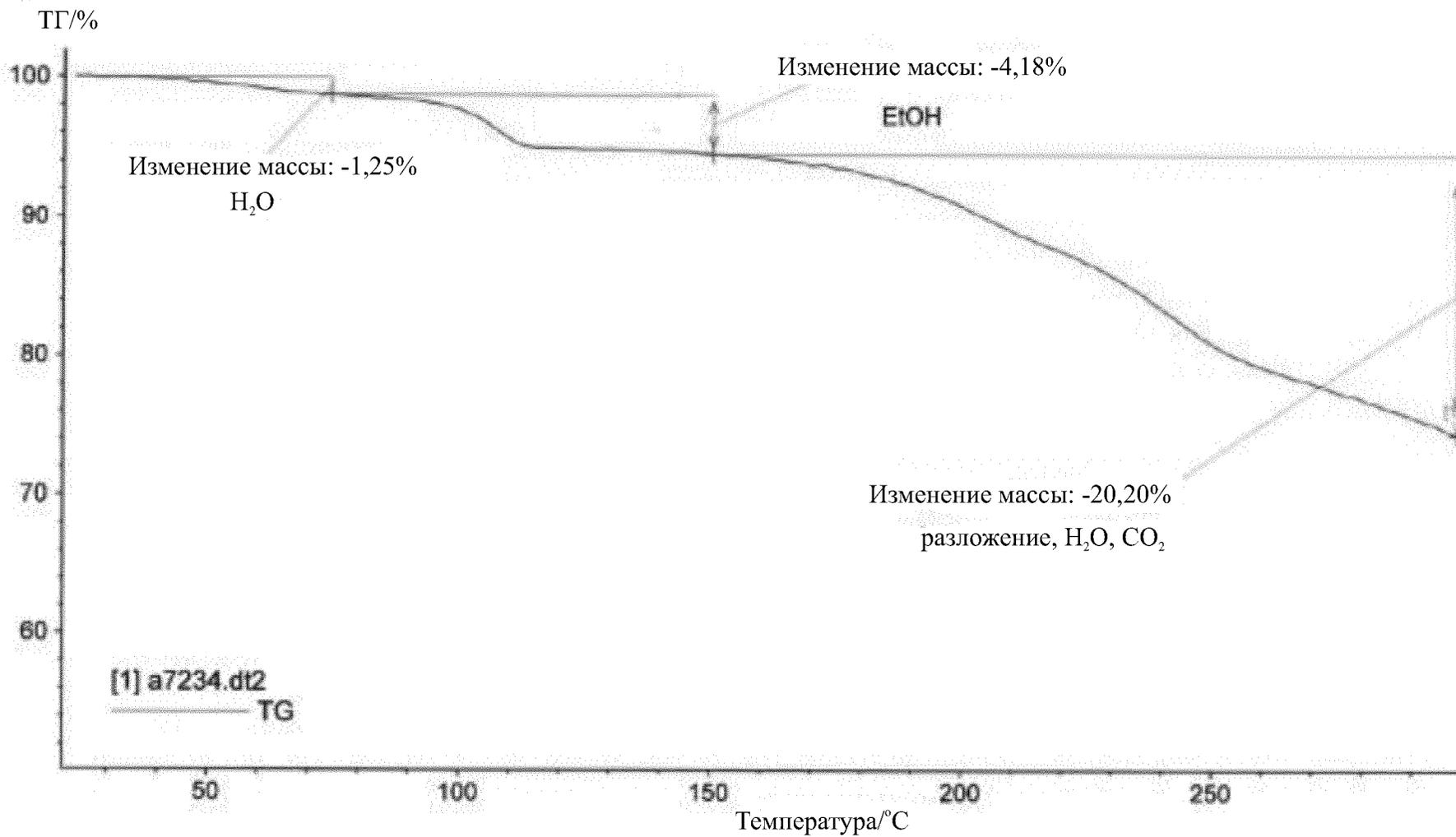
Фиг. 6.10



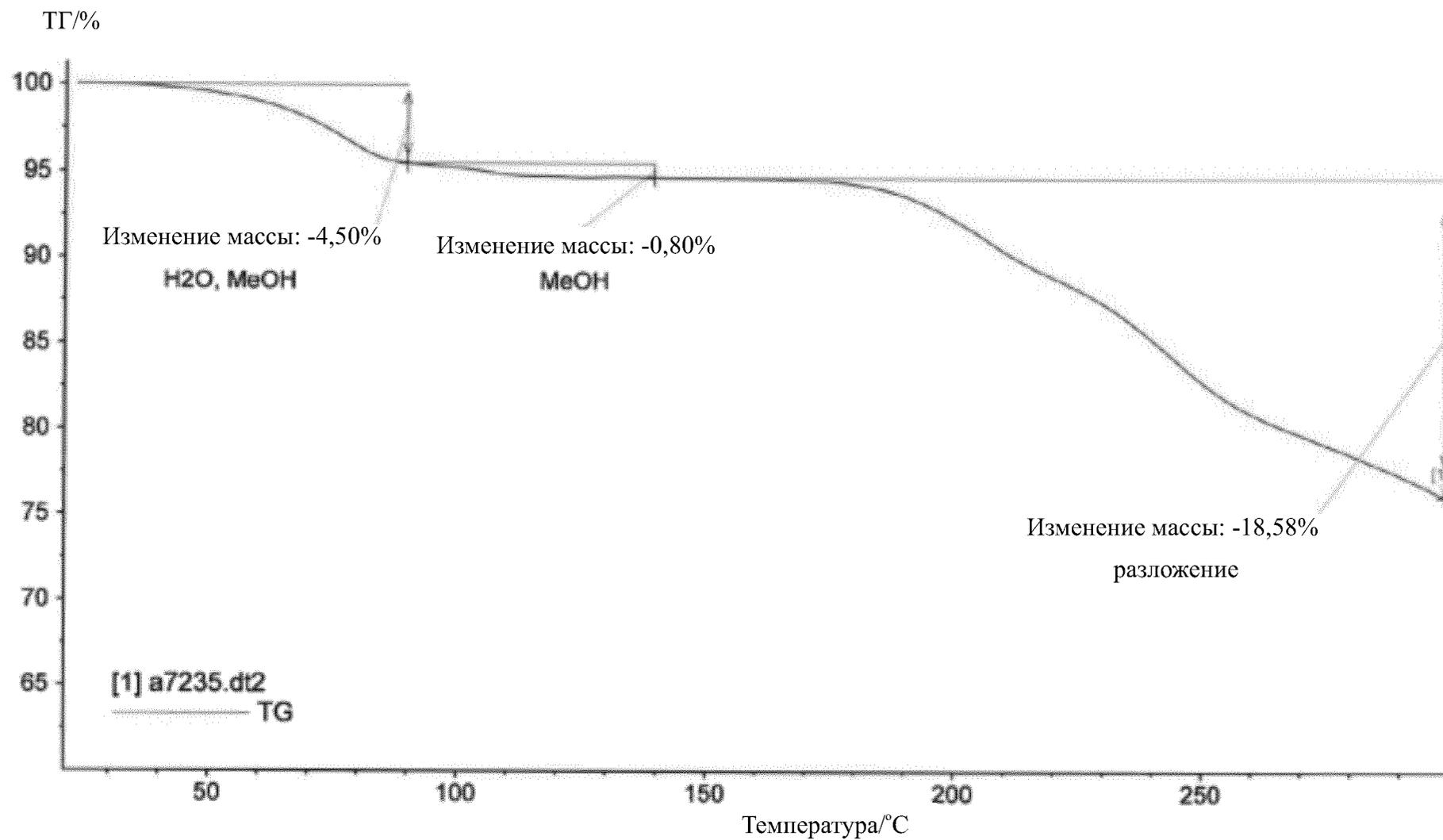
Фиг. 6.11



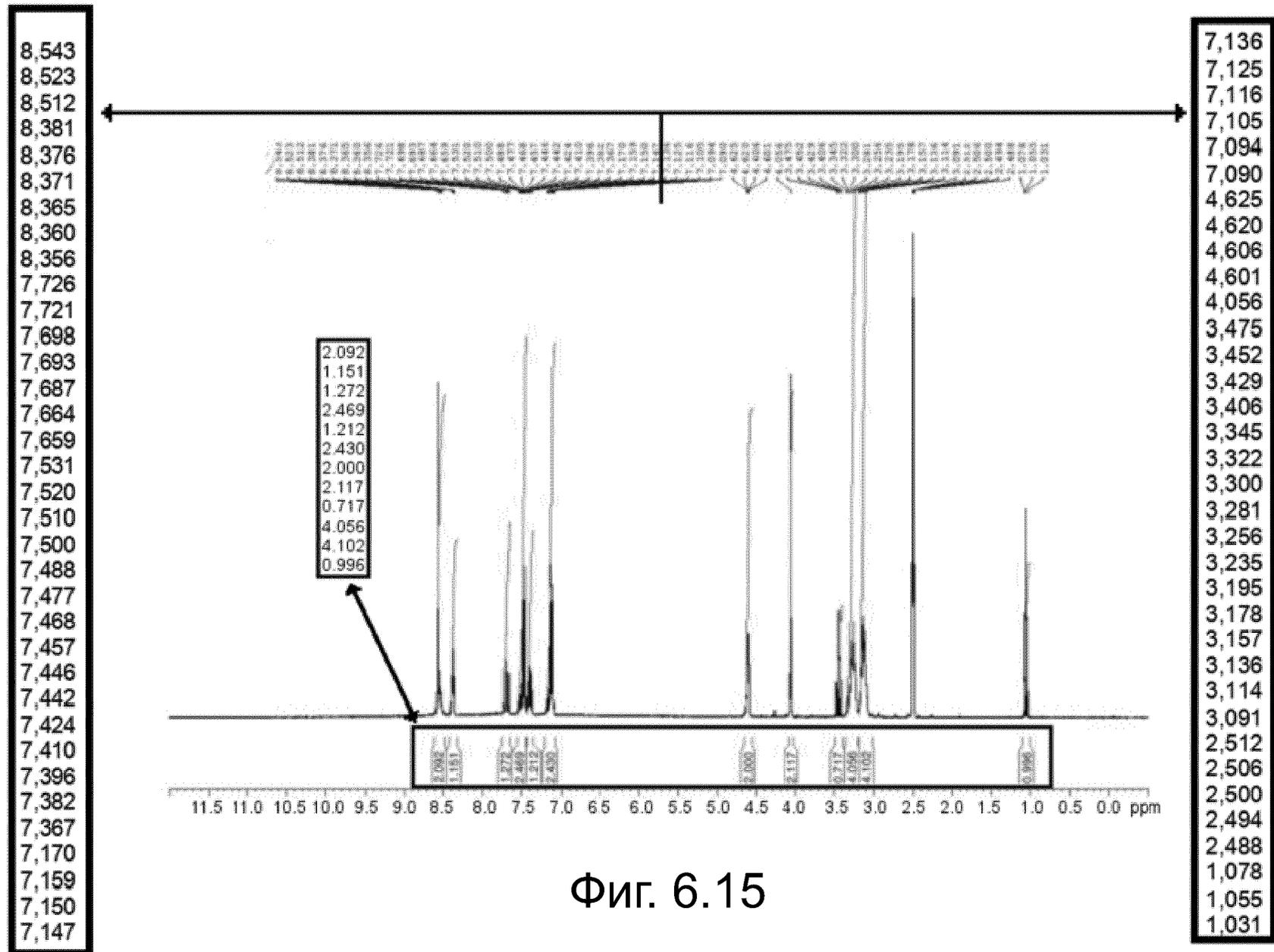
Фиг. 6.12



Фиг. 6.13

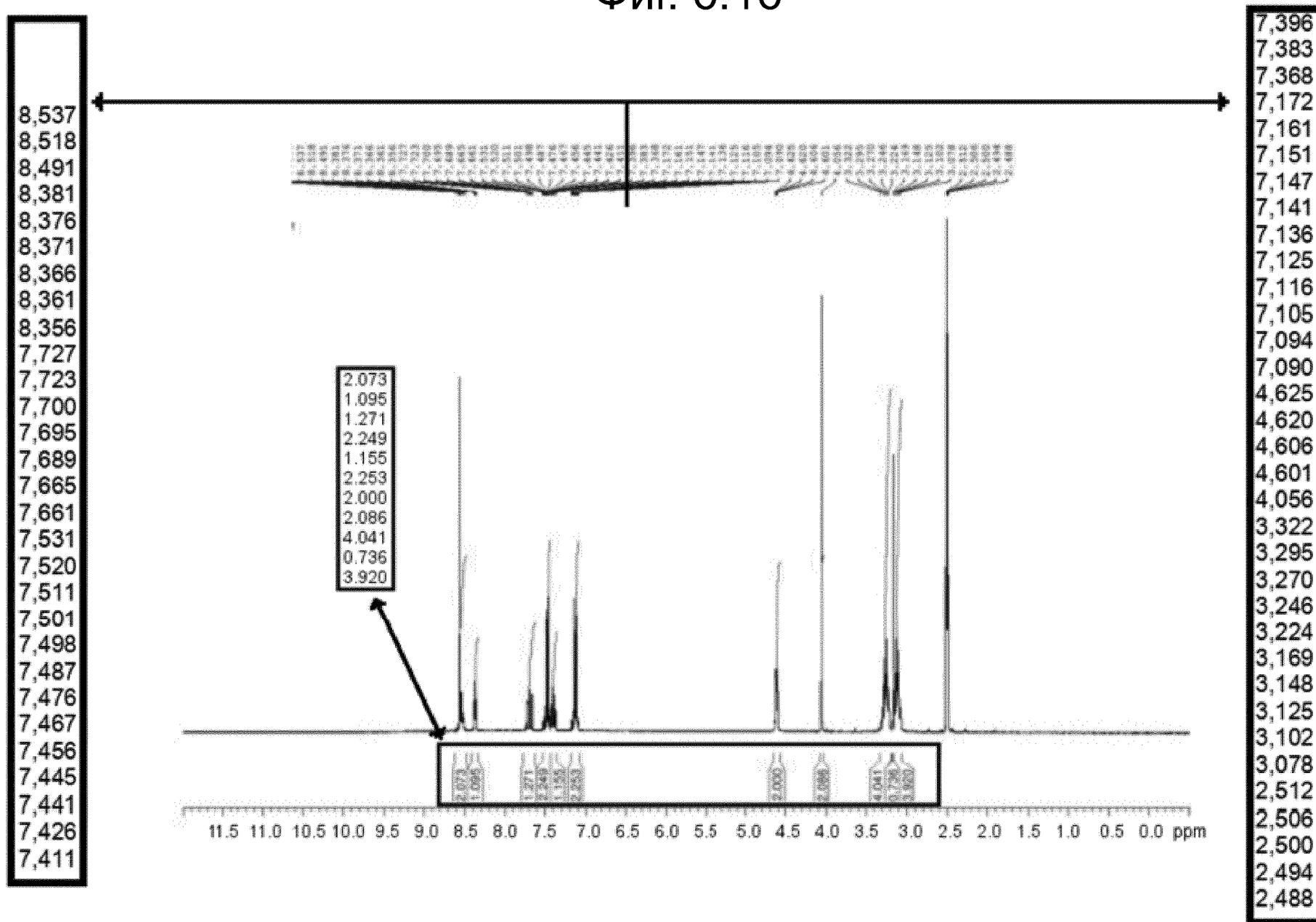


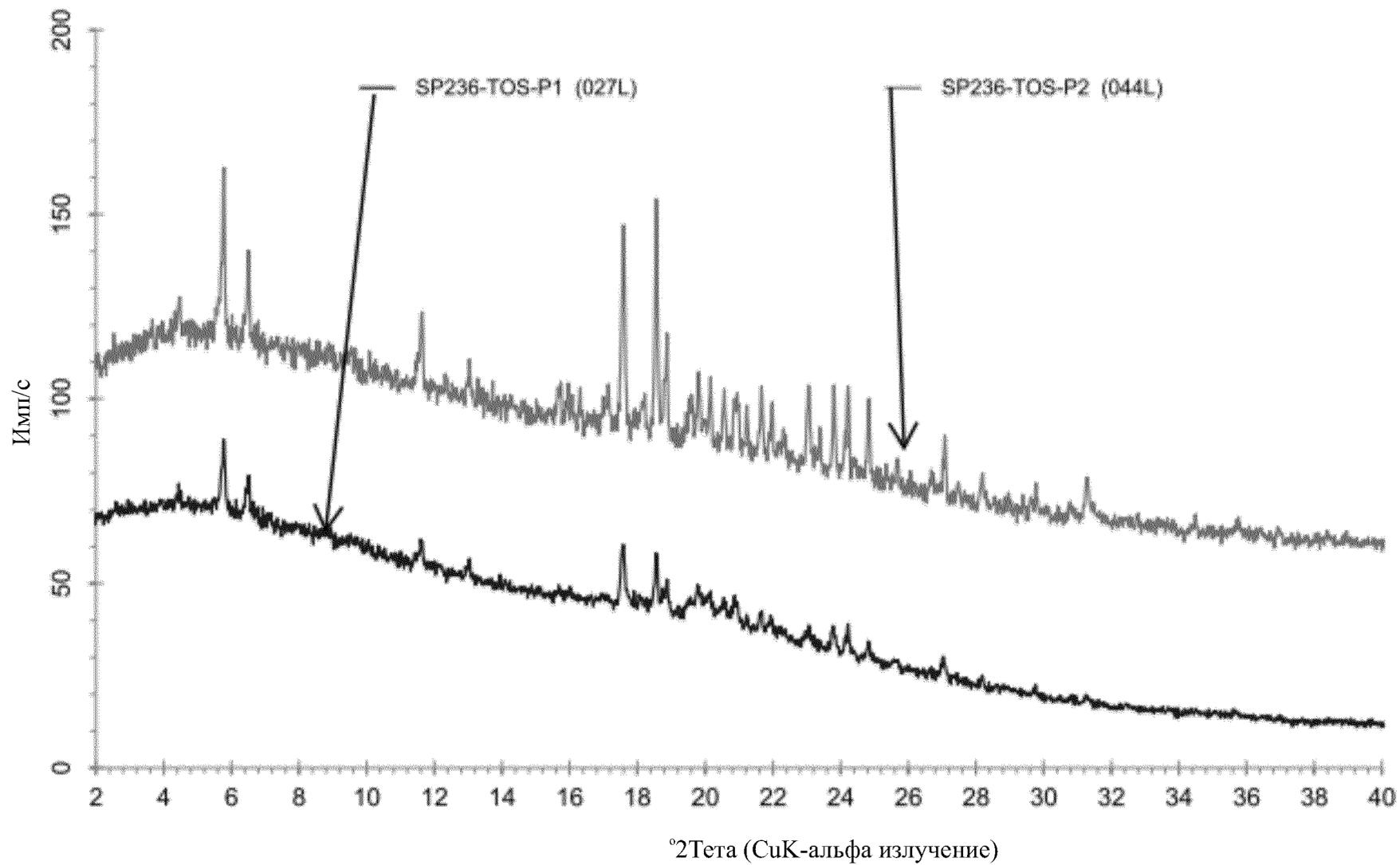
Фиг. 6.14



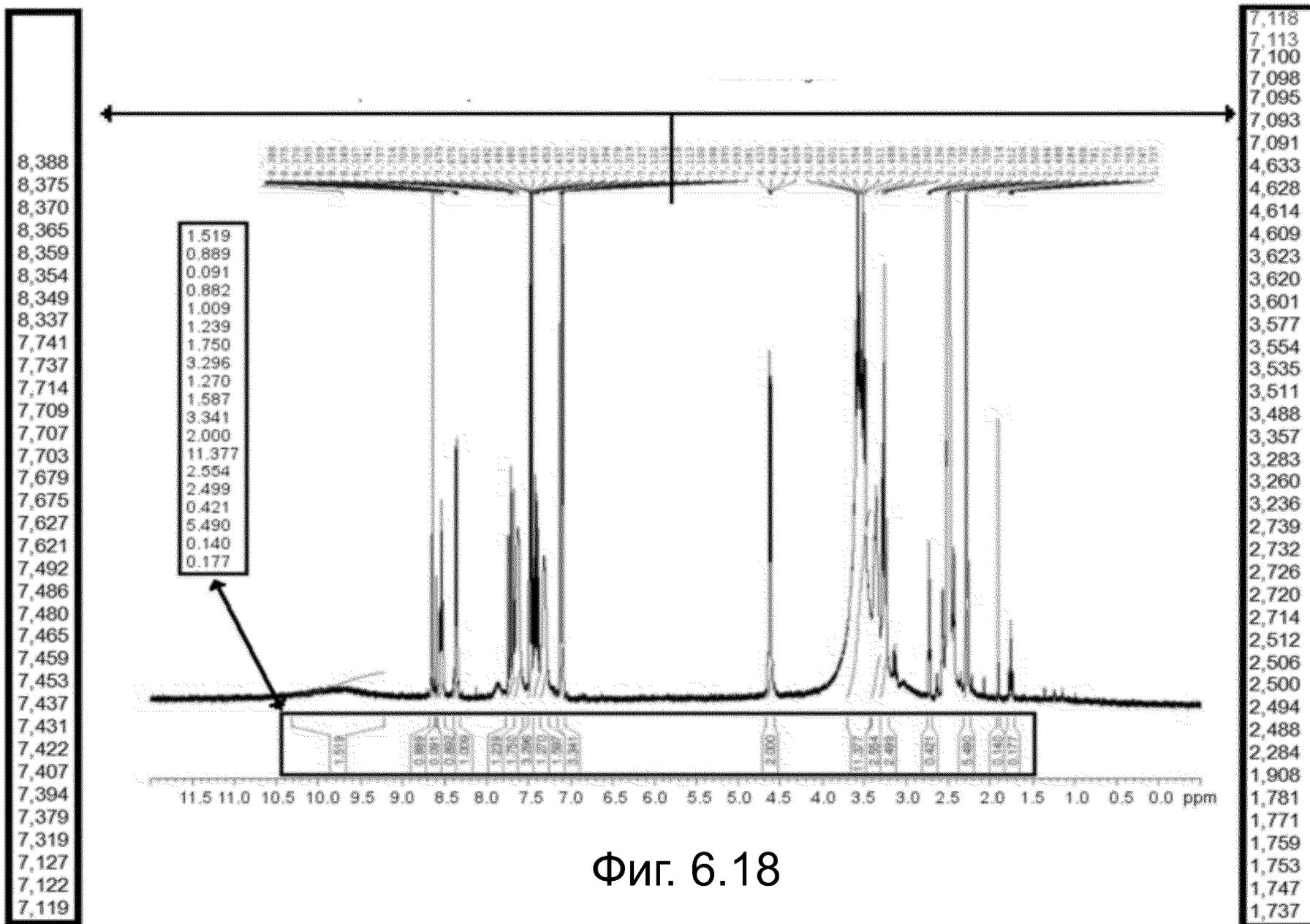
Фиг. 6.15

Фиг. 6.16



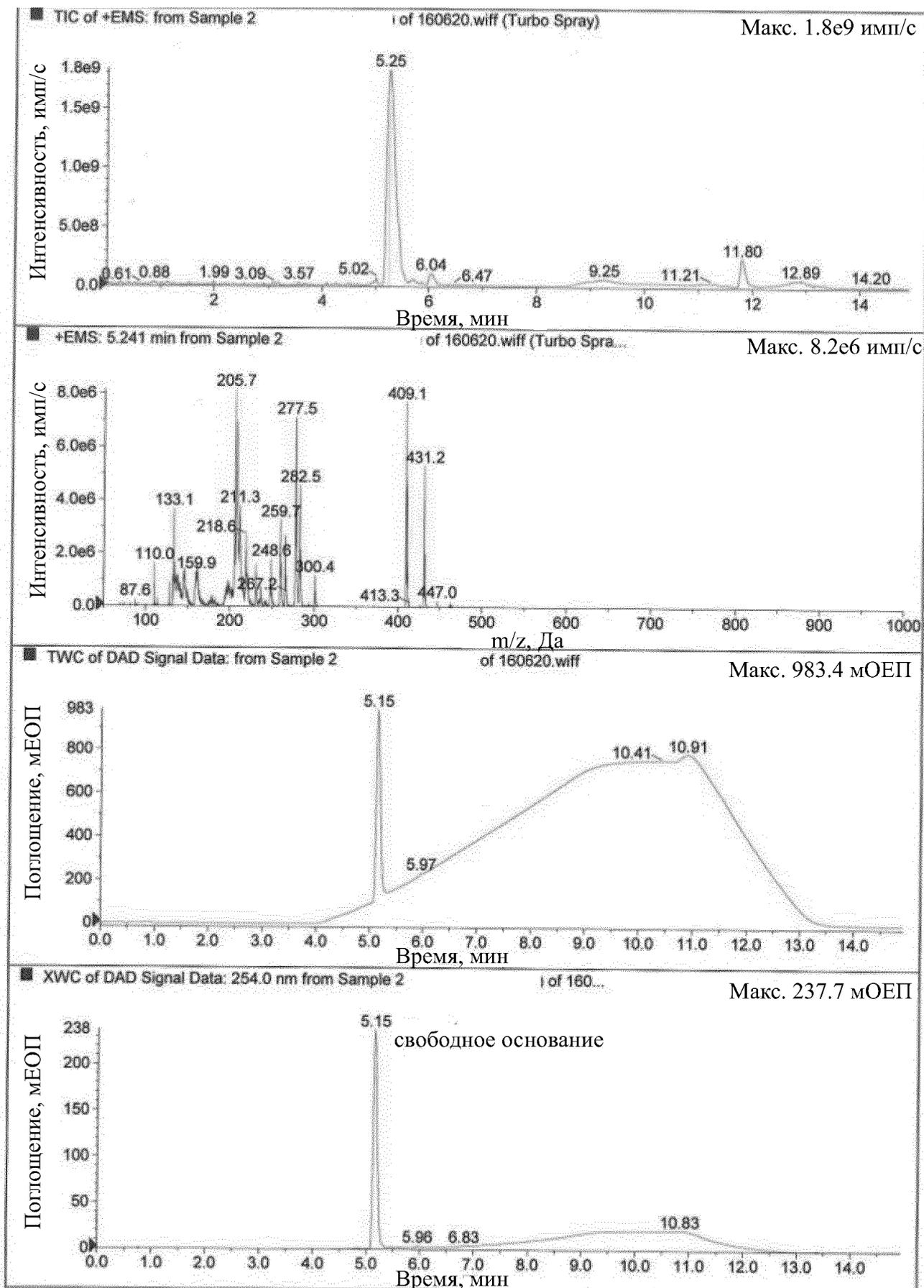


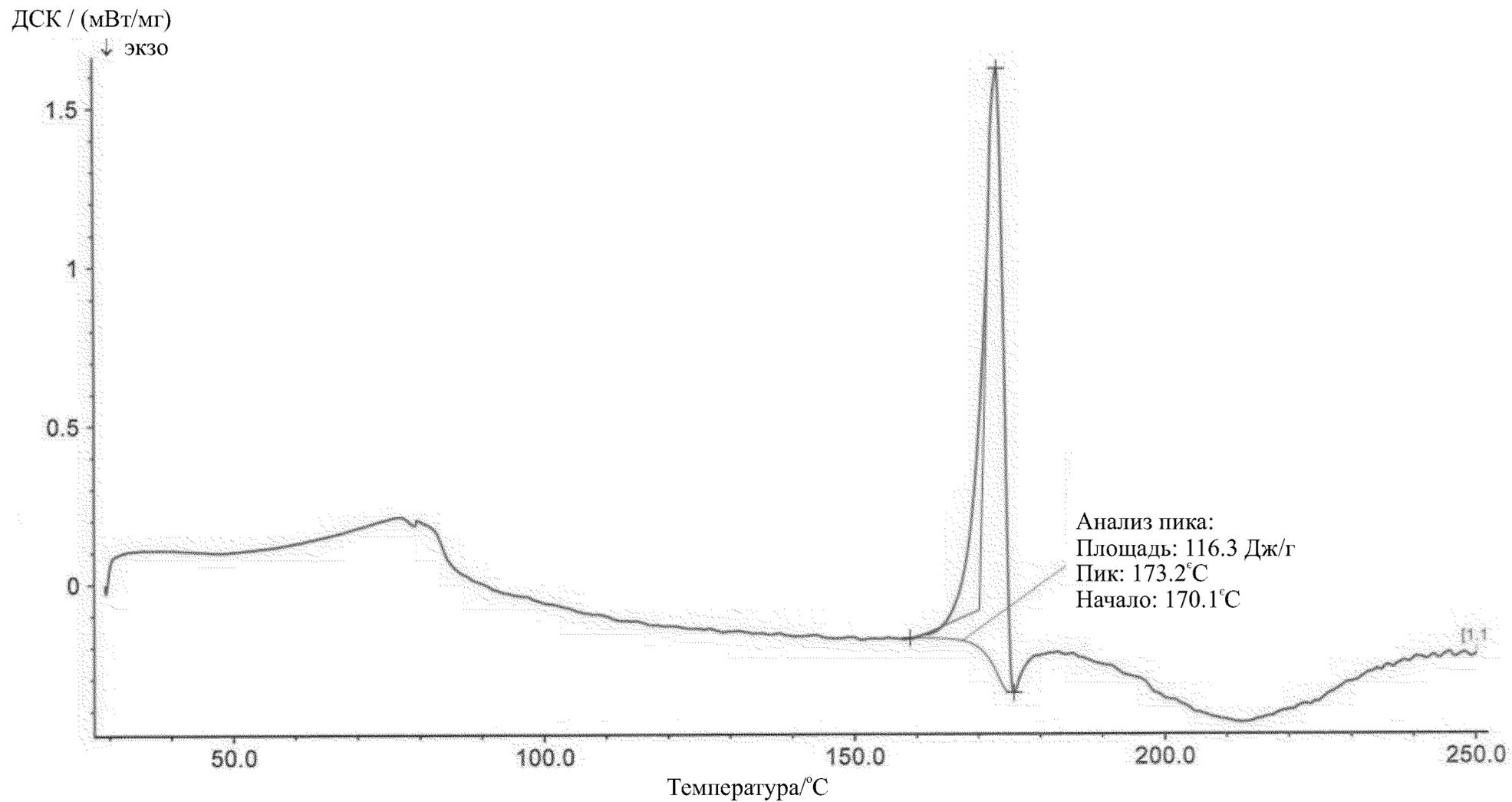
Фиг. 6.17



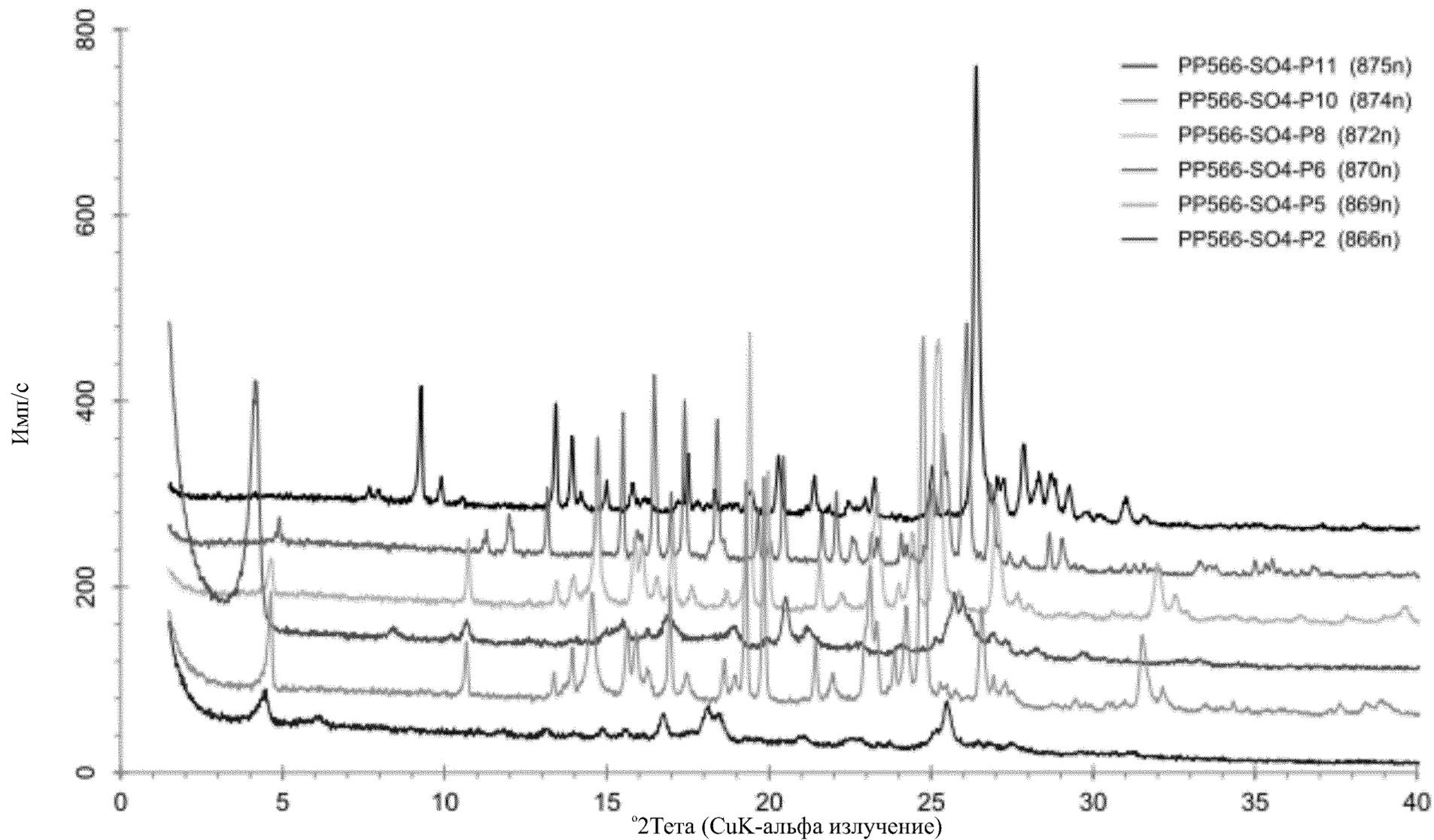
Фиг. 6.18

Фиг. 7.1

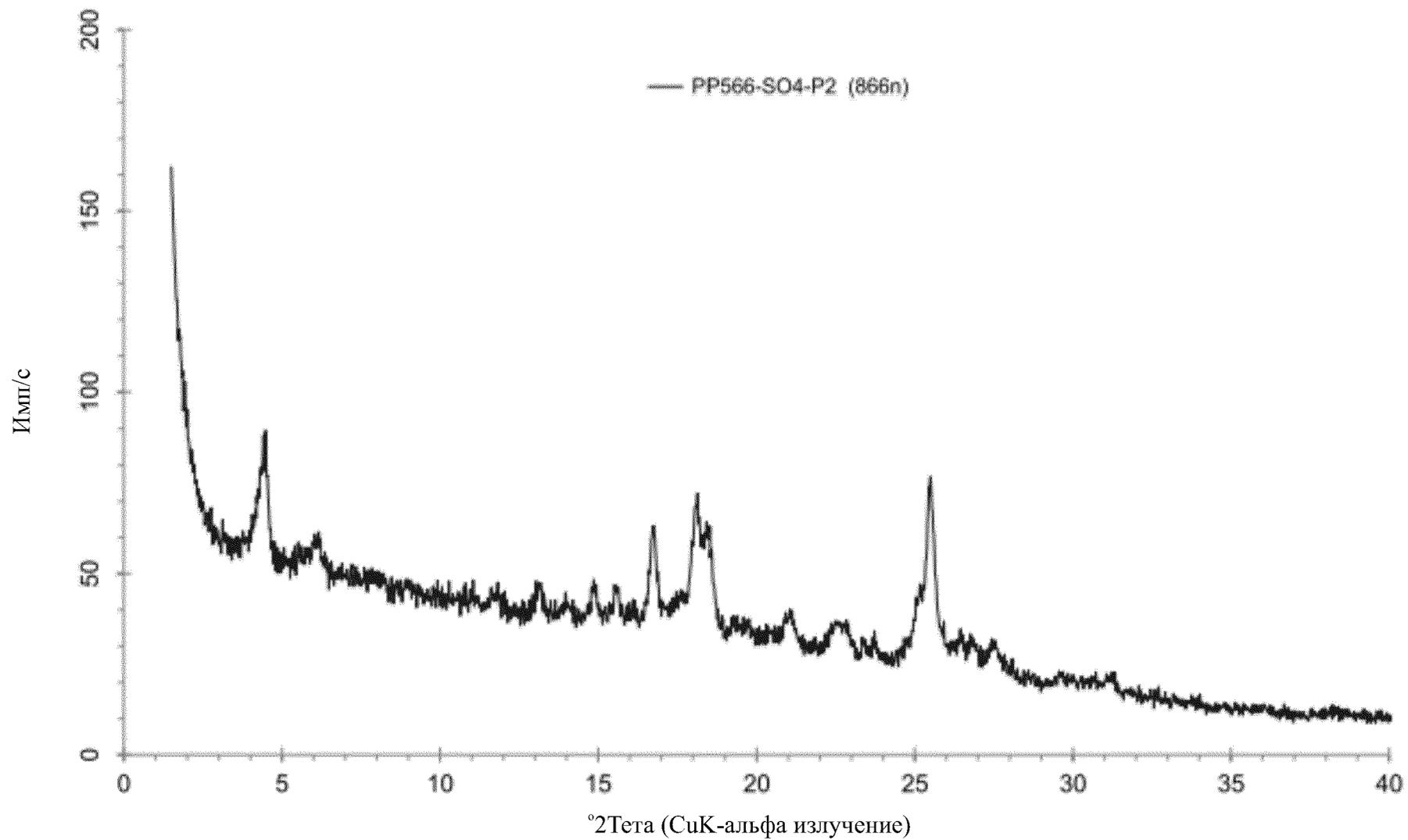




Фиг. 7.2

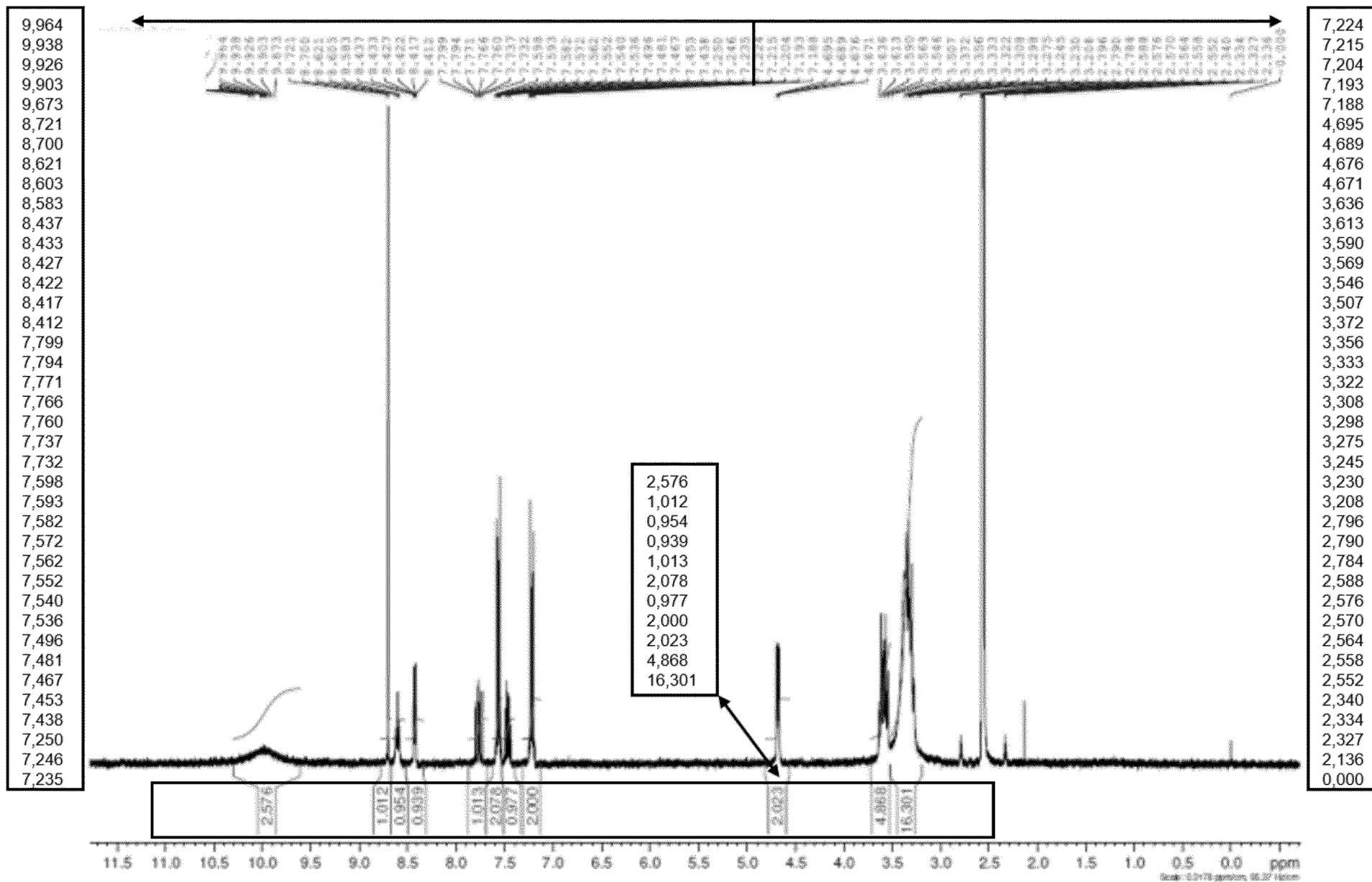


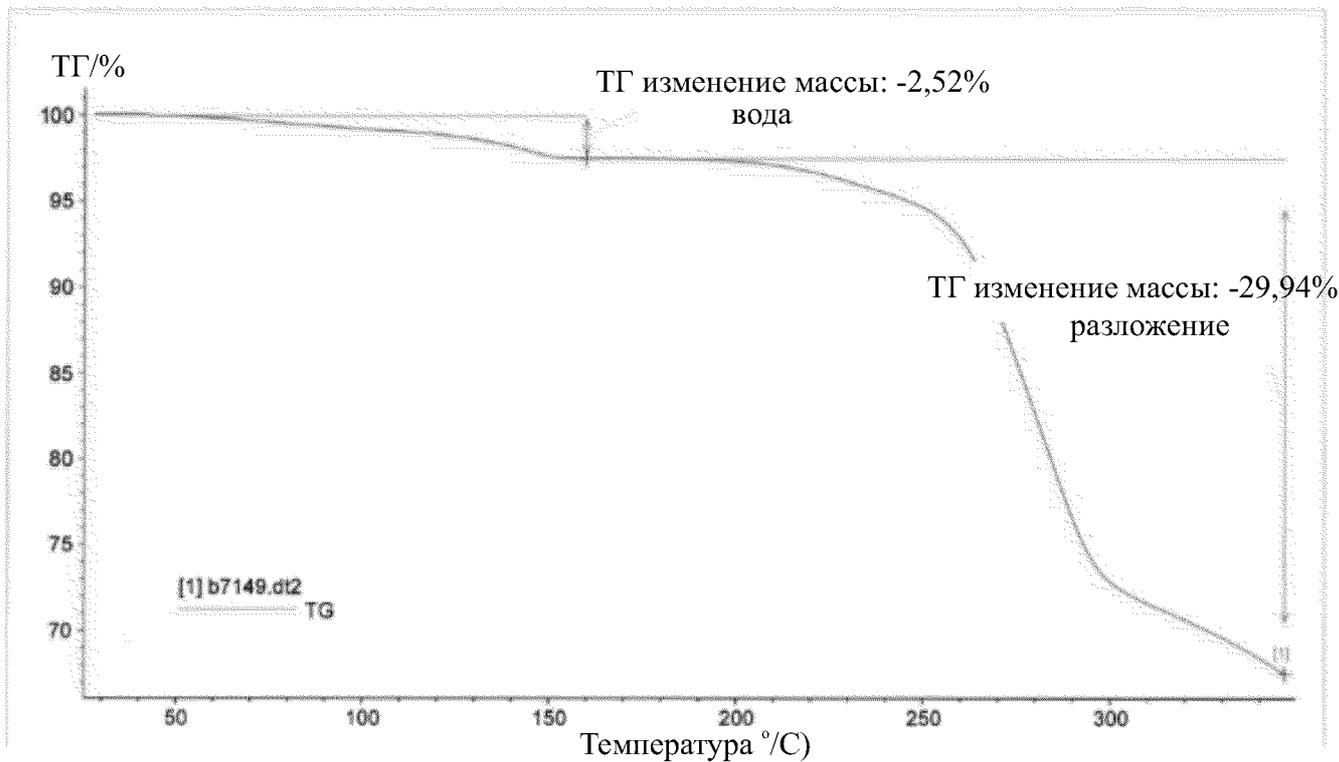
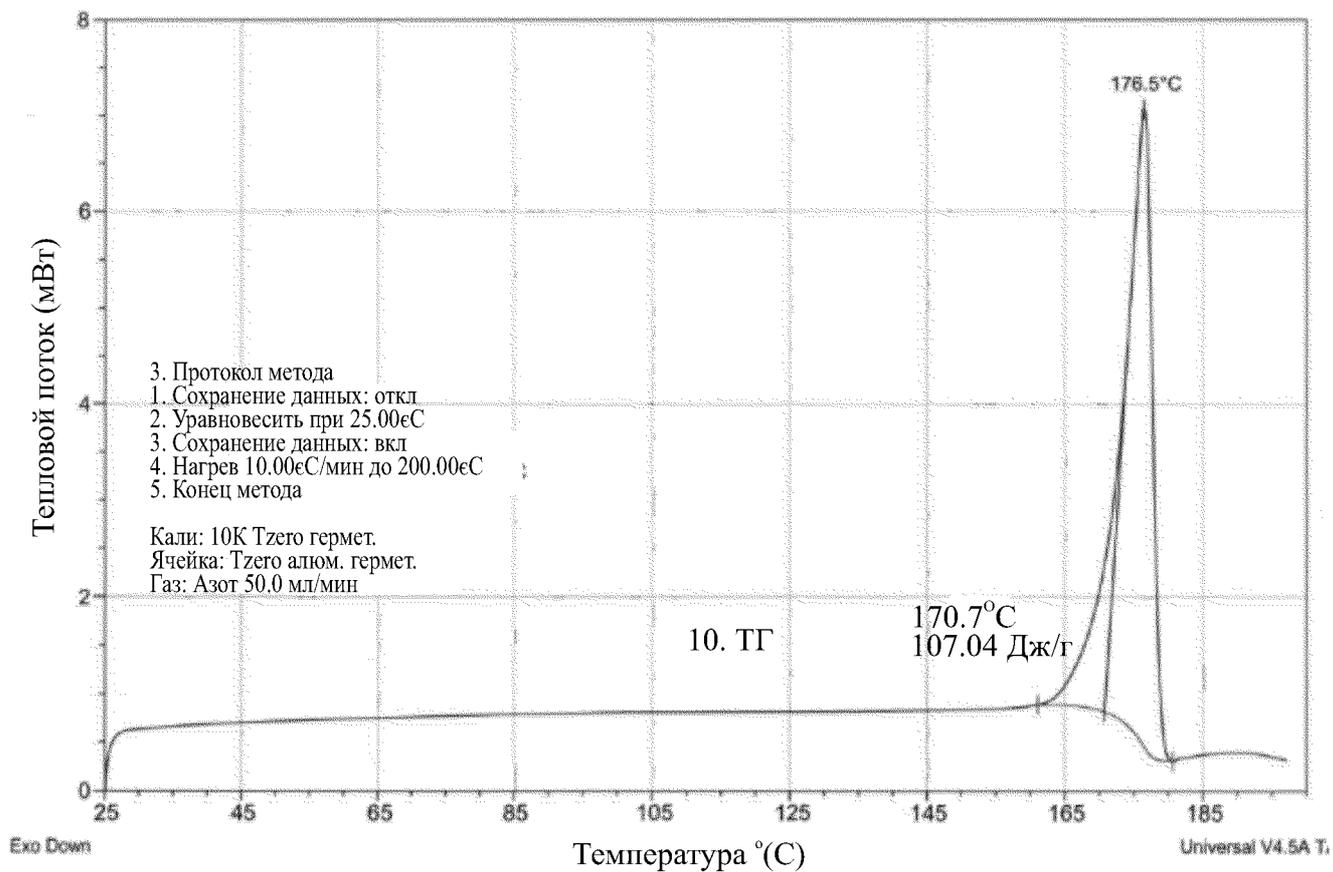
ФИГ. 8.1



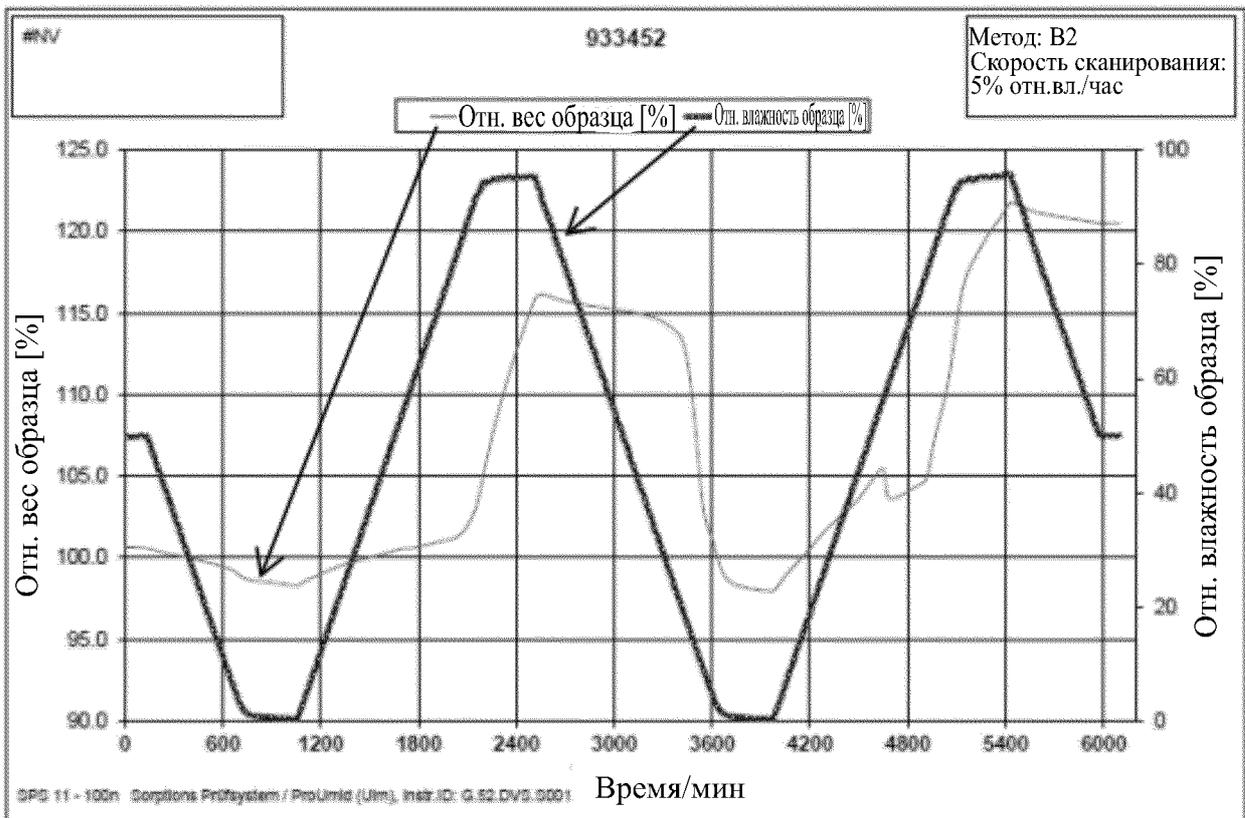
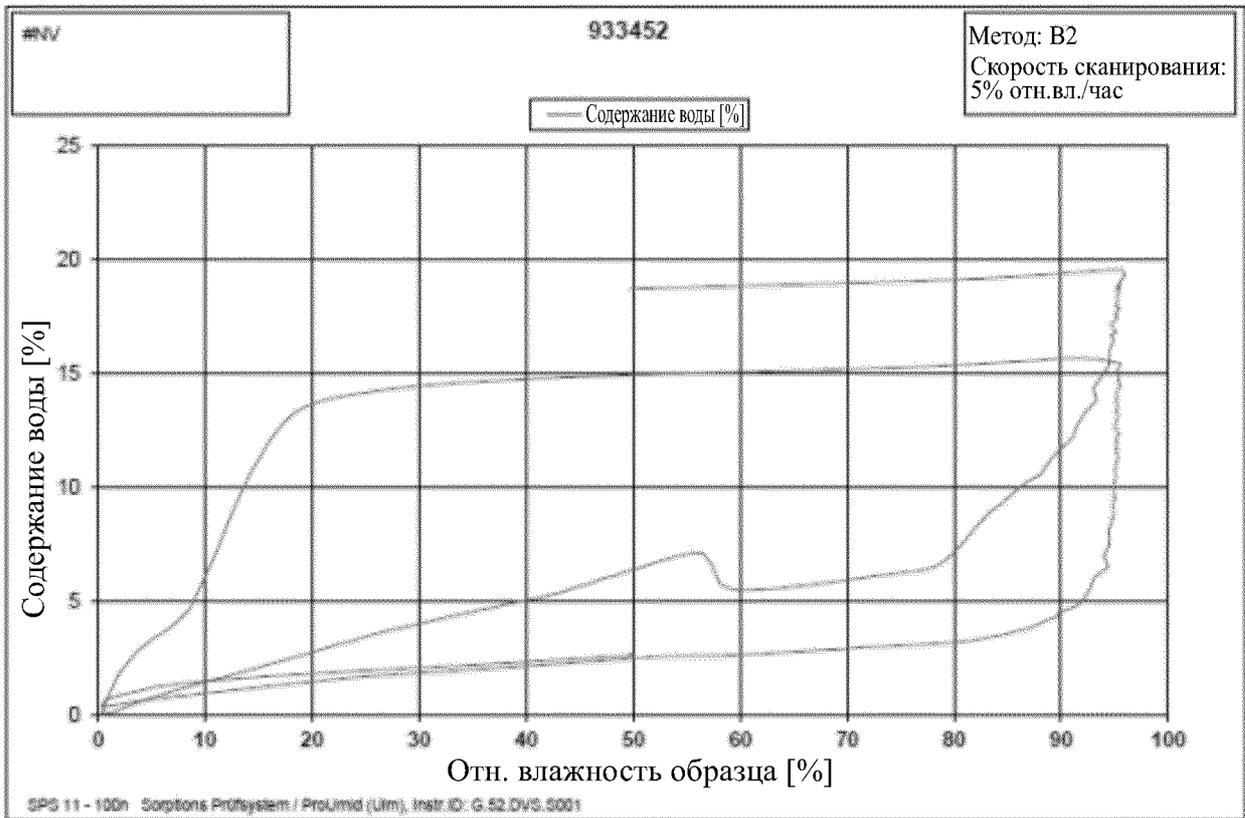
Фиг. 8.2

Фиг. 8.3

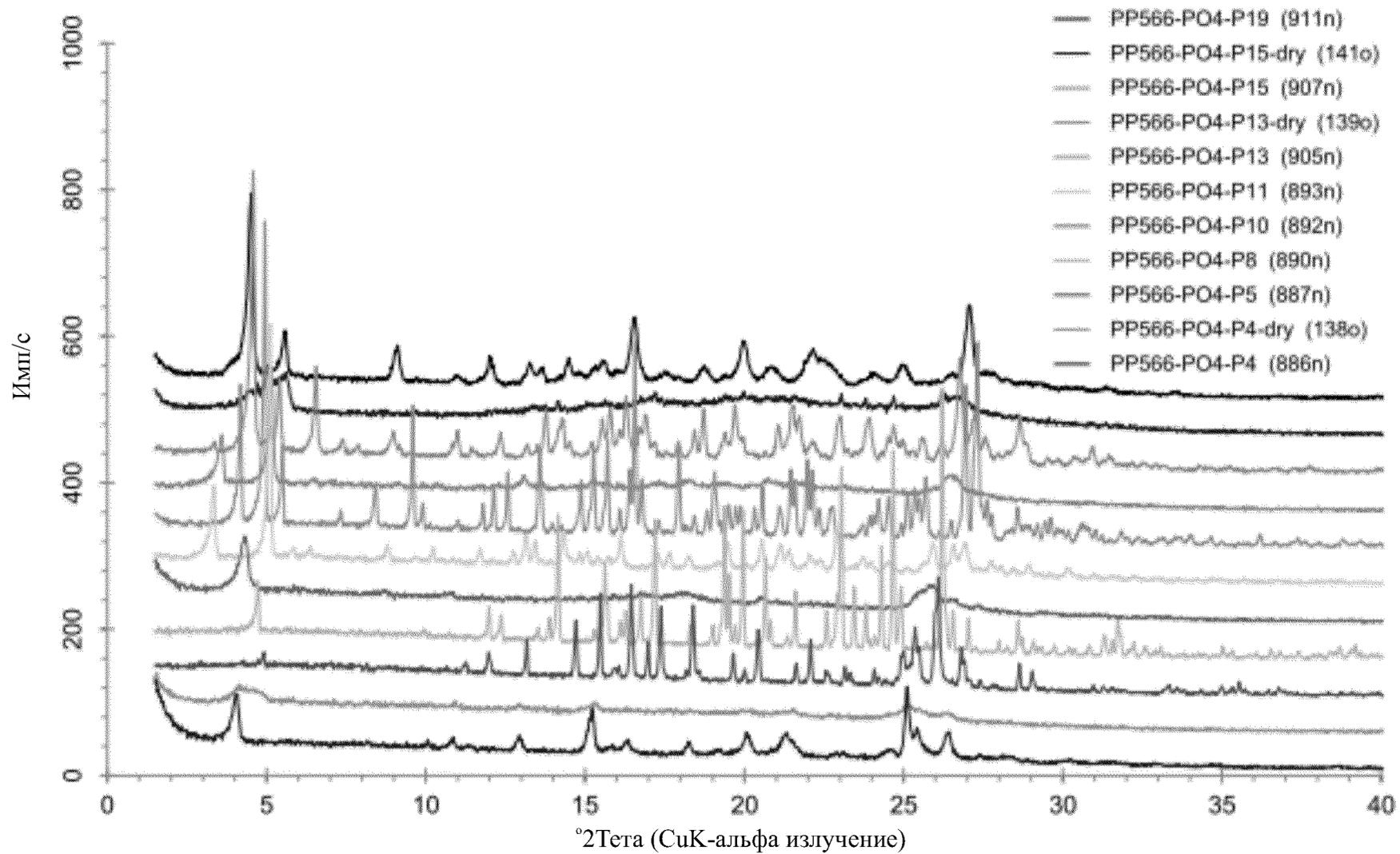




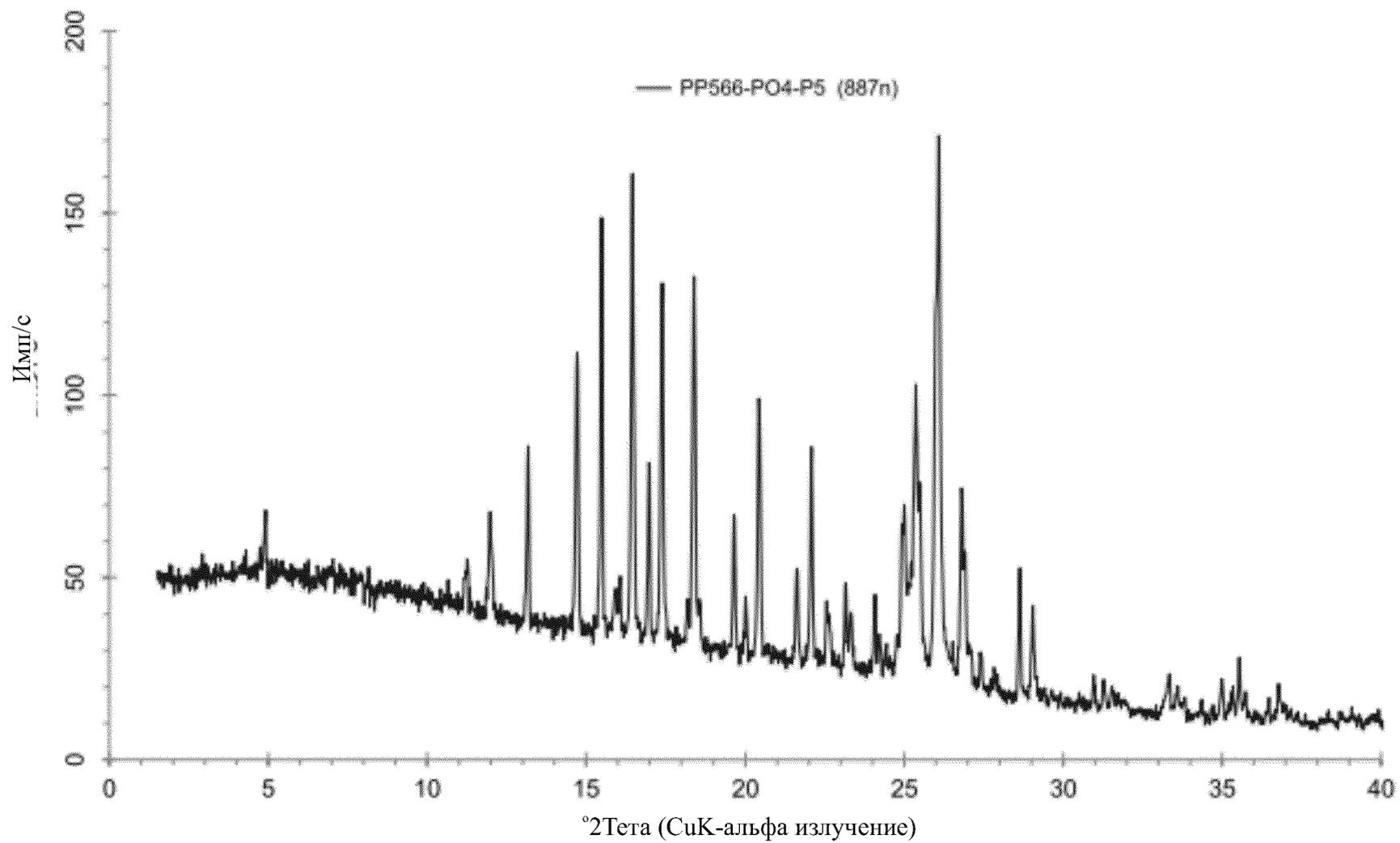
Фиг. 8.4



Фиг. 8.5

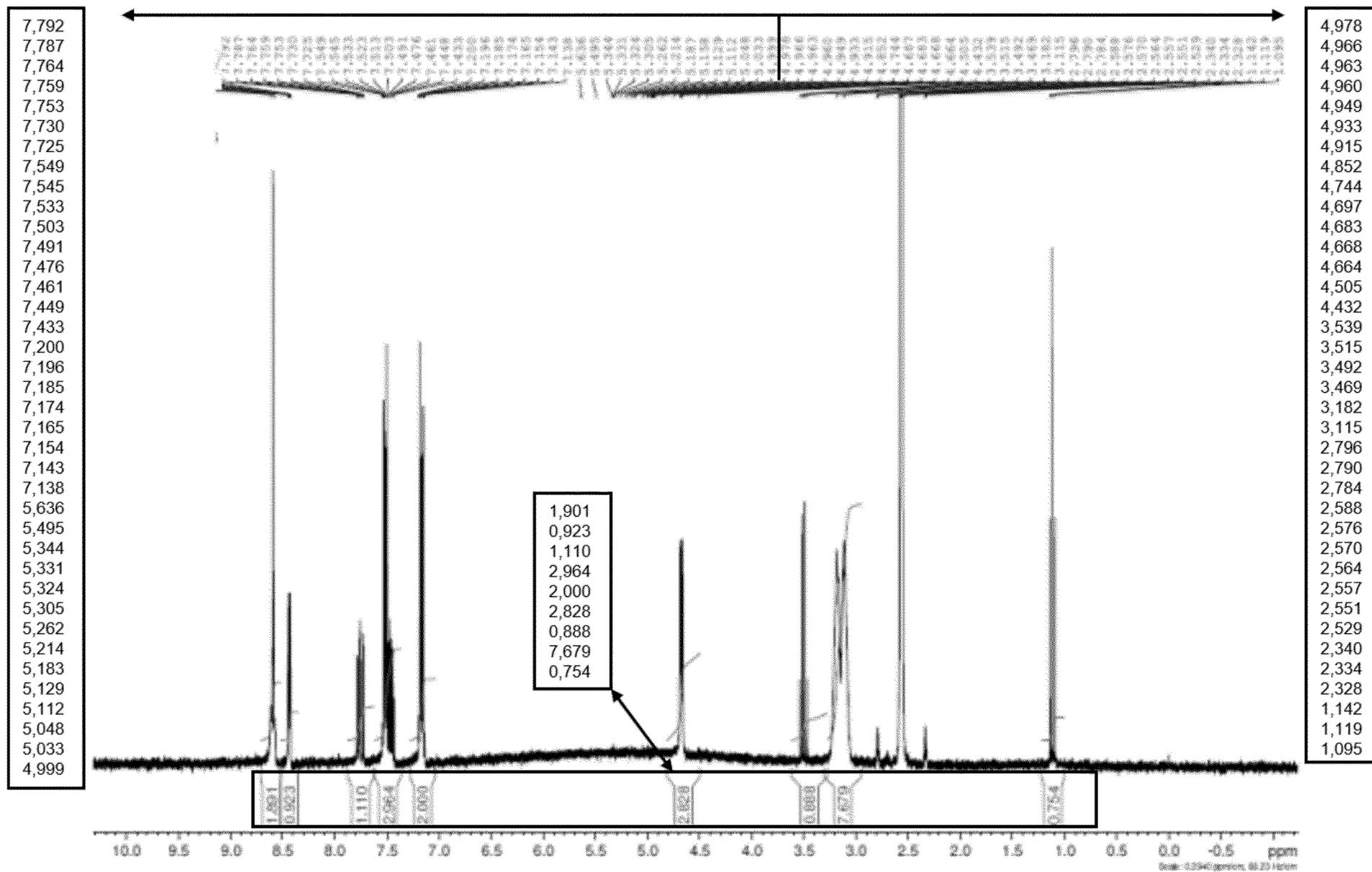


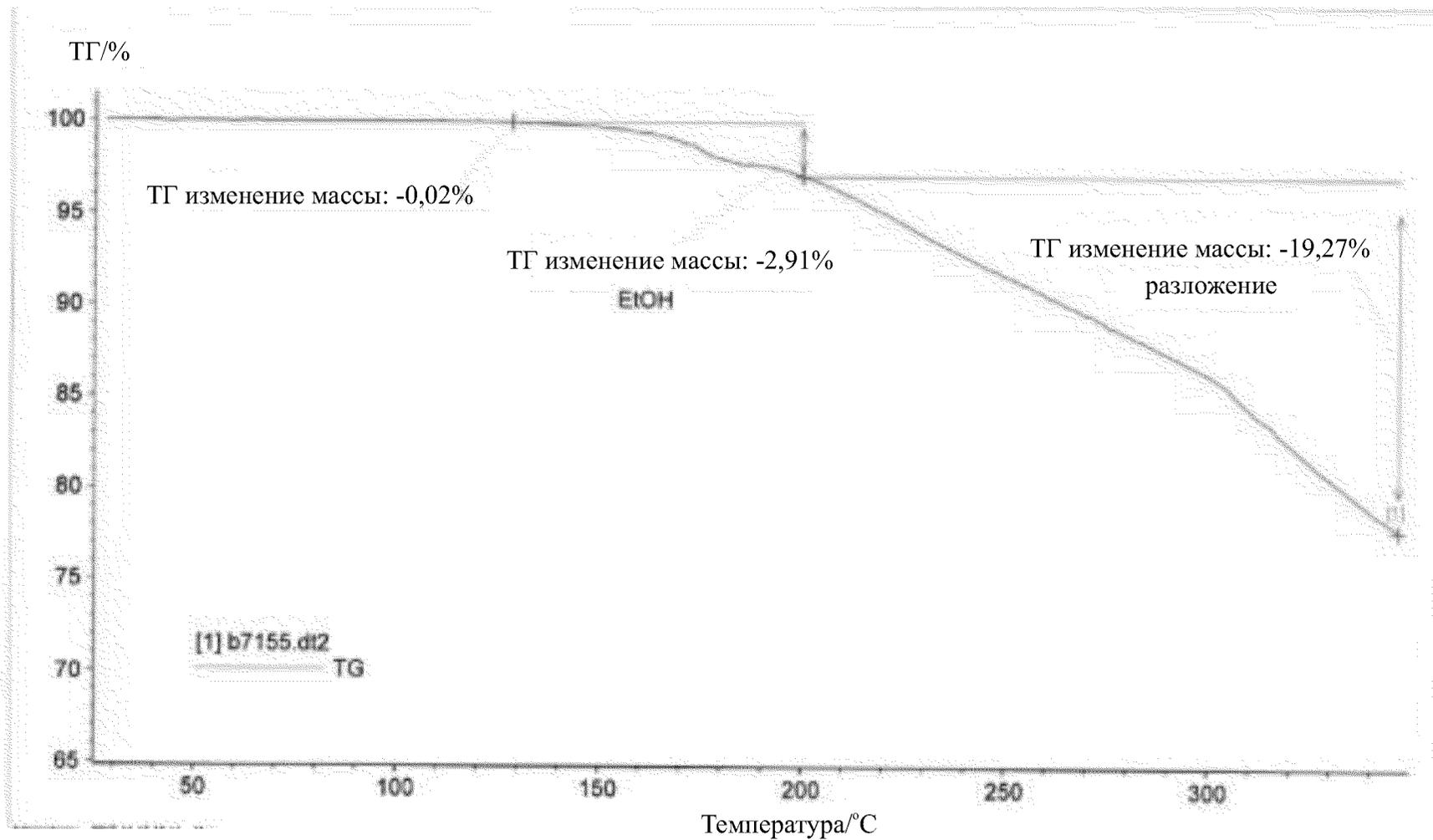
ФИГ. 9.1



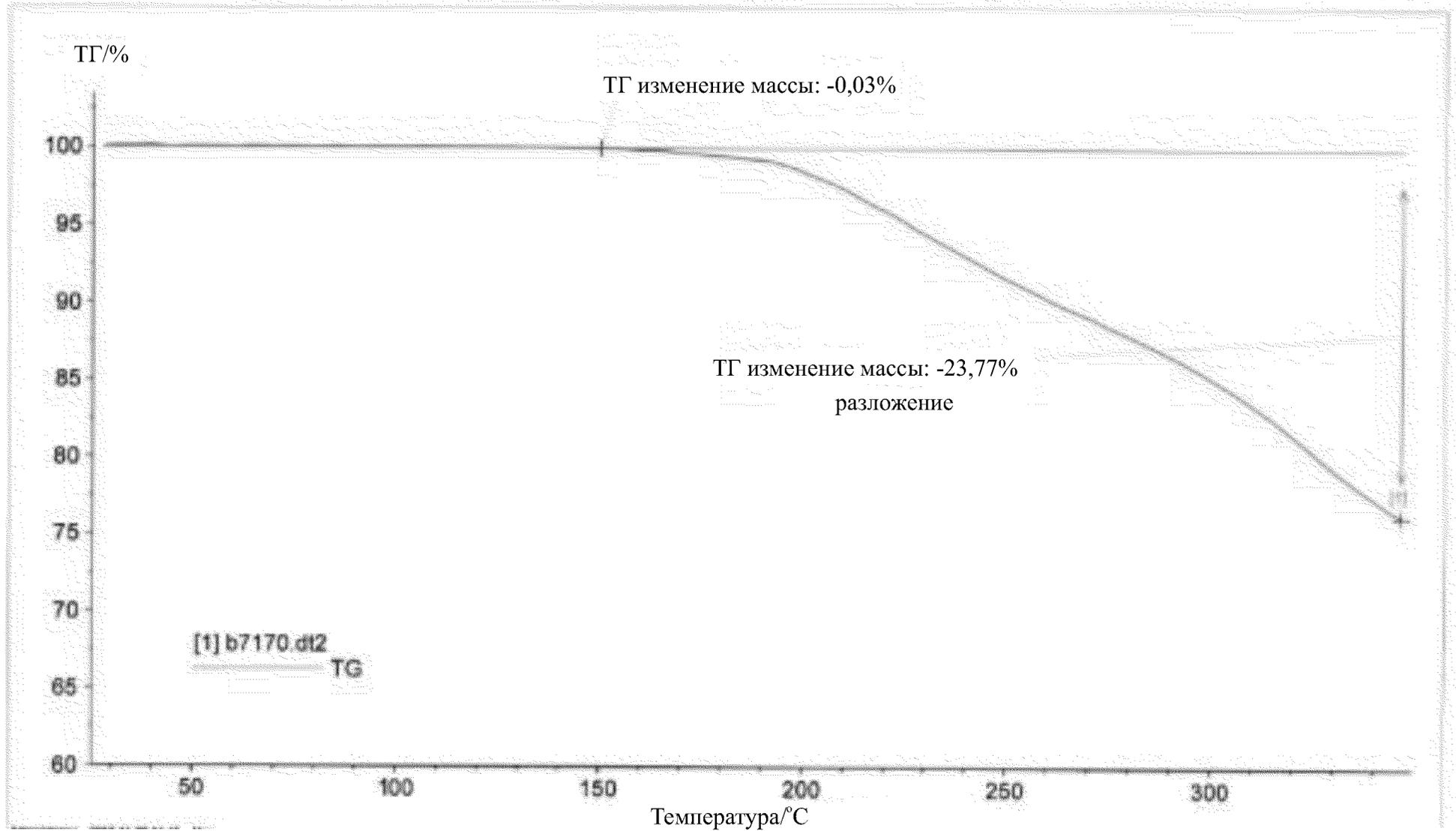
Фиг. 9.2

Фиг. 9.3

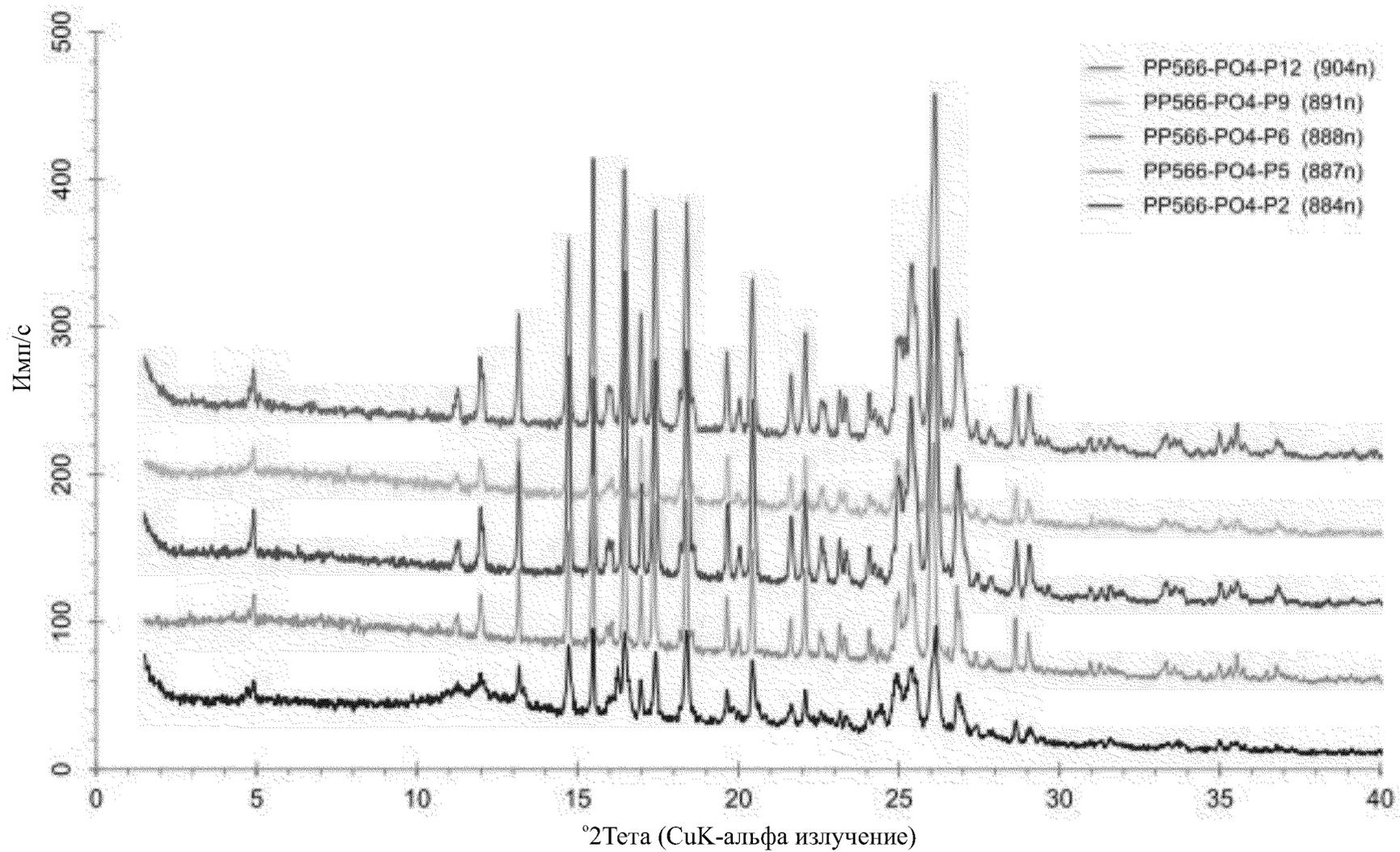




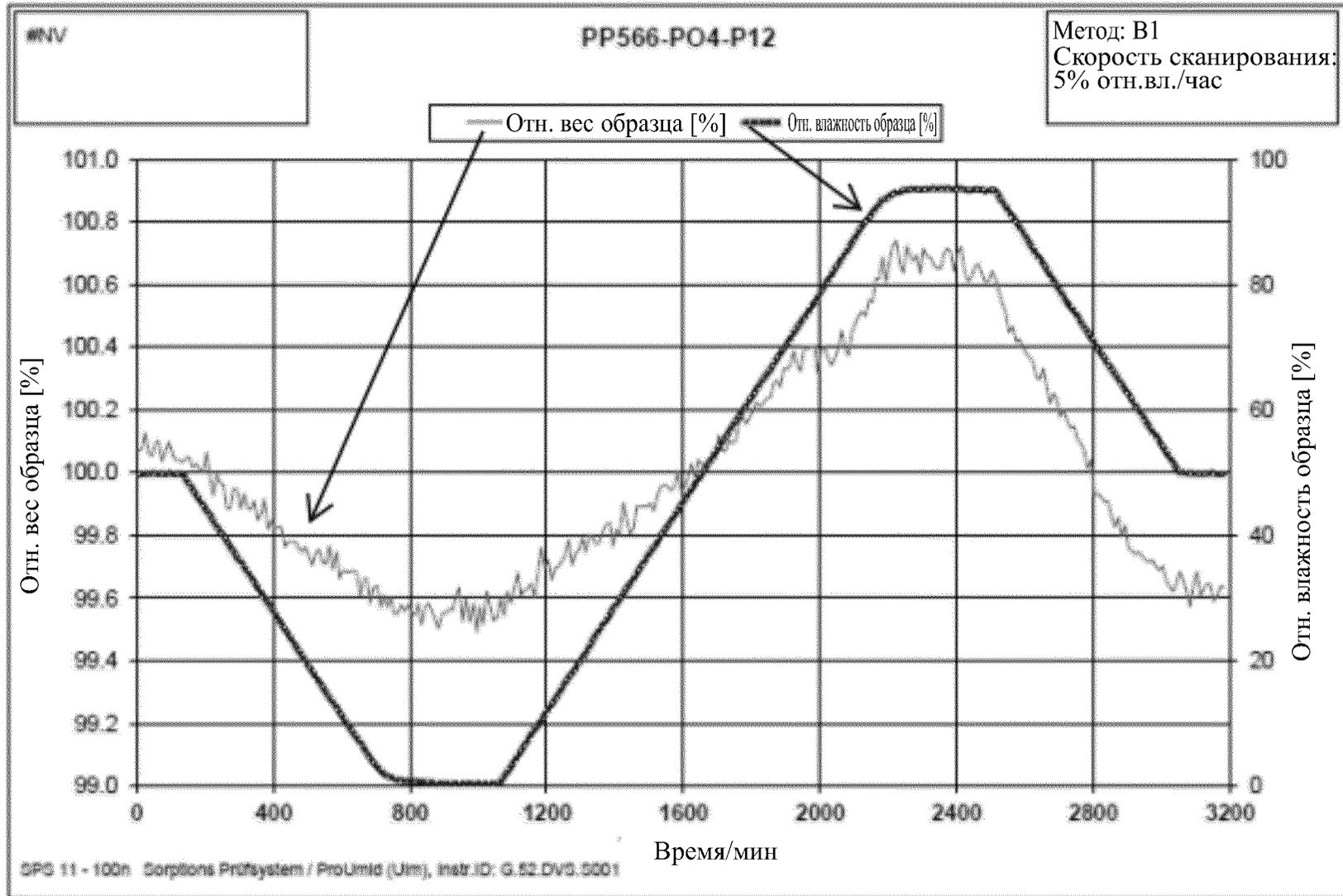
Фиг. 9.4



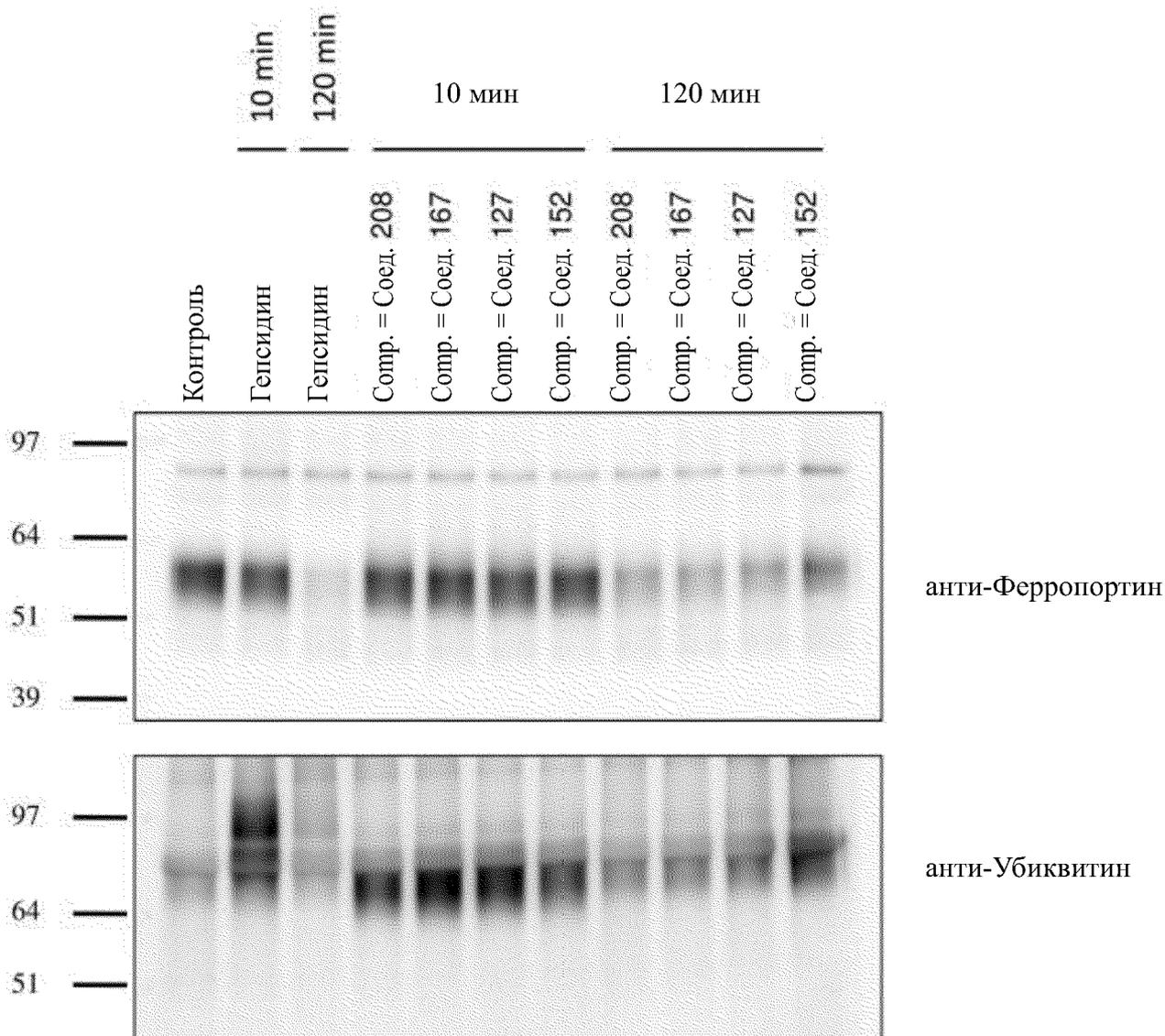
Фиг. 9.5



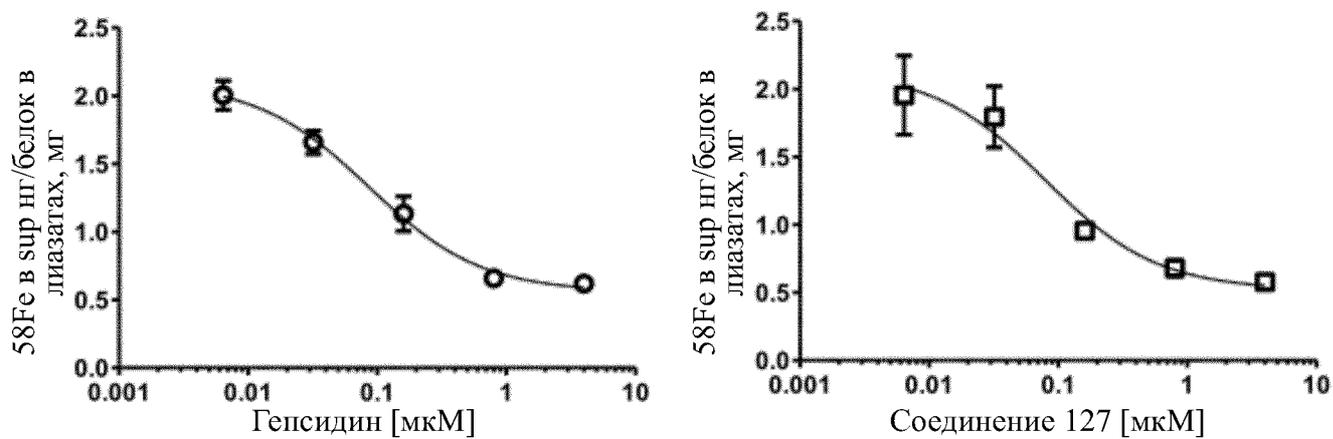
Фиг. 9.6



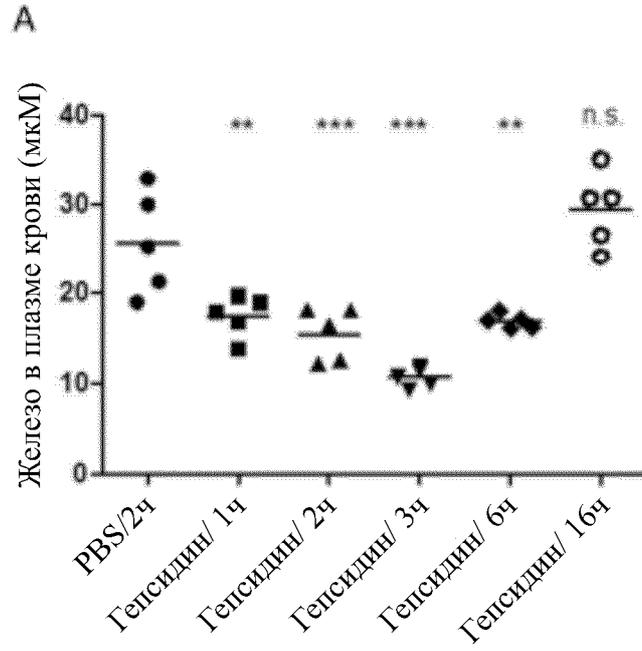
Фиг. 9.7



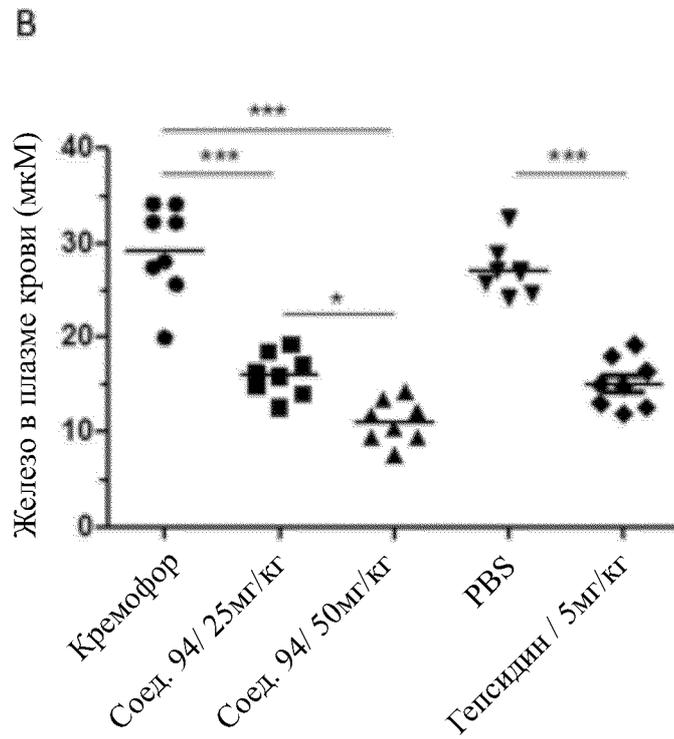
Фиг. 10



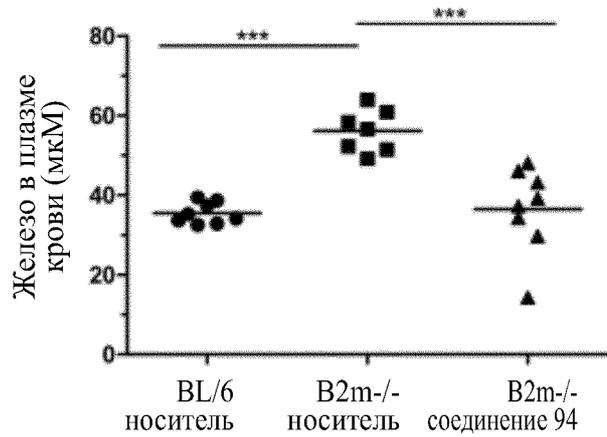
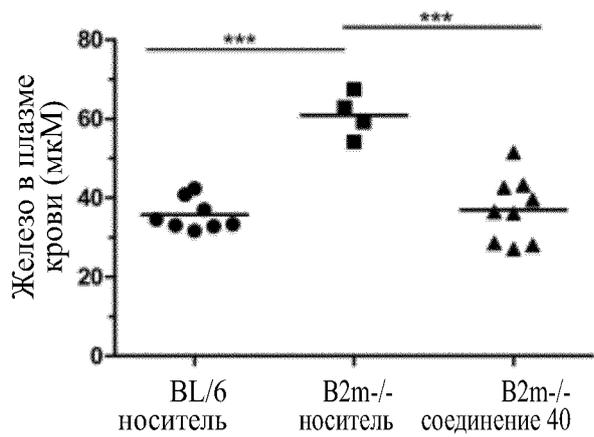
Фиг. 11



Фиг. 12А



Фиг. 12В



ФИГ. 13