(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.02.09

(21) Номер заявки

201891210

(22) Дата подачи заявки 2017.01.04

(51) Int. Cl. *C07D 277/06* (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01) **A61K 31/426** (2006.01) **A61P 15/00** (2006.01) A61P 15/06 (2006.01)

WO-A1-03082278

US-B1-9447055

СПОСОБЫ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫХ РОДОВ С ПОМОЩЬЮ КОМБИНАЦИИ ИНГИБИТОРА PGF2α И ТОКОЛИТИЧЕСКОГО АГЕНТА

(56)

- (31) 14/987,586; 62/274,674; 62/395,664; 62/407,918
- (32)2016.01.04; 2016.01.04; 2016.09.16; 2016.10.13
- (33)US
- (43) 2019.04.30
- (86) PCT/EP2017/050099
- (87) WO 2017/118639 2017.07.13
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец: ОБСЕВА С.А. (СН)
- (72) Изобретатель:

Наксос Пейдж Патрик, Шварц Маттиас (СН), Жоран-Лебрён Кетрин (FR), Кваттропани Анна (CH), Помел Винсент (FR), Лумайе Эрнест, Поль Оливье, Готтеланд Жан-Пьер (СН)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении предложен способ лечения или предотвращения преждевременных родов, а также способ предотвращения родов перед родоразрешением путём кесарева сечения, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его

фармацевтически приемлемой соли и дополнительного токолитического агента.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к способам лечения и предотвращения преждевременных родов, а также способам предотвращения родов перед родоразрешением путём кесарева сечения путем введения пациенту, нуждающемуся в таком лечении, соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного токолитического агента.

Предпосылки создания изобретения

Преждевременные роды являются основной причиной перинатальной смертности в развитых странах и они происходят около в 7-10% всех родов (Berkowitz и др., Epidemiol. Rev. 15:414-443 (1993)). У недоношенных новорожденных значительно чаще наблюдаются тяжелые заболевания, в особенности респираторный дистресс-синдром, внутрижелудочковое кровоизлияние, бронхолёгочная дисплазия и некротизирующий энтероколит, по сравнению с доношенными новорожденными. Длительные нарушения, такие как центральный паралич, нарушение зрения и потеря слуха, также наиболее распространены у недоношенных детей. В настоящее время, преждевременные роды остаются основной причиной смертности и заболеваемости новорожденных в Соединенных Штатах Америки, где, несмотря на значительные улучшения родовспомогательной медицины, уровень смертности детей первого года жизни является более высоким, чем во многих других промышленно развитых странах, что вызывает затраты на интенсивную терапию новорожденных детей с чрезвычайно низкой массой тела, превышающие 5 миллиардов долларов в год. Действительные затраты, связанные с этой интенсивной терапией, еще выше, если принимать во внимание предоставление медицинских услуг для лечения заболеваний, связанных с преждевременным рождением детей, таких как респираторный дистресс-синдром, сердечные патологии, центральный паралич, эпилепсия и тяжелые трудности обучения.

За последние 40 лет клинических исследований, и, несмотря на применение различных терапевтических средств, частота преждевременных родов значительно не снизилась. Предотвратить преждевременные роды очень сложно и, несмотря на то, что токолитическая терапия остается ключевым элементом сдерживания преждевременных родов, отсутствует универсальное соглашение относительно его значения для этого состояния. Доступные токолитические агенты сами по себе не пролонгируют роды более, чем на 48 часов, и у большинства из этих средств отсутствует селективность по отношению к матке и, следовательно, они могут вызвать потенциальные тяжелые побочные эффекты как для матери, так и для плода.

Фундаментально, роды в срок и преждевременные роды являются сходными процессами, поскольку у них общая физиологическая конечная точка, которая характеризуется маточными сокращениями, раскрытием шейки матки и активацией плодных оболочек. Различие состоит в гестационном возрасте, при котором происходят эти процессы, и механизмах, которые их активируют. Полагают, что роды в срок являются результатом физиологической активации терминального пути, в то время как преждевременные роды являются патологическим состоянием, которое характеризуется различными этиологиями, при котором одно или большее количество компонентов этого пути аббератно активированы.

Сократительная способность матки стимулируется или ингибируется различными рецепторами в клетках миометрия. Существует гипотеза, что активация миометрия является результатом координированной экспрессии белков, связанных с сокращениями (CAPs), включая актин, миозин, коннексин-43, и рецепторов для окситоцина и простагландинов. Как правило, рецепторы, которые вызывают вход кальция или высвобождение кальция из внутриклеточного пула, стимулируют сократительную способность. Однако, рецепторы, связанные с продукцией циклических нуклеотидов, таких как циклический аденозинмонофосфат (цАМ Φ), расслабляют матку. Например, рецепторы окситоцина и простагландина F (FP) являются стимулирующими, в то время как $\beta 2$ адренорецепторы и рецепторы простагландина E2, связанные с образованием цАМ Φ , являются ингибирующими.

В тканях матки было показано, что простагландины E2 (PGE2) и F2α (PGF2α) индуцируют изменения цервикального канала и вызывают сократительную способность матки, два ключевых события в физиологии родов и родоразрешения. Активация FP рецептора в миометрии человека с помощью PGF2α приводит к повышению внутриклеточной концентрации кальция, что, в свою очередь, приводит к сокращению гладкомышечных клеток матки (Abramovitz и др. J. Biol. Chem. 269:2632-2636 (1994) и Senior и др. Вг. J. Pharmacol. 108:501-506 (1993)). FP рецепторы активированы в маточных тканях к сроду родов (Al-Matubsi и др. Biol. Reprod. 65:1029-1037 (2001)). Ингибиторы синтеза простагландина (такие как индометацин и нимесулид) проявляют некоторый токолитический эффект, но у них присутствуют побочные эффекты и их безлицензионное использование в клинической практике вызывает опасения с точки зрения безопасности плода (Norton и др. New Engl. J. Med. 329:1602-1067 (1993) и Peruzzi и др. NewEngl. J. Med. 354:1615 (1999)). Сохраняется потребность в разработке лекарственных средств с селективностью по отношению к миометрию, которые позволят длительно ингибировать маточные сокращения, приводящие к родам, и пролонгировать беременность до стадии, на которой повышенное созревание плода увеличивает шансы на выживание.

Сущность изобретения

Изобретение охватывает альфа-сложные аминоэфиры производного гидроксипропилтиазолидин

карбоксамида, а также их соли, которые способны нарушать взаимодействие между простагландином $F2\alpha$ (PGF2 α) и рецептором простагландина F. Эти соединения могут вводиться субъекту, такому как беременная женщина, для лечения или предотвращения преждевременных родов.

В первом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения или предотвращения преждевременных родов у пациента, представляющего собой человека, путем введения пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I)

или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного токолитического агента.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает способ предотвращения преждевременных родов перед родоразрешением путём кесарева сечения у пациента, представляющего собой человека, путем введения пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного токолитического агента.

В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение представлено формулой (III)

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение находится в кристаллическом состоянии.

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение проявляет характеристические пики порошковой рентгеновской дифракции при углах $20\,7,0^{\circ}$, $8,1^{\circ}$, $10,0^{\circ}$, $12,0^{\circ}$, $13,1^{\circ}$, $14,1^{\circ}$, $16,4^{\circ}$, $18,4^{\circ}$, $20,1^{\circ}$, $21,0^{\circ}$, $23,5^{\circ}$ и $29,5^{\circ}$.

В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение характеризуется спектром порошковой рентгеновской дифракции, таким, как изображено на фиг. 49.

В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение проявляет пики ¹Н ядерного магнитного резонанса (ЯМР), центрированные при 1,1 м.ч., 3,3 м.ч. 4,9 м.ч., 5,4 м.ч., 7,1 м.ч., 7,7 м.ч., 7,9 м.ч., и 8,0 м.ч.

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение характеризуется ¹Н ЯМР спектром, таким, как изображено на фиг. 21.

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение проявляет эндотерму при от 145 до 147° С, как определено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, такой, как изображено на фиг. 20 или фиг. 23.

В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение характеризуется потерей веса от 0,2 до 0,6%, при нагревании от 25 до 100° С, как измерено с помощью термогравиметрического анализа.

В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение характеризуется кривой термогравиметрического анализа, такой как изображено на фиг. 24.

В некоторых вариантах осуществления способ включает пероральное введение соединения.

В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный токолитический агент представляет собой антагонист рецептора окситоцина. В некоторых вариантах осуществления способ включает пероральное введение антагониста рецептора окситоцина субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение антагониста рецептора окситоцина пациенту. Соединение может вводиться субъекту одновременно с введением антагониста рецептора окситоцина. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту перед введением антагониста рецептора окситоцина пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту после введения антагониста рецептора окситоцина субъекту. В некоторых вариантах осуществления соединение смешивают с антагонистом рецептора окситоцина, и эти агенты вводят пациенту одновременно. В некоторых вариантах осуществления антагонист рецептора окситоцина представляет собой атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан, или ноласибан.

В некоторых вариантах осуществления антагонист рецептора окситоцина представляет собой атосибан.

В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный токолитический агент пред-

ставляет собой блокатор кальциевых каналов. В некоторых вариантах осуществления указанный блокатор кальциевых каналов представляет собой нифедипин или никардипин. В некоторых вариантах осуществления указанный блокатор кальциевых каналов представляет собой нифедипин. В некоторых вариантах осуществления способ включает пероральное введение блокатора кальциевых каналов пациенту. Соединение может вводиться субъекту одновременно с введением блокатора кальциевых каналов. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту перед введением блокатора кальциевых каналов пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту после введения блокатора кальциевых каналов пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение смешивают с блокатором кальциевых каналов, и эти агенты вводят пациенту одновременно.

В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный токолитический агент представляет собой бетамиметик, магниевую соль, донор оксида азота, прогестерон или его вариант. В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный токолитический агент представляет собой бетамиметик, выбранный из группы, включающей тербуталин, ритодрин, гексопреналин, альбутерол, фенотерол, нилидрин, или орципреналин. В некоторых вариантах осуществления способ включает пероральное введение бетамиметика пациенту. Соединение может вводиться пациенту одновременно с введением бетамиметика. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту перед введением бетамиметика пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту после введения бетамиметика пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение смешивают с бетамиметиком, и эти агенты вводят пациенту одновременно.

В некоторых вариантах осуществления что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой сульфат магния. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение магниевой соли субъекту. В некоторых вариантах осуществления, способ включает внутримышечное введение магниевой соли пациенту. В некоторых вариантах осуществления способ включает пероральное введение магниевой соли пациенту. Соединение может вводиться пациенту одновременно с введением магниевой соли. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят субъекту перед введением магниевой соли пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят субъекту после введения магниевой соли пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение смешивают с магниевой солью, и эти агенты вводят пациенту одновременно.

В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный токолитический агент представляет собой нитроглицерин. В некоторых вариантах осуществления способ включает пероральное введение нитроглицерина пациенту. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривенное введение нитроглицерина пациенту. Соединение может вводиться пациенту одновременно с введением нитроглицерина. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту перед введением нитроглицерина пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят пациенту после введения нитроглицерина пациенту. В некоторых вариантах осуществления соединение смешивают с нитроглицерином, и эти агенты вводят пациенту одновременно.

В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный токолитический агент представляет собой прогестерон или 17-α-гидроксипрогестерон капроат. В некоторых вариантах осуществления, способ включает пероральное введение прогестерона или 17-α-гидроксипрогестерон капроата, субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутривагинальное введение прогестерона или 17-α-гидроксипрогестерон капроата, субъекту. Соединение может вводиться субъекту одновременно с введением прогестерона или 17-α-гидроксипрогестерон капроата. В некоторых вариантах осуществления, соединение вводят субъекту перед введением прогестерона 17-α-гидроксипрогестерон капроата, субъекту. В некоторых вариантах осуществления, соединение вводят субъекту после введения прогестерона 17-α-гидроксипрогестерон капроата, субъекту. В некоторых вариантах осуществления соединение смешивают с прогестероном 17-α-гидроксипрогестерон капроат (например, в частности, в пероральном препарате), и эти агенты вводят субъекту одновременно.

В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой бетаметазон. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид представляет собой гидрокортизон. В некоторых вариантах осуществления способ включает пероральное введение кортикостероида субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ включает внутримышечное введение кортикостероида субъекту. Соединение может вводиться субъекту одновременно с введением кортикостероида. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят субъекту перед введением кортикостероида субъекту. В некоторых вариантах осуществления соединение вводят субъекту после введения кортикостероида субъекту. В некоторых вариантах осуществления соединение смешивают с кортикостероидом (например, в частности, в пероральном препарате), и эти агенты вводят субъекту одновременно.

В некоторых вариантах осуществления пациент характеризуется гестационным возрастом от около 24 до около 34 недели. В некоторых вариантах осуществления, субъект проявляет уменьшение амплитуды маточных сокращений после введения, например, уменьшение на от около 40% до около 50% (на-

пример, около 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50%) относительно измерения амплитуды маточных сокращений у пациента, записанных перед введением. В некоторых вариантах осуществления соединение проявляет период полувыведения от около 1 до около 4 ч у субъекта (например, около 1 ч, 1,1 ч, 1,2 ч, 1,3 ч, 1,4 ч, 1,5 ч, 1,6 ч, 1,7 ч, 1,8 ч, 1,9 ч, 2,0 ч, 2,1 ч, 2,2 ч, 2,3 ч, 2,4 ч, 2,5 ч, 2,6 ч, 2,7 ч, 2,8 ч, 2,9 ч, 3,0 ч, 3,1 ч, 3,2 ч, 3,3 ч, 3,4 ч, 3,5 ч, 3,6 ч, 3,7 ч, 3,8 ч, 3,9 ч или 4,0 ч). В некоторых вариантах осуществления, соединение достигает максимальной концентрации в плазме у субъекта в течение от около 0,25 до около 2 ч введения (например, около 0,25 ч, 0,3 ч, 0,4 ч, 0,5 ч, 0,6 ч, 0,7 ч, 0,8 ч, 0,9 ч, 1,0 ч, 1,1 ч, 1,2 ч, 1,3 ч, 1,4 ч, 1,5 ч, 1,6 ч, 1,7 ч, 1,8 ч, 1,9 ч или 2,0 ч). В некоторых вариантах осуществления, субъектом является млекопитающее, например, человек. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение связывается с рецептором F2α простагландина человека с аффинностью около 1 нМ. Соединения согласно изобретению демонстрируют способность селективно связываться с рецепторами простагландина F, такими как простагландин F2α, по сравнению с другими подтипами рецепторов простагландина. Например, соединения согласно изобретению проявляют аффинность к рецептору простагландина $F2\alpha$, которая около в 10 раз больше, чем наблюдаемая для рецептора простагландина Е2. Дополнительно, соединения согласно изобретению проявляют аффинность к рецептору простагландина F2a, которая около в 100 раз или выше (например, от около в 100 раз до около 1000 раз, например, около в 100 раз, 110 раз, 120 раз, 130 pas, 140 pas, 150 pas, 160 pas, 170 pas, 180 pas, 190 pas, 200 pas, 210 pas, 220 pas, 230 pas, 240 pas, 250 раз, 260 раз, 270 раз, 280 раз, 290 раз, 300 раз, 310 раз, 320 раз, 330 раз, 340 раз, 350 раз, 360 раз, 370 раз, 380 pas, 390 pas, 400 pas, 410 pas, 420 pas, 430 pas, 440 pas, 450 pas, 460 pas, 470 pas, 480 pas, 490 pas, 500 раз, 510 раз, 520 раз, 530 раз, 540 раз, 550 раз, 560 раз, 570 раз, 580 раз, 590 раз, 600 раз, 610 раз, 620 раз, 630 pas, 640 pas, 650 pas, 660 pas, 670 pas, 680 pas, 690 pas, 700 pas, 710 pas, 720 pas, 730 pas, 740 pas, 750 раз, 760 раз, 770 раз, 780 раз, 790 раз, 800 раз, 810 раз, 820 раз, 830 раз, 840 раз, 850 раз, 860 раз, 870 раз, 880 pas, 890 pas, 900 pas, 910 pas, 920 pas, 930 pas, 940 pas, 950 pas, 960 pas, 970 pas, 980 pas, 990 pas, 1000 раз, или выше) больше, чем для других подтипов рецепторов простагландина, таких как подтипа рецепторов простагландина E1, E3, E4, D1, D2, I1, и I2. В некоторых вариантах осуществления, соединение растворимо в водном растворе при концентрации от около 300 мкг/мл до около 500 мкг/мл, например, при концентрации около 380 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение ингибирует синтез инозитол трифосфата в клетке, такой как клетка млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка млекопитающего является клеткой человека, такой как клетка миометрия. В некоторых вариантах осуществления, клетка миометрия представляет собой маточный миоцит. В некоторых вариантах осуществления, соединение индуцирует уменьшение амплитуды маточных сокращений у субъекта после введения соединения субъекту. Например, соединение может индуцировать уменьшение от около 40 до около 50% относительно измерения амплитуды маточных сокращений у субъекта, записанной перед введением. В некоторых вариантах осуществления, соединение проявляет период полувыведения у субъекта от около 1 до около 4 ч после введения соединения субъекту. В некоторых вариантах осуществления, соединение достигает максимальной концентрации в плазме у субъекта в течение от около 0,25 до около 2 ч после введения соединения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, пациент представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления, соединение вводят субъекту перорально. В некоторых вариантах осуществления, соединение вводят субъекту внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы (III) проявляет характеристические пики порошковой рентгеновской дифракции около при 7.0° 20, около 8.1° 20, около 10.0° 20, около 20.1° 20, около 21.0° 20, и около 23.5° 20. В некоторых вариантах осуществления соединение дополнительно проявляет пики порошковой рентгеновской дифракции около при 12.0° 20, около 13.1° 20, около 14.1° 20, около 16.4° 20, около 18.4° 20, и около 29.5° 20. В некоторых вариантах осуществления, соединение характеризуется спектром порошковой рентгеновской дифракции, по существу таким, как представлено на любой из фиг. 19.22,29,45-49, и 54. Например, в некоторых вариантах осуществления, соединение характеризуется спектром порошковой рентгеновской дифракции, по существу таким, как изображено на фиг. 49.

В некоторых вариантах осуществления, указаное соединение проявляет пики ¹Н ядерного магнитного резонанса (ЯМР), центрированные около при 1,1 м.ч., около 3,3 м.ч., около 4,9 м.ч., около 5,4 м.ч., около 7,1 м.ч., около 7,7 м.ч., около 7,9 м.ч., и около 8,0 м.ч.. В некоторых вариантах осуществления, соединение характеризуется ¹Н ЯМР спектром, по существу таким, как изображено на фиг. 21.

В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение проявляет эндотерму при от около 145° С до около 147° С, как измеряется с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение проявляет дополнительную эндотерму около при 214°С, как измеряется с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, по существу такой, как изображено на фиг. 20. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение проявляет дополнительную эндотерму около при 228°С, как измеряется с по-

мощью дифференциальной сканирующей калориметрии. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, по существу такой, как изображено на фиг. 23.

В некоторых вариантах осуществления указанное соединение проявляет потерю веса от около 0,2% до около 0,6%, при нагревании от 25 до 100°С, как измеряется с помощью термогравиметрического анализа. В некоторых вариантах осуществления указанное соединение проявляет потерю веса от около 2,5% до около 3,5%, при нагревании от 100 до 160°С, как измеряется с помощью термогравиметрического анализа. В некоторых вариантах осуществления, указаное соединение проявляет кривую термогравиметрического анализа, по существу такую, как изображено на фиг. 24.

Определения

Как используется в настоящей заявке, термин "около" относится к значению, которое находится в пределах 10% выше или ниже указанного значения.

Как используется в настоящей заявке, термин "аффинность" относится к силе связывающего взаимодействия между двумя молекулами, например, лигандом и рецептором. Термин " K_i ", как используется в настоящей заявке, относится к константе ингибирования антагониста для конкретной молекулы, представляющей интерес, и выражается в виде молярной концентрации (M). K_i значения взаимодействий антагонист-мишень могут быть определены, например, используя методы, существующие в данной области техники. Методы, которые можно использовать для определения K_i антагониста для молекулярной мишени, включают эксперименты конкурентного связывания, например, исследования конкурентного связывания радиоактивного лиганда, например, как описано в US 8415480. Термин " K_d ", как используется в настоящей заявке, относится к константе диссоциации, которая может быть получена, например, из соотношения константы скорости диссоциации двух молекул (k_d) к константе скорости ассоциации двух молекул (k_d) и выражается в виде молярной концентрации (M). K_d значения для взаимодействий рецептор-лиганд могут быть определены, например, используя методы, существующие в данной области техники. Методы, которые можно использовать для определения K_d взаимодействия рецептор-лиганд, включают поверхностный плазмонный резонанс, например, путем применения биосенсорной системы, такой как система BIACORE®.

Как используется в настоящей заявке, термин "кортикостероид" относится к любому из стероидных гормонов, продуцируемых корой надпочечников, или их синтетическим аналогам. Типичные кортикостероиды включают, в частности, бетаметазон, дексаметазон, и гидрокортизон, а также их варианты. Кортикостероиды для применения в сочетании с композициями и методами, описанными в настоящей заявке, включают те, которые способны индуцировать созревание легких плода, например, для предотвращения развития респираторного дистресс-синдрома у недоношенных новорожденных. Типичные кортикостероиды для применения в сочетании с композициями и методами, описанными в настоящей заявке, включают те, которые описаны в Jobe и др. Ат. J. Obstet. Gynecol. 190:878-881 (2004) и Miracle и др. J. Pennat. Med. 36:191-196 (2008), раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки.

Как используется в настоящей заявке, термин "кристаллический" или "кристаллическая форма" обозначает, что соединение имеет физическое состояние, которое представляет собой регулярную пространственную решетку атомов, ионов, молекул или молекулярных агрегатов. Кристаллические формы имеют решетчатые структуры структурных элементов, называемых ассиметричными единицами, которые расположены в определенном порядке в соответствии четко выраженной симметрией в единичных ячейках, которые повторяются в трех измерениях. В отличие от этого, термин "аморфный" или "аморфная форма" относится к неорганизованной (неупорядоченной) структуре. Физическое состояние терапевтического соединения может быть определено с помощью типичных методик, таких как рентгеноструктурный анализ, микроскопия в поляризованном свете и/или дифференциальная сканирующая калориметрия.

Как используется в настоящей заявке, термин "эндогенный" описывает молекулу (например, полипептид, нуклеиновую кислоту или кофактор), которая обнаружена в естественных условиях в конкретном организме (например, человеке) или в конкретной локализации в организме (например, органе, ткани, или клетке, такой как клетка человека).

Как используется в настоящей заявке, термин "экзогенный" описывает молекулу (например, полипептид, нуклеиновую кислоту или кофактор), которая не обнаружена в естественных условиях в конкретном организме (например, человеке) или в конкретной локализации в организме (например, органе, ткани, или клетке, такой как клетка человека). Экзогенные материалы включают те, которые обеспечиваются из внешнего источника для организма или культивируемый материал, экстрагируемый из них.

Как используется в настоящей заявке, термин "гестационный возраст" описывает, как долго продолжается конкретная беременность, и измеряется от первого дня последнего менструального цикла беременной особи женского пола до настоящей даты. Как используется в настоящей заявке, термин "роды" (который также может обозначаться как рождение) относится к изгнанию плода и плаценты из матки беременной особи женского пола. Для нормальной беременности, роды могут происходить в гестационном возрасте около 40 недель. "Преждевременные роды", как используется в настоящей заявке, относится к состоянию, при котором роды наступают ранее, чем за три недели до полного гестационного периода, который обычно составляет около 40 недель. Таким образом, преждевременные роды происходят на любой стадии перед, например, 38 неделей гестации. Преждевременные роды обычно приводят к наступлению родов или физиологических изменений, связанных с родами у беременной особи женского пола, если не проводить лечение. Преждевременные роды могут быть ассоциированы или не ассоциированы с вагинальным кровотечением или разрывом маточных мембран. Преждевременные роды также могут обозначаться как преждевременное окончание беременности. Предотвращение преждевременных родов у субъекта будет пролонгировать термин беременности и, следовательно, может избежать преждевременного родоразрешения, уменьшая, таким образом, риск неонатальной смертности и заболеваемости.

Как используется в настоящей заявке, термин " IC_{50} " относится к концентрации вещества (антагониста), которая уменьшает эффективность сравнительного агониста или конститутивную активность биологической мишени на 50%, например, как измеряют в конкурентном анализе связывания с лигандом. Типичные конкурентные анализы связывания с лигандом включают, в частности, конкурентные анализы связывания с радиоактивно-меченным лигандом, конкурентные твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), и анализы на основе анизотропии флуоресценции, известные в данной области техники.

Как используется в настоящей заявке в контексте обеспечения или введения двух или больше терапевтических средств субъекту, фраза "в комбинации с" относится к доставке двух или больше терапевтических средств субъекту (например, субъекту-млекопитающему, например, человеку), например, либо одновременно или в различное время. Например, одно терапевтическое средство может вводиться субъекту в комбинации с другим путем введения обоих агентов субъекту одновременно, например, в одной фармацевтической композиции или в отдельных композициях, которые вводятся субъекту одновременно (например, с помощью различных путей введения). В другом примере, одно терапевтическое средство может вводиться субъекту в комбинации с другим путем первого введения субъекту одного терапевтического средства, либо таким же путем введения или другим путем введения.

Как используется в настоящей заявке, термин "ноласибан" относится к (3Z,5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3-он О-метилоксиму, который представлен следующей структурной формулой:

Варианты, составы, и кристаллическая форма ноласибана описаны, например, в патенте США № 7115754 и опубликованной заявке на патент США № 2015/0073032; 2015/0164859; и 2016/0002160, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки.

Как используется в настоящей заявке, термин "пероральная биодоступность" относится к фракции вводимого соединения субъекту, например, млекопитающему (например, человеку), которая достигает системного кровотока у субъекта, и которая не депонируется в нецелевом органе или экскретируется без абсорбции через желудочно-кишечный тракт. Термин относится к концентрации в плазме крови, которая интегрирована во времени и типично выражается в виде процента перорально введенной дозы.

Как используется в настоящей заявке, термин "антагонист рецептора окситоцина" или "антагонист окситоцина" относится к соединению, способному ингибировать взаимодействие между окситоцином и рецептором окситоцина, например, таким образом, что активность одной или нескольких нижерасположенных сигнальных молекул в каскаде передачи сигналов окситоцина ингибируется. Антагонисты окситоцина для применения в композициях и способах, описанных в настоящей заявке, включают соединения, которые связывают и ингибируют рецептор окситоцина, например, в частности, атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан и ноласибан, а также их варианты, составы, кристаллические формы и производные, включая те, которые описаны в настоящей заявке.

Как используется в настоящей заявке, термин "фармацевтически приемлемый" относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или дозированным формам, которые пригодны для контактирования с тканями субъекта, например, млекопитающего (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и других проблемных осложнений, соразмерных с приемлемым соотношением польза/риск.

Как используется в настоящей заявке, термин "фармацевтическая композиция" обозначает смесь, содержащую терапевтическое соединение для введения субъекту, например, млекопитающему, например, человеку, для предотвращения, лечения или контроля конкретного заболевания или состояния, поражающего млекопитающее, например, в особенности, преждевременных родов или дисменореи, например, как описано в настоящей заявке.

Как используется в настоящей заявке, термин "защитная группа" относится к химическому компоненту, который, при связывании с функциональной группой, придает функциональной группе инертность к одной или нескольким химическим реакциям. Такие реакции могут модифицировать один или большее количество заместителей в соединении и, при отсутствии защитной группы, будут приводить к нежелательной химической модификации (например, электроноакцепторное добавление, сольволиз, окисление, восстановление, или взаимное превращение функциональных групп) компонента, представляющего интерес (например, амино, гидроксильного, карбоксильного или карбоксамидного компонента). Защитные группы могут, в подходящие момент времени, химически реагировать таким образом, что восстанавливается исходная функциональная группа. Идентичность защитной группы может быть выбрана таким образом, чтобы быть совместимой с остальной частью молекулы, например, таким образом, что защитная группа не удаляется при последующих стадиях синтеза или модификации молекулы, и необязательно, таким образом, что реакционные условия, используемые для эффективного удаления защитной группы, не приводят к удалению других защитных групп, расположенных на других заместителях в молекуле. Типичные защитные группы включают те группы, которые могут быть ковалентно связаны, например, с амино заместителем, например, аминогруппой а-сложного аминоэфира. Последующее удаление защитной группы, обозначаемое в настоящей заявке как "снятие защиты" с химического компонента, можно осуществлять, используя реагенты и условия, известные в данной области техники. Примеры защитных групп включают, в частности, но не ограничиваясь только ими, бензил, ацетил, оксиацетил, кар-9-флуоренилоксикарбонил, 2-хлор-1-инданилметоксикарбонил, метоксикарбонил, 2-(трет-бутилсульфонил)-2-пропенилоксикарбонил, бензотиофен сульфон-2-метилкарбонил, трет-бутоксикарбонил, трет-амилоксикарбонил, β-триметилсилилэтилоксикарбонил, адамантилоксикарбонил, 1-метилциклобутилоксикарбонил, 2-(n-бифенилил)пропил-2-оксикарбонил, 2-(nфенилазофенил)пропил-2-оксикарбонил, 2-2-диметил-3,5-диметилоксибензилоксикарбонил, 2-фенилпропил-2-оксикарбонил, бензилоксикарбонил, n-толуолсульфониламинокарбонил, о-нитрофенилсульфенил, дитиасукциноил, фталоил, пиперидинооксикарбонил, формил, трифторацетил, 2,4,6-триметоксибензил, 2,3,6-триметил-4 метоксибензолсульфонил, трет-бутоксиметил, пентаметилхромансульфонил, адамантли, β-триметилсилилэтил, β-триметилилилэтилоксикарбонил, трет-бутил, трет-бутилбензил, циклопентил, трифенилметил, бензилоксикарбонил, формил, и трифторацетил. Защитные группы могут быть подходящими для конкретного химического заместителя. Например, примеры гидроксильных защитных групп включают, но не ограничиваясь только ими, бензил, п-метоксибензил, п-нитробензил, аллил, тритил, диалкилсилиловые простые эфиры, например, диметилсилиловый простой эфир, и триалкилсилиловые простые эфиры, такие как триметилсилиловый простой эфир, и триэтилсилиловый простой эфир, и трет-бутилдиметилсилиловый простой эфир; сложные эфиры, такие как бензоил, ацетил, фенилацетил, формил, моно-, ди-, и тригалоацетил, такой как хлорацетил, дихлорацетил, трихлорацетил, трифторацетил; и карбонаты, такие как метил, этил, 2,2,2-трихлорэтил, аллил, бензил, и п-нитрофенил. Дополнительные примеры защитных групп можно найти, например, в Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2-ое изд., 1991, John Wiley & Sons, а также в McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, 1975, Plenum Press, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки. Другие примеры защитных групп описаны, например, в патентах США№№ 3835175; 4508657; 3839396; 4581167; 4460501; и 4108846, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки.

Как используется в настоящей заявке в контексте терапевтического лечения, термины "вводится" и "вводиться" относятся к доставке терапевтического средства субъекту (например, субъекту-млекопитающему, например, человеку) нуждающемуся в лечении, например, субъекту, подверженному или имеющему риск развития преждевременных родов. Терапевтическое средство может вводиться субъекту, который в этом нуждается, например, путем непосредственного введения терапевтического средства субъекту, или путем введения пролекарства, которое превращается іп vivo в терапевтическое средство при введении пролекарства субъекту. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваясь только ими, сложные эфиры, фосфаты и другие химические функциональные группы, чувствительные к гидролизу при введении субъекту. Пролекарства включают те, которые известны в данной области техники, например, те, которые описаны, например, в Vig и др., Adv. Drug Deliv. Rev. 65:1370-1385 (2013), и Ниttunen и др., Pharmacol. Rev. 63:750-771 (2011), раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки.

Как используется в настоящей заявке, термин "образец" относится к пробе (например, крови, компонента крови (например, сыворотке или плазме), моче, слюне, амниотической жидкости, спинномозговой жидкости, ткани (например, плаценты или кожи), панкреатического сока, проб ворсин хориона, и клеток), выделенных из субъекта.

Как используется в настоящей заявке, фразы "специфически связывается" и "связывается" относится к реакции связывания, которая является определяющей присутствия конкретного белка в гетерогенной популяции белков и других биологических молекул, которые распознаются, например, лигандом со специфичностью. Лиганд (например, белок, протеогликан, или гликозаминогликан), который специфически связывается с белком, будет связываться с белком, например, с K_D меньше, чем 100 нМ. Например, лиганд, который специфически связывается с белком, может связываться с белком с K_D вплоть до 100 нМ (например, в диапазоне от 1 пМ до 100 нМ). Лиганд, который не проявляет специфического связывания с белком или его доменом, будет проявлять K_D больше, чем 100 нМ (например, больше, чем 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ, 1 мкМ, 100 мкМ, 500 мкМ, или 1 мМ) для этого конкретного белка или его домена. Различные форматы анализов могут использоваться для определения аффинности лиганда к специфическому белку. Например, твердофазные ELISA анализы общепринято используются для идентификации лигандов, которые специфически связываются с целевым белком. См., например, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1988) и Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York (1999), относительно описания форматов анализов и условий, которые можно использовать для определения специфического связывания белков.

Как используется в настоящей заявке, термины "субъект" и "пациент" являются взаимозаменяемыми и относятся к организму, который получает лечения от конкретного заболевания или состояния, как описано в настоящей заявке (такие как преждевременные роды или дисменорея) или у которого диагностировано наличие заболевания или состояния в соответствии со способами, описанными в настоящей заявке. Примеры субъектов и пациентов включают млекопитающих, например, людей, получавших лечения от заболеваний или состояний, например, преждевременных родов на раннем гестационном возрасте (например, 24-34 недели).

Соединение, солевая форма, кристаллический полиморф, терапевтическое средство или другая композиция, как описанные в настоящей заявке, могут обозначаться как такие, которые характеризуются графическими данными "по существу, как представлено на" фигуре. Такие данные могут включать, но не ограничиваясь только ими, например, порошковые рентгеновские дифрактограммы, ЯМР спектры, кривые дифференциальной сканирующей калориметрии, и кривые термогравиметрического анализа. Как известно в данной области техники, такие графические данные могут обеспечивать дополнительную техническую информацию для дальнейшего определения соединения, солевой формы, кристаллического полиморфа, терапевтического средства или другой композиции. Как подразумевается квалифицированным специалистом в данной области техники, такие графические представления данных могут подвергаться небольшим вариациям, например, для относительных интенсивностей пиков и положений пиков вследствие таких факторов, как вариации в характеристиках приборов и вариациях для концентрации и чистоты образцов. Тем не менее, квалифицированный специалист в данной области техники легко сможет сравнить графические данные на фигурах в настоящей заявке с графическими данными, генерированными для соединения, солевой формы, кристаллического полиморфа, терапевтического средства или другой композиции и подтвердить, будут ли два набора графических данных характеризовать один и тот же материал или два различных материала. Например, кристаллическая форма (3S)-3-({[(2S)-3-(бифенил-4-илсульфонил)-1,3-тиазолидин-2-ил]карбонил}амино)-3-(4-фторфенил)пропил L-валинат гидрохлорида обозначается в данной заявке как такая, которая характеризуется графическими данными "по существу, как представлено на" фигуре, следовательно, будет пониматься как включающая любую кристалличе-(3S)-3-({[(2S)-3-(бифенил-4-илсульфонил)-1,3-тиазолидин-2-ил]карбонил}-амино)-3-(4фторфенил)пропил L-валинат гидрохлорида, которая характеризуется графическими данными, необязательно имеющими одно или большее количество небольших вариаций, например, одно или большее количество вариаций, описанных выше или известных специалисту в данной области техники.

Как используется в настоящей заявке, термины "лечить" или "лечение" относится к терапевтическому лечению, при котором у объекта предотвращают или замедляют (уменьшают) нежелательное физиологическое изменение или нарушение, например, прогрессирование преждевременных родов в раннем гестационном возрасте (например, 24-34 недели). Благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваясь только ими, ослабление симптомов, таких как вагинальное кровотечение или разрушение мембраны, и задержка или замедление родов. Те особи, которые нуждаются в лечении, включают, например, беременные особи женского пола, у которых уже начинаются преждевременные роды, а также те, которые предрасположены к развитию этого состояния.

Как используется в настоящей заявке, термин "токолитическое средство" относится к веществу, способному замедлять начало родов у субъекта (например, субъекта-млекопитающего, например, человека). Токолитические средства могут действовать путем подавления сократительной способности матки, например, путем повышения цитоплазматических уровней цАМФ и ингибирования мобилизации внутриклеточного Ca²⁺. Тчнипиые токолитические средства описаны, например, в Haas и др. Int. J. Womens Health. 6:343-349 (2014), раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки. Токолитические средства для применения в сочетании с композициями и методами, описанными в настоящей заявке, включают, но не ограничиваясь только ими, вещества, перечисленные в табл.1, ниже.

Таблица 1. Типичные токолитические средства

Фармакологический	Типичные	Ссылка	
класс	токолитические		
	средства		
Бетамиметики	Тербуталин, ритодрин,	Conde-Agudelo и др. Am.	
	гексопреналин,	J. Obstet. Gynecol. 204:e1-	
	альбутерол, фенотерол,	e20 (2011);	
	нилидрин, орципреналин	Creasy и др. Creast and	
		Resnik's Maternal Fetal	
		Medicine: Principles and	
		Practice. Ed. 6.	
		Philadelphia, PA (2009)	
Блокаторы кальциевых	Дигидропиридины,	Nassar и др. Am. J.	
каналов	например, нифедипин,	Perinatol. 281:57-66	
	никардипин	(2011)	
Соли магния	Сульфат магния	Mercer и др. Obstet.	
		Gynecol. 114:650-668	
		(2009)	
Антагонисты рецептора	атосибан, ретосибан,	Papatsonis и др. Cochrane	
окситоцина	барусибан, эпельсибан,	Database Syst. Rev.	
	ноласибан	3:CD004452 (2005)	
Доноры оксида азота	Нитроглицерин	Duckitt и др. Cochrane	
		Database Syst. Rev.	
		3:CD002860 (2002)	

Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет собой график, на котором продемонстрировано влияние соединения II и соединения III на самопроизвольную сократительную способность матки у беременных крыс на поздних сроках после внутривенного введения.

Фиг. 2 представляет собой график, на котором показано дозозависимое и обратимое влияние соединения I на самопроизвольное сокращение матки у беременных крыс на поздних сроках.

Фиг. 3 представляет собой график, на котором продемонстрировано влияние соединения II и соединения III на самопроизвольную сократительную способность матки у беременных крыс на поздних сроках после перорального введения.

Фиг. 4 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные различных способов, используемых для получения свободного основания соединения I, а также наблюдений относительно физических характеристик и ЯМР спектров соединения I, как получено с помощью каждого способа.

Фиг. 5 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные различных способов, используемых для получения солей соединения I, а также наблюдений относительно физических характеристик и ЯМР спектров этих солей, как получено с помощью каждого способа.

Фиг. 6 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные физических характеристик, а также спектров порошковой рентгеновской дифракции (XRPD) различных солей соединения I.

Фиг. 7 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные способов, используемых для получения кристаллических форм различных солей соединения I, а также наблюдений относительно физических характеристик и XRPD спектров каждой кристаллической формы.

Фиг. 8 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные растворимости различных солей соединения I в водном растворе.

Фиг. 9 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные стабильности кристаллических форм различных солей соединения I при указанной относительной влажности (OB).

Фиг. 10 представляет собой таблицу, в которой обобщены различные характеристики соединения III, как определено с помощью порошковой рентгеновской дифракции (XRPD), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), термогравиметрического (ТG) анализа, сорбции/десорбции влаги (МВ), и ¹Н ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Фиг. 11 представляет собой таблицу, в которой обобщены различные характеристики гидросульфатной соли соединения I, как определено с помощью порошковой рентгеновской дифракции (XRPD), дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), термогравиметрического (ТG) анализа, и 1 H ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

- Фиг. 12 показывает XRPD спектр мезилатной соли соединения I.
- Фиг. 13 показывает ¹Н ЯМР спектр мезилатной соли соединения I.
- Фиг. 14 показывает XRPD спектр свободного основания соединения I.
- Фиг. 15 показывает ¹Н ЯМР спектр свободного основания соединения I.
- Фиг. 16 показывает рамановский инфракрасный спектр свободного основания соединения I.
- Фиг. 17 показывает ¹Н ЯМР спектр мезилатной соли соединения І. Мезилатную соль приготавливали путем добавления метансульфоновой кислоты к раствору свободного основания соединения І в простом диэтиловом эфире.
- Фиг. 18 показывает серии ¹Н ЯМР спектра свободного основания соединения I, записанные с использованием гомоядерных экспериментов разъединения.
- Фиг. 19 показывает серии XRPD спектра хлоридной соли соединения I, как получено из ацетоновой взвеси (вверху), при упаривании из смеси метиленхлорид:этиловый простой эфир (вторая сверху), и при медленном упаривании смеси 1:1 ацетон:толуол (вторая снизу и нижняя).
- Фиг. 20 показывает перекрытие кривой дифференциальной сканирующей калориметрии (в диапазоне от около -0,5 до около 1,3 Bt/r) и кривой термогравиметрического анализа (в диапазоне от около 0% до около 100% по весу), записанной для хлоридной соли соединения I, как получено из ацетоновой взвеси.
- Фиг. 21 показывает ¹Н ЯМР спектр хлоридной соли соединения I, как получено из смеси 1:1 ацетон: толуол.
- Фиг. 22 показывает серии XRPD спектров хлоридной соли соединения I, как получено из ацетоновой взвеси (вверху) и после высушивания в вакууме около при 50°C в течение 1 дня (внизу).
- Фиг. 23 показывает перекрытие кривой дифференциальной сканирующей калориметрии (в диапазоне от около -1,0 до около 0,2 Вт/г) и кривой термогравиметрического анализа (в диапазоне от около 30% до около 100% по весу), записанной для хлоридной соли соединения I в вакууме около при 50°C в течение 1 дня.
- Фиг. 24 показывает перекрытие кривых термогравиметрического анализа хлоридной соли соединения I, как получено из ацетоновой взвеси (вверху) и после высушивания в вакууме около при 50° C в течение 1 дня (внизу).
- Фиг. 25 показывает перекрытие кривых дифференциальной сканирующей калориметрии, записанной для хлоридной соли соединения I, как получено из ацетоновой взвеси (вверху) и после высушивания в вакууме около при 50° С в течение 1 дня (внизу).
- Фиг. 26 показывает кривые сорбции/десорбции влаги, записанной для хлоридной соли соединения І. Значения на оси У показывают процент изменения веса хлоридной соли в зависимости от относительной влажности (ОВ) в атмосфере, окружающей соль.
- Фиг. 27 представляет собой таблицу, в которой представленные данные, полученные при экспериментах сорбции/десорбции влаги, которые осуществляли с хлоридной солью соединения I.
- Фиг. 28 показывает кривую сорбции/десорбции влаги, записанную для хлоридной соли соединения I. Значения на оси Y показывают процент изменения веса хлоридной соли в зависимости от времени, в течение которого изменяется относительная влажность в атмосфере, окружающей соль.
- Фиг. 29 показывает перекрытия XRPD спектров хлоридной соли соединения I после (вверху) и перед осуществлением экспериментов (внизу) сорбции/десорбции влаги.
- Фиг. 30 показывает перекрытие XRPD спектра фумаратной соли соединения I, полученного путем медленного упаривания смеси 1:1 метанол:толуол (вверху) и XRPD фумаровой кислоты (внизу).
- Фиг. 31 показывает перекрытие XRPD спектра дигидрофосфатной соли соединения I (вверху) и XRPD гидросульфатной соли соединения I (внизу).
- Фиг. 32 показывает перекрытие кривой дифференциальной сканирующей калориметрии (в диапазоне от около -1,9 до около 0 Вт/г) и кривой термогравиметрического анализа (в диапазоне от около 25% до около 95% по весу), записанной для гидросульфатной соли соединения I.
 - Фиг. 33 показывает ¹Н ЯМР спектр гидросульфатной соли соединения I.
 - Фиг. 34 показывает ¹Н ЯМР спектр сульфатной соли соединения I.
 - Фиг. 35 показывает XRPD спектр мезилатной соли соединения I.
 - Фиг. 36 показывает XRPD спектр цитратной соли соединения I.
 - Фиг. 37 показывает XRPD спектр эдизилатной соли соединения I.
 - Фиг. 38 показывает XRPD спектр гидросульфатной соли соединения I.
- Фиг. 39 показывает XRPD спектр цитратной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:2 метанол:толуол.
- Фиг. 40 показывает XRPD спектр гидросульфатной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 6:1 этилацетатгептан.
- Фиг. 41 показывает XRPD спектр гидросульфатной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси этилацетат.
 - Фиг. 42 показывает XRPD спектр дигидрофосфатной соли соединения I, как получено путем мед-

ленного упаривания смеси 1:2 метанол:ацетонитрил.

Фиг. 43 показывает XRPD спектр дигидрофосфатной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:1 метил этил кетон:н-бутил ацетат.

Фиг. 44 показывает XRPD спектр, записанный из дублирующего XRPD эксперимента дигидрофосфатной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:1 метил этил кетон:н-бутил ацетат.

Фиг. 45 показывает XRPD спектр хлоридной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:1 ацетон:толуол.

Фиг. 46 показывает XRPD спектр, записанный из дублирующего XRPD эксперимента хлоридной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:1 ацетон:толуол.

Фиг. 47 показывает XRPD спектр хлоридной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси простой диэтиловый эфир:метиленхлорид.

Фиг. 48 показывает XRPD спектр хлоридной соли соединения I, как получено из ацетоновой взвеси.

Фиг. 49 показывает XRPD спектр хлоридной соли соединения I после вакуумной сушки.

Фиг. 50 показывает XRPD спектр фумаратной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:1 метанол:толуол.

Фиг. 51 показывает XRPD спектр фумаратной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:1 метанол:этилацетат.

Фиг. 52 показывает XRPD спектр фумаратной соли соединения I, как получено путем вакуумной сушкисмеси 1:1 метанол:толуол.

Фиг. 53 показывает XRPD спектр эдизилатной соли соединения I, как получено путем медленного упаривания смеси 1:1:1 метанол:метил этил кетон: толуол.

Фиг. 54 показывает перекрытия XRPD спектров хлоридной соли соединения I перед (внизу) и после (вверху) хранения при 40° С и 75% относительной влажности.

Фиг. 55 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные стабильности мезилатной соли соединения I и соединение II в буфере, используемом для экспериментов проникновения Сасо-2: сбалансированный буферный солевой раствор Хенкса (HBSS), 2% конечная концентрация ДМСО.

Фиг. 56а представляет собой таблицу, в которой описанные данные, полученные при анализе способности мезилатной соли соединения I проходить из апикального в базолатеральный компартмент transwell, покрытых монослоем Caco-2 клеток. Культивируемые Caco-2 клетки инкубировали с указанной концентрацией мезилатной соли соединения I в апикальном компартменте transwell, и отбирали аликвоты из базолатерального компартмента в указанные промежутки времени отбора проб для определения присутствия соединения I или соединения II. Данные описывают концентрацию соединения II в базолатеральном компартменте в процентах от указанной исходной концентрации мезилатной соли соединения I

Фиг. 56b представляет собой таблицу, в которой описанные данные, полученные при анализе способности мезилатной соли соединения I проходить из базолатерального в апикальный компартмент transwell, покрытых монослоем Caco-2 клеток. Культивируемые Caco-2 клетки инкубировали с указанной концентрацией мезилатной соли соединения I в базолатеральном компартменте transwell, и отбирали аликвоты из апикального компартмента в указанные промежутки времени отбора проб для определения присутствия соединения I или соединения II. Данные описывают концентрацию соединения II в базолатеральном компартменте в процентах от указанной исходной концентрации мезилатной соли соединения I.

Фиг. 56с представляет собой график, на котором показано относительную концентрацию соединения II в базолатеральном компартменте в процентах от исходной концентрации мезилатной соли соединения I в апикальном компартменте.

Фиг. 56d представляет собой график, на котором показано относительную концентрацию соединения II в апикальном компартменте в процентах от исходной концентрации мезилатной соли соединения I в базолатеральном компартменте. Соединение I не было обнаружено в базолатеральном компартменте после инкубирования в течение 60 или 120 мин в апикальном компартменте. Дополнительно, соединение I не было обнаружено в апикальном компартменте после инкубирования в течение 60 или 120 мин в базолатеральном компартменте. В отличие от этого, соединение II было обнаружено в каждом случае.

Фиг. 56е представляет собой таблицу, в которой показано восстановление соединения I в апикальном компартменте после инкубирования в течение 120 мин. Исходное соединение преимущественно восстанавливалось в форме деэстерифицированного варианта, соединения II.

Фиг. 58а представляет собой таблицу, в которой описанные данные, полученные при анализе способности мезилатной соли соединения I проходить из апикального в базолатеральный компартмент transwell, покрытых монослоем Caco-2 клеток. Культивируемые Caco-2 клетки инкубировали с указанной концентрацией мезилатной соли соединения I в апикальном компартменте transwell, и отбирали аликвоты из базолатерального компартмента в указанные промежутки времени отбора проб для определения присутствия соединения I или соединения II. Данные описывают концентрацию соединения II в базолатеральном компартменте в процентах от указанной исходной концентрации мезилатной соли соединения I. Соединение I не было обнаружено в базолатеральном компартменте после инкубирования в течение 60 или 120 минут в апикальном компартменте.

Фиг. 58b представляет собой график, на котором показано относительную концентрацию соединения II в базолатеральном компартменте в процентах от исходной концентрации мезилатной соли соединения I в апикальном компартменте.

Фиг. 58с представляет собой таблицу, в которой показано восстановление соединения I в апикальном компартменте после инкубирования в течение 120 мин. Исходное соединение преимущественно восстанавливалось в форме деэстерифицированного варианта соединения, соединения II.

Фиг. 59 представляет собой таблицу, в которой обобщены данные параметров хроматографии и масс-спектрометрии, используемых для анализа концентрации соединения I и соединения II в экспериментах проникновения через Сасо-2 клетки, описанные в настоящей заявке.

Фиг. 60а представляет собой график, иллюстрирующий фракционную жизнеспособность потомства CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или липополисахарида (LPS) в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего. Звездочка обозначает р значение p<0,05. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни относительно соответствующей группы.

Фиг. 60b представляет собой график, иллюстрирующий количество жизнеспособного и нежизнеспособного потомства CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 61а представляет собой график, иллюстрирующий время от индукции до рождения первого плода для CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего.

Фиг. 61b и 61c представляют собой графики, иллюстрирующие время от индукции до завершения родов среди CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения вдоль оси Y обозначают пропорцию CD-1 мышей, у которых завершились роды. На каждой фигуре звездочка обозначает р значение p<0,05. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни или логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 62а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно) и нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально) на фракционную жизнеспособность потомков CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или липополисахарида (LPS) в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего. Звездочка обозначает р значение p<0,05; "нд" обозначает р значение p>0,05. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни или непарный двусторонний t-критерий Стьюдента по сравнению с соответствующей группой с наполнителем.

Фиг. 62b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно) и нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально) на количество жизнеспособного и нежизнеспособного потомства CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 63а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния соединения III (10 мг/кг, 30 мг/кг, и 100 мг/кг, вводимого перорально) на фракционную жизнеспособность потомков CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего, "нд" обозначает р значение p>0,05. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни по сравнению с соответствующей группой с наполнителем.

Фиг. 63b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния соединения III (10 мг/кг, 30 мг/кг, и 100 мг/кг, вводимого перорально) на количество жизнеспособного и нежизнеспособного потомства CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 или LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 64а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на фракционную жизнеспособность потомков CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего, "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы; "НД" обозначает р значение р>0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 64b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на количество жизнеспособного и нежизнеспособного потомства CD-1 мышей, леченных с помощью RU486

в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 65а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на время от индукции до рождения первого плода для CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего. Три звездочки обозначают р значение p<0,001 относительно соответствующей группы; две звездочки обозначают р значение p<0,01 относительно соответствующей группы. Нифедипин, соединение III, и их комбинация проявляют р значения p=0,0576, p=0,0601, и p<0,001 (обозначенные символом "\$\$\$"), соответственно, по сравнению с группой, которую лечили наполнителем отдельно. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни или непарный двусторонний t-критерий Стьюдента по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 65b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на время от индукции до завершения родов среди CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения вдоль оси Y обозначают пропорцию CD-1 мышей, у которых завершились роды.

Фиг. 65с представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для наполнителя и их комбинации, представленной на фиг. 65b. Три звездочки обозначают р значение p<0,001 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 65d представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для соединения III и их комбинации, представленной на фиг. 65b. Три звездочки обозначают р значение p<0,001 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 65е представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для нифедипина и их комбинации, представленной на фиг. 65b. Две звездочки обозначают р значение p<0,01 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 66а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на фракционную жизнеспособность потомков CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего, "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы; "НД" обозначает р значение р>0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 66b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на количество жизнеспособного и нежизнеспособного потомства CD-1 мышей, леченный с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 67а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на время от индукции до рождения первого плода для CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего, "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы; "НД" обозначает р значение р>0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем. Атосибан, соединение III, и их комбинация проявляют р значения р>0,05, р=0,0601, и р>0,05, соответственно, по сравнению с группой с наполнителем. Статистический анализ осуществляли, используя непарный двусторонний t-критерий Стьюдента по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 67b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на время от индукции до завершения родов среди CD-1 мышей, леченных с помощью RU486 в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения вдоль оси У обозначают пропорцию CD-1 мышей, у которых завершились роды.

Фиг. 67с представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для наполнителя и их комбинации, представленной на фиг. 67b. "нд" обозначает р значение p>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя лога-

рифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 67d представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для соединения III и их комбинации, представленной на фиг. 67b. Их комбинация проявляет р значение p=0,0832 относительно комбинации с соединением III. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 67е представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для атосибана и их комбинации, представленной на фиг. 67b. "нд" обозначает р значение p>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 68а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (10 мг/кг, 30 мг/кг, и 100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинаций на фракционную жизнеспособность потомков CD-1 мышей, леченных с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего, "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы; "НД" обозначает р значение р>0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем. Группа с нифедипином проявляет р значение р=0,0859 по сравнению с группой, которую лечили наполнителем отдельно. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни или непарный двусторонний t-критерий Стьюдента по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 68b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (10 мг/кг, 30 мг/кг, и 100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинаций на количество жизнеспособного и нежизнеспособного потомства CD-1 мышей, леченный с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 69а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинаций на время от индукции до рождения первого плода для CD-1 мышей, леченный с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего. Две звездочки обозначают р значение p<0,01 относительно соответствующей группы, как оценивали с помощью теста Манна-Уитни относительно соответствующей группы; "нд" обозначает р значение p>0,05 относительно соответствующей группы; "НД" обозначает р значение p>0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем, как оценивали с помощью непарного двустороннего t-критерия Стьюдента относительно соответствующей группы; "без тестирования" обозначает, что для указанной пары не проводили статистического тестирования.

Фиг. 69b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (10 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинаций на время от индукции до завершения родов среди CD-1 мышей, леченных с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 69с представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (30 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинаций на время от индукции до завершения родов среди CD-1 мышей, леченных с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 69d представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния нифедипина (5 мг/кг, вводимого перорально), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинаций на время от индукции до завершения родов среди CD-1 мышей, леченных с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 69е представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для наполнителя и их комбинации, представленной на фиг. 69b. "нд" обозначает р значение p>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 69f представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для соединения III и их комбинации, представленной на фиг. 69b. Две звездочки обозначают р значение p<0,01 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 69g представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для нифедипина и их комбинации, представленной на фиг. 69b. "нд" обозначает р значение p>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 69h представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рож-

дения плодов для наполнителя и их комбинации, представленной на фиг. 69с. "нд" обозначает р значение p>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 69і представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для соединения III и их комбинации, представленной на фиг. 69с. "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 69ј представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для нифедипина и их комбинации, представленной на фиг. 69с. "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 69k представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для наполнителя и их комбинации, представленной на фиг. 69d. "нд" обозначает р значение p>0.05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 691 представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для соединения III и их комбинации, представленной на фиг. 69d. "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 69m представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для нифедипина и их комбинации, представленной на фиг. 69d. "нд" обозначает р значение p>0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий относительно соответствующей группы.

Фиг. 70а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на фракционную жизнеспособность потомков CD-1 мышей, леченных с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего, "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы; "НД" обозначает р значение р>0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни или непарный двусторонний t-критерий Стьюдента по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 70b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на количество жизнеспособного и нежизнеспособного потомства CD-1 мышей, леченный с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 71а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на время от индукции до рождения первого плода для CD-1 мышей, леченный с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды. Значения представляют собой среднее значение плюс/минус стандартная погрешность среднего, "нд" обозначает р значение р>0,05 относительно соответствующей группы; "НД" обозначает р значение р>0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем; "\$" обозначает р значение р<0,05 по сравнению с соответствующей группой с наполнителем. Их комбинация проявляет р значение р=0,0909 по сравнению с группой, леченной атосибаном отдельно. Статистический анализ осуществляли, используя тест Манна-Уитни или непарный двусторонний t-критерий Стьюдента по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 71b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния атосибана (300 мг/кг, который вводили подкожно), соединения III (100 мг/кг, вводимого перорально), и их комбинации на время от индукции до завершения родов среди CD-1 мышей, леченных с помощью LPS в гестационном возрасте 17 дней таким образом, чтобы индуцировать роды.

Фиг. 71с представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для наполнителя и их комбинации, представленной на фиг. 71b. Две звездочки обозначают р значение p<0,01 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 71d представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для соединения III и их комбинации, представленной на фиг. 71b. Их комбинация проявляет р значение p=0,0964 относительно комбинации с соединением III. Статистический анализ осуществляли, используя логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 71е представляет собой график, на котором показано время от индукции до завершения рождения плодов для атосибана и их комбинации, представленной на фиг. 71b. Звездочка обозначает р значение p<0,05 относительно соответствующей группы. Статистический анализ осуществляли, используя

логарифмический ранговый критерий по сравнению с соответствующей группой, представляющей интерес.

Фиг. 74а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на частоту PGF2α-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Муograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня частоты самопроизвольных сокращений. Измерения частоты самопроизвольных сокращений представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан ("Ato") затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на частоту сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Ato." Влияния атосибана на частоту сокращений в присутствии PGF2α впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций PGF2 (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGF2 α 1 нМ," "PGF2 α 10 нМ," и "PGF2 α 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой частоту сокращений в процентах от частоты самопроизвольных исходных сокращений. Звездочка обозначает р значение p<0,05 по сравнению с ДМСО контролем.

Фиг. 74b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на работу, выполненную на сокращение (площадь под кривой, или "AUC") РОР2α-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня самопроизвольной работы, выполненной на сокращение. Измерения самопроизвольной работы, выполненной на сокращение, представлены на оси Х в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на работу, выполненную на сокращение, измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Ato." Влияния атосибана на работу, выполненную на сокращение в присутствии PGF2α впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций PGF2 (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGF2α 1 нМ," "PGF2α 10 нМ," и "PGF2α 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой работу, выполненную на сокращение, в процентах от работы, выполненной на сокращение, для самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 74с представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на амплитуду пика РСР2 синдуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектовженщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTS™) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня амплитуды пика самопроизвольных сокращений. Измерения амплитуды пика самопроизвольных сокращений представлены на оси Х в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на амплитуду пика сокращений измеряли в течение последующего 10минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Аto." Влияния атосибана на амплитуду пика сокращений в присутствии PGF2α впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций PGF2α (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGF2α 1 нМ," "PGF2α 10 нМ," и "PGF2α 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой амплитуду пика сокращений в процентах от амплитуды пика самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 74d представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на продолжительность PGF2α-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектовженщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTS™) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня продолжительности самопроизвольных сокращений. Измерения продолжительности самопроизвольных сокращений представлены на оси X в виде "Самопр."

ДМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на продолжительность сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Ato." Влияния атосибана на продолжительность сокращений в присутствии PGF2 α впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций PGF2 α (1 нM, 10 нM, и 100 нM) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGF2 α 1 нМ," "PGF2 α 10 нМ," и "PGF2 α 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси Y представляют собой продолжительность сокращений в процентах от продолжительности самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 74е представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на общую работу, выполненную при всех сокращениях (сумма площади под кривой для всех сокращений) для PGF2α-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня работы, выполненной для всех самопроизвольных сокращений. Измерения работы, выполненной для всех самопроизвольных сокращений, представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на общую работу, выполненную для всех последующих сокращений, измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси Х в виде "Ato." Влияния атосибана на общую работу, выполненную сокращениями, в присутствии PGF2α, впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций PGF2α (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGF2 α 1 нМ," "PGF2 α 10 нМ," и "PGF2 α 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой общую работу, выполненную сокращениями, в процентах от общей работы, выполненной самопроизвольными исходными сокращениями. Звездочка обозначает р значение p<0.05 по сравнению с ДМСО контролем.

Фиг. 75а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на частоту PGE2-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня частоты самопроизвольных сокращений. Измерения частоты самопроизвольных сокращений представлены на оси Х в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан ("Ato") затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на частоту сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Аto." Влияния атосибана на частоту сокращений в присутствии PGE2 впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций РGE2 (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGE2 1 нМ," "PGE2 10 нМ," и "PGE2 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой частоту сокращений в процентах от частоты самопроизвольных исходных сокращений. Три звездочки обозначают р значение p<0,001 по сравнению с ДМСО контролем.

Фиг. 75b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на работу, выполненную на сокращение (площадь под кривой, или "AUC") РGE2-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня самопроизвольной работы, выполненной на сокращение. Измерения самопроизвольной работы, выполненной на сокращение, представлены на оси Х в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на работу, выполненную на сокращение, измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Ato." Влияния атосибана на работу, выполненную на сокращение в присутствии PGE2 впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций РGE2 (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGE2 1 нМ," "PGE2 10 нМ," и "PGE2 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой работу, выполненную на сокращение, в процентах от работы, выполненной на сокращение, для самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 75с представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концен-

траций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на амплитуду пика PGE2-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня амплитуды пика самопроизвольных сокращений. Измерения амплитуды пика самопроизвольных сокращений представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на амплитуду пика сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Ato." Влияния атосибана на амплитуду пика сокращений в присутствии PGE2 впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций РGE2 (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGE2 1 нМ," "PGE2 10 нМ," и "PGE2 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой амплитуду пика сокращений в процентах от амплитуды пика самопроизвольных исходных сокращений. Звездочка обозначает р значение р<0.05 по сравнению с ДМСО контролем.

Фиг. 75d представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на продолжительность РGE2-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектовженщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTS™) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня продолжительности самопроизвольных сокращений. Измерения продолжительности самопроизвольных сокращений представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на продолжительность сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Аto." Влияния атосибана на продолжительность сокращений в присутствии PGE2 впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций РGE2 (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGE2 1 нМ," "PGE2 10 нМ," и "PGE2 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси Y представляют собой продолжительность сокращений в процентах от продолжительности самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 75е представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций атосибана (6 нМ, 60 нМ, и 600 нМ) на общую работу, выполненную при всех сокращениях (сумма площади под кривой для всех сокращений) для РGE2-индуцированных сокращений гладких мышц у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня работы, выполненной для всех самопроизвольных сокращений. Измерения работы, выполненной для всех самопроизвольных сокращений, представлены на оси X в виде "Самопр." ЛМСО контроль или атосибан затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или атосибана на общую работу, выполненную для всех последующих сокращений, измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси Х в виде "Ato." Влияния атосибана на общую работу, выполненную сокращениями, в присутствии PGE2 впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций PGE2 (1 нM, 10 нM, и 100 нM) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "PGE2 1 нМ," "PGE2 10 нМ," и "PGE2 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой общую работу, выполненную сокращениями, в процентах от общей работы, выполненной самопроизвольными исходными сокращениями. Звездочка обозначает р значение p<0.05 по сравнению с ДМСО контролем. Три звездочки обозначают р значение p<0.001 по сравнению с ДМСО контролем.

Фиг. 77а представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций нифедипина (1 нМ, 6 нМ, 60 нМ, 600 нМ, и 10 мкМ) на частоту ОТ-индуцированных сокращений гладких мышц у N=2 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектовженщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTS™) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня частоты самопроизвольных сокращений. Измерения частоты самопроизвольных сокращений представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или нифедипин затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля

или нифедипина на частоту сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Nif." Влияния нифедипина на частоту сокращений в присутствии ОТ впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций ОТ (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "ОТ 1 нМ," "ОТ 10 нМ," и "ОТ 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси Y представляют собой частоту сокращений в процентах от частоты самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 77b представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций нифедипина (1 нМ, 6 нМ, 60 нМ, 600 нМ, и 10 мкМ) на работу, выполненную на сокращение (площадь под кривой, или "AUC") ОТ-индуцированных сокращений гладких мышц у N=2 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRU-MENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня самопроизвольной работы, выполненной на сокращение. Измерения самопроизвольной работы, выполненной на сокращение, представлены на оси Х в виде "Самопр." ДМСО контроль или нифедипин затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или нифедипина на работу, выполненную на сокращение, измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Nif." Влияния нифедипина на работу, выполненную на сокращение в присутствии ОТ впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций ОТ (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси Х в виде "ОТ 1 нМ," "ОТ 10 нМ," и "ОТ 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой работу, выполненную на сокращение, в процентах от работы, выполненной на сокращение, для самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 77с представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций нифедипина (1 нМ, 6 нМ, 600 нМ, и 10 мкМ) на амплитуду пика ОТ-индуцированных сокращений гладких мышц у N=2 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня амплитуды пика самопроизвольных сокращений. Измерения амплитуды пика самопроизвольных сокращений представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или нифедипин затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или нифедипина на амплитуду пика сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Nif." Влияния нифедипина на амплитуду пика сокращений в присутствии ОТ впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций ОТ (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "ОТ 1 нМ," "ОТ 10 нМ," и "ОТ 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой амплитуду пика сокращений в процентах от амплитуды пика самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 77d представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций нифедипина (1 нМ, 6 нМ, 600 нМ, и 10 мкМ) на продолжительность ОТ-индуцированных сокращений гладких мышц у N=2 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, используя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня продолжительности самопроизвольных сокращений. Измерения продолжительности самопроизвольных сокращений представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или нифедипин затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или нифедипина на продолжительность сокращений измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Nif." Влияния нифедипина на продолжительность сокрашений в присутствии ОТ впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций ОТ (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси Х в виде "ОТ 1 нМ," "ОТ 10 нМ," и "ОТ 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси У представляют собой продолжительность сокращений в процентах от продолжительности самопроизвольных исходных сокращений.

Фиг. 77е представляет собой график, на котором продемонстрировано влияния различных концентраций нифедипина (1 нМ, 6 нМ, 60 нМ, 600 нМ, и 10 мкМ) на общую работу, выполненную при всех сокращениях (сумма площади под кривой для всех сокращений) для ОТ-индуцированных сокращений гладких мышц у N=2 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектовженщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Эксперименты осуществляли, исполь-

зуя DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTS™) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab. После установления регулярных сокращений по меньшей мере в течение 20 мин, записывали измерения исходного уровня работы, выполненной для всех самопроизвольных сокращений. Измерения работы, выполненной для всех самопроизвольных сокращений, представлены на оси X в виде "Самопр." ДМСО контроль или нифедипин затем добавляли в каждый образец миометрия в указанных концентрациях и влияния контроля или нифедипина на общую работу, выполненную для всех последующих сокращений, измеряли в течение последующего 10-минутного периода. Эта временная точка представлена на оси X в виде "Nif." Влияния нифедипина на общую работу, выполненную сокращениями, в присутствии ОТ впоследствии измеряли путем воздействия на образцы ткани миометрия возрастающих концентраций ОТ (1 нМ, 10 нМ, и 100 нМ) через последующие 10-минутные интервалы. Эти временные точки представлены на оси X в виде "ОТ 1 нМ," "ОТ 10 нМ," и "ОТ 100 нМ," соответственно. Значения вдоль оси Y представляют собой общую работу, выполненную сокращениями, в процентах от общей работы, выполненной самопроизвольными исходными сокращениями.

Фиг. 79а представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий эффекты окситоцина, ноласибана и их комбинации на экспрессию фосфорилированной p65 (p-p65), фосфорилированной p38 (p-p38), и фосфорилированной киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (p-ERK) у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("НС"), стимулированными с помощью окситоцина ("ОТ"), леченным с применением ноласибана при концентрации 1 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и ноласибаном, при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β-актину осуществляли в качестве контроля. Фиг. 79b представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий эффекты окситоцина и/или различных концентраций соединения ІІ, необязательно в комбинации с ноласибаном, на экспрессию p-p65, p-p38, и p-ERK у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("НС"), стимулированными с помощью окситоцина ("ОТ"), леченным с применением соединения II при концентрации 3 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и соединением II при различных концентрациях соединения II, оба в присутствии и отсутствии ноласибана при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β-актину осуществляли в качестве контроля.

Фиг. 79с представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий эффекты окситоцина, ноласибана и их комбинации на экспрессию провоспалительных генов циклооксигеназы 2 (СОХ-2) и фосфорилированной кальций-зависимой фосфолипазы A2 (p-cPLA2) у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("НС"), стимулированными с помощью окситоцина ("ОТ"), леченные с применением ноласибана при концентрации 1 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и ноласибаном при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β-актину осуществляли в качестве контроля.

Фиг. 79d представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий влияния окситоцина и/или различных концентраций соединения II, необязательно в комбинации с ноласибаном, на экспрессию провоспалительных генов СОХ-2 и p-cPLA2 у N=6 биопсий эндометрия в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("HC"), стимулированными с помощью окситоцина ("OT"), леченным с применением соединения II при концентрации 3 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и соединением II при различных концентрациях соединения II, оба в присутствии и отсутствии ноласибана при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β-актину осуществляли в качестве контроля.

Фиг. 79е представляет собой график количественного анализа экспрессии p-p65, показанной на фиг. 79a и 79b.

Фиг. 79f представляет собой график количественного анализа экспрессии p-p38, показанной на фиг. 79a и 79b.

Фиг. 79g представляет собой график количественного анализа экспрессии p-ERK, показанной на фиг. 79a и 79b.

Фиг. 79h представляет собой график количественного анализа экспрессии COX-2, показанной на фиг. 79c и 79d. Звездочка обозначает р значение p<0,05 по сравнению с нестимулированными ("HC") образцами. Две звездочки обозначают р значение p<0,01 по сравнению с нестимулированными образцами. Три звездочки обозначают р значение p<0,001 по сравнению с нестимулированными образцами. Три "#" символа обозначают р значение p<0,001 по сравнению с образцами, леченными окситоцином (ОТ).

Фиг. 79і представляет собой график количественного анализа экспрессии p-cPLA2, показанной на фиг. 79с и 79d. Звездочка обозначает р значение p<0,05 по сравнению с нестимулированными ("HC") образцами. Три звездочки обозначают р значение p<0,001 по сравнению с нестимулированными образцами.

Фиг. 80а представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий эффекты окситоцина, ноласибана и их комбинации на экспрессию p-p65, p-p38, и p-ERK у N=3 биопсий амнионов в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("HC"), стимулированными с помощью окситоцина ("OT"), леченные с применением ноласибана при концентрации 1 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и ноласибаном при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β -актину осуществляли в качестве контроля.

Фиг. 80b представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий влияния окситоцина и/или различных концентраций соединения II, необязательно в комбинации с ноласибаном, на экспрессию p-p65, p-p38, и p-ERK у N=3 биопсий амнионов в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("HC"), стимулированными с помощью окситоцина ("OT"), леченным с применением соединения II при концентрации 3 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и соединением II при различных концентрациях соединения II, оба в присутствии и отсутствии ноласибана при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β-актину осуществляли в качестве контроля.

Фиг. 80с представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий эффекты окситоцина, ноласибана и их комбинации на экспрессию провоспалительных генов COX-2 и p-cPLA2 у N=3 биопсий амнионов в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("HC"), стимулированными с помощью окситоцина ("OT"), леченные с применением ноласибана при концентрации 1 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и ноласибаном при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β-актину осуществляли в качестве контроля.

Фиг. 80d представляет собой вестерн-блоттинг, показывающий влияния окситоцина и/или различных концентраций соединения II, необязательно в комбинации с ноласибаном, на экспрессию провоспалительных генов СОХ-2 и p-cPLA2 у N=3 биопсий амнионов в первом периоде родов в срок, отобранных у субъектов-женщин, подвергнутых родоразрешению путем кесарево сечения. Образцы были либо нестимулированными ("HC"), стимулированными с помощью окситоцина ("OT"), леченным с применением соединения II при концентрации 3 мкМ, или леченные обоими препаратами, окситоцином и соединением II при различных концентрациях соединения II, оба в присутствии и отсутствии ноласибана при концентрации 1 мкМ для указанных периодов времени. Блот к β-актину осуществляли в качестве контроля.

Подробное описание

Изобретение обеспечивает α-сложные аминоэфиры тиазолидин карбоксамида, например, (3S)-3- $(\{[(2S)-3-(бифенил-4-илсульфонил)-1,3-тиазолидин-2-ил]карбонил\}-амино)-3-(4-фторфенил)пропил$ валинат, а также его солевые формы и кристаллические полиморфы. Эти соединения способны ингибировать активность белков семейства рецептора простагландина F (FP-R), например, рецептора простагландина $F2\alpha$ (PGF2 α). Соединения, соли и кристаллические полиморфы, описанные в настоящей заявке, могут использоваться для ингибирования активности рецептора простагландина F in vitro и in vivo, и представляют собой эффективные терапевтические композиции для лечения преждевременных родов. Соединения, соли, и кристаллические полиморфы, описанные в настоящей заявке, могут вводиться субъекту (например, субъекту-млекопитающему, например, человеку), у которого происходят или есть риск развития родов в раннем гестационном возрасте, например, до 38 недели (например, от около 20 до около 37 недель, например, гестационный возраст около 20 недель, 21 неделя, 22 недели, 23 недели, 24 недели, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 29 недель, 30 недель, 31 неделя, 32 недели, 33 недели, 34 недель. 35 недель. 36 недель, или 37 недель, предпочтительно от около 24 до около 34 недели, например, гестационный возраст около 24 недели, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 29 недель, 30 недель. 31 неделя, 32 недели, 33 недели, или 34 недели). Изобретение дополнительно обеспечивает спо-(3S)-3-({[(2S)-3-(бифенил-4-илсульфонил)-1,3-тиазолидин-2-ил]карбонил}амино)-3-(4фторфенил)пропил L-валината, а также способы получения его солевых форм и кристаллических полиморфов. Изобретение дополнительно охватывает способы лечения преждевременных родов у субъекта путем введения альфа-сложного аминоэфира согласно изобретению субъекту, нуждающемуся в лечении, например, субъекту, у которого происходят преждевременные роды, или субъекту, у которого есть риск развития преждевременных родов, необязательно в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, как описано в настоящей заявке.

Дополнительно к описанному выше изобретение охватывает композиции и способы, относящиеся к 3-([1,1'-бифенил]-4-илсульфонил)-N-[1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропил]-1,3-тиазолидин-2-карбоксамиду. Как описано в настоящей заявке, это соединение может вводиться субъекту (например, субъектумлекопитающему, например, человек), у которого происходят или есть риск развития родов в раннем гестационном возрасте, например, до 38 недели (например, от около 20 до около 37 недель, например, гестационный возраст около 20 недель, 21 неделя, 22 недели, 23 недели, 24 недели, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 29 недель, 30 недель, 31 неделя, 32 недели, 33 недели, 34 недели, 35 недель, 36 недель, или 37 недель, предпочтительно от около 24 до около 34 недели, например, гестационный возраст

около 24 недели, 25 недель, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 29 недель, 30 недель, 31 неделя, 32 недели, 33 недели, или 34 недели), необязательно в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами как описано в настоящей заявке.

(3S)-3-({[(2S)-3-(Бифенил-4-илсульфонил)-1,3-тиазолидин-2-ил]карбонил}-амино)-3-(4-фторфенил) пропил L-валинат (Соединение I).

Изобретение основывается на открытии того, что соединение I ((3S)-3-({[(2S)-3-(бифенил-4-илсульфонил)-1,3-тиазолидин-2-ил]карбонил}-амино)-3-(4-фторфенил)пропил L-валинат, представленное формулой I, ниже) и его соли превращаются in vivo в 3-([1,1'-бифенил]-4-илсульфонил)-N-[1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропил]-1,3-тиазолидин-2-карбоксамид (представленное формулой II, ниже). Соединение II, ранее описанное в US 8415480, представляет собой антагонист рецептора простагландина F, так как это соединение проявляет константу ингибирования (Кі) 6 нМ для FP-R человека, что определяется с помощью конкурентных анализов связывания с радиоактивно меченным лигандом (экспериментальные детали конкурентных анализов связывания с радиоактивно меченным лигандом, пригодные для определения значений Ki, описаны, например, в US 8,415,480, пример 51). Было обнаружено, что после введения субъекту, соединение I деэстерифицируется in vivo таким образом, что образуется соединение II вследствие активности эндогенных эстераз, например, тех, которые присутствуют в желудочно-кишечном тракте.

Было открыто, что соединение I представляет собой ингибитор рецептора простагландина F, поскольку соединение I ингибирует FP-R человека с Ki 1 нМ. Соединение I проявляет улучшения в некоторых физико-химических характеристиках по отношению к соединению II, включая растворимость в воде, а также в средах, которые моделируют содержание тонкого кишечника в сытом (FeSSIF) и голодном (FaSSIF) состояниях. Эти данные обобщены в табл.2, ниже.

Таблица 2. Сравнение физико-химических свойств соединения I и соединения II

Параметр	Соединение I	Соединение П
Растворимость в воде (мкг/мл)	380	0,4
Растворимость в FaSSIF (мкг/мл) pH 6,5	70	0,4
Растворимость в FeSSIF (мкг/мл) pH 5,0	90	10
Кі FP-R человека (нМ)	1	6

Дополнительно к проявлению повышенной волной растворимости, соединение І и его соли проявляют неожиданный и благоприятный механизм абсорбции. Как описано в примерах ниже, соединение I деэстерифицируется эстеразами окружающей среды в тонком кишечнике и затем пассивно проходит через эпителий тонкого кишечника. Неожиданно, соединение І и его соли не являются субстратами для белка-переносчика РерТ1, протон-сопряжённого сопереносчика, который опосредует абсорбцию пептидных питательных веществ. Это открытие представляет неожиданное и фармакологически благоприятное свойство. Известно, что PepT1 опосредует абсорбцию различных сложных эфиров валината, как описано, например, в Vig и др., Adv. Drug Deliv. Rev. 65:1370-1385 (2013), раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки. РерТ1 проявляет широкий спектр субстратной специфичности, что подтверждается структурным разнообразием соединений, которые переносятся этим белком через кишечный эпителий. Несмотря на присутствие функциональной группы сложного эфира валината, соединение І и его соли не зависят от этого переносчика для абсорбции через эпителий тонкого кишечника. Это является благоприятным свойством, поскольку соединение I и его соли (например, соединение III) таким образом не конкурирует с природными субстратами РерТ1, например, пептидными питательными веществами, за связывание и транспорт с помощью этого белка. Напротив, соединение І и его соли превращаются in vivo в форму, которая легко абсорбируется способом, независимым от энергии и локального протонного градиента. Это неожиданное свойство, связанное с высокой водной растворимостью соединения I и его солей, собирательно обеспечивает благоприятный фармакокинетический профиль, благодаря которому соединения согласно изобретению легко растворяются в водной среде и, в свою очередь, превращаются в форму, способную к абсорбции, независимой от переносчика.

(3S)-3-({[(2S)-3-(Бифенил-4-илсульфонил)-1,3-тиазолидин-2-ил]карбонил}-амино)-3-(4-фторфенил) пропил L-валинат гидрохлорид (Соединение III).

Было открыто, что хлоридная соль соединения I ((3S)-3-({[(2S)-3-(бифенил-4-илсульфонил)-1,3тиазолидин-2-ил]карбонил}амино)-3-(4-фторфенил)пропил L-валинат гидрохлорид, обозначенного как III ниже) легко кристаллизуется, используя большее количество различных экспериментальных методик, как описано в примерах ниже. Соединение III принимает единственную, воспроизводимую кристаллическую форму при кристаллизации из различных сред и в различных условиях окружающей среды. Кроме того, эта кристаллическая форма соединения Ш проявляет увеличенную стабильность в условиях окружающей среды и в присутствии повышенной относительной влажности. Как описано более подробно в Примерах, представленных ниже, соединение ІІІ проявляет низкую гигроскопичность и, следовательно, не проявляет склонности абсорбировать влагу из местной атмосферы. Таким образом, соединение III проявляет устойчивость к химическим изменениям, например, гидролизу, а также устойчивость к включению примесей. Например, примеси, связанные с атмосферной водой, нелегко интегрируются в кристаллическую форму соединения III. Соединение III может вводиться субъекту, например, беременной женщине, для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель). Соединение III может вводиться субъекту, например, беременной женщине, для ослабления одного или нескольких симптомов, связанных с родами, таких как вагинальное кровотечение и разрыв маточных мембран.

Соединение I, или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III, могут вводиться отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными средствами, например, дополнительным терапевтическим средством. Типичные дополнительные терапевтические средства включают дополнительные токолитические средства, например, антагонист рецептора окситоцина, описанный в настоящей заявке, включая, например, атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан и ноласибан, который представляет собой (3Z, 5S)-5-(гидроксиметил)-1-[(2'-метил-1,1'-бифенил-4-ил)карбонил]пирролидин-3он О-метил оксим, или его вариант, препарат, кристаллическую форму, или производное. Путем подавления передачи сигнала окситоцином, антагонисты рецептора окситоцина могут действовать синергически с антагонистами рецептора простагландина F2α, описанными в настоящей заявке, замедляя или останавливая маточные сокращения, например, у пациента, у которого происходят или есть риск развития (например, присутствуют один или большее количество симптомов) преждевременных родов. Типичные дополнительные токолитические средства включают бетамиметики, например, тербуталин, ритодрин, гексопреналин, альбутерол, фенотерол, нилидрин и орципреналин, которые могут действовать путем инактивации киназы легких цепей миозина и/или путем истощения резервов Ca²⁺ в миометрии путем повышенной регуляции цАМФ, подавляя, таким образом, сократительную способность матки. Блокаторы кальциевых каналов, например, дигидропиридины (например, нифедипин и никардипин), могут дополнительно или альтернативно вводиться в сочетании с соединением согласно изобретению, например, для модуляции $[Ca^{2+}]$ в миометрии и подавлении Ca^{2+} -опосредованной активации миозиновых филаментов, что приводит к сокращению миометрия. Соли магния, например, сульфат магния, могут дополнительно или альтернативно вводиться в сочетании с соединением согласно изобретению, например, для гиперполяризации плазматической мембраны и/или для конкуренции с Ca²⁺ за связывание с легкой цепью миозина. Дополнительно или альтернативно, доноры оксида азота, например, нитроглицерин, могут вводиться в сочетании с соединением, описанным в настоящей заявке, например, для увеличения уровней циклического гуанозинмонофосфата в миометрии, инактивирования, таким образом, легких цепей миозиновых филаментов.

Соединение согласно изобретению, например, соединение I или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III, дополнительно или альтернативно может вводиться в сочетании с прогестероном или его вариантом или производным, например, 17- α -гидроксипрогестероном, для подавления сократительной способности матки у субъекта, у которого развиваются или есть риск развития (например, присутствуют один или большее количество симптомов) преждевременных родов.

Дополнительно или альтернативно, соединение согласно изобретению может вводиться в сочетании с кортикостероидом, описанным в настоящей заявке, или известном в данной области техники, например, для способствования созревания легких плода, таким образом, что предотвращается развитие респираторного дистресс-синдрома, среди других нарушений у новорожденных.

Дополнительно, соединение III может быть приготовлено в виде фармацевтической композиции,

например, фармацевтической композиции, приготовленной, как описано ниже.

Способы лечения

Соединение І, а также его соли, являются эффективными ингибиторами рецептора простагландина F и могут использоваться для вызывания антагонизма взаимодействия между представителями семейства простагландина F, например, простагландина F2 α , с соответствующим рецептором простагландина F in vivo для ослабления маточных сокращений. Соединение I и его соли могут вводиться субъекту, такому как беременная женщина, для лечения или предотвращения преждевременных родов. Эндогенный простагландин F2α синтезируется и высвобождается маточными эпителиальными клетками в ответ на каскады передачи сигналов, инициируемые окситоцином. При связывании $PGF2\alpha$ с $PGF2\alpha$ -R на внеклеточной поверхности маточного миоцита, фосфолипаза С расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (РІР₂) с образованием диацилглицерина (DAG) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃). IP₃, в свою очередь, потенцирует высвобождение внутриклеточного кальция (Ca²⁺) саркоплазматическим ретикулумом. Неожиданное повышение хранилищ кальция в конечном итоге приводит к сокращениям маточных мышц и некрозу эндотелиальных клеток желтого тела, структуры, синтезирующим прогестерон, которые поддерживает развитие плода. Аберрантное инициирование маточных сокращений и деградация желтого тела, вызываемая нарушением регуляции секреции PGF2a, может приводить к преждевременным родам. Соединение I и его соли, например, соединение III, может ослаблять опосредованное фосфолипазой С образование ІР3, и последующую мобилизацию внутриклеточных хранилищ кальция, путем ингибирования ассоциации PGF2α с PGF2αR. Соединение I или его соль, например, соединение III, следовательно, может вводиться субъектам, например, беременным женщинам, для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель). Например, соединение I или его соль, например, соединение III, могут вводиться субъекту для предотвращения родов перед родоразрешением путём кесарева сечения. Дополнительно, соединение I или его соль, например, соединение III, могут вводиться субъекту для профилактики и/или лечения дисменореи. Соединение I или его соль. например, соединение III, также может вводиться субъекту, например, беременной женщине, для ослабления одного или нескольких симптомов, связанных с родами, таких как вагинальное кровотечение и разрыв маточных мембран.

Дополнительно, соединения согласно изобретению могут вводиться для лечения эндометриоза у пациента (например, пациента-человека). Сверхэкспрессия рецептора простагландина $F2\alpha$ коррелирует с аберрантным ростом эндометрия. В качестве антагонистов активности рецептора простагландина $F2\alpha$, соединения согласно изобретению (например, соединение (I) или его соль, например, соединение (III)) могут вводиться пациенту, страдающему от эндометриоза, для лечения этого показания. Соединения согласно изобретению также могут вводиться пациенту для ослабления одного или нескольких симптомов эндометриоза, таких болевых симптомов, включая дисменорею, диспареунию, хроническую тазовую боль, дизурию, и дисхезию во время и/или после менструации. Об успешном лечении эндометриоза путем введения соединения согласно изобретению пациенту можно судить, например, по уменьшению роста ткани эндометрия, и/или уменьшению болевых симптомов во время и/или независимо от менструации. Комбинированная терапия

Несмотря на то, что процессы, вовлеченные в начало родов до сих пор полностью четко не определены, существует возрастающее количество доказательств, подтверждающих значимость воспаления как для родов в срок, так и для преждевременных родов. При начале родовой деятельности, имеет место системное повышение количества провоспалительных факторов, включая простагландины, цитокины, и дисмутазы пероксида марганца. Дополнительно, воспаление существенно вовлечено в преждевременные роды, запускаемые инфекцией.

Полагают, что окситоцин инициирует роды путем вызывания двух различных эффектов: непосредственного индуцирования сокращения маточного миометрия, и усиления синтеза и высвобождения сократительных простагландинов из маточного эндометрия/децидуальной оболочки. Путем ингибирования передачи сигнала окситоцина, можно достичь прямого (сократительного) и непрямого (усиления синтеза простагландинов) эффектов окситоцина на матку. Дополнительно, лечение децидуальной оболочки человека с помощью окситоцина приводит к стимуляции продукции простагландина $F2\alpha$. Это подтверждает существование комплементарной роли передачи сигналов окситоцином в тканях матки, с помощью которых окситоцин может взаимодействовать не только непосредственно на миометрий, стимулируя маточные сокращения, но также и опосредованно, путем образования простагландинов в других тканях.

В последнее время получены доказательства корреляции активности сократительного рецептора простагландина F с началом родов и во время прогрессирования родовой деятельности. Последние отчеты исследований также указывают на то, что окситоцин индуцирует продукцию простагландинов в клетках миометрия человека путем потенцирования циклооксигеназы 2 (COX-2). Такой механизм может объяснять замедленное высвобождение простагландинов в ткани матки, что стимулирует родовую деятельность. Таким образом, комбинированная терапия, включающая антагонист рецептора простагландина

 $F2\alpha$, например, соединение I или его соль (например, соединение III) и антагонист рецептора окситоцина может использоваться для лечения и/или предотвращения или преждевременных родов. Дополнительно, комбинация антагониста рецептора окситоцина и антагониста рецептора простагландина $F2\alpha$ может быть более эффективна для лечения преждевременных родов, чем существующие в настоящее время терапевтические схемы. Могут наблюдаться синергетические эффекты и они описаны в настоящей заявке, для предотвращения как сократительных, так и воспалительных процессов, которые лежат в основе преждевременных родов, так как доза (ы) антагониста рецептора окситоцина, вводимые пациенту, могут быть ниже при введении в комбинации с антагонистом рецептора простагландина F относительно дозы, которые могут вводиться пациенту, получающему антагонист рецептора окситоцина отдельно.

Соединение I или его соль, например, соединение III, могут вводиться с одним или несколькими дополнительными средствами, например, антагонистом рецептора окситоцина, для уменьшения частоты маточных сокращений и для задержки начала родов. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, могут вводиться одновременно с, в смеси с, или вводиться отдельно от антагониста рецептора окситоцина. Типичные антагонисты рецептора окситоцина для применения в сочетании с композициями и способами согласно изобретению включают атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан и ноласибан, или его вариант, препарат, кристаллическую форму, или производное. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, может вводиться перед, после, или одновременно с ноласибаном, или его вариантом, препаратом, кристаллической формой, или производным, для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель).

Дополнительно или альтернативно, соединение согласно изобретению (например, соединение I или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III) может вводиться пациенту, у которого происходят или есть риск развития (например, проявляются один или большее количество симптомов) преждевременных родов в сочетании с бетамиметиком. Бетамиметики, например, тербуталин, ритодрин, гексопреналин, альбутерол, фенотерол, нилидрин и орципреналин, могут действовать путем истощения внутриклеточных уровней Ca²⁺ (например, внутриклеточных миометральных уровней Ca²⁺) путем потенцирования β-2 адренергических рецепторов, таким образом повышенно регулируя цАМФ и истощая внутриклеточные резервы Ca²⁺, которые при иных обстоятельствах способны стимулировать сократительную способность матки. Типичные бетамиметики для применения в сочетании с композициями и методами, описанными в настоящей заявке, а также примеры способов для введения бетамиметиков в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящей заявке, описаны, например, в Gyetvai и др. Obstet. Gynecol. 94:869-877 (1999), раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки.

Дополнительно или альтернативно, соединение согласно изобретению (например, соединение I или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III) может вводиться пациенту, у которого происходят или есть риск развития (например, проявляются один или большее количество симптомов) преждевременных родов в сочетании с блокатором кальциевых каналов, например, блокатором кальциевых каналов L-типа. Блокаторы кальциевых каналов, включая дигидропиридины, например, нифедипин и никардипин, могут действовать путем подавления высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, таким образом предотвращая мобилизацию Ca^{2+} , что стимулирует сокращение мышц матки. Примеры блокаторов кальциевых каналов для применения в сочетании с композициями и методами, описанными в настоящей заявке, а также примеры способов для введения блокаторов кальциевых каналов в сочетании с композициями и способами, раскрытыми в настоящей заявке, описаны, например, в Wojcieszek и др. Сосһгапе Database Syst. Rev. 6:CD002255 (2014), раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки.

Дополнительно или альтернативно, соединение согласно изобретению (например, соединение І или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III) может вводиться пациенту, у которого происходят или есть риск развития (например, проявляются один или большее количество симптомов) преждевременных родов в сочетании с магниевой солью, например, сульфатом магния. Соли магния, например, сульфат магния, могут модулировать сократительную способность матки посредством различных механизмов, например, путем индуцирования гиперполяризации плазматической мембраны и/или путем конкуренции с Са2+ за связывание с легкими цепями миозина, таким образом подавляя сокращения миозиновых филаментов в маточных миоцитах. Дополнительно или альтернативно, соединение согласно изобретению (например, соединение І или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III) может вводиться пациенту, у которого происходят или есть риск развития (например, проявляются один или большее количество симптомов) преждевременных родов в сочетании с донором оксида азота. Оксид азота, сосудорасширяющее средство, который необходим для поддержания нормального тонуса гладких мышц, продуцируется различными клетками. Оксид азота синтезируется при окислении L-аргинина до L-цитруллина. Эта реакция катализируется синтазой оксида азота, которая существует в нескольких формах. Обе формы синтазы оксида азота, как индуцибельная (тип 2), так и головного мозга (тип 1) экспрессируются в клетках миометрия и эндотелиальных клетках кровеносных

сосудов, в то время как эндотелиальная синтаза оксида азота (тип 3) экспрессируется исключительно в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов. Взаимодействие между оксидом азота и растворимой гуанилилциклазой, которая присутствует в близкорасположенных эффекторных клетках, представляет собой широко распространенный механизм передачи сигналов, который связывает различные внеклеточные стимулы образования оксида азота с синтезом циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в клетках-мишенях. Повышение содержания цГМФ в гладкомышечных клетках, например, маточных миоцитах, инактивирует киназы легких цепей миозина, что приводит к расслаблению гладких мышц. Токолитические эффекты доноров оксида азота, например, нитроглицерина, описаны, например, в Simhan и др. New Engl. J. Med. 357:477-487 (2007), раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки.

Дополнительно или альтернативно, соединение согласно изобретению (например, соединение I или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III) может вводиться пациенту, у которого происходят или есть риск развития (например, проявляются один или большее количество симптомов) преждевременных родов в сочетании с прогестероном или его вариантом, например, 17- α -гидроксипрогестерон капроатом. Прогестерон представляет собой стероидный гормон, секретируемый желтым телом и плацентой около с 8 недели гестации. Прогестерон и его варианты, например, 17- α -гидроксипрогестерон капроат, могут регулировать состояние покоя матки путем непосредственного модулирования синтеза [Ca²⁺] в миометрии и простагландина, как описано, например, в Muglia и др. New Engl. J. Med. 362:529-535 (2010); Simhan и др. New Engl. J. Med. 357:477-487 (2007); Smith и др. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 142:3-11 (2009); Bernal. Sem. Cell Dev. Biol. 18:340-347 (2007); и Hubinont и др. J. Pregnancy. 941057 (2011), раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки.

Дополнительно или альтернативно, соединение согласно изобретению (например, соединение I или его фармацевтически приемлемая соль, например, соединение III) может вводиться пациенту, у которого происходят или есть риск развития (например, проявляются один или большее количество симптомов) преждевременных родов в сочетании с кортикостероидом. Антенатальные кортикостероиды, например, бетаметазон, дексаметазон, и гидрокортизон, представляют собой класс терапевтических средств, которые могут вводиться субъекту, например, беременной особи женского пола во время преждевременных родов или субъекту с риском развития преждевременных родов (например, субъекту, у которого проявляется один или большее количество симптомов преждевременных родов, таких как вагинальное кровотечение и разрыв маточных мембран) для ускорения созревания легких плода. Лечение с применением антенатальных кортикостероидов связано с суммарным уменьшением неонатальной смертности, респираторного дистресс-синдрома, внутрижелудочкового кровоизлияния, некротизирующего энтероколита, вспомогательной искусственной вентиляции лёгких, необходимости случаев реанимации и интенсивной терапии, и системных инфекций в течение первых 48 ч жизни. Дополнительно, лечение с применением антенатальных кортикостероидов эффективно у женщин с преждевременным отхождением околоплодных вод (PROM) и гипертоническими синдромами, связанными с беременностью. Существуют доказательства, подтверждающие преимущества для широкого диапазона гестационного возраста, например, в частности, от около 26 до около 34 недели (Miracle и др. J. Perinat. Med. 36:191-196 (2008), раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки).

Композиции для комбинированной терапии

Соединение I или его соль, например, соединение III, может применяться отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными средствами, пригодными для ингибирования маточных сокращений и/или лютеолиза, например, такими как атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан и ноласибан, или его вариант, препарат, кристаллическая форма, или производное, наряду с другими терапевтическими средствами (например, токолитическими средствами), описанными в настоящей заявке. Соединение I или его соль, например, соединение III, может быть смешано с дополнительным активным средством, например, антагонистом рецептора окситоцина, бетамиметиком, блокатором кальциевых каналов, магниевой солью, донором оксида азота, прогестероном или его вариантом, или кортикостероидом, описанными в настоящей заявке, и вводиться пациенту в одной композиции, или соединение I или его соль, например, соединение III, могут вводиться пациенту отдельно от дополнительного активного средства. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, и дополнительное активное средство могут раздельно вводиться пациенту.

Композиция для комбинированной терапии, описанная в настоящей заявке, например, фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, может вводиться субъекту для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель). В некоторых вариантах осуществления, у субъекта происходят преждевременные роды. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическую композицию вводят субъекту (например, субъекту-человеку) перед началом преждевременных родов. Фармацевтическая композиция согласно изобретению может вводиться субъекту (на-

пример, субъекту-человеку) для предотвращения родов перед родоразрешением путём кесарева сечения. Фармацевтическая композиция согласно изобретению может вводиться субъекту (например, субъектучеловеку) для лечения или предотвращения дисменореи. Фармацевтическая композиция согласно изобретению может вводиться субъекту, например, беременной женщине, для ослабления одного или нескольких симптомов, связанных с родами, таких как вагинальное кровотечение и разрыв маточных мембран.

Дополнительное терапевтическое средство, присутствующее в композиции для комбинированной терапии, может представлять собой, например, другое токолитическое средство. Дополнительное токолитическое средство может представлять собой, например, антагонист рецептора окситоцина, такой как атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан и ноласибан, а также один или большее количество их вариантов, составов, кристаллических форм или производных. Например, атосибан и его варианты описаны, например, в патенте

США № 4504469 и 4402942, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки. Ретосибан и его варианты описаны, например, в патенте США№ 7514437; 8367673; 8541579; 8071594; 8357685; 8937179; и US 2016/0074413, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки. Барусибан и его варианты описаны, например, в патенте США № 6143722; 7091314; 7816489; и US 2016/0175283, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки. Эпельсибан и его варианты описаны, например, в патенте США № 7514437; 8367673; 8541579; 7550462; 7919492; 8202864; 8742099; 9408851; 8716286; и 8815856, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки. Ноласибан и варианты, составы, и их кристаллические формы описаны, например, в патенте США № 7115754 и опубликованная заявка на патент США № 2015/0073032; 2015/0164859; и 2016/0002160, раскрытие каждого из которых включено в настоящую заявку в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительное токолитическое средство представляет собой бетамиметик, например, тербуталин, ритодрин, гексопреналин, альбутерол, фенотерол, нилидрин, или орципреналин. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное токолитическое средство представляет собой блокатор кальциевых каналов, например, дигидропиридин, например, нифедипин или никардипин. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное токолитическое средство представляет собой магниевую соль, например, сульфат магния. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное токолитическое средство представляет собой донор оксида азота, например, нитроглицерин.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительное терапевтическое средство представляет собой прогестерон или его вариант или производное, например, 17-α-гидроксипрогестерон капроат.

В некоторых вариантах осуществления, дополнительное терапевтическое средство представляет собой кортикостероид. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой бетаметазон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой гидрокортизон.

В комбинированных лечениях, дозировки одного или нескольких терапевтических соединений могут уменьшаться относительно стандартных дозировок при введении отдельно. Например, дозы могут определяться эмпирически из комбинаций и перестановок лекарственных средств или могут быть выведены квалифицированным специалистом в данной области техники.

Примеры

Следующие примеры приведены для обеспечения квалифицированных специалистов в данной области техники описанием, как композиции и способы, раскрытые в настоящей заявке, могут использоваться, приготавливаться и оцениваться, и являются исключительно примерами осуществления изобретения и не предназначены для ограничения объема изобретения, заявленного изобретателями.

Пример 1. Приготовление соединения I и III.

Соединение I, и его хлоридную соль (соединение III), приготавливали в соответствии со схемой 1, представленной ниже. Этот пример будет описан для каждой из стадий, осуществляемых для синтеза соединения I, обозначенных как стадии 1-6.

Схема 1. Приготовление соединения I и его хлоридной соли

Стадия 1. Приготовление трет-бутилового эфира 2-[1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропилкарбамоил] тиазолидин-3-карбоновой кислоты

В колбу подходящего размера (сосуд A), добавляли 3-(бутоксикарбонил)-1,3-тиазолидин-(2S)-карбоновой кислоты (1 мас.), затем добавляли тетрагидрофуран и после этого компоненты колбы охлаждали до -35°C около до -45°C. После этого в колбу добавляли N-метилморфолин (1,18 об.), при этом температуру поддерживали в диапазоне от -30 до -40°C. После этого в колбу добавляли изобутил хлорформиат (0,58 об.), при этом температуру поддерживали в диапазоне от -30 до -40°C.

В отдельный сосуд (сосуд В), добавляли (3S)-амино-3-(4-фторфенил)пропан-1-ол (0,76 мас.) и $T\Gamma\Phi$ и сосуд перемешивали до тех пор, пока не растворялись крупные твердые вещества.

Раствор (3S)-амино-3-(4-фторфенил)пропан-1-ола из сосуда В затем добавляли в реакционный сосуд А, при этом температуру поддерживали в диапазоне от -30 до -40°С. Затем содержимому колбу позволяли нагреться до 15-25°С в течение периода 1-24 ч. Реакционную смесь перемешивали при 15-25°С до завершения реакции. Реакционную смесь концентрировали насухо, и затем к остатку добавляли этилацетат, после этого насыщенный водный хлорид аммония. Органическую фазу отделяли и промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония. После этого органическую фазу отделяли и промывали насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия. Затем органическую фазу высушивали над сульфатом натрия, фильтровали, и фильтрат концентрировали при 35-40°С, до тех пор, пока содержание этилацетата не оставляло <10% по весу (мас./мас.), получая трет-бутиловый эфир 2-[1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропилкарбамоил]тиазолидин-3-карбоновой кислоты.

Стадия 2. Приготовление [1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропил]амида 3-(бифенил-4-сульфонил)тиа-

золидин-2-карбоновой кислоты

В колбу подходящего размера (сосуд А), добавляли трет-бутиловый эфир 2-[1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропилкарбамоил]тиазолидин-3-карбоновой кислоты (1 мас), после этого добавляли дихлорметан. После этого компоненты колбы охлаждали до -15 - -20°С. Затем в колбу добавляли соляную кислоту (3,3 об.), при этом температуру поддерживали в диапазоне -15 и -20°С до завершения реакции. После этого реакционную смесь охлаждали до -35 - -40°С и к смеси добавляли тетрагидрофуран, при этом температуру поддерживали в диапазоне -30 и -40°С. Затем к смеси добавляли N,N-диизопропилэтиламин (8,16 об.), при этом температуру поддерживали в диапазоне -15 и -45°С. Затем в сосуд добавляли 4-диметиламинопиридин (0,032 мас.), при этом температуру поддерживали в диапазоне -15 и -45°С.

В отдельный сосуд (сосуд В), добавляли 4-бифенилсульфонил хлорид (0,85 мас), после этого ТГФ.

Раствор 4-бифенилсульфонилхлорида из сосуда В добавляли в реакционный сосуд А, при этом температуру поддерживали в диапазоне -15 и -45°C. Затем компонентам реакционной смеси позволяли нагреться до 15-25°Св течение периода времени от 1 до 24 ч. После этого в колбу добавляли этилацетат, затем насыщенный водный раствор хлорида аммония. Органическую фазу отделяли и промывали насыщенным водным раствором хлорида аммония, после этого насыщенным водным раствором гидрокарбоната. Затем органическую фазу высушивали над сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали при 35-40°С до получения твердого остатка. Затем к остатку добавляли дихлорметан и смешивали при 30-35°С. После упаривания, затем к остатку добавляли этилацетат, и взвесь переносили в подходящий сосуд. После этого перемешиваемую взвесь нагревали в колбе с обратным холодильником, и затем охлаждали до 0-5°С. Осажденное твердое вещество собирали путем фильтровальный осадок откачивали насухо в течение 1-24 ч в атмосфере азота, получая [1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропил]амид 3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбоновой кислоты.

Стадия 3A. Приготовление 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил)-3-пропилового эфира 2-трет-бутоксикарбониламино-3-метилмасляной кислоты

В колбу подходящего размера (сосуд A), добавляли Вос-L-валин (0,48 мас), дихлорметан, и N,N-диметилформамид и смесь затем перемешивали в атмосфере азота 15-25°С. После этого в сосуд добавляли 1-гидроксибензотриазол (HOBt, 0,3 мас.) и 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлорид (EDCl, 0,42 мас.), при этом температуру поддерживали при 15-25°С. Затем смесь перемешивали при 15-25°С до тех пор, пока все количество твердых веществ не растворялось, получая раствор А.

В отдельный сосуд (сосуд В), добавляли [1-(4-фторфенил)-3-гидроксипропил]амид 3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбоновой кислоты (1,0 мас.), дихлорметан, и N,N-диметилформамид, и затем смесь перемешивали при 15-25°С в атмосфере азота. Затем в сосуд добавляли 4-диметиламинопиридин (0,27 мас.), при этом температуру поддерживали в диапазоне 15-25°С. Смесь перемешивали при этой температуре, до тех пор пока все твердые вещества не растворялись (типично 5-15 мин), получая раствор в

Раствор А затем добавляли к раствору В, при этом температуру поддерживали в диапазоне 15-30°С. Смесь перемешивали при этой температуре до завершения реакции. Реакционную смесь концентрировали для удаления летучих растворителей. Затем в колбу добавляли этилацетат, после этого 10% мас./мас. водный раствор лимонной кислоты. Водную фазу отделяли и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы промывали смесью 10% мас./мас. водного раствора лимонной кислоты и добавляли насыщенный водный раствор хлорида натрия, затем насыщенный водный раствор хлорида аммония, насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия и насыщенный водный раствор хлорида натрия. Затем органическую фазу высушивали над сульфатом магния, фильтровали, и фильтровальный осадок промывали этилацетатом. Фильтраты концентрировали до тех пор, пока не получали твердый остаток, получая неочищенный 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-

фторфенил)-3-пропиловый эфир 2-трет-бутоксикарбониламино-3-метилмасляной кислоты.

Стадия 3В. Очистка 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил)-3-пропилового эфира 2-трет-бутоксикарбониламино-3-метилмасляной кислоты

Для очистки 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил)-3-пропилового эфира 2-трет-бутоксикарбониламино-3-метилмасляной кислоты, неочищенный продукт (1 мас.) и дихлорметан смешивали в сосуде до тех пор, пока все твердые вещества не растворялись. Затем раствор загружали на диоксид кремния, после этого добавляли дихлорметан. Продукт элюировали с помощью этилацетаг:гептаны. Фракции, содержащие продукт, объединяли и концентрировали насухо в вакууме при температуре водной бани 35-40°С, получая очищенный 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил)-3-пропиловый эфир 2-трет-бутоксикарбониламино-3-метилмасляной кислоты.

Стадия 4. Приготовление метансульфоната 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил] амино}-3-(4-фторфенил) пропилового эфира 2-амино-3-метилмасляной кислоты

В колбу подходящего размера, добавляли 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил] амино}-3-(4-фторфенил)-3-пропиловый эфир 2-трет-бутоксикарбониламино-3-метилмасляной кислоты (1 мас.), после этого добавляли 1,4-диоксан и смесь перемешивали в атмосфере азота. После этого добавляли метансульфоновую кислоту (0,18 мас.), и содержимое колбы нагревали до 68-73°С. Реакцию перемешивали при этой температуре до завершения реакции с помощью ¹Н ЯМР анализа. После этого реакционную смесь охлаждали до 35-40°С и концентрировали насухо при этой температуре. Затем остаток растворяли в ТГФ и концентрировали насухо при 35-40°С. Это цикл азеовысушивания повторяли до тех пор, пока содержание 1,4-диокеана не составляли меньше, чем 1,0% мас./мас, получая метансульфонат 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил) пропилового эфира 2-амино-3-метилмасляной кислоты.

Стадия 5. Приготовление 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил) пропилового эфира 2-амино-3-метилмасляной кислоты (Соединение I)

В колбу подходящего размера, добавляли метансульфонат пропилового эфира 2-амино-3-метилмасляной кислоты 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил) (1 мас.), затем добавляли дихлорметан. После этого компоненты колбы охлаждали до 5-15°С. К смеси добавляли водный раствор гидрокарбоната натрия, при этом температуру поддерживали в диапазоне 5°С и 25°С. После этого фазы разделяли, и органическую фазу повторно добавляли в сосуд, затем добавляли насыщенный водный раствор гидрокарбоната натрия, при этом температуру поддерживали при 5-25°С. После этого водный и органические слои разделяли, и органическую фазу высушивали над сульфатом магния, фильтровали, и фильтровальный осадок промывали дихлорметаном. Затем объединенные органические слои концентрировали насухо при 40-45°С до тех пор, пока содержимое дихлорметана не составляло < 2% мас./мас., получая пропиловый эфир 2-амино-3-метилмасляной кислоты 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил) (соединение I).

Стадия 6. Приготовление гидрохлорида пропилового эфира 2-амино-3-метилмасляной кислоты 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил) (Соединение III)

В колбу подходящего размера, добавляли воду (1,66 об.), затем добавляли соляную кислоту (0,18 об.), и температуру смеси доводили до 15-25°С. Затем раствор фильтровали, и фильтровальный раствор добавляли в колбу подходящего размера (сосуд A), затем добавляли этанол и этилацетат. Полученную смесь перемешивали в атмосфере азота при 15-25°С по меньшей мере в течение 5 мин.

В сосуд подходящего размера (сосуд В), добавляли пропиловый эфир 2-амино-3-метилмасляной кислоты 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил)тиазолидин-2-карбонил]амино}-3-(4-фторфенил) (1 мас.), затем добавляли этанол. После этого содержимое колбы перемешивали для растворения всех твердых веществ и получения прозрачного раствора.

Раствор из сосуда В затем добавляли в сосуд А, при этом температуру поддерживали при 15-25°С. Перемешиваемую смесь охлаждали до 0-5°С и перемешивали при этой температуре в течение 50-70 мин. Твердое вещество собирали путем фильтрации и фильтровальный осадок откачивали насухо в атмосфере азота по меньшей мере в течение 12 ч, получая неочищенный гидрохлорид 3-{[3-(бифенил-4-сульфонил) тиазолидин-2-карбонил]амино} -3-(4-фторфенил) пропилового эфира 2-амино-3-метилмасляной кислоты.

Пример 2. Фармакодинамические свойства соединения I и его солей.

Неклиническая фармакология.

Соединение I и его соли быстро превращаются в соединение II после введения в желудочнокишечный тракт. Соединение II является конкурентным и обратимым антагонистом рецептора простагландина $F2\alpha$ (FP2 α рецептор человека K_i =6 нM), которое находится в процессе разработки для контроля преждевременных родов путем ингибирования преждевременных маточных сокращений. Эффективная фармакология (токолитический эффект) была показана на модели спонтанной маточной активности у беременных крыс на поздней стадии беременности.

Фармакология in vitro.

Эффективность ингибирования соединения I и соединения II на рецептор простагландина F2α оценивали путем анализа аффинности этих соединений для рекомбинантного FP рецептора, экспрессируемого в клетках HEK293-EBNA. Результаты показали высокую аффинность связывания соединения I и соединения II с рецептором человека (см. табл.2).

Селективность соединения II тестировали по отношению ко всем восьми подтипам рецепторов простагландина. Селективность была около 10 раз относительно рецептора 2 простагландина Е (ЕР2) и больше, чем в 100 раз по отношению к другим рецепторам. Тестирование эффекта 1 мкМ соединения II относительно панели сайтов связывания 50 рецепторов, каналов и ферментов показало высокую селективность для FP.

Функциональную характеристику соединения II на FP человека осуществляли в трансфектированных HEK293-EBNA клетках. Соединение II также способно дозозависимым образом ингибировать синтез IP3 с IC_{50} значением 60 нМ. При добавлении отдельнл к FP/HEK293-EBNA клеткам, соединение II, тестируемое вплоть до 10 мкМ, не индуцирует какого-либо синтеза IP3, что указывает на отсутствие у соединения активности агониста.

Фармакология in vivo.

Токолитические эффекты соединения I и соединения II исследовали на модели самопроизвольной маточной активности на поздних терминах (19-21 дней гестации) анестезированных беременных крыс (Каwarabayashi и др. Ат. J. Obstet. Gynecol. 175:1348-1355 (1996) и Shinkai и др. J. Pharm. Pharmacol. 52:1417-1423 (2000)). Вкратце, беременных на поздней стадии крыс анестезировали уретаном. Один рог беременной матки освобождали и полиэтиленовый катетер, несущий на конце латексную камеру, заполненную солевым раствором, вставляли в полость матки. Катетер присоединяли к амплифицирующей /записывающей системе с помощью пневмодатчика. Возрастающие дозы соединения I (в виде мезилатной соли) или соединения II перорально вводили или инъецировали путем 10-ти минутной в/в инфузии. Для в/в введения, сократительную активность матки количественно определяли путем расчета АUC на протяжении 10-ти минутного периода инъецирования.

Вариации в процентах значений AUC относительно самопроизвольного маточного ответа, наблюдаемого после введения каждого соединения, рассчитывали путем сравнения со значением, записанным перед введением первой дозы (исходный уровень). Влияние соединения I или соединения II оценивали путем сравнения значения давления в полости матке перед и после лечения. Для перорального введения, применяли аналогичный вычислительный метод обработки данных в различные временные точки после

лечения. Статистические различия между леченными группами в каждую временную точку определяли с использованием однофакторного ANOVA с последующим критерием Тьюки. Оба соединения, которые вводили внутривенно или перорально, способны заметно уменьшать самопроизвольные маточные сокращения около на 40-50% (максимальный эффект, полученный при введении дозы 30 мг/кг внутривенным путем и 60 мг/кг пероральным путем). Внутривенная активность была сопоставимой или незначительно выше, чем такая у токолитического средства атосибана, лицензированного в Европейском Союзе.

Ингибирующий эффект после перорального введения имеет быстрое начало (5-15 мин после введения) и оставался на поддерживаемом уровне вплоть до конца периода наблюдения 3 ч (фиг. 3).

C помощью однократной пероральной дозы существенное ингибирование маточных сокращений достигают в дозе 30 мг/кг.

Таким образом, с помощью фармакологических исследований in vitro было показана высокая аффинность соединения I и соединения II для рецептора FP человека. При введении внутривенным или пероральным путем, эти соединения способны существенно уменьшать самопроизвольные маточные сокращения около на 40-50% при исследовании на модели самопроизвольной маточной активности на поздней стадии беременности (19-21 дней гестации) анестезированных беременных крыс.

Пример 3. Кристаллические решетки солей соединения I.

В этом примере описаны эксперименты создания и характеристики кристаллических солевых форм соединения I.

Сущность.

Было определено, что мезилатная соль соединения I является аморфной согласно XRPD. Попытки кристаллизовать материал были неуспешными. Свободное основание синтезировали из мезилатной соли и использовали для приготовления различных солей. Кристаллическую гидросульфатную соль получали непосредственно из синтезированной соли. Три соли кристаллизовали, используя смеси различных растворителей и методики кристаллизации: гидрохлорид, фумарат и дигидрофосфат. Полагают, что гидрохлоридная соль проявляет низкую гигроскопичность, увеличенную стабильность при повышенной относительной влажности (ОВ), и представляет собой единичную кристаллическую форму при кристаллизации из различных отличающихся экспериментальных условиях.

Кристаллическую HCl соль получали в двух экспериментах упаривания и с суспензией. В каждом случае наблюдали одинаковую картину XRPD. На основании термических данных, материал имел некоторое количество остаточного растворителя, а возможная точка плавления составляла около 146-147°C. Вероятно, при плавлении происходит частичное разложение. Гидрохлоридная соль была негигроскопичной на основании данных баланса влаги.

Кристаллическая гидросульфатная соль, вероятно, сольватируется и разлагается выше около 100°С. Материал был стабильным при относительных влажностях вплоть до около 65%.

Кристаллическая дигидрофосфатная и фумаратная соль были гигроскопичными при около 65% OB. Попытки промышленного получения солей были неуспешными вследствие высокой лабораторной влажности. Таким образом, только частичная характеристика доступна для этих солей.

Гидрохлоридная, гидросульфатная и фумаратная соль проявляют сравнимые растворимости в воде (ниже 1 мг/мл, см. фиг. 8).

Экспериментальная часть.

Анализы с помощью порошковой рентгеновской дифракции, описанные в настоящей заявке, осуществляли на Shimadzu XRD-6000 порошковом рентгеновском дифрактометре, используя Си Кс излучение. Прибор оборудован длинной тонкофокусной рентгеновской трубкой. Напряжение и силу тока на трубке устанавливали на 40 кВ и 40 мА, соответственно. Дивергенцию и щели рассеивания устанавливали на 1° и приемную щель устанавливали на 0,15 мм. Дифрагированные лучи определяли с помощью Nal сцинтилляционного детектора. Использовали тета-два тета непрерывное сканирование при 3°/мин (0,4 с/0,02° шаг) до 2,5-40°20. Кремниевый стандарт анализировали каждый день для контроля настроек прибора. Образцы анализировали с помощью кремниевого держателя образцов.

Анализы порошковой рентгеновской дифракции, описанные в настоящей заявке, также осуществляли на Inel XRG-3000 дифрактометре, оборудованном изогнутым позиционно-чувствительным детектором с диапазоном 2θ 120°. Данные в реальном времени собирали, используя Cu Kα излучения, начиная около при 4°2θ при разрешении 0,03°2θ. Напряжение и силу тока на трубке устанавливали на 40 кВ и 30 мА, соответственно. Щель монохроматора устанавливали 5 мм путем 160 мкм. Диаграммы представляли от 2,5 до 40°2θ. Образцы приготавливали для анализа путем упаковывания их в тонкостенные стеклянные капилляры. Каждый капилляр устанавливали на гониометрическую головку, которая переводилась в двигательный режим для возможности вращения капилляра при измерении и записи параметров. Образцы анализировали в течение 5 или 10 мин. Калибровку прибора осуществляли ежедневно с помощью силиконового сравнительного стандарта.

ДСК анализы, описанные в настоящей заявке, осуществляли на ТА Instruments дифференциальном сканирующем калориметре 2920. Прибор калибровали, используя индий в качестве эталонного материала. Образцы помещали в стандартный алюминиевый ДСК тигель, тигель зажимали и вес точно записы-

вали. Образцы уравновешивали при 25°C и нагревали при продувании азотом при скорости 10°C/мин вплоть до 350°C. Метал индия использовали в качестве калибровочного стандарта.

ТG анализы, описанные в настоящей заявке, осуществляли термогравиметрическом анализаторе TA Instruments 2950. Стандарты для калибровки представляли собой никель и ALUMEL™. Образцы помещали в алюминиевую кювету для образцов и вставляли в TG термошкаф. Образцы сначала уравновешивали при 25°C, затем нагревали под поток азота при скорости нагревания 10°С/мин вплоть до 350°C.

Спектры растворов ¹Н ядерного магнитного резонанса (ЯМР), описанных в настоящем изобретении, записывали при температуре окружающей среды с помощью спектрометра Varian UNITYINOVA-400 при ¹Н ларморовской частоте 399,8 МГц. Образцы растворяли в метанол-d4, метиленхлорид-d2, или хлороформ-d3. Спектры получали с ¹Н шириной импульсов 7,8 или 8,6 мкс, временем экспозиции 2,50 с, 5-ти секундной задержкой между сканированиями, шириной спектра 4095 или 6400 Гц с 20474 или 32000 данными наблюдений, и 16 или 40 совместно объединенными сканированиями. Сигнал свободной индукции (FID) осуществляли, используя программное обеспечение Varian VNMR 6.1C с 65536 точками и экспоненциальным фактором уширения линий 0,2 Гц для улучшения отношения сигнал/шум. Спектры сравнивали с внутренним стандартно тетраметилсиланом (ТМS) при 0,0 м.ч. или пиком остаточного растворителя.

FT-рамановский спектр, описанный в настоящей заявке, записывали на FT-Raman 960 или 860 спектрометре (Thermo Nicolet). В этом спектрометре используют длину волн возбуждения 1064 нм. Около 0,5-0,7 Вт Nd:YVO $_4$ лазерного порошка использовали для облучения образцов. Спектры Рамана измеряли с помощью детектора индий-галлий-арсенид (InGaAs). Образцы приготавливали для анализа путем помещения материала в стеклянный капилляр и затем в покрытый золотом капиллярный держатель во вспомогательном устройстве. В целом 256 сканирований образцов собирали от 3600 до 100 см $^{-1}$ при спектральном разрешении 4 см $^{-1}$, используя аподизацию Хаппа-Гензеля. Калибровку по длинам волн осуществляли, используя серу и циклогексан.

Данные поглощения/десорбции влаги (МВ) собирали на VTI SGA-100 Vapor Sorption Analyzer. Данные сорбции и десорбции собирали в диапазоне от 5 до 95% относительной влажности (ОВ) при 10% ОВ интервалах при продувке азотом. Образцы не высушивали перед анализом. Критериями равновесия, используемыми для анализа, была менее 0,0100% изменений веса за 5 мин, с максимальным временем уравновешивания 3 ч, если весовой критерий не соблюдался. Данные не корректировали относительно начального содержания влаги в образцах. NaCl и PVP использовали в качестве стандартов для калибровки

Приготовление соединения I.

Многочисленные попытки были предприняты для получения свободного основания соединения I из мезилатной соли, результаты этого описаны на фиг. 4. Изначально, один эквивалент гидроксида натрия использовали на эквивалент соли. Протонный ЯМР указывал на наличие пиков метансульфоновой кислоты. Полную реакцию получали, если мезилатную соль в метиленхлориде и растворе NaOH в воде смешивали при соотношении 1:2 соль: основание. Органический слой отделяли после нескольких промывок и упаривали. Полученный пастообразный или вязкий маслянистый материал высушивали в вакууме, получая аморфное твердое вещество. Свободное основание анализировали путем ¹Н ЯМР и спектроскопии Рамана (фиг. 15 и фиг. 16, соответственно). В последующих исследованиях скрининга солей использовали свободное основание в качестве исходного вещества (обобщенные результаты представлены на фиг. 5-7).

Отбор солей соединения I.

Приготавливали двенадцать солей соединения I. Кристаллическая гидросульфатная соль осаждалась путем добавления около 25 молярного избытка серной кислоты к раствору свободного основания в ацетоне. Полагают, что другие соли со стадии синтеза не способны к двойному лучепреломлению путем микроскопии или аморфные согласно XRPD (фиг. 5-7). Бензолсульфонатные, цитратные, этансульфонатные, гидрохлоридные, гидросульфатные и сульфатные соли анализировали с помощью протонного ЯМР.

Эксперименты по кристаллизации на солях соединения I обобщены на фиг. 5-7. Кристаллизовали следующие соли: гидрохлорид, фумарат и дигидрофосфат.

Хлоридную соль кристаллизовали из 1:1 смеси ацетон: толуол, смеси метиленхлорид: этиловый простой эфир, и ацетоновой суспензии. Аналогичную картину XRPD наблюдали во всех экспериментах и обозначали как форма A (фиг. 7). Кристаллическую фумаратную соль получали путем медленного упаривания из 1:1 раствора метанол: толуол. Рентгеновская дифракционная картина обозначена как картина В. Гидросульфатная и дигидрофосфатная соль проявляют очень сходные картины XRPD (обозначены как картина X). Противоионы HSO_4^- и $H_2PO_4^-$ сходны по размерам и небольшие по сравнению с молекулой свободного основания, таким образом, сходные кристаллические структуры вполне вероятны для гидросульфатной и дигидрофосфатной соли. При попытках кристаллизовать мезилатную соль получали вязкие или стеклообразные твердые материалы.

Характеристики свободного основания и мезилатной соли соединения I.

Протонный ЯМР спектр свободного основания проявил два дублета около при 1 м.ч., что соответствует метальным группам валинового фрагмента. Метальные группы находятся на хиральном углеродном центре и, следовательно, не являются эквивалентами в протонном ЯМР. Два дублета для метальных групп наблюдаются для следующих солей соединения I: бесилат, цитрат, эсилат, гидросульфат (более перекрывающий) и сульфат (более перекрывающий). В 1 Н ЯМР спектре мезилатной соли и хлоридной соли, дублет при ~ 1 м.ч. соответствует шести атомам водорода, что возникает при полном перекрытии двух дублетов метальных групп (фиг. 13 и 21).

Эксперимент гомоядерного разъединения ¹Н ЯМР на свободное основание подтвердил метин (СН) водород мультиплет около при 2 м.ч. (фиг. 18). ¹Н ЯМР спектр свободного основания, записанный при отсутствии предварительного облучения любой метильной группы представлено внизу на фиг. 18. Облучение каждой метильной группы (сверху, посредине) приводит к упрощенному метиновому мультиплету с таким же количеством линий (5). Если два дублета соответствуют различным диастереоизомерам, то будут наблюдать два типа мультиплетов, исходный и упрощенный.

Характеристика хлоридной соли соединения I (соединение III).

Кристаллическую хлоридную соль анализировали путем термических техник, ¹Н ЯМР и автоматизированный анализ сорбции/десорбции влаги. Эндотерма около при 147°С в ДСК проявляется более широко, чем она типично наблюдается для эндотермы плавления. Потерю веса около 4% наблюдали от 25 до 160°С (анализ образца ацетоновой взвеси, фиг. 20). ¹Н ЯМР хлоридной соли соответствовал структуре (фиг. 21). Тем не менее, данные не могут коррелировать с потерей веса в термических анализах, поскольку анализировали различные образцы (медленное упаривание 1:1 смеси ацетон: толуол). Хлоридную соль из ацетоновой взвеси высушивали в вакууме около при 50°С в течение 1 дня. Полученный образец был сходным с исходной солью согласно XRPD (фиг. 22). Термические данные представлены на фиг. 23. На основании сравнения термических данных, высушенный материал имел более низкие потери в диапазоне от 25 до 100°С (0,2% отн. 0,6% для исходной хлоридной соли) и 100 и 160°С (2,5% отн. 3,5%) (фиг. 24). Это указывало на то, что некоторая часть растворителя была удалена при вакуумной сушке. Тем не менее, эндотерма около при 146-147°С в ДСК все еще была широкой (фиг. 25). Частичное разложение возможно происходит при плавлении (примечание: исходное разложение и соответствующая потеря веса в ТG).

Хлоридная соль соединения I не переходит в жидкое состояние через 2 дня около при 95% ОВ. Данные сорбции/десорбции влаги обобщены на фиг. 27 и представлены на фиг. 26 и 28. Минимальную потерю веса наблюдали при уравновешивании при 5% ОВ. Около 0,9% увеличение веса происходило при сорбции от 5 до 95% относительной влажности. Образец проявлял около 0,7% потеря веса при десорбции. XRPD анализ на пост-МВ образце проявлял рентгеновскую дифрактограмму, сходную с таковой для исходного вещества (фиг. 29).

Характеристика гидросулъфатной и сульфатной соли соединения I.

Приготавливали обе соли: гидросульфатную и сульфатную соль соединения І. Гидросульфатная соль осаждалась из раствора ацетона свободного основания путем добавления около 25 молярного избытка серной кислоты. Было обнаружено, что осадок является кристаллическим согласно ХRPD (Фиг. 38). Термические данные для гидросульфатной соли представлены на фиг. 32. Широкая эндотерма около при 68°C соответствует потере веса около 1% и, вероятно, обусловлена десольватацией (дегидратацией). Разложение происходит при более высоких температурах. Она переходит в жидкое состояние через 3 дня около при 65% ОВ (фиг. 32). Сульфатную соль приготавливали, используя два эквивалента свободного основания на один эквивалент кислоты. Попытки кристаллизовать сульфатную соль соединения І были неуспешными (фиг. 5-7). Гидросульфатную и сульфатную соль анализировали с помощью протонного ЯМР (фиг. 33 и фиг. 34). На ЯМР спектрах различий не наблюдали. Например, полагают, что метальные группы валинового фрагмента имеют различное связывание.

Харкетристика дигидрофосфатной соли соединения I.

Дигидрофосфатную соль кристаллизовали из смеси 1:1 метилэтилкетон: н-бутилацетат (фиг. 5-7). Она проявляет рентгеновскую дифрактограмму, сходную к таковой гидросульфатной соли (фиг. 43). Характеристика дигидрофосфатной соли ограничена XRPD вследствие потери образца при анализе. Попытки приготовить дополнительные количества кристаллической соли были неуспешными. Низкокристаллический материал получали при первой попытке (фиг. 5-7). При перекристаллизации низкокристаллической соли получали вязкое твердое вещество. Материал оставался вязким после высушивания в вакууме. Лабораторная влажность составляла около 62% ОВ при кристаллизации в промышленном масштабе и, вероятно, повреждает материал благодаря его гигроскопичности. Дополнительных попыток кристаллизации дигидрофосфатной соли не предпринимали.

Характеристика фумаратной соль соединения I.

Небольшое количество фумаратной соли кристаллизовали из смеси метанол: толуол 1:1 (фиг. 5-7). Попытки получить в промышленном масштабе кристаллическую соль осуществляли при лабораторной влажности около 62% ОВ и были неуспешными. Получали большинство маслянистых материалов, хотя присутствовало некоторое количество кристаллического твердого вещества путем микроскопии. При

высушивании вязкого твердого вещества в вакууме получали практически аморфный материал. Первоначально приготовленную кристаллическую соль использовали для затравочных экспериментов. Тем не менее, не получали кристаллических материалов. Гигроскопическую природу фумаратной соли подтверждали в исследованиях относительной влажности.

Полагают, что фумаратная соль более чувствительна к влаге. Кристаллическая соль была стабильной около при 43 и 53% относительной влажности, и начинала переходить в жидкое состояние в течение первого дня около при 65% OB. Желтое масло образовывалось через 3 дня при 65% OB (около 4% увеличения влажности).

Выводы.

Было обнаружено, что мезилатная соль соединения I является аморфной согласно XRPD. Попытки кристаллизовать материал были неуспешными.

Свободное основание соединения I синтезировали из мезилатной соли и использовали для приготовления 12 солей. Кристаллическую гидросульфатную соль получали непосредственно из синтезируемой соли. Три соли кристаллизовали, используя смеси различных растворителей и методики кристаллизации: гидрохлорид, фумарат и дигидрофосфат. Полагают, что хлоридная соль является наилучшим кандидатом для дальнейшей разработки. Кристаллическая гидросульфатная соль, вероятно, сольватируется и разлагается выше около 100°С. Материал был стабильным при относительных влажностях вплоть до около 65%. Кристаллическую HCl соль получали в двух экспериментах упаривания и эксперимента с суспензией. Наблюдали аналогичную картину XRPD. На основании термических данных, материал имел некоторое количество остаточного растворителя; а возможная точка плавления составляла около 146-147°С. Вероятно, при плавлении происходит частичное разложение. Хлоридная соль была негигроскопичной на основании данных баланса влаги. Кристаллическая дигидрофосфатная и фумаратная соль были гигроскопичными около при 65% ОВ. Попытки промышленного получения солей были неуспешными вследствие высокой лабораторной влажности. Таким образом, только частичная характеристика доступна для этих солей.

Пример 4. Мониторинг проницаемости в Сасо-2 клетки мезилатной соли соединения І.

Биодоступность перорально вводимых лекарственных средств главным образом зависит от способности проникать через кишечные барьеры. Сасо-2 клетки, имеющие происхождение из аденокарциномы ободочной кишки человека, адаптированные J. Fogh для их способности достигать высокой степени дифференциации энтероцитов, могут использоваться в качестве модели in vitro для исследования транспорта лекарственных средств через кишечный эпителий. Эти клетки образуют монослой поляризованных эпителиальных клеток при выращивании на покрытой коллагеном поликарбонатной мембране. Монослой дифференциированных клеток представляет собой релевантную модель для эпителия тонкого кишечника. Процесс дифференциации, начинающийся при слиянии клеток, приводит к образованию кисточковой каймы с хорошо развитыми микроворсинками, тесными апикальными соединениями, и поляризованным распределением мембранных компонентов, включая ферменты, рецепторы, транспортные системы, ионные каналы и липидные молекулы.

Целью исследования являлось на первом этапе оценка неспецифического связывания соединений I в тестируемой системе на основании Caco-2 клеток (без клеток) и, на втором этапе, оценка превращения соединения I в соединение II и определение того факта, опосредуется ли транспорт соединения I через монослои Caco-2 клеток PepT1 транспортным белком.

Материалы.

Клеточную линию Caco-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека) получали из контролируемых клеточных банков (Biosearch S.p.A, Джеренцано -Италия). Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), эмбриональную телячью сыворотку, раствор заменимых аминокислот, L-Глутамин 200 мМ, Раствор Пенициллин/Стрептомицин, раствор Трипсин-ЕDTA без кальция и магния получали от Celbio (Милан, Италия). HEPES, сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS), фосфатно-солевой буфер Дульбекко (PBS), Диметилсульфоксид (ДМСО), Глицин-Саркозин (Gly-Sar) получали от Sigma (Милан, Италия).

Экспериментальная часть.

Клетки Сасо-2 культивировали в DMEM, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 2% L-Глутамином 200 мМ и 1% раствором заменимых аминокислот.

Клетки хранили замороженными в криопробирках в жидком азоте, в виде клеточной суспензии объемом 1 мл в эмбриональной телячьей сыворотке, содержащей 10% ДМСО. Клетки, используемые для экспериментов, выдерживали в культуре не больше одного месяца.

При необходимости, замороженные флаконы Caco-2 клеток быстро размораживали при 37°C на водяной бане путем острожного завихрения вплоть до полузавершенного оттаивания. После этого клеточную суспензию добавляли по каплям к 10 мл среды для культивирования клеток. После этого клеточную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 900-1000 об./мин, супернатант удаляли и осадок клеток после центрифугирования восстанавливали в среде и распределяли в колбы, содержащие среду объемом 75 см². Колбы инкубировали при 37°C в атмосфере 5 % CO₂. Клетки серийно субкультивировали до

получения почти сплошных монослоев. Среду из каждой колбы удаляли и монослой промывали с помощью 10-15 мл забуференной фосфатом среды Дульбекко (PBS).

Раствор трипсин-EDTA раствор добавляли к клеточному монослою, инкубировали при 37° С и нарезали аккуратно через интервалы для сдвигания клеток. Полностью отсоединенный и дезагрегированный клеточный монослой подтверждали путем исследования под микроскопом. Затем клетки ресуспендировали в 10 мл полной среды и центрифугировали в течение 7 мин при 900-1000 об./мин. Супернатант отбрасывали; клетки ресуспендировали в культуральной среде и высевали при $2,5\times10^5$ клеток/мл в колбы 175 см².

Клетки из колб почты сплошных культур отсоединяли и дезагрегировали путем обработки трипсином, как описано выше. Клетки ресуспендировали в культуральной середе и подсчитывали количество клеток. Клеточную суспензию разводили средой до получения около 1×10^6 клеток/мл и 300 мкл клеточной суспензии помещали на апикальный компартмент Transwell (диаметр 6,5 мм, размер пор 0,4 мкм). 600 мкл клеточной среды помещали в базолатеральный компартмент. Планшеты инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO_2 на воздухе в течение 15-21 дней, заменяя среду каждый 48-72 ч.

Целостность каждого монослоя Caco-2 клеток оценивали с помощью трансэпительального электрического сопротивления (TEER), как перед началом эксперимента, так и после окончания времени инкубирования. TEER, выраженный в виде $Om \times cm^2$, измеряли в Transwells, используя Millicell-ERS (Millipore). Монослой считали дифференцированным, если значение TEER было больше, чем 800 $Om \times cm^2$.

Целостность каждого монослоя Caco-2 клеток оценивали после окончания времени инкубирования с помощью люцифера жёлтого. После эксперимента Transwells промывали два раза транспортирующим буфером. 200 мкл люцифера жёлтого при концентрации 100 мкМ в HBSS распределяли в апикальный компартмент, в то время как 400 мкл HBSS добавляли в базолатеральный компартмент. Transwells инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Количество люцифера жёлтого определяли в базолатеральном компартменте при длине волны 535 нм относительно стандартной кривой люцифера жёлтого в таком же солевом растворе, используя спектрофотометр для анализа микропланшет (EG & G WALLAC). Монослой считали неповрежденным, если обнаруживали <1% Люцифера жёлтого в базолатеральном компартменте.

Оценка неспецифического связывания в бесклеточном transwell.

Неспецифическое связывание и восстановление оценивали в бесклеточном. Соединение I тестировали при 1,5, 3 и 6 мкМ в двух повторах в бесклеточном transwell. Тестирование осуществляли в рН градиенте между апикальным и базолатеральным компартментом. Апикальный компартмент (донор) имел буфер с 6,5, в то время как базолатеральный компартмент (получатель) имел буфер с рН 7,4. Пробы отбирали в следующее время: 60 и 120 мин для базолатерального компартмента (получатель) и 120 мин для апикального компартмента (донор). Полученные образцы анализировали с помощью ЖХ-МС, оба компонента, соединение I и соединение II мониторили для оценки процента восстановления.

Оценку стабильности соединения I и соединения II.

Стабильность обоих компонентов, соединения I и соединения II оценивали при проведении теста. Эти соединения растворяли в HBSS буфере (конечная концентрация 1% ДМСО) при концентрациях 1,5, 3 и 6 мкМ. Аликвоты каждого раствора отбирали в момент времени ноль (t=0) для оценки исходных концентраций соединений. Растворы инкубировали при 37°С для продолжительного эксперимента транспорта. Аликвоту каждого раствора отбирали при окончании эксперимента (t=120) для оценки конечных концентраций соединения I и соединения II. Пробы анализировали путем ЖХ-МС.

Оценка двунаправленной проницаемости соединения I.

Соединение I растворяли в HBSS буфер (1% ДМСО конечная концентрация) при концентрациях 1,5, 3 и 6 мкМ. Каждую концентрацию /время отбора образца прогоняли в лунках в двух повторах. Тестирование осуществляли в градиенте рН: апикальный компартмент (слизистый) осуществляли при рН 6,5, базолатеральный компартмент (серозный) осуществляли при рН 7,4.

Транспорт с апикального в базолатеральном направлении ($A \rightarrow B$, слизистый в серозный): 200 мкл каждой концентрации соединения I добавляли в апикальный компартмент и 400 мкл HBSS добавляли в базолатеральный компартмент. Планшеты инкубировали при 37°C. Аликвоту базолатерального компартмента отбирали через 60 и 120 мин (t=60 и t=120). Аликвоту апикального компартмента отбирали в начальное время (t=0) и через 120 мин (t=120).

Транспорт с базолатерального в апикальном направлении (В \rightarrow A, серозный в слизистый): 400 мкл каждой концентрации соединения I добавляли в базолатеральный компартмент и 200 мкл HBSS добавляли в апикальный компартмент. Планшеты инкубировали при 37°C. Аликвоту апикального компартмента отбирали через 60 и 120 мин (t=60 и t=120). Аликвоту базолатерального компартмента отбирали в начальное время (t=0) и через 120 мин (t=120). Все образцы анализировали с помощью ЖХ-МС, контролируя оба компонента, соединение I и появление соединения II.

Оценка двунаправленной проницаемости соединения II.

Соединение II растворяли в HBSS буфер (1%ДМСО конечная концентрация) при концентрациях 1,5, 3 и 6 мкМ. Каждую концентрацию /время отбора образца прогоняли в лунках в двух повторах. Тес-

тирование осуществляли в градиенте рН: апикальный компартмент (слизистый) осуществляли при рН 6,5, базолатеральный компартмент (серозный) осуществляли при рН 7,4.

Транспорт с апикального в базолатеральном направлении ($A \rightarrow B$, слизистый в серозный): 200 мкл каждой концентрации соединения II добавляли в апикальный компартмент и 400 мкл HBSS добавляли в базолатеральный компартмент. Планшеты инкубировали при 37°C. Аликвоту базолатерального компартмента отбирали через 60 и 120 мин (t=60 и t=120). Аликвоту апикального компартмента отбирали в начальное время (t=0) и через 120 мин (t=120).

Транспорт с базолатерального в апикальном направлении ($B \rightarrow A$, серозный в слизистый): 400 мкл каждой концентрации соединения II добавляли в базолатеральный компартмент и 200 мкл HBSS добавляли в апикальный компартмент. Планшеты инкубировали при 37°C. Аликвоту апикального компартмента отбирали через 60 и 120 мин (t=60 и t=120). Аликвоту базолатерального компартмента отбирали в начальное время (t=0) и через 120 мин (t=120). Все образцы анализировали с помощью ЖХ-МС, контролируя соединение II.

Ингибирование транспорта слизистый \rightarrow серозный соединения I с помощью PepT1 субстрата (Gly-Sar)

Дифференцированные клетки предварительно обрабатывали в течение 30 мин с помощью 10 мМ Gly-Sar для блокирования активного транспортёра PepT1.

Соединение I растворяли в HBSS буфер (1% ДМСО конечная концентрация) при концентрациях 1,5, 3 и 6 мкМ. Каждую концентрацию /время отбора образца прогоняли в лунках в двух повторах. Тестирование осуществляли в градиенте рН: апикальный компартмент (слизистый) осуществляли при рН 6,5, базолатеральный компартмент (серозный) осуществляли при рН 7,4.

Транспорт с апикального в базолатеральном направлении (А→В, слизистый в серозный): 200 мкл каждой концентрации соединения I добавляли в апикальный компартмент и 400 мкл HBSS добавляли в базолатеральный компартмент. Планшеты инкубировали при 37°С. Аликвоту базолатерального компартмента отбирали через 60 и 120 мин (t=60 и t=120). Аликвоту апикального компартмента отбирали в начальное время (t=0) и через 120 мин (t=120). Все образцы анализировали с помощью ЖХ-МС, контролируя оба компонента, соединение I и появление соединения II.

Аналитические определения.

Концентрации соединения II и соединения I в образцах после инкубирования определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии /масс-спектрометрии (ЖХ/МС), описанном в приложениях (раздел 7.1) без какого-либо дополнительного разведения.

Результаты.

Значения предварительных экспериментов TEER монослоев Caco-2 клеток использовались в диапазоне от 850 до $1160~\Omega \times \text{ cm}^2$, что указывает на конфлюентный монослой с плотными контактами. После окончания экспериментов, значения TEER снижалась в среднем на $170~\Omega \times \text{cm}^2$ (от $680~\text{до }990~\Omega \times \text{cm}^2$) без влияния на целостность монослоя клеток. Тест с Люцифером жёлтым подтвердил целостность всех монослоев после экспериментов, фактически, обнаруживаемое количество люцифера жёлтого в базолатеральных компартментах после экспериментов всегда было <1% во всех лунках. на фиг. 55 описаны данные, полученные в тесте на неспецифическое связывание для соединения І. В тестируемых условиях соединение I доказано восстанавливается в апикальном компартменте при всех тестируемых дозах. Соединение I не обнаруживается в базолатеральном компартменте при любой тестируемой дозе. Неспецифическое связывание соединения I исключено. Соединение II не обнаруживается в любом компартменте. на фиг. 55 описаны данные, получены в исследовании стабильности для соединения I и соединения II. Оба соединения доказано являются стабильными в тестируемых условиях: HBSS буфер (2% ДМСО конечная концентрация) при 37°C в течение 60 и 120 мин на фиг. 56а-56е представлены данные, полученные в исследовании двунаправленной проницаемости для соединения І. Это соединение не проходит через монослой клеток. В исследовании транспорта с апикального в базолатеральном направлении соединение I не обнаруживается в получающем компартменте как через 60 мин, так и через 120 мин, в то время как возрастающие концентрации соединения II были обнаружены после окончания эксперимента в базолатеральный компартменте. Процентные значения прохождения соединения ІІ описаны в таблице. После окончания эксперимента транспорта с апикального в базолатеральном направлении, в апикальном компартменте наблюдали низкий перенос соединения І, в то время как были обнаружены повышенные концентрации соединения II (высокий перенос). Возрастающие концентрации соединения II через 120 мин в апикальном компартменте могут быть объяснены присутствием вне- и внутриклеточных эстераз в Сасо-2 клетках, способных деэстерифицировать соединения (Kern и др. J. Agric. Food Chem. 51: 7884-7891 (2003)). При исследовании транспорта с базолатерального в апикальном направлении соединение I не обнаружено в получающем компартменте, в то время как были обнаружены низкие соединения II. Таким образом, соединение I, вероятно, переносится и транспортируется в виде соединения II через Сасо-2 монослой. на фиг. 57а-57е представлены данные, полученные в исследовании двунаправленной проницаемости для соединения ІІ. Это соединение проявило высокое процентное соотношение прохождения с апикального в базолатеральном направлении и низкую скорость проницаемости с базолатерального в апикальный компартмент. Рассчитывали Рарр, поскольку концентрация в донорных компартментах была известна. Соединение II имеет хорошее пассивное прохождение через Сасо-2 монослой. Утечки не обнаруживали. на фиг. 58а-58с представлены данные, полученные в исследовании ингибирования, в котором монослой Сасо-2 клеток предварительно обрабатывали с помощью 10 мМ Gly-Sar (для насыщения РерТ1 переносчик). Соединение I не было обнаружено в получающем компартменте, в то время как наблюдали прохождение соединения II. Процентные значения прохождения не являются линейными в этом эксперименте.

Обсуждение.

В этом исследовании оценивали и исключали неспецифическое связывание соединения I в тестируемой системе Caco-2 клеток (без клеток). Соединение I было стабильным в тестируемых условиях.

Превращение соединения I в соединение II оценивали и подтверждали в исследовании двунаправленной проницаемости. Соединение I не проходит через монослой клеток в тестируемых условиях. Таким образом, вероятно, соединение I переносится и транспортируется в виде деэстерифицированного соединения II через монослой Сасо-2 клеток.

В исследовании двунаправленной проницаемости соединение II проявило хорошее пассивное прохождение через монослой Сасо-2 клеток. Не было обнаружено подтверждений того, что соединение II может быть субстратом для эффлюксного переносчика.

Тестирование с предварительной обработкой с помощью Gly-Sar (для насыщения PepT1 переносчика) показало отсутствие прохождения соединения I и норму прохождения соединения II. Вероятно, транспорт соединения I через монослои Caco-2 клеток не опосредуется PepT1.

Эти эксперименты указывают на то, что абсорбция соединения I и его солей в кишечнике не опосредуется белковым РерТ1 переносчиком. Вместо этого, вышеприведенные результаты свидетельствует о том, что соединение I деэстерифицируется с помощью окружающих эстераз в тонком кишечнике и впоследствии пассивно проникает через эпителий тонкого кишечника. Это соединение I и его соли не являются субстратами для РерТ1, что является неожиданным и фармакологически благоприятным свойством. РерТ1 является рН-независимым со-переносчиком, для которого известно опосредование абсорбции различных сложных эфиров валината, как описано, например, в Vig и др., Adv. Drug Deliv. Rev. 65:1370-1385 (2013), раскрытие которой включено в настоящую заявку путем ссылки. РерТ1 проявляет широкую субстратную специфичность, что подтверждается структурным разнообразием соединений, которые транспортируются через кишечный эпителий с помощью этого белка. Неожиданно, несмотря на присутствие функциональных групп сложного эфира валината, соединение I и его соли не зависят от этого переносчика для абсорбции через эпителий тонкого кишечника. Это является благоприятным свойством, так как Соединение I и его соли таким образом не конкурируют с природными субстратами РерТ1, например, пептидными питательными веществами, за связывание и транспорт с помощью этого белка. Предпочтительно, соединение I и его соли превращаются in vivo в форму, которая легко абсорбируется способом, независимым от энергии и локального протонного градиента. Это является неожиданным свойством, связанным с высокой водной растворимостью соединения І и его солей, что совместно обеспечивает благоприятный фармакокинетический профиль, благодаря которому эти терапевтические средства легко растворяются в водной окружающей среде и, в свою очередь, превращаются в форму, способную к независимой от переносчика абсорбции.

Пример 5. Комбинированная терапия, включающая дополнительное токолитическое средство.

Соединение I или его соль, например, соединение III, могут вводиться субъекту, например, человеку, в комбинации с одним или более дополнительными средствами, например, антагонистом рецептора окситоцина, бетамиметиком, блокатором кальциевых каналов, магниевой солью, или донором оксида азота, например, для уменьшения частоты маточных сокращений и для задержки начала родов.

Квалифицированный специалист в данной области техники может вводить соединение I или его соль, например, соединение III, одновременно с, в виде смеси с, или отдельно от антагониста рецептора окситоцина. Типичные антагонисты рецептора окситоцина для применения в сочетании с композициями и способами согласно изобретению включают атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан и ноласибан, или его вариант, препарат, кристаллическую форму, или производное. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, может вводиться перед, после, или одновременно с ноласибаном, или его вариантом, препаратом, кристаллической формой, или производным, для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель).

Дополнительно или альтернативно, квалифицированный специалист в данной области техники может вводить соединение I или его соль, например, соединение III, одновременно с, в виде смеси с, или отдельно от бетамиметика, например, бетамиметиком, описанным в настоящей заявке. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, может вводиться перед, после, или одновременно с бетамиметиком, описанным в настоящей заявке или известным в данной области для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29,

или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель).

Дополнительно или альтернативно, квалифицированный специалист в данной области техники может вводить соединение I или его соль, например, соединение III, одновременно с, в виде смеси с, или отдельно от блокатора кальциевых каналов, например, блокатором кальциевых каналов, описанным в настоящей заявке. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, может вводиться перед, после, или одновременно с блокатором кальциевых каналов, описанным в настоящей заявке или известным в данной области для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель).

Дополнительно или альтернативно, квалифицированный специалист в данной области техники может вводить соединение I или его соль, например, соединение III, одновременно с, в виде смеси с, или отдельно от магниевой соли, например, сульфатом магния. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, может вводиться перед, после, или одновременно с сульфатом магния для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель).

Дополнительно или альтернативно, квалифицированный специалист в данной области техники может вводить соединение I или его соль, например, соединение III, одновременно с, в виде смеси с, или отдельно от донора оксида азота, например, нитроглицерина. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, может вводиться перед, после, или одновременно с нитроглицерином для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель).

Дополнительно или альтернативно, квалифицированный специалист в данной области техники может вводить соединение I или его соль, например, соединение III, одновременно с, в виде смеси с, или отдельно от прогестерона или его производного или варианта, например, производным или вариантом, описанным в настоящей заявке или известным в данной области техники. Например, соединение I или его соль, например, соединение III, может вводиться перед, после, или одновременно с прогестероном или его вариантом или производным, описанным в настоящей заявке или известным в данной области для задержки начала родов у субъекта, например, на один или больше дней или недель, например, от около 1 дня до около 16 недель (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30 дней, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 16 недель).

Пример 6. Токолитические эффекты соединения I и их фармацевтически приемлемых солей в комбинации с нифедипином и атосибаном на моделях преждевременных родов у мышей.

Для исследования терапевтических эффектов соединения I в комбинации с блокатором кальциевых каналов или антагонистом рецептора окситоцина на животных моделях преждевременных родов, первобеременных мышей CD-1 лечили с помощью установленных индукторов родов в раннем гестационном возрасте 17 дней и после этого вводили различные дозы хлоридной соли соединения I (соединение III; 10 мг/кг, 30 мг/кг, или 100 мг/кг, каждое вводили перорально) отдельно или в комбинации с нифедипином (5 мг/кг, вводимым перорально) или атосибаном (300 мг/кг, вводимым подкожно). Токолитические эффекты оценивали путем измерения времени от индукции до рождения первого малыша для каждой мыши в леченной и контрольных группах, времени от времени индукции до завершения родов для всех мышей в каждой группе, и жизнеспособность потомков среди мышей в каждой группе. Индукторами преждевременных родов, используемых в этом исследовании, были RU486 (также обозначаемый как мифепристон), стероидный антипрогестин, который способствует раскрытию шейки матки и стимулирует усиление сократительной способности матки и чувствительность к простагландинам, и липополисахарид (LPS), медиатор воспаления.

Для индукции родов в раннем гестационном возрасте, единичную дозу RU486 вводили каждой мыши подкожно в количестве 2,5 мг/кг (t=0). Мыши, леченные с помощью LPS, получали единичную внутрибрюшинную инъекцию LPS в количестве 2 мг/кг (t=0). Атосибан вводили CD-1 мышам путем подкожной инъекции в дозе 300 мг/кг в два различных сайта. Эти инъекции осуществляли в 5 ч (t=5) и 29 ч (t=29) после лечения с применением индуцирующего агента RU486 или LPS. Нифедипин вводили CD-1 мышам перорально в дозе 5 мг/кг через 5 ч (t=5), 19 ч (t=19), 29 ч (t=29), и 43 ч (t=43) после лечения с применением индуцирующего агента RU486 или LPS. Соединение III вводили CD-1 мышам перорально в дозе либо 10 мг/кг, 30 мг/кг, или 100 мг/кг через 5 ч (t=5), 19 ч (t=19), 29 ч (t=29), и 43 ч (t=43) после лечения с применением индуцирующего агента RU486 или LPS. После индукции с применением RU486 или LPS и последующего введения атосибана, нифедипина и/или соединения III, группы мышей подвергали непрерывному визуальному контролю для оценки времени, прошедшего между индукцией и рождения первого малыша для каждой мыши, а также пропорции мышей в каждой группе, в которых наступали роды в зависимости от времени. Жизнеспособность рожденных плодов в каждой группе оценивали

с помощью гидростатической легочной жизненной пробы.

Способность RU486 и LPS индуцировать преждевременные роды была подтверждена, так как лечение CD-1 мышей с помощью RU486 в гестационном возрасте 17 дней приводило к среднему времени родов около 21 ч после индукции (t=21; рассчитанное среднее значение=21±1,00 ч), в то время как CD-1 мыши, леченные с помощью LPS, в гестационном возрасте 17 дней проявляли среднее время родов около 26 ч после индукции (t=26; рассчитанное среднее значение=26±2,34 ч). В отличие от этого, роды в срок у CD-1 мышей происходят в гестационном возрасте от около 19 дней до около 21 дней, более чем через 50 ч после 17 дня гестации. Среди мышат, рожденных от мышей, получавших RU486, 96% родились живыми, и 48% мышат, рожденных от мышей, леченных с помощью LPS, родились живыми (фиг. 60 и 61). 3% мышей, леченных с помощью RU486, были исключены из этого исследования вследствие смерти или умерщвления во время исследования.

Во время исследования было показано, что лечение с применением нифедипина отдельно индуцирует существенное повышение среднего времени до родов по сравнению с наполнителем $(23,53\pm0,99\ ч$ относительно $21,19\pm1,00\ ч$; фиг. 65) у мышей, леченных с помощью RU486. Лечение с применением нифедипина отдельно дополнительно способствует повышению среднего времени до родов и существенно повышает фракционную жизнеспособность потомков у мышей, леченных с помощью LPS, по сравнению с наполнителем $(90,39\pm5,34\%$ относительно $48,20\pm16,45\%$; фиг. 68 и 69). Введение атосибана сходно приводит к повышению среднего времени до родов у мышей, леченных с помощью LPS (фиг. 70).

Было обнаружено, что соединение III способствует повышению среднего времени до родов по сравнению с наполнителем у мышей, леченных с помощью RU486 (фиг. 65 и 67). В особенности, мыши, леченные с помощью RU486, которым вводили соединение III перорально в дозе 30 мг/кг и 100 мг/кг, проявляли повышение время до родов по сравнению с наполнителем (p=0,0871 и p=0,0601, соответственно). Дополнительно, введение соединения III мышам, леченным с помощью LPS, приводит к дозозависимому повышению фракционированной жизнеспособности потомков (69,41± 5,76% жизнеспособности, наблюдаемой в ответ на введение 100 мг/кг соединения III относительно 48,20±16,45% наблюдаемой в ответ на введение наполнителя; фиг. 68).

Комбинация нифедипина и соединения III приводила к особенно выраженному токолитическому эффекту (фиг. 65 и 69). Пероральное введение нифедипина (5 мг/кг) и соединения III (100 мг/кг) мышам, леченным с помощью RU486, приводила к очевидному синергетическому эффекту, так как эта комбинация индуцирует существенное повышение среднего времени до родов по сравнению с наполнителем (27,91±0,35 ч относительно 21,19±1,00 ч), такая же дозировка нифедипина отдельно (27,91±0,35 ч относительно 23,53±0,99 ч), и такая же дозировка соединения III отдельно (27,91±0,35 ч относительно 23,70±0,60 ч). Дополнительно, пероральное введение нифедипина (5 мг/кг) и соединения III (10 мг/кг) мышам, леченным с помощью LPS, приводила к существенному повышению среднего времени до родов относительно группы, леченной с применением 10 мг/кг соединения III отдельно (31,01±1,89 ч относительно 23,98±0,66 ч). Пероральное введение 10 мг/кг соединения III в комбинации с 5 мг/кг нифедипина также способствует повышению жизнеспособности рожденных плодов у мышей, леченных с помощью LPS, по сравнению с мышами, которым вводили такую же дозировку соединения III отдельно (94,23±3,68% относительно 57,90±14,89%) и относительно мышей, которым вводили наполнитель отдельно (94,23±3,68% относительно 48,20±16,45%; фиг. 68).

Комбинация атосибана и соединения III дополнительно потенцирует токолитический эффект каждого соединения, используемого отдельно. Подкожное введение атосибана (300 мг/кг) и пероральное введение соединения III (100 мг/кг) мышам, леченным с помощью LPS, индуцирует существенное повышение среднего времени до родов относительно мышей, которым вводили наполнитель отдельно (33,23 \pm 2,95 ч относительно 26,17 \pm 1,98 ч) и относительно мышей, которым вводили такую же дозировку атосибана отдельно (33,23 \pm 2,95 ч относительно 28,41 \pm 2,99 ч; фиг. 71). Эта комбинация также проявляет свойство повышать фракционную жизнеспособность потомков по сравнению с мышами, которых лечили наполнителем отдельно, такой же дозировкой атосибана отдельно, или такой же дозировкой соединения III отдельно (фиг. 70).

Это исследование дополнительно иллюстрирует токолитический эффект соли FP антагониста соединения I на двух различных животных моделях преждевременных родов и подтверждает применение соединения I и его соли для лечения и предотвращения преждевременных родов независимо от биохимической этиологии, лежащей в их основе. Это исследование дополнительно поддерживает применение FP антагонистов, например, соединения I и его солей (например, соединения III) в комбинации по отдельности с антагонистом кальциевых каналов и антагонистом рецептора окситоцина для предотвращения преждевременных родов. Применение соединения III в комбинации по отдельности с нифедипином и атосибаном существенно превышает терапевтические эффекты индивидуальных компонентов, и демонстрирует, что соединение I и его соли, например, соединение III, может синергизировать с дополнительными токолитическими средствами.

Пример 7. Токолитические эффекты соединения ІІ в комбинации с нифедипином, атосибаном и но-

ласибаном на образцах ткани человека.

Для исследования терапевтических эффектов соединений II, активного метаболита соединения I и его солей (таких как соединение III), в комбинации с антагонистами рецептора окситоцина и блокаторами кальциевых каналов, биопсии эндометрия получали от родивших в срок, преждевременно родивших женщин, которых родоразрешали путем кесарево сечения. Одной из целей этого исследования было охарактеризовать эффекты соединения II, отдельно и в комбинации с дополнительными токолитическими средствами, на частоту, амплитуду пика и продолжительность сокращений миометрия, а также на роботу, выполненную на сокращение, и общую работу, выполненную при всех сокращениях. Для этого, эксперименты осуществляли с использованием DMT Myograph 800 MS (ADINSTRUMENTSTM) в оксигенированном растворе Кребса с программным обеспечением ADI Powerlab, которое облегчает одновременное измерение многих препаратов мышц параллельно.

Эксперименты на биопсиях эндометрия инициировали путем предоставления возможности сокращений гладким мышцах для установления исходных значений в течение по меньшей мере 20 мин. После этого периода времени, записывали исходные измерения частоты самопроизвольных сокращений, амплитуды пика, продолжительности, работу, выполненную на сокращение, и общую работу, выполненную при всех сокращениях. После этого, образцы биопсии эндометрия обрабатывали с помощью ДМСО контроля, соединения ІІ, атосибана, нифедипина, комбинации соединения ІІ и атосибана, или комбинации соединения II и нифедипина. После этого измеряли эффекты этих агентов на частоту, амплитуду, и продолжительность, а также на роботу, выполненную при сокращении миометрия, в течение последующего 10-ти минутного периода. Затем образцы миометрия загружали путем добавления возрастающих концентраций вещества, стимулирующего сокращения, например, окситоцина, PGF2 а, или PGE2, в течение последовательных 10-ти минутных интервалов, и измеряли частоту сокращений, амплитуду пика, продолжительность, работу, выполненную на сокращение, и общую работу, выполненную при всех сокращениях, соответственно. Окситоцин, PGF2a, и PGE каждый представляет собой различные модуляторы сократительной способности матки и преждевременных родов. Окситоцин непосредственно индуцирует сокращение маточного миометрия и повышает синтез и высвобождение сократительных простагландинов из маточного эндометрия и децидуальной оболочки. Окситоцин также вовлечен в способствование продукции простагландинов в клетках миометрия посредством потенцирования циклооксигеназы 2 (COX-2). Было показано, что простагландины PGF2α и PGE2 индуцируют измерения цервикального канала и возбуждают сократительную способность матки, два ключевых события в физиологии родов и родоразрешения. Активация FP рецептора в миометрии человека с помощью PGF2 приводит к повышению внутриклеточной концентрации кальция, что, в свою очередь, приводит к сокращению гладкомышечных клеток матки. Таким образом, другой целью исследования было оценить способность соединения II ослаблять сократительную активность матки, индуцированную тремя различными биохимическими средствами.

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что соединение II отдельно способно подавлять, как РСР2α-индуцированную, так и ОТ-индуцированную сократительную способность миометрия в зависимости от дозы (фиг. 72 и 73). Кроме того, в данном случае было открыто, что соединение II проявляет неожиданный синергетический эффект на уменьшение сократительной способности миометрия при использовании в комбинации с антагонистом рецептора окситоцина атосибаном (фиг. 76) и блокатором кальциевых каналов нифедипином (фиг. 78). Неожиданно, дозы соединения II, которые проявляют более низкую эффективность для уменьшения сократительной способности миометрия, при использовании при отсутствии дополнительного токолитического средства (такие как 60 нМ, фиг. 72 и 73) проявляют сильное повышение ингибирующей активности при комбинировании с атосибаном (фиг. 76) и нифедипином (фиг. 78). Аналогичным образом, было обнаружено, что дозы атосибана (6 нМ, фиг. 74 и 75) и нифедипина (6 нМ, фиг. 77) являются субоптимальными для уменьшения сократительной способности миометрия при использовании при отсутствии соединения II, проявляют неожиданное повышение протисократительной эффективности при комбинировании с соединением ІІ (фиг. 76 и 78). Эти данные свидетельствуют о том, что соединение II способно синергизировать с дополнительными токолитическими средствами, например, антагонистами рецептора окситоцина и блокаторами кальциевых каналов, для подавления сократительной активности матки, что может приводить к преждевременным родам.

Дополнительно к подавлению сократительной способности миометрия, токолитические эффекты соединения II также подтверждают способность этого средства ослаблять экспрессию нижерасположенных провоспалительных генов в биопсиях эндометрия и амиона человека (фиг. 79 и 80). Вестерн-блоты осуществляли для характеристики способности соединения II, отдельно и в комбинации с дополнительными токолитическими средствами, модулировать экспрессию различных белков в образцах миометрия и амниона, выделенных из родивших в срок, преждевременно родивших женщин, которых родоразрешали путем кесарево сечения. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что соединение II способно уменьшать экспрессию различных провоспалительных белков, и проявляет неожиданный синергизм при использовании в комбинации с ноласибаном относительно уменьшения экспрессии COX-2.

В совокупности, данные, полученные из этих экспериментов, свидетельствуют о том, что соедине-

ние II способно подавлять активность гладких мышц, которая может приводить к преждевременным родам, что индуцируется различными модуляторами сократительной способности матки. Кроме того, соединение II проявляет неожиданный синергетический эффект по отношению к ослаблению маточных сокращений при использовании в комбинации с антагонистами рецептора окситоцина и блокаторами кальциевых каналов. Этот синергизм проявляется как на уровне активности гладких мышц, таких и на уровне уменьшения экспрессии провоспалительного гена в биопсиях миометрия и амниона, и проявляют различные преимущества, обеспечения соединения II в комбинации с одним или несколькими дополнительными токолитическими средствами субъекту, нуждающемуся в лечении, например, субъекту, у которого начинаются или есть риск развития преждевременных родов.

Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в настоящей заявке, включены в нее в качестве ссылки таким образом, если бы каждая независимая публикация или патентная заявка была специфически и индивидуально включена в качестве ссылки.

Несмотря на то, что изобретение было описано с использованием его специфических вариантов осуществления, подразумевается, что возможны дальнейшие модификации и настоящее описание предназначено для того, чтобы охватывать любые вариации, применения или адаптации изобретения, следуя, в целом, принципам изобретения и включая такие отклонения от изобретения, которые подпадают под известную или общепринятую практику в области, к которой относится изобретение, и могут применяться в существенным характерным признакам, изложенным ранее в настоящей заявке, и в дальнейшем, охватываются объемом пунктов формулы изобретения.

Другие варианты осуществления охватываются пунктами формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предотвращения преждевременных родов у пациента, представляющего собой человека, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I)

или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного токолитического агента.

2. Способ предотвращения родов перед родоразрешением путём кесарева сечения у пациента, представляющего собой человека, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I)

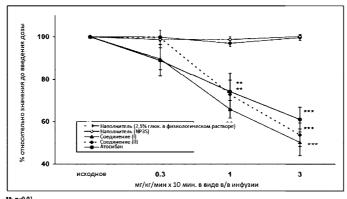
или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного токолитического агента.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанное соединение представлено формулой (III)

- 4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанное соединение находится в кристаллическом состоянии.
- 5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанное соединение проявляет характеристические пики порошковой рентгеновской дифракции при углах 20.70° , 8.1° , 10.0° , 12.0° , 13.1° , 14.1° , 16.4° , 18.4° , 20.1° , 21.0° , 23.5° и 29.5° .
 - 6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное соединение характеризуется спектром порош-

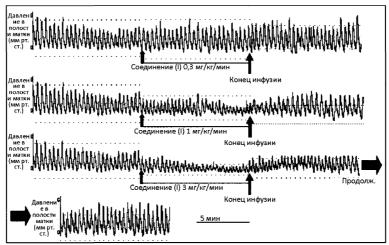
ковой рентгеновской дифракции, таким, как изображено на фиг. 49.

- 7. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанное соединение проявляет пики ¹Н ядерного магнитного резонанса (ЯМР), центрированные при 1,1 м.ч., 3,3 м.ч., 4,9 м.ч., 5,4 м.ч., 7,1 м.ч., 7,7 м.ч., 7,9 м.ч., и 8,0 м.ч.
- 8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанное соединение характеризуется ¹Н ЯМР спектром, таким как изображено на фиг. 21.
- 9. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанное соединение проявляет эндотерму при от 145 до 147°С, как определено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.
- 10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанное соединение характеризуется кривой дифференциальной сканирующей калориметрии, такой, как изображено на фиг. 20 или 23.
- 11. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанное соединение характеризуется потерей веса от 0,2 до 0,6% при нагревании от 25 до 100°С, как измерено с помощью термогравиметрического анализа.
- 12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанное соединение характеризуется кривой термогравиметрического анализа, такой, как изображено на фиг. 24.
- 13. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой антагонист рецептора окситоцина.
- 14. Способ по п.13, отличающийся тем, что указанный антагонист рецептора окситоцина представляет собой атосибан, ретосибан, барусибан, эпельсибан или ноласибан.
- 15. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанный антагонист рецептора окситоцина представляет собой атосибан.
- 16. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой блокатор кальциевых каналов.
- 17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный блокатор кальциевых каналов представляет собой нифедипин или никардипин.
- 18. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанный блокатор кальциевых каналов представляет собой нифедипин.
- 19. Способ по п.1 или 2 отличающийся тем, что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой бетамиметик, магниевую соль, донор оксида азота, прогестерон или его вариант.
- 20. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой бетамиметик, выбранный из группы, включающей тербуталин, ритодрин, гексопреналин, альбутерол, фенотерол, нилидрин и орципреналин.
- 21. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой сульфат магния.
- 22. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой нитроглицерин.
- 23. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанный дополнительный токолитический агент представляет собой прогестерон или 17-α-гидроксипрогестерон капроат.
 - 24. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что пациенту дополнительно вводят кортикостероид.
- 25. Способ по п.24, отличающийся тем, что указанный кортикостероид, выбран из группы, включающей бетаметазон, дексаметазон и гидрокортизон.
- 26. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанное соединение вводят перорально указанному пациенту.
- 27. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный пациент характеризуется гестационным возрастом от примерно 24 недель до примерно 34 недель.
- 28. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что у пациента проявляется уменьшение амплитуды маточных сокращений после указанного введения.

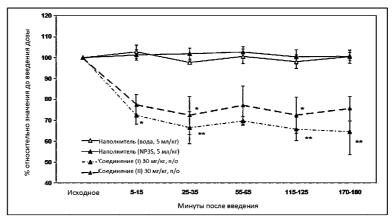


***: p<0.001 относительно группы, которой вводили наполните

Фиг. 1



Фиг. 2



*:p<0.05
**: p<0.01 относительно группы, которой вводили

Фиг. 3

Метод	Наблюдения	Результаты ЯМР
Добавление раствора NaOH (H_2O) к раствору соли (CH_2CI_2)	Ротационное выпаривание насухо, высушивание в вакуумной печи	присутствует пик метасульфоновой кислоты
Добавление раствора NaOH (H_2O) к раствору соли (CH_2CI_2)	Желтая паста, высушивание в вакуумной печи	присутствует пик метасульфоновой кислоты
К раствору СН₂Сl₂ добавляли воду Взбалтывали вручную. Удаляли водный СН₂Cl₂ слой, упаривали.	Твердые вещества осаждались в водном слое	-
Добавляли NaOH (в воде) к водной слою. Добавляли CH ₂ Cl ₂ , збалтывали вручную.	Клейкое твердое вещество, высушивание в вакуумной печи	-
Удаляли СН₂СІ₂ слой, упаривали	Паста, высушивание в вакуумной печи.	присутствует пик метасульфоновой кислоты
Добавление раствора NaOH (EtOH) к раствору соли (EtOH)	Незначительное образование осадка, белого, помещали в холодильник. Ротационное выпаривание, высушивание в вакуумной печи.	присутствует пик метасульфонов ой кислоты
Добавление раствора NaOH (EtOH) к раствору соли (EtOH) 2:1. Упаривали	Паста, высушивание в вакуумной печи.	свободное основание
Добавление раствора NaOH (EtOH) к раствору соли (EtOH) 2:1. Упаривали	Высушивание в вакуумной печи.	свободное основание
Добавление раствора NaOH (EtOH) к раствору соли (EtOH) 2:1. Упаривали.	Высушивание в вакуумной печи.	свободное основание
Добавление водного раствора NaOH к раствору соли в CH_2Cl_2 (2:1). Упаривали.	Высушивание в вакуумной печи.	свободное основание

Фиг. 4

039545

Соль	Метод	Наблюдения	Результат ЯМР
	Добавляли раствор кислоты к отфильтрованному раствору основания, EtOH	Прозрачный раствор, упаривали. Прозрачное стеклообразное твердое вещество, суспендированное в простом эфире. Белые, стеклообразные твердые вещества.	Бензол- сульфонатная соль
Бесилат	Раствор свободного основания добавляли к кислотной взвеси (CH ₂ Cl ₂)	Прозрачный раствор- замороженный Помещали в холодильник.	-
	Раствор кислоты добавляли к раствору основания (Ацетон)	Слегка мутный, желтоватый раствор. Очень небольшое количество твердого вещества, замороженный	-
	Раствор свободного основания добавляли к кислотной взвеси (EtOAc)	Белый осадок. Суспендированное, твердое вещество становлось пастообразным. Упаривали.	•
	Раствор свободного основания добавляли к кислотной взвеси (EtOAc)	ьелый осадок, пастообразный. Помещали на орбитальный шейкер, при 50°C. Прозрачный раствор, замороженный.	-
Цитрат	Раствор свободного основания добавляли к кислотной взвеси (EtOAc)	Пастообразный осадок. Раствор, слегка мутный, перемещивавамый. Прозрачный раствор, белая паста. Помещали в вакумную печь. Белое твердое вещество, неизвестной морфологии/ прозрачная стеклообразная пленка в отдельных местах. Без двойного лучепреломшения	Цитратная соль
	Раствор свободного основания добавляли к кислотной взвеси (Диоксан)	Прозрачный раствор. Замороженный. Раствор отвердевал, доводили до КТ, прозрачный раствор, упаривали	•
Эдисилат	Раствор кислоты (мутный-Диоксан) добавляли к раствору основания (EtOAc)	Без осадка. Прозрачный желтоватый раствор, замораживали. Медленно упаривали - бесцветное масло. Высушивали в вакууме при окружающей	•
HCl -	HCl в Et₂O добавляли к раствору основания в Et₂O	Белый осадок, суспензию перемешивали в течение 30 минут, вакуумно фильтровали. Твердое вещество неизвестной морфологии, без двойного лучепреломления	HCI соль
1101	HCl в Et ₂ O добавляли к раствору основания в CH ₂ Cl ₂ / Et ₂ O	Белый осадок, суспензию хранили в течение 15 минут, вакуумно фильтровали Вязкообразное твердое вещество. Добавляли ацетон, суспендировали в течение 2 дней	HCI соль

Соль	Метод	Наблюдения	Результати ЯМР
Эсилат	Добавляли кислоту к отфильтрованному раствору основания, CH₂Cl₂	Прозрачный раствор, упаривали. Прозрачное стеклообразное твердое вещество, суспендированное в простом эфире. Белая пленка, похожая на твердое вещество, не имела четкой структуры, без двойного лучепреломления.	Этансульфонат ная соль
	Добавляли кислоту к раствору основания, EtOAc	Сразу не образовывался осадок. Очень небольшое количество твердых веществ при перемешивании. Замораживали.	•
Фумарат	Раствор свободного основания добавляли к суспензии кислоты (ацетон)	Очень небольшое количество осадка при перемешивании. Частично упаривали. _Замораживали.	-
Глутамат	Раствор кислоты (H_2O) добавляли к раствору основания (H_2O /EtOH)	Вкрапления маслянистого вещества, растворитель отбрасывали, масло высушивали в атмосферной вакуумной печи.	-
	Раствор кислоты (Н₂О) добавляли к раствору основания (ацетон)	Желтоватый маслянистый осадок, мутный белый раствор. Обрабатывали ультразвуком, замораживали.	•
	Раствор свободного основания добавляли к суспензии кислоты (ацетон)	Прозрачный раствор. Замораживали	-
Малеат	Добавляли кислоту к раствору основания, EtOAc	Сразу образовывался осадок, превращался в раствор при перемешивании. Малое количество осадка, замораживали	•
Мезилат	Добавляли кислоту к раствору <i>о</i> снования в EtOH	Сразу образовывался белый осадок, перемешвали прибл. в течение 30 мин. Вакуумно фильтровали — вязкое твердое вещество, промывали простым эфуром, высушивали в вакууме, в окружающей среде. Стеклообразный, без двойного лучепреломления	Мезилатная соль
Фосфат	Кислоту (Н₂О) добавляли к раствору основания (мутный) EtOH	Незначительно мутный раствор. Упаривали. Мелкозернистое белое твердое вещество - вымораживали, Битое стекло, агрегаты неизвестной морфологии, белые. Не проявляют двойного светопреломления - хранули.	•
	Добавляли кислоту к раствору основания (ацетон)	Без осадка. Замораживали Светло-желтое масло, высушивали в вакууме в окружающей среде.	-
Сульфат	Кислоту (H ₂ O) добавляли к раствору основания в смеси Et ₂ O и CH ₂ Cl ₂	Гетерогенная реакция. Светлый осадок, интенсивно перемешивали прибл. в течение 30 мин. – белая суспензия, оставляли для упаривания	Сульфатная соль

039545

Соль	Метод	Наблюдения	Результат ЯМР
Гидросульфат	Кислоту (H ₂ O) добавляли к раствору основания (мутный) EtOH	Белый осадок, суспендированный на ротаторе, Прозрачный раствор, Замороженный, Белый, молочный раствор - замораживатель. Белые твердые вещества, декантировали, помещали в вытяжной шкаф для упаривания — твердые вещества таким образом в оставшийся раствор, прозрачный. Высушивали в вакууме. Темрець вещества оставались пастообразными, без двойного лучепреломления - хранили.	-
(использовал и 25 молярный избыток Н₂SO₄)	Кислоту (Н ₂ О) добавляли к отфильтрованному раствору основания (ацетон)	Мутный раствор, замороженный. Помещали в замораживатель. Бёрдые вещества —скорее всего, вследствие воды в растворы кислоты, частично упаривали. Сливали оставшийся растворитель, белое твердое вещество. Очень мелкие игольчатые кристаллы, сферолить, двойное лучепреломление. Высушивали в вакууме. Коричневая паста – хранили.	-
	Кислоту (Н₂О) добавляли к отфильтрованному раствору основания (ацетон)	Белый осадок, вязкий. Обрабатывали ультразвуком, прибл. 30 минут. Белое рыхлое твердое вещество, паста на дне сосуда. Замораживали. Рыхлые твердые вещества, мелкие игольчатые кристаллы.	Гидросульфатная соль
	Раствор кислоты добавляли к раствору основания (мутный). EtOH	Небольшое количество твердых веществ. Замороженный. Мелкие белые твердые частицы - замораживатель.	-
Тозилат	Раствор кислоты добавляли к раствору основания, EtOAc	Без осадка. Замороженный. Медленно упаривали — бесцветное масло. Высушивали в вакууме при окружащей	-

Фиг. 5

Соль	Наблюдения	XRPD Результат
Безилат	светло-желтое твердое вещество, стеклообразное, без двойного лучепреломления	-
	стеклообразное, без	аморфный
	двойного лучепреломления	-
Цитрат	неизвестной морфологии, прозрачная стеклообразная пленка без двойного лучепреломления	-
	стеклообразное, без двоиного лучепреломления	аморфный
Эдисилат	розовое стеклообразное твердое вещество, без двойного лучепреломления	<u>-</u>
Эсилат	белое стеклообразное твердое вещество, без двойного лучепреломления	-
Фумарат	оранжевое стеклообразное твердое вещество, без двойного лучепреломления	-
Глутамат	стеклообразное, без двойного лучепреломления	
Малеат	белое стеклообразное твердое вещество, без двойного лучепреломления	-
Фосфат	белое твердое вещество, неизвестной морфологии, без двойного лучепреломления	
[рыхлое твердое вещество, игольчатые кристаллы	кристаллическое Х
Гидросульфат	светло-желтое масло	. =
	светло-желтое масло	-
Сульфат	белое твердое вещество, неизвестной морфолотии, без двойного лучепреломления	-
Т	стеклообразное, без двоиного лучепреломления	<u> </u>
Тозилат	стеклообразное, без двоиного лучепреломления	-
HCI	белое твердое вещество неизвестной морфологии, без двойного лучепреломления	-

Фиг. 6

Соль ID	Растворитель	Метод ^а	Наблюдения	XRPD
образца	Тастворитель	Метод		Результат
	метанол: толуол 1:2	SE	стеклообразное, частично двойное лучепреломление стеклообразное, без	аморфное
Цитрат	ацетон: изо-пропанол 1:2	SE	двойного лучепреломления	
	метанол: этил ацетат 1:2	SE	І лвойного пучепрепомпения.	
	ацетон: этил ацетат: гептан 2:3:1	SE	стеклообрязное, без двоиного лучепреломления	-
	ацетон: толуол	VD	стеклообразное, без лвойного лучепредомления частично стеклообразное,	
Гидросуль	этил ацетат: гептан 6.1	SE	частично стеклоооразное, частично двойное лучепреломление	аморфное
фат	этил ацетат	SE		аморфиое
•	· -	SE	очень вязкое масло	
	мвк: н-бутил ацетат 1:1	вакуумная сушка	не совсем белое тветяте веществел склоородзиос с до до до до до до лучетое помпения стехноого за сего лвойного пуствеломления склоподнова отла тверда	-
	ацетон: толуол 2:1		пройного пунетретомления	
Сульфат	мек: н-бутил ацетат 1:1	SE		
	ацетон: толуол 2:1		creiticobpashoe, tes	
	метанол: этил ацетат 1:2	SE	Treplocobassion, on	
			ластапомиороча до посторожения до посторожени	
Дигидроф	метанол: ацетонитрил 1:2	SE	двойное лучепредомление неизвестной морфологии,	аморфное
осфат	метанол: толуол 1:2	SE	без двойного лучепреломления белое твердое вещество	•
		SE	неизвестной морфологии,	кристаллич еское х
	метил этил кетон: н-бутил	SE	белое твердое вещество, агломерированные пластинки, двойное лучепреломление	низко- кристалличес кое х
	ацетат	SE	твердое вещество	-
		вакуумная сушка	вязкое светло-желтое твердое вещество	•
Глутамат	этил ацетат: гептап н	SE	стеклообразное, без двойного лучепреломления	
ĺ	метанол: голуол 1:1	SÉ	с теклюобразное, без двойного лучепреломления	
Тозилат	мстанол: толуол 1:2	SE	стеклообразное, без двойного лучепреломления	-
l i	ацетон: изо-пропанол 1:2	SE	стекнообразное, без лвойного пучетнепомпения	· ·
	СЦСК: ТОЛУОЛ 1:2	SE	двойного лучепредомления стеклосоразное, без двойного лучепредомления	· .
	этил ацстат: н-бутил ацстат: гептан	VD	утеклообразное, без двойного пучепреломления	
	метил этил кетон: гептан 3:2	SE	стеклообрязное, без двойного лучепреломления	-
	ацетон: толуол 1:1	SE	стеклюобразное, без двойного пучетрепомления	
HC1	этил ацетат: гептан 5:1	SE	утеклюобразное, без лвойного пучепредомпения частично стеклоооразное, без двойного пучепредомления	
	ацетон: толуол 1:1	SE	лучепреломления бело твердое вещество неизвестной морфологии, двойное лучепреломление село твердое вещество неизвестной морфологии, пвойное лучепреломление	кристаллич еское A кристаллич еское A
	Et ₂ O: CH ₂ Cl ₂	FE	двойное лучепреломление агломераты игольчатых кристаллов, двойное лучепреломление	кристаллич еское A
	ацетон	взвесь, 2 д	белое рыхлое твердое вещество, тонкие игольчатые кристаллы, двойное лучепреломпение	кристаллич
	высушенное в вакууме пр	HOKNEK	двоиное лучепреломление	еское д
	ное упаривание FF -быстр	п экруж.		KOE A

высушенное в вакууме при окруж. - Турке сасите а. SE =медленное упаривание, FE =быстрое упаривание, SC =медленное охлаждение, CC =ускоренное охлаждение b. исходный образец

Соль по образца	Растворитель	Метод ^а	Наблюдения	хвер Результат
	метанол: толуол 1 2	SE	стеклообразное, без двоиного лучепреломления	
	ацетон: изо-пропанол 1:2	SE	стеклюобразное, без двойного лученреломления	
	мек: н-бутилацетат і і	SE	вязкообразное твердое вещество	
	сн.си: н-бутил ацетат :::	SE	вязкообразное твердое вещество	
	CH,Cl,; EtOAc; Et,O	SE	стеклообразное, без двойного лученредомления	
		SC	прозрачный раствор	
		FE	стеклообрязное, без двоиного пучепреломления	-
	изо-пропил ацетат. метанол зал	CC	прозрачный раствор	
		SE	прозрачное стекло образное твердое в ещество	-
	-	SC	прозрачный раствор	
		FE	стеклюобразное, без двойного дучепреломления	<u> </u>
Мезилат	гентан-Мек этанол 61:2	cc	прозрачный раствор	<u> </u>
		SE	прозрачное, стеклообразное	-:-
	ацегон: МТВЕ 1:2	SĒ	твердое вещество стеклообразное, без дв ойного	
	ацетон: толуол 1:2	FE	лучепреломления стеклообразное, без двойного лучепреломления	
	изо-пропанол толуол 3:1	FE	стеклообразное, без двойного	·····
		FE	лучепреломления прозрачное	-
	изо-пропанол изо-пропиловый эфир 1:1	FE	стеклообразное твердое вещество	-
		CC	прозрачный раствор	
	CH ₃ CN:вода 1:1	SE	нсизвестная морфология, без двойного лучепреломления	-
		CC	прозрачный раствор	
	изо-пропиловый эфир. сном м∞н 2052	SE	стекпообразнос, без двойного лучепреломления	
	ацетон и-бутилацетат н	SE	лучепреложиения стеклосоразное, оез двоиного лучепреломпения	
	CH ₂ Cl ₂ : изо-пропанол 1:1	SE	тученреложиения стеклообразное, без двойного лучепреломпения	
	метанол толуол 1:1	SE	лученрекомпения частично стеклообразное, частичное двойное лучепреломление	кристаллическ ое в
	метанол: этил ацетат і і	SE	частично маслянистое, частичное двойное пучепреломиение (волокия)	аморфное
Фумарат -		SE	частково масляниста, частково двозаломлююча (волокна)	-
	MATORIOT, TOTAVOT :	1	светло-желтое масло	
	метанол толуол и	вакуумна я сушка	светло-желтое твердое вещество, неизвестной морфологии, двойное лучепреломление	аморфный + пик
	метанол толуол 4 1	SE	стеклоооразное, оез двоиного лучепреломпения	-

а. SE =медленное упаривание, FE =быстрое упаривание, SC =медленное охлаждение, CC =ускоренное охлаждение

b. исходный образец

Соль/ ID образца	Растворител ь	Метод ^а	Наблюдения	XRPD результаты
Эсилат	МеОН: н-бутил ацетат 1:1	ПВ	стеклообразное, без двойного лучепреломления	•
	ацетон: толуол 1:1	ПВ	стеклообразное, без двойного лучепреломления	
	этил ацетат: гептан 4:1	ПВ	стеклообразное, без двойного лучепреломления	
Бесилат	ацетон: толуол 1:1	ПВ	стеклообразное, без двойного лучепреломления	
	СН₂СІ₂: изо-пропанол 1:1	ПВ	стеклообразное, без двойного лучепреломления	
	МЕК: н-бутил ацетат 1:1	ПВ	стеклообразное, без двойного лучепреломления	•
3	ацетон: н-бутил ацетат 1:1	HB	стеклообразное, без двойного лучепреломления	•
Эдисилат	МеОН: МЕК: толуол 1:1:1	ПВ	частично стеклообразное, частично двойное лучепреломление	аморфное
Малеат	МеОН: н-бутил ацетат 1:1	ПВ	стеклообразное, без двойного лучепреломления	-
	ацетон: изо-пропанол 1:2	11B	стеклообразное, без двойного лучепреломления	•

а. SE =медленное упаривание, FE =быстрое упаривание, SC =медленное охлаждение, CC =ускоренное охлаждение

Фиг. 7

Соль	Растворимость (мг/мл)*
HCl	< 1
гидросульфат	< 1
фумарат	< 0,5 (становится вязким)
мезилат	< 46

а. Растворимости рассчитаны на основании общего растворителя, используемого для получения раствора; реальные растворимости могут быть больше, поскольку используется объем частей растворителя или медленной скорости растворения. Растворимости описаны приближенно к мг/мл.

Фиг. 8

Соль	Примечания	Относительная влажность, %	Время	Наблюдения	Изменение веса, %
HCl	-	95%	~2д	внешний вид безводный	0,2
HOI	Вакуумная сушка	95%	~2 Д	внешний вид безводный	~ 6³
		43%	~ 20 часов	внешнии вид безводный	
_	-	53%	~ 3 часа	внешний вид безводный	0ь
Гидросульфат	Ì	650/	~1д	внешний вид безводный	
		65%	~3д	внешний вид безводный	~ 2°
		43%	~ 20 часов		
	Фумарат - 65%	53%	∼ 3 часа	внешний вид безводный	~ 2 ^b
Фумарат			~1 Д	внешний вид частично маслянистый	
Фумарат		65%	~3 д	Желтое масло с небольшим количеством твердого материала	~ 4°

Фиг. 9

Источник образца	Технология	Анализ/Результат
	XRPD	кристаллический I
	DSC ^a	эндо 147,228 (разлож.)
	TG⁵	0.55 @ 25-100 4.10 @ 25-160
Із суспензії в ацетоні	MB¢	0,3 % мас. потеря при 5% OB 0,9 % мас. увеличение от 5-95% OB 0,7 % мас. потеря от 95-5% OB
	¹ H NMR ^a	согласуется со структурой
	XRPD	кристаллический I
Висушений під вакуумом	DSC ³	ендо 146
J J	TG ^b	0.21 @ 25-100 2.53 @ 100-160

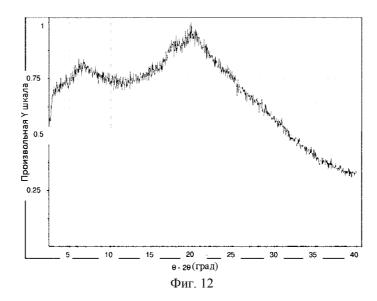
а. эндо= эндотерма, указанные температуры (°C) представляют собой максимумы переходов. Температуры округлены до ближайшего градуса.

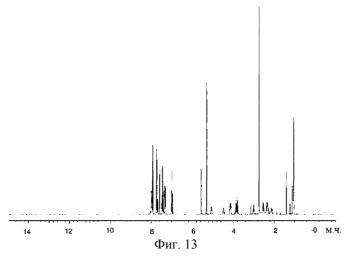
Фиг. 10

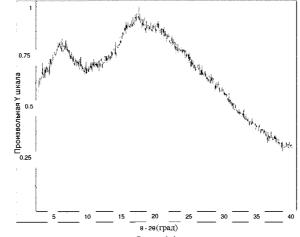
b. исходный образец

b. потеря веса (%) при определенной температуре (°C); изменения веса (%) округлены до 2 десятичных знаков; температуры округлены до ближайшего градуса.

Технология	Анализ/Результат
XRPD	кристаллический I
DSC*	плечевой эндо 188, 206, 272
TGb	0.0 @ 25-165 6.7 @ 165-220
¹H NMR	0,12 молярный % EtOH

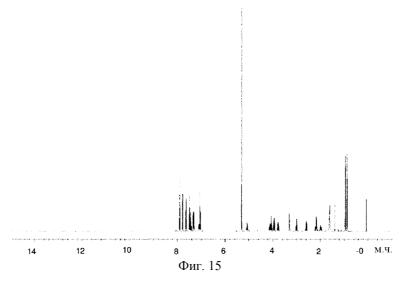


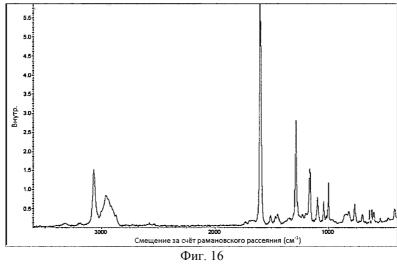


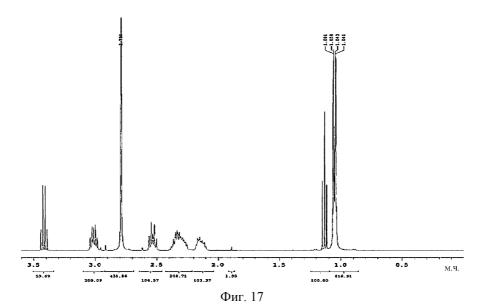


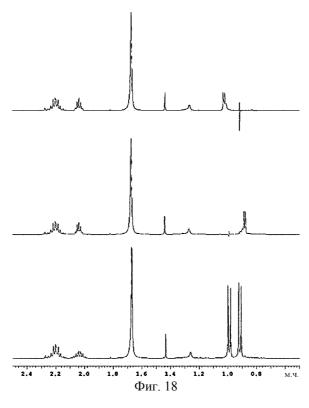
Фиг. 14

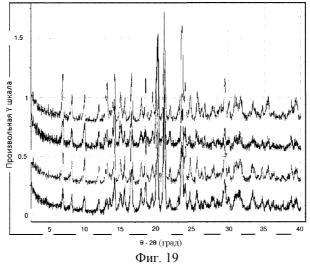
а. эндо= эндотерма, указанные температуры (°C) пр**едставляют собой максимумы пе**реходов. Температуры округлены до ближайшего градуса. b. потеря веса (%) при определенной температуре (°C); изменения веса (%) округлены до 2 десятичных знаков; температуры округлены до ближайшего градуса. Фиг. 11

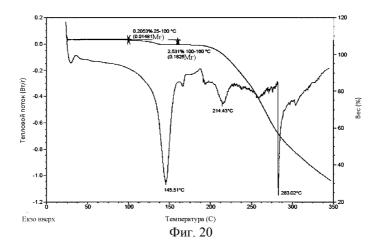


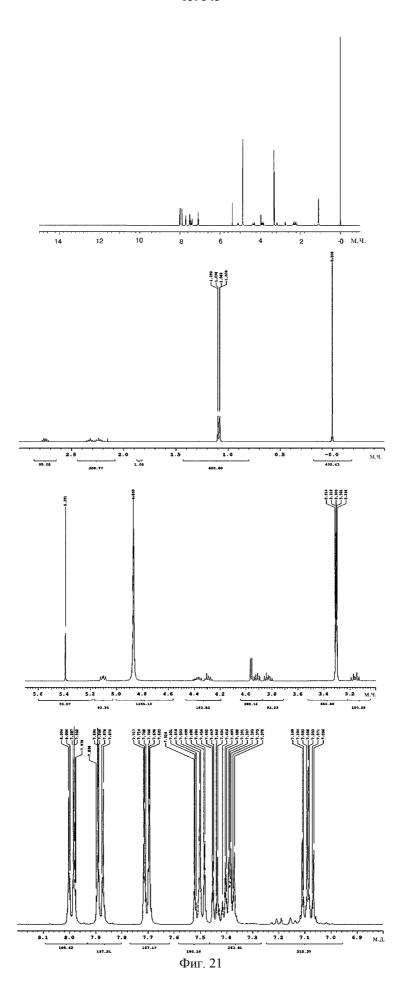


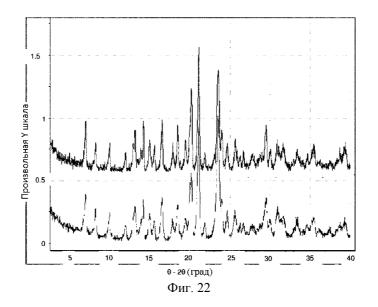


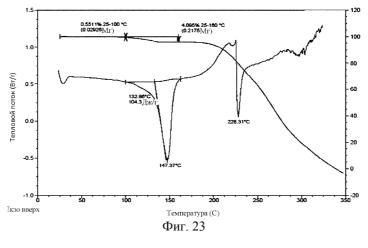


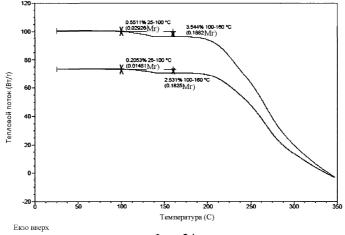


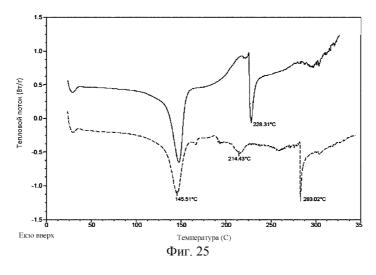


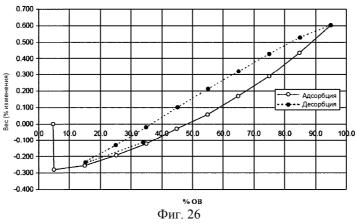




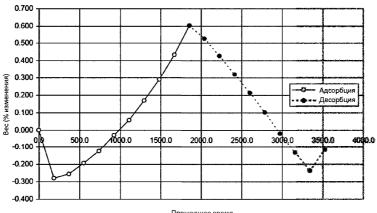




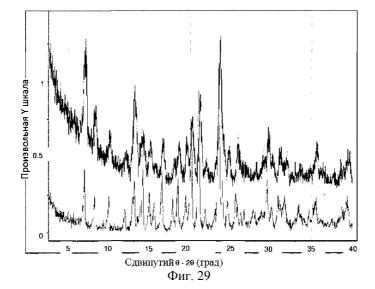




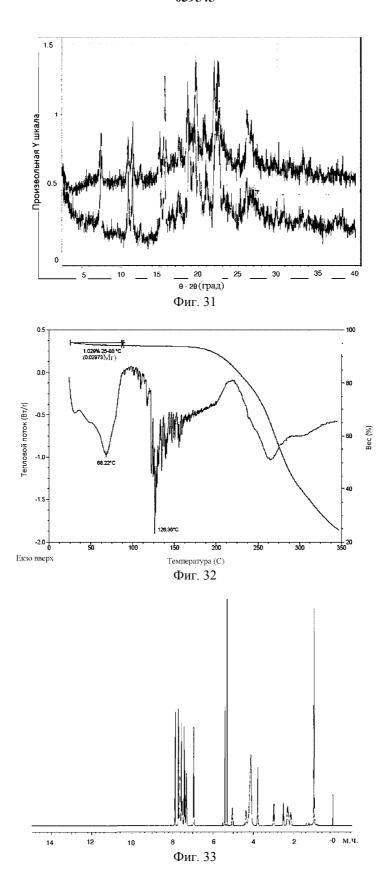
Прош. время	Bec	Bec	Темп. обр.	ОВ обр.
мин	MΓ	% изм.	°C	%
0.1	4.894	0.000	25.06	4.67
185.6	4.880	-0.279	25.07	4.95
369.1	4.881	-0.255	25.06	14.98
552.5	4.885	-0.192	25.06	25,17
738.2	4.200	-0.123	25,06	34,94
923.7	4,892	-0.029	25.05	44.85
1109.2	4.897	0.058	25.05	54,90
1294.8	4,902	0.170	25.08	64.87
1480.7	4.908	0.291	25,05	74.97
1666.2	4.915	0.435	25.04	84.82
1851.6	4.923	0.602	25.14	94.94
2037.8	4.920	0.528	25.03	84,97
2223.3	4,915	0.428	25.03	74.96
2410.8	4.910	0.321	25.03	65.01
2598,3	4.904	0.214	25.03	55.07
2783. 9	4.899	0.101	25.04	45.13
2969.4	4.893	-0.020	25.03	34.89
3154.9	4.887	-0.131	25.06	25.04
3338.4	4.882	-0.236	25.02	15.23
3521.5	4.888	-0.114	25.04	33.97
		Фиг. 27		

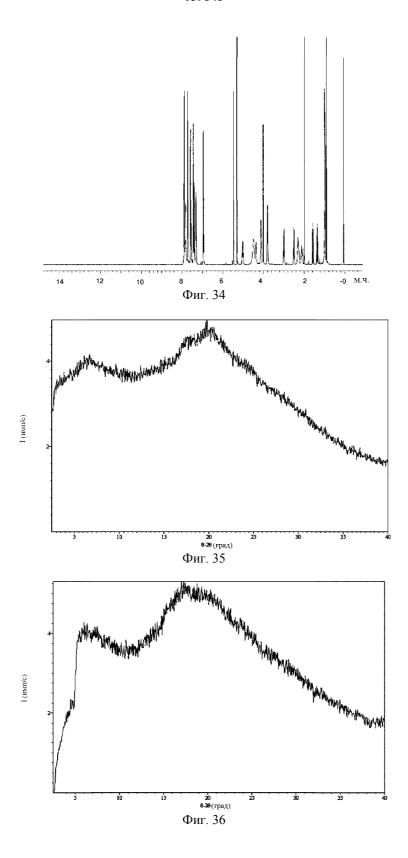


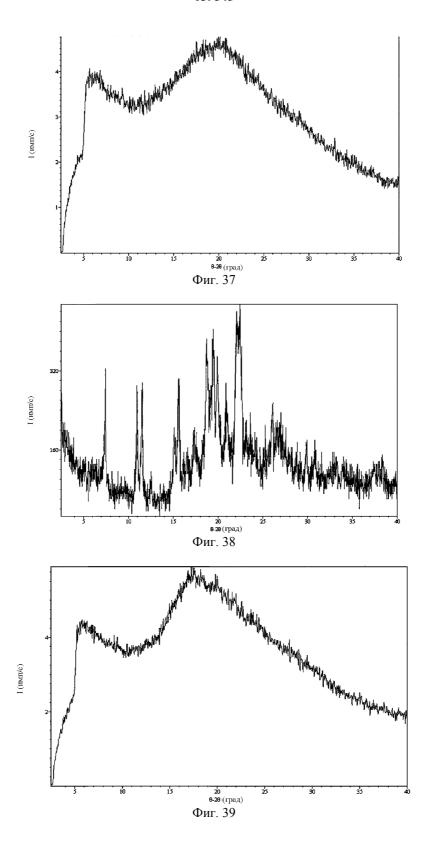
Прошедшее время Φ иг. 28

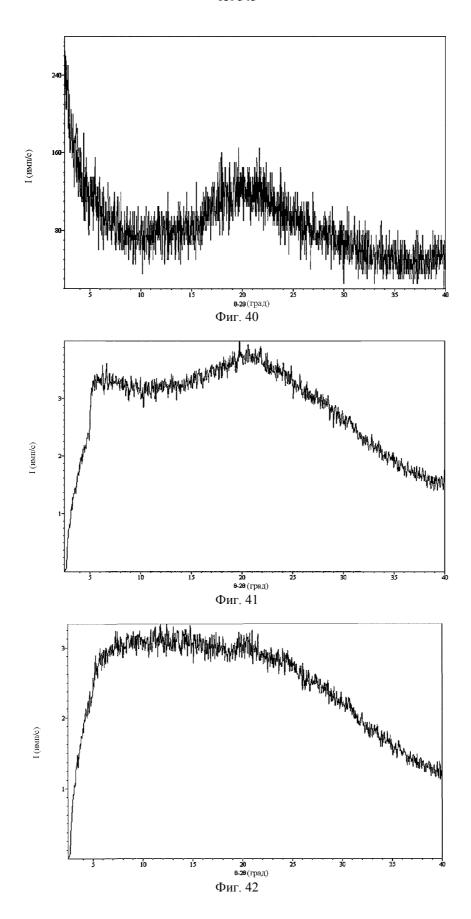


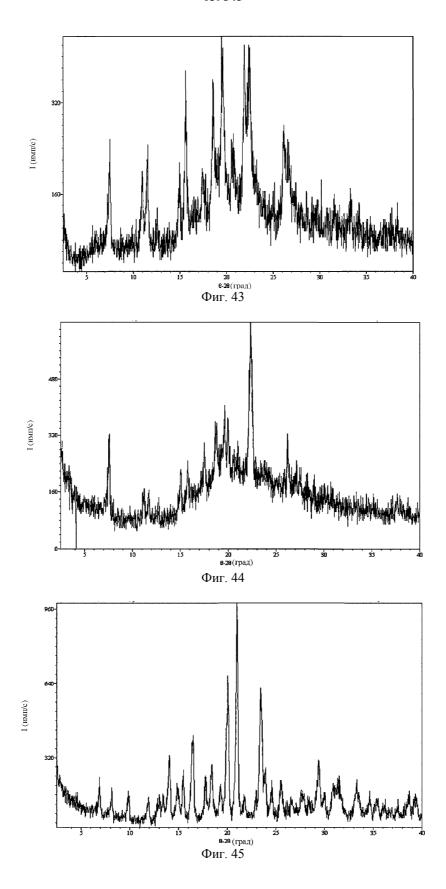
1.5 обрания о

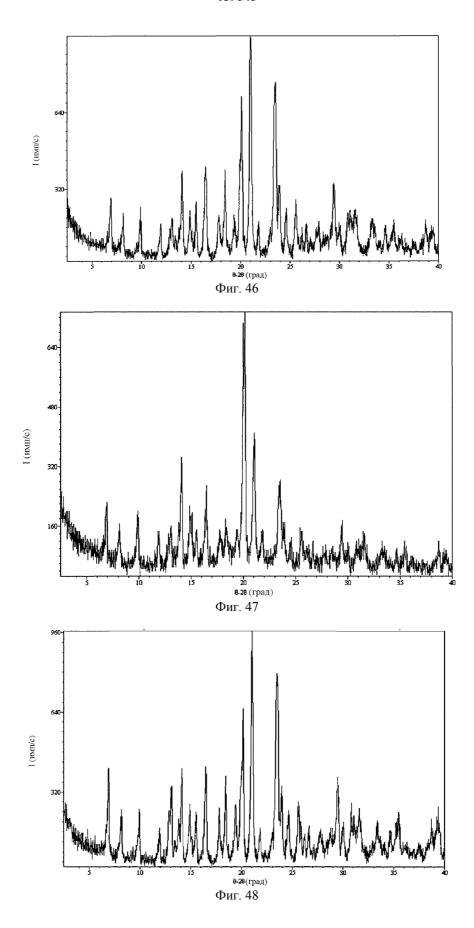


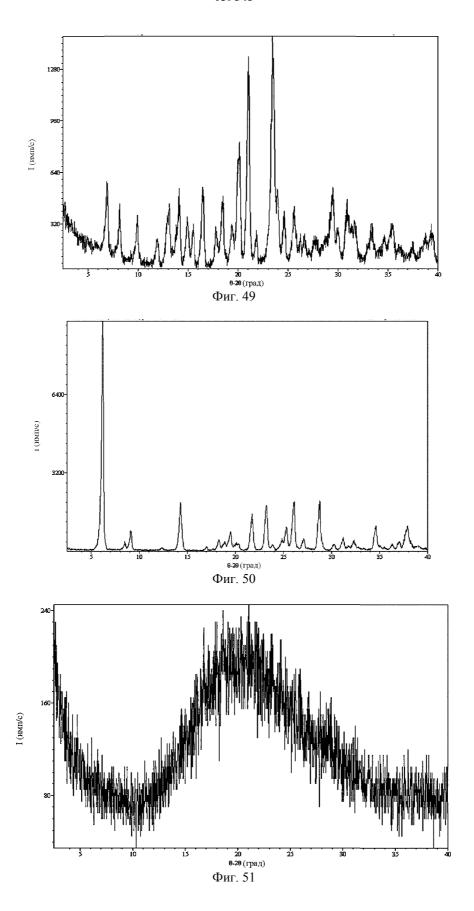


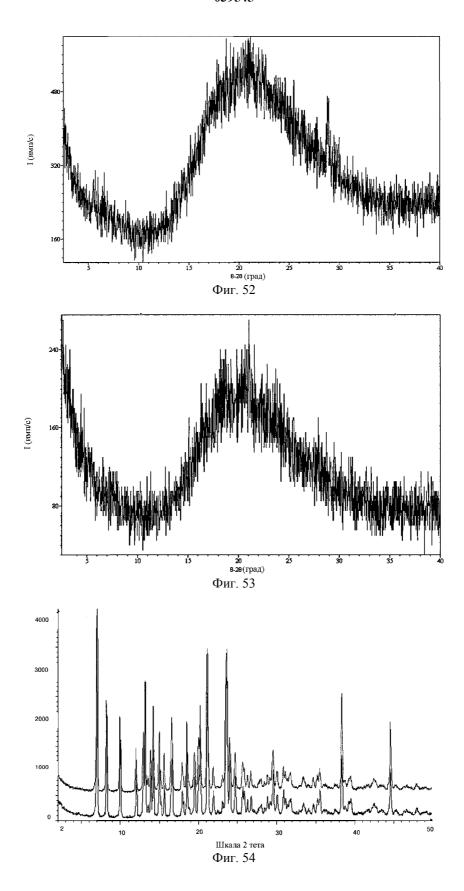












039545

	Co	оединение (1)	Соединение (II)			
Время отбора образца	Кон	центрация м	ικΜ	Коні	центрация	мкМ	
HNWI 0	1.48	3.08	5.96	1.54	2.97	6.07	
120 мин	1.43	2.86	5.65	1.48	3.04	5.74	
Восстанов ление	97%	93%	95%	96%	102%	95%	

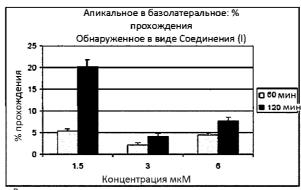
Фиг. 55

	Апикальное в базолатеральное: обнаруженное Соединение (II)								
	1,	1.5 MKM 3 MKM 6 MKM					M		
	% прохождения		% прохождения		% прохождени		дения		
Время отбора образца	Среднее ± CO		Сред	нее	± CO	Сред	нее	± CO	
60 мин	5.39	±	0.46	2.27	±	0.38	4.41	±	0.38
120 мин	20.22	±	1.47	4.11	±	0.73	7.54	±	0.99

Фиг. 56а

	Базолатеральное в апикальное: обнаруженное Соединение (II)								
	1.	1.5 MKM 3 MKM					6 мкМ		
	% прохождения		% про	хож,	дения	% про	хож	дения	
Время отбора образца	Среднее ± CO		Сред	нее	± CO	Сред	нее	± CO	
60 мин	5.81	±	0.95	1.04	±	0.34	0.42	±	0.16
120 мин	5.25	±	0.92	1.06	±	0.25	0.60	±	0.01

Фиг. 56b



Восстановление в апикальном компартменте при окончании лечения (120 мин)

Фиг. 56с



Восстановление в апикальном компартменте при окончании лечения (120 мин)

Фиг. 56d

Соединение (I) Соединение (II)

1.5 мкМ	3 мкМ	6 мкМ
2%	0.6%	3.1%
349%	217%	302%

Фиг. 56е

	Апикальное в базолатеральное: обнаруженное Соединение (II)								
	1	1.5 MKM 3 MKM 6 MKM					M		
	% прохождения			% пр	жохс	дения	% про	хожд	ения
Время отбора образца	Средн	ee ±	со	Сред	⊣ee ±	: CO	Среді	нее ±	со
60 і мин	25.11	±	2.82	11.72	±	5.34	3.25	±	0.50
120 мин	14.47	±	5.15	13.26	Ŧ	5.66	5.46	±	1.72

Фиг. 58а



Восстановление в апикальном компартменте при окончании лечения (120 мин)

Фиг. 58b

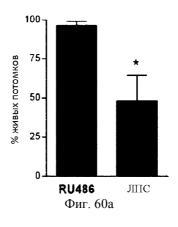
Соединение (I) Соединение (II)

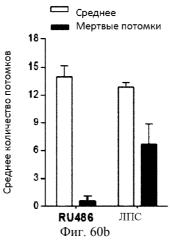
1.5 мкМ	3 мкМ	6 мкМ
0.8%	1.8%	0.3%
37.1%	39.1%	156.3%

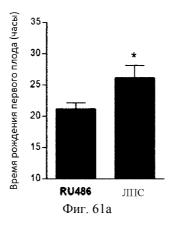
Фиг. 58с

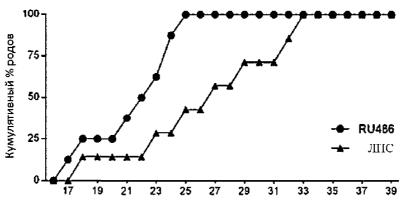
Анали	тическое обору	дование	
ВЭЖХ Автодозатор Детектор Система данных МС интерфейс Тип сканирования Полярность Наблюдаемый ион Соединение (I) Наблюдаемый ион Соединение (II)	501.2 M/a (mayayur	o Thermo Finnigan спечение Excalib ый ион 484,1 — 50	ur
Хроматографические Аналитическая колонка	и масс-спектрол Xterra 5 мкМ С ₁₈ (: 22 °C		
Температура колонки Подвижная фаза А Подвижная фаза В	FOA 0,1% в воде CH₃CN 400 мкл/мин		
Скорость потока Инъецируемый объем Градиент	10 мкл · Время (мин)	Подвижная фаза% А	Подвижная фаза% В
	0 2.0	85 5	15 95

Фиг. 59

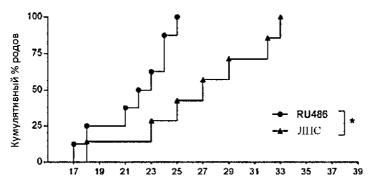






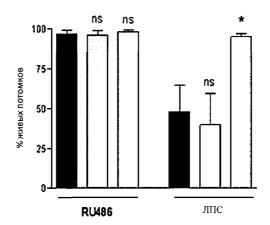


Время после инъекции RU486 или LPS (часы) Φ иг. 61b

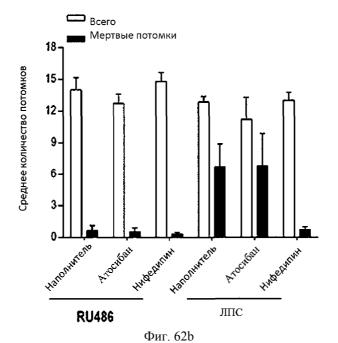


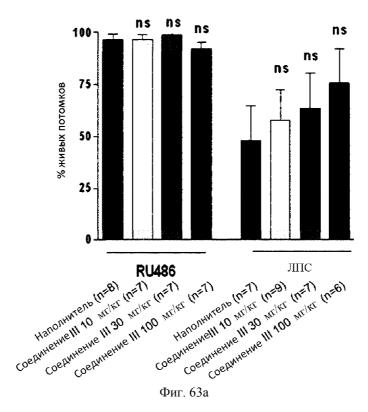
Время после инъекции RU486 или LPS (часы)

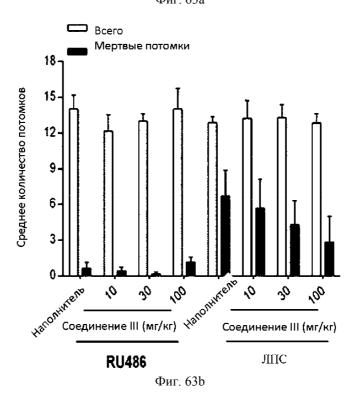
Фиг. 61с

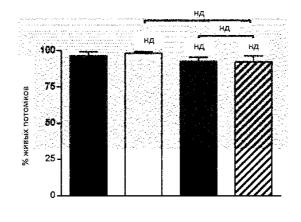


■■ Наполнитель (n=8 RU486, n=7 LPS)









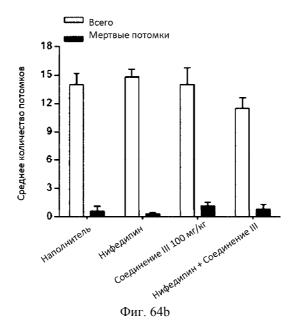
■Наполнитель(n=8)

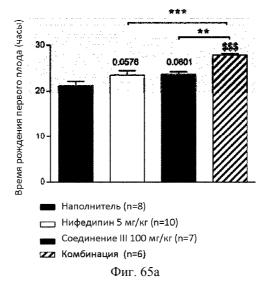
□ Нифедипин 5 мг/кг (n=10)

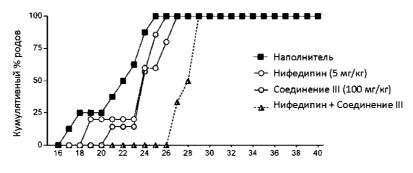
Соединение III 100 мл/кг (n=7)

ZZ Комбинация (n=6)

Фиг. 64а

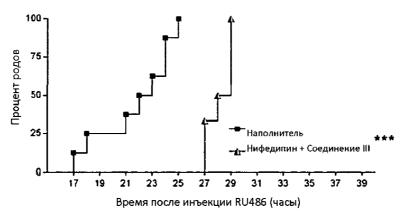




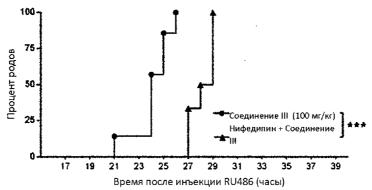


Время после инъекции RU486 (часы)

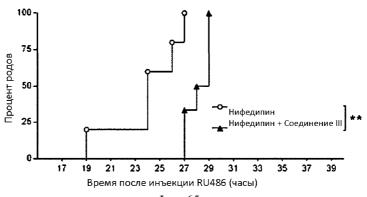
Фиг. 65b



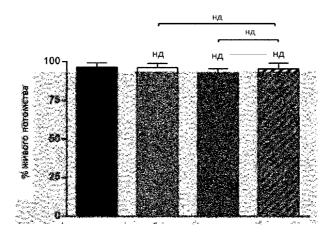
Фиг. 65с



Фиг. 65d



Фиг. 65е



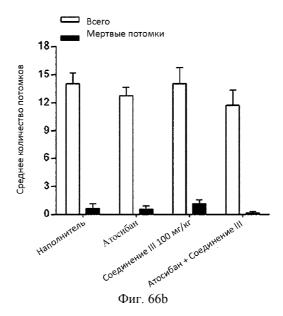
Наполнитель (n=8)

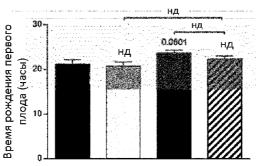
СП Атосибан (n=11)

■ Соединение III 100 мг/кг (n=7)

томбинация (n=7)

Фиг. 66а





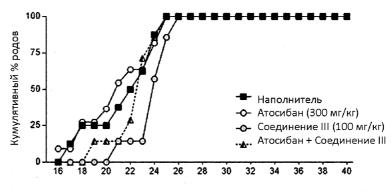
■ Наполнитель (n=8)

🖂 Атосибан (n=11)

___ Соединение III 100 мг/кг (n=7)

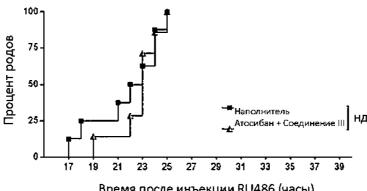
zza Комбинация (n=7)

Фиг. 67а

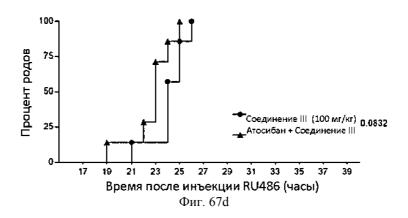


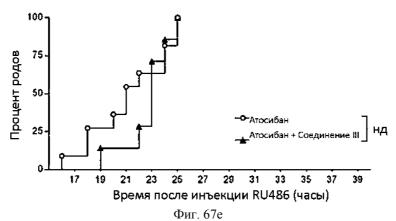
Время после инъекции RU486 (часы)

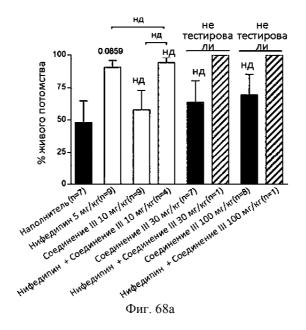
Фиг. 67b

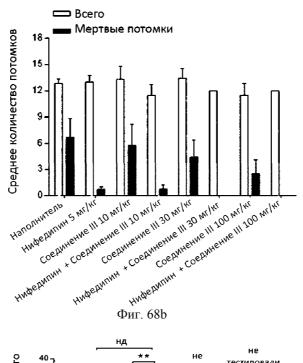


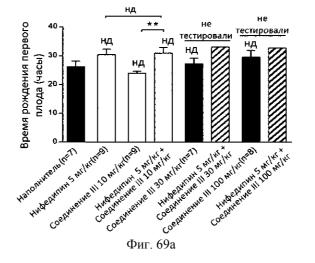
Время после инъекции RU486 (часы) $\Phi_{\rm MT.}$ 67c

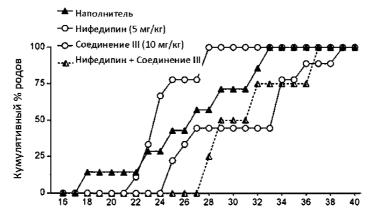






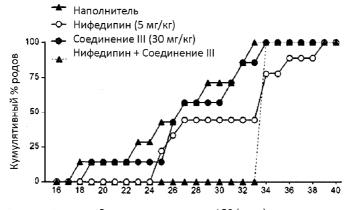






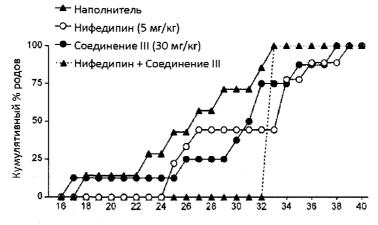
Время после инъекции LPS (часы)

Фиг. 69b

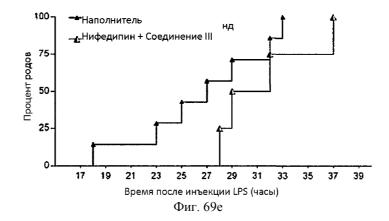


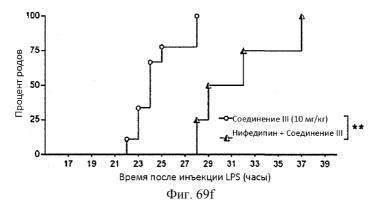
Время после инъекции LPS (часы)

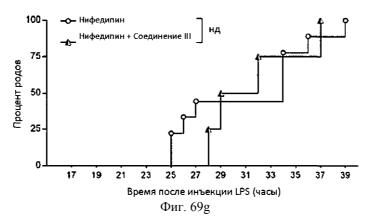
Фиг. 69с

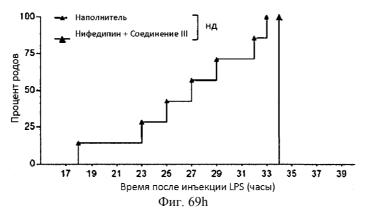


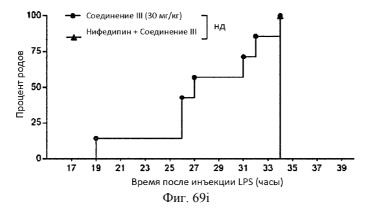
Время после инъекции LPS (часы) Φ иг. 69d

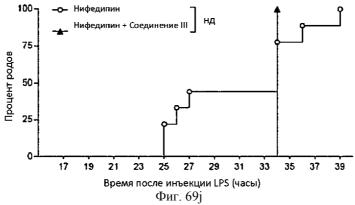


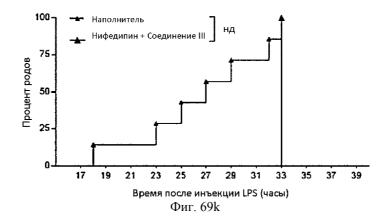


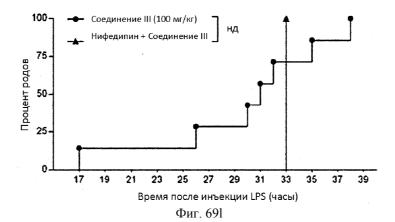


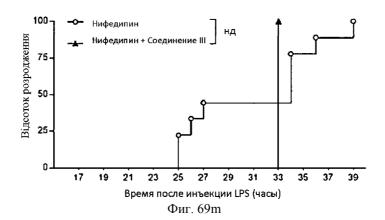


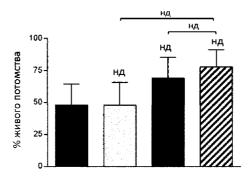










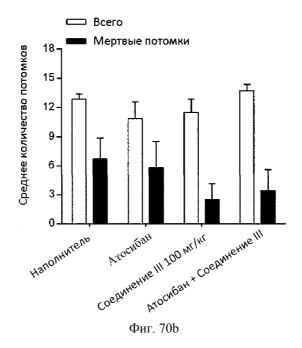


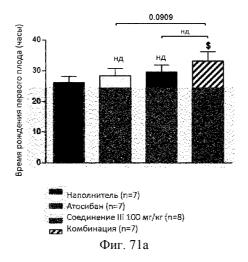
■ Наполнитель (n=7)

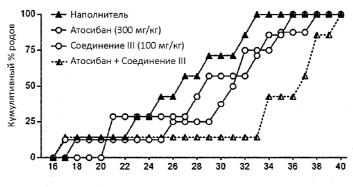
Соединение III 100 мг/кг (n=6)

∠∠∠ Комбинация (n=7)

Фиг. 70а

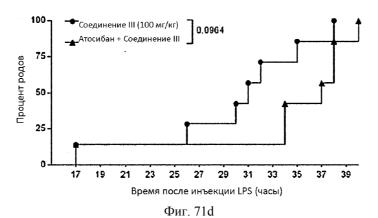


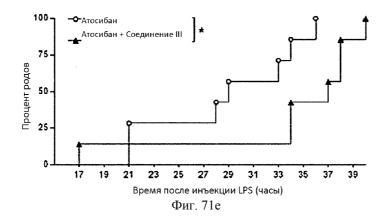


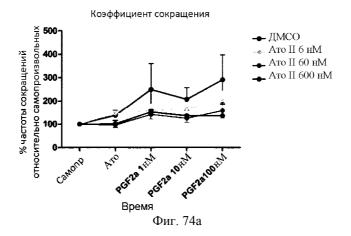


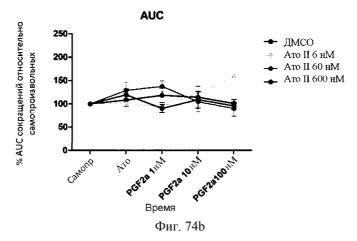
Время после инъекции LPS (часы) Φ иг. 71b

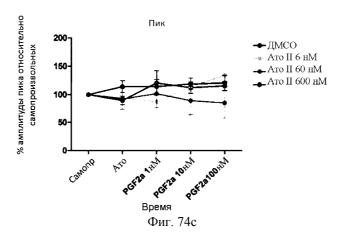


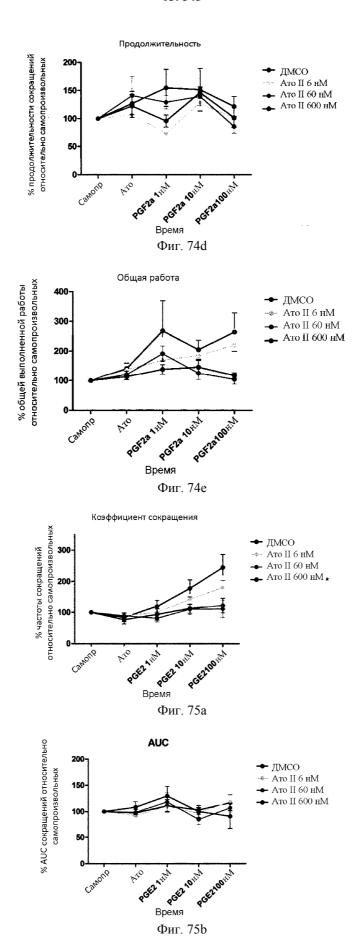


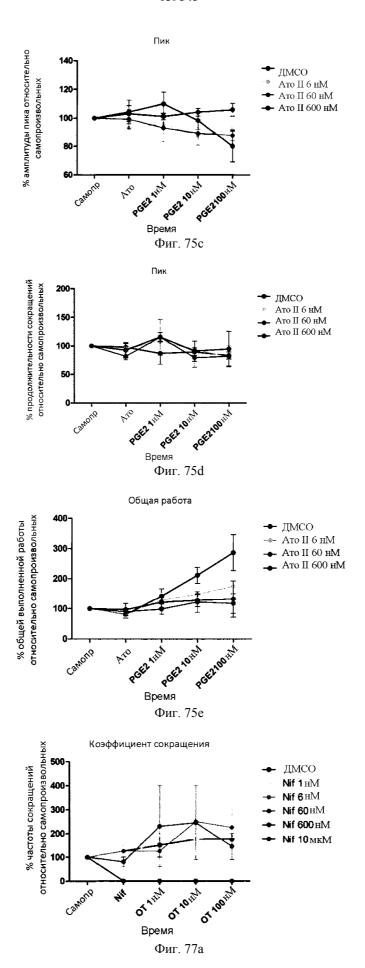


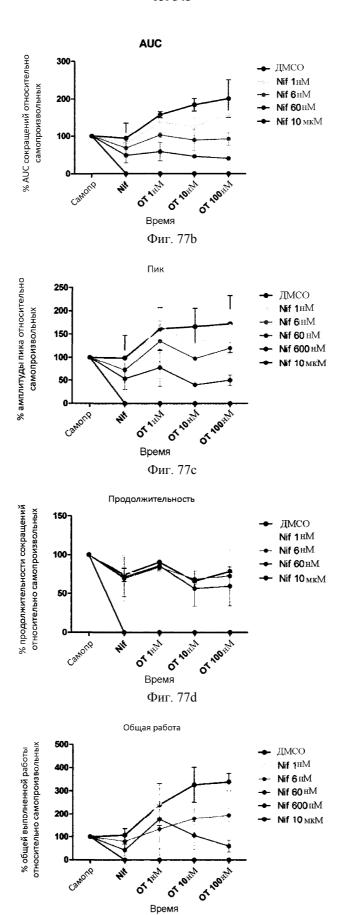




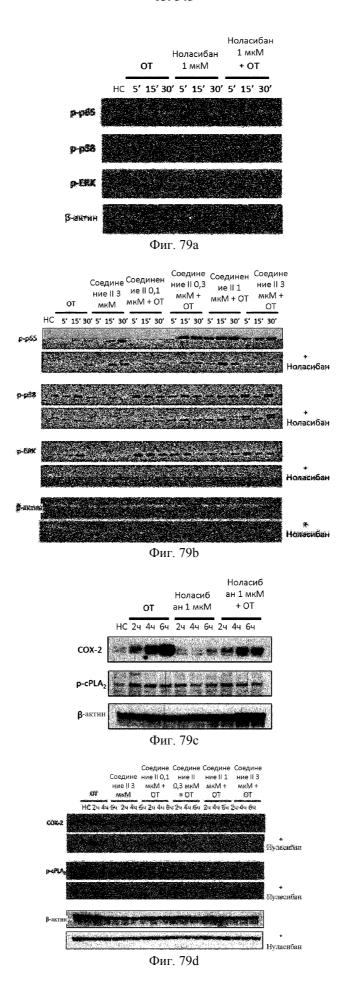


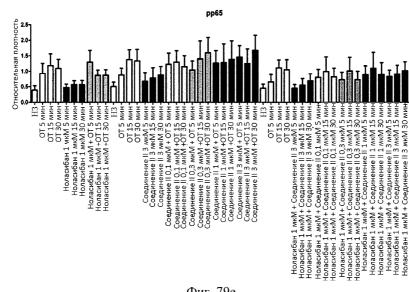




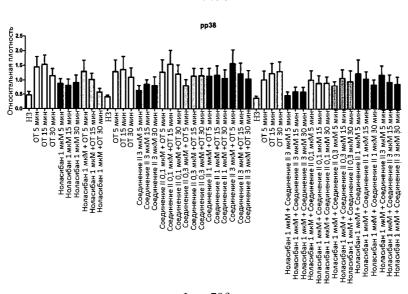


Фиг. 77е

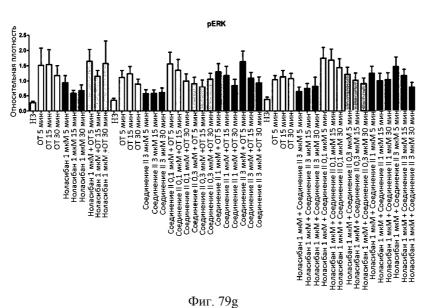


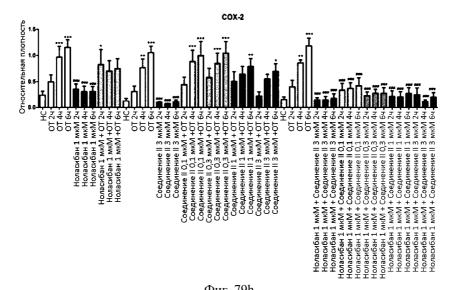


Фиг. 79е

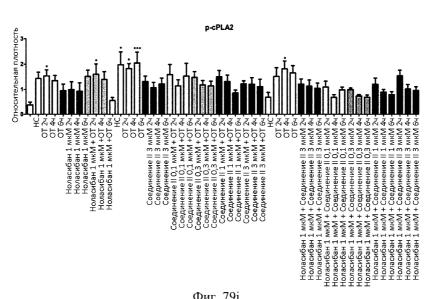


Фиг. 79f





Фиг. 79h



Фиг. 79і

