

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040138

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.25

(51) Int. Cl. C07D 303/46 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990154

(22) Дата подачи заявки
2017.06.29

(54) ИНГИБИТОР ИММУНОПРОТЕАСОМЫ НА ОСНОВЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ СОЛЕЙ ПЕПТИДНЫХ ЭПОКСИКЕТОНОВ

(31) 62/356,287

(32) 2016.06.29

(33) US

(43) 2019.06.28

(86) PCT/US2017/039961

(87) WO 2018/005772 2018.01.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КЕЗАР ЛАЙФ САЙНСИЗ (US)

(72) Изобретатель:
Джонсон Генри, Льюис Иван, Далзил Шон, Макминн Дастин (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2014152134
SAAL C ET AL.: "Pharmaceutical salts: A summary on doses of salt formers from the Orange Book", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 49, no. 4, 5 June 2013 (2013-06-05), pages 614-623, XP028676562, ISSN: 0928-0987, DOI: 10.1016/J.EJPS.2013.05.026, page 615 - page 616; table 1

Harry G. Brittain: "Developing an Appropriate Salt Form for an Active Pharmaceutical Ingredient American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology", American Pharmaceutical Review, 1 December 2009 (2009-12-01), XP055109646, Retrieved from the Internet: URL:http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/117788-Developing-an-Appropriate-Salt-

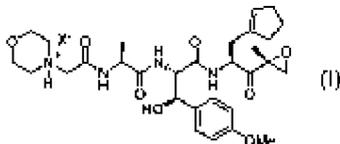
Form-for-an-Active-Pharmaceutical-Ingredient/ [retrieved on 2014-03-24] the whole document
"THE COMPLETE BLOG FOR THE PREPARATION OF PHARMACEUTICAL SALTS", INTERNET CITATION, 11 February 2008 (2008-02-11), pages 1-10, XP002513555, Retrieved from the Internet: URL:http://kilomentor.chemicalblogs.com/55_kilomentor/archive/552_the_complete_blog_for_the_preparation_of_pharmaceutical_salts.html [retrieved on 2009-02-04] the whole document

"Pharmaceutical Salts", 1 May 1958 (1958-05-01), pages 334-345, XP55136472, Retrieved from the Internet: URL:http://phoenix.tuwien.ac.at/pdf/pharmaceutical_salts/Pharmaceutical_salts.pdf [retrieved on 2014-08-26] tables

STEPHEN M BERGE ET AL.: "Pharmaceutical salts", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY AND AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, vol. 66, no. 1, 1 January 1977 (1977-01-01), pages 1-19, XP002675560, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.2600660104, Retrieved from the Internet: URL:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.2600660104/abstract [retrieved on 2006-09-18] page 9, left-hand column, last paragraph - page 10

WERMUTH CAMILLE ET AL.: "Chapter 11: Selected procedures for the preparation of pharmaceutically acceptable salts", 1 January 2008 (2008-01-01), HANDBOOK OR PHARMACEUTICAL S, VERL. HELVETICA CHIMICA ACTA, ZÜRICH, CH, PAGE(S) 219 - 263, XP008153319, ISBN: 978-3-906390-58-1, page 254 - page 255

(57) В данном документе предложен ингибитор иммунопротеасомы на основе пептидного эпоксикетона, имеющий структуру формулы (I), где X⁻ представляет собой противоион, кристаллические формы, соли, а также способы их получения и их составы.



040138 B1

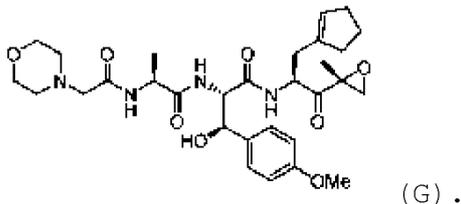
040138 B1

Уровень техники
Область изобретения

Данное раскрытие относится к новым кристаллическим солям (2S,3R)-N-[(2S)-3-(циклопент-1-ен-1-ил)-1-[(2R)-2-метилоксиран-2-ил]-1-оксопропан-2-ил]-3-гидрокси-3-(4-метоксифенил)-2-[(2S)-2-[2-(морфолин-4-ил)ацетиамидо]пропанамидо]пропанамида или гидратам солей, их фармацевтическим композициям, способам их получения и способам их применения.

Описание родственных технологий

Соединение (2S,3R)-N-[(2S)-3-(циклопент-1-ен-1-ил)-1-[(2R)-2-метилоксиран-2-ил]-1-оксопропан-2-ил]-3-гидрокси-3-(4-метоксифенил)-2-[(2S)-2-[2-(морфолин-4-ил)ацетиамидо]пропанамидо]пропанамида ("соединение G") пригодно в качестве ингибитора иммунопротеасомы

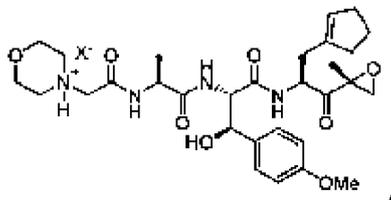


В эукариотах деградация белка преимущественно опосредована через метаболический путь убиквитина, в котором белки, нацеливаемые для деструкции, лигированы с 76 аминокислотой полипептида убиквитина. Затем, после нацеливания белки убиквитина служат субстратами для протеасомы 26S, мультикаталитической протеазы, которая расщепляет белки на короткие пептиды под действием ее трех основных протеолитических активностей. Наряду с имеющейся главной функцией во внутриклеточном белковом обмене, опосредованная протеасомой деградация также играет ключевую роль во многих процессах, а именно представлении антигена главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, апоптозе, регуляции роста клеток, активации NF-κB, процессинге антигена и трансдукции провоспалительных сигналов.

РСТ публикация № WO 2014/152134 описывает ингибиторы протеасомы на основе трипептидного эпоксикетона и способы применения этих соединений для лечения заболеваний и болезней, связанных с aberrантной иммунопротеасомной активностью. Поскольку ингибиторы протеасомы на основе трипептидного эпоксикетона, а именно соединение G, пригодны для лечения заболеваний и болезней у пациента, существует потребность в легко растворимых и стабильных формах этих соединений для их производства, доставки, хранения и введения.

Сущность изобретения

В одном аспекте раскрытие предлагает кристаллическую соль, имеющую структуру



где X⁺ представляет собой противоион. В некоторых вариантах реализации изобретения X⁺ представляет собой малеат, фуемарат, оксалат, малат, сульфат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, фосфат, галогенид, тартрат, цитрат, тозилат, пропионат и/или бензоат. В различных случаях соль представляет собой гидрат соли.

В некоторых случаях X⁺ представляет собой малеат. Например, кристаллическая соль может быть мономалеатом.

Форма А. В некоторых вариантах реализации изобретения кристаллический мономалеат имеет форму А, характеризующуюся (а) рентгеновской дифрактограммой порошкового продукта ("XRPD"), включающей пики при около 6,9, 17,3 и 17,8 ± 0,2° 2θ, при использовании излучения Cu Kα, или (б) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,9, 17,3, 17,8, 4,9, 6,8, 6,9, 7,7, 17,2 и 17,6 ± 0,2° 2θ, при использовании излучения Cu Kα, или (в) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,9, 17,3, 17,8, 4,9, 6,8, 6,9, 7,7, 17,2, 17,6, 10,9, 12,4, 13,5, 14,2, 16,1, 16,4, 18,5, 21,0, 22,0, 23,4, 23,7, 24,5 и 25,2 ± 0,2° 2θ, при использовании излучения Cu Kα, или (г) дифрактограммой XRPD, по сути изображенной на фиг. 1, или (д) термограммой дифференциальной сканирующей калориметрии ("ДСК"), по сути изображенной на фиг. 2.

Форма В. В некоторых вариантах реализации изобретения, кристаллический мономалеат имеет форму В, характеризующуюся (а) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 7,2, 18,4 и 22,0 ± 0,2° 2θ, при использовании излучения Cu Kα, или (б) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,8, 7,2, 18,4, 6,6, 13,6, 22,0, 17,4, 14,5, 18,0 и 5,0 ± 0,2° 2θ, при использовании излучения Cu Kα, или (в) дифрактограммой XRPD, по сути изображенной на фиг. 13, или (г) термограммой ДСК, по сути

изображенной на фиг. 17.

Форма С. В некоторых вариантах реализации изобретения кристаллический мономалеат имеет форму С, характеризующуюся (а) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 7,4, 13,2 и 20,1 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (б) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,6, 13,2, 7,4, 20,1, 13,6, 6,9, 16,9, 3,7, 17,9 и 19,9 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (в) дифрактограммой XRPD, по сути изображенной на фиг. 7, или (г) термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 8.

Форма D. В некоторых вариантах реализации изобретения кристаллический мономалеат имеет форму D, характеризующуюся (а) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 4,9, 7,7, 10,9, 12,4, 13,6 и 15,3 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (б) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,8, 4,9, 17,4, 15,3, 7,7, 3,4, 17,7, 13,6, 12,4 и 10,9 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (в) дифрактограммой XRPD, по сути изображенной на фиг. 9, или (г) термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 10.

Форма E. В некоторых вариантах реализации изобретения кристаллический мономалеат имеет форму E, характеризующуюся (а) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,4, 7,3 и 19,8 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (б) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,5, 3,3, 7,3, 19,8, 6,8, 16,5, 12,1, 21,5, 4,0 и 13,0 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (в) дифрактограммой XRPD, по сути изображенной на фиг. 11, или (г) термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 12.

Форма F. В некоторых вариантах реализации изобретения кристаллический мономалеат имеет форму F, характеризующуюся (а) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,3, 19,0 и 19,6 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (б) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,3, 7,1, 19,0, 17,5, 19,6, 17,9, 22,0, 13,5, 18,2 и 15,5 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (в) дифрактограммой XRPD, по сути изображенной на фиг. 19, или (г) термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 20.

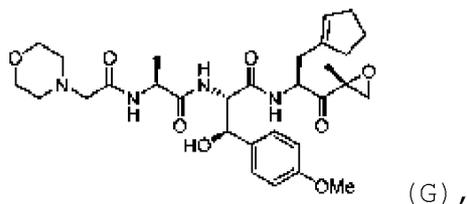
В некоторых случаях X⁻ представляет собой фумарат. Например, кристаллическая соль представляет собой монофумарат.

Форма G. В некоторых вариантах реализации изобретения кристаллический монофумарат имеет форму G, характеризующуюся (а) дифрактограммой XRPD, включающей пики при около 6,4, 7,2, 13,8, 16,0, 17,4, 18,5, 18,7, 20,0, 20,9, 21,9, 24,5 и 25,8 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α , или (б) дифрактограммой XRPD, по сути изображенной на фиг. 21, или (в) термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 22. В некоторых случаях монофумарат представляет собой гидрат монофумарата и может представлять собой смесь гидратной и негидратной формы (или ангидрита).

В некоторых вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой оксалат. В различных вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой малат. В некоторых случаях X⁻ представляет собой сульфат. В различных случаях X⁻ представляет собой метансульфонат. В некоторых вариантах реализации изобретения, X⁻ представляет собой 2-нафталинсульфонат. В различных вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой фосфат. В некоторых случаях галогенид (например, хлорид, бромид, йодид). В разных случаях X⁻ представляет собой тартрат. В некоторых вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой цитрат. В различных вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой тозилат. В некоторых случаях X⁻ представляет собой пропионат. В различных случаях X⁻ представляет собой бензоат. В любом из этих случаев соль находится в виде гидрата или смеси гидратной и негидратной формы (или ангидрита).

В другом аспекте раскрытие предлагает способ получения кристаллической соли, раскрытой в данной документе, путем смешивания

(а) соединения G



(б) maleиновой кислоты и

(в) растворителя

для получения суспензии.

В некоторых вариантах реализации изобретения молярное отношение соединения G к maleиновой кислоте находится в диапазоне от около 1:0,5 до 1:2 или около 1:1. В различных случаях растворитель выбирают из группы, состоящей из метанола ("MeOH"), этанола ("EtOH"), изопропанола ("IPA"), этилацетата ("EtOAc"), изопропилацетата ("IPAc"), тетрагидрофурана ("THF"), метил-трет-бутилового эфира ("MTBE"), ацетона/н-гептана, ацетона, диэтилового эфира ("Et₂O")/EtOAc, гексана/EtOAc, MTBE/EtOAc,

толуола, 1,4-диоксана, ацетонитрила ("ACN"), 1-бутанола, водных смесей из вышеуказанных и их комбинации. Например, растворитель представляет собой EtOAc, IPA, EtOH, их водные смеси или их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения смешивание происходит при температуре в диапазоне от 0 до 80°C или при температуре в диапазоне от 40 до 60°C. Смешивание происходит в период до 6 ч. В различных вариантах реализации изобретения способ необязательно включает охлаждение суспензии до 0°C. В некоторых случаях способ необязательно включает фильтрацию суспензии для образования осадка. В различных случаях способ необязательно включает промывание, сушку или и промывание и сушку осадка. Способ дополнительно включает перекристаллизацию осадка. Дополнительно или в альтернативном варианте способ дополнительно включает (1) восстановление соединения G из осадка; и (2) смешивание восстановленного соединения G, малеиновой кислоты и растворителя для образования кристаллической соли.

Раскрытие дополнительно предлагает состав, содержащий кристаллические соли, раскрытые в данном документе, и один или более эксципиентов. В некоторых вариантах реализации изобретения состав представляет собой жидкую лекарственную форму.

В некоторых случаях лекарственная форма представляет собой лиофилизированную лекарственную форму, причем лиофилизированную лекарственную форму восстанавливают до жидкой формы. В некоторых случаях кристаллическая соль находится в жидкой или восстановленной лиофилизированной лекарственной форме при концентрации в диапазоне от около 1 до около 150 мг/мл, или от около 10 до около 70 мг/мл, или от около 30 до около 50 мг/мл от массы свободного основания кристаллической соли.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более эксципиентов в составе выбирают из группы, состоящей из поверхностно-активного вещества, регулятора тоничности, буфера и их комбинаций. В некоторых случаях лиофилизированная лекарственная форма необязательно содержит криопротектор, объемобразующий агент или оба. В различных вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, полиоксил касторового масла, поли(алкилен)гликоль, каприлокапроилполиоксилглицерид, полиоксиалкиленовые блок-сополимеры и их комбинации. В различных случаях регулятор тоничности представляет собой соль, многоатомный спирт или их комбинации. В некоторых случаях жидкая лекарственная форма или восстановленная лиофилизированная лекарственная форма является изотонической. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер выбирают из группы, состоящей из цитрата, фосфата, гистидина, сукцината, ацетата, малеата, глюконата и их комбинаций. В различных случаях жидкая лекарственная форма или восстановленная лиофилизированная лекарственная форма имеет pH в диапазоне от около 3,0 до около 8,0 или от около 4,0 до около 6,5. В различных вариантах реализации изобретения жидкая лекарственная форма или восстановленная лиофилизированная лекарственная форма подходит для парентерального введения субъекту (например, человеку). В некоторых случаях парентеральное введение является внутривенным, внутримышечным, внутривенным или подкожным. Например, парентеральное введение является подкожным. В некоторых вариантах реализации изобретения состав имеет биодоступность по меньшей мере 55%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 65%.

Другой аспект раскрытия предлагает способ ингибирования иммунопротеасомы клетки, включающий контактирование клетки с кристаллической солью или составом из нее, раскрытыми в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения иммунопротеасома LMP7 ингибирована. В некоторых случаях контактирование происходит *in vivo*. В различных вариантах реализации изобретения контактирование включает введение субъекту, страдающему расстройством, связанным с aberrантной иммунопротеасомной активностью. В некоторых вариантах реализации изобретения расстройство представляет собой аутоиммунное заболевание или воспаление. В некоторых случаях это заболевание представляет собой псориаз, дерматит, системную склеродермию, склероз, болезнь Крона, язвенный колит; синдром дыхательной недостаточности, менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; экзему, астму, хроническое воспаление; атеросклероз; дефицит адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (СКВ); сахарный диабет; рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; синдром Шегрена; ювенильный диабет; туберкулез, саркоидоз, полимиозит, гранулематоз, васкулит; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); заболевание, включающее диapedез лейкоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганной недостаточности; гемолитическую анемию; миастению; заболевание, опосредованное комплексом антиген-антитело; легочно-почечный синдром; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пемфигоид; пемфигус; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром мышечной скованности; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунный комплекс нефрит; IgA нефропатия; полиневропатии IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП) или аутоиммунную тромбоцитопению. В различных случаях расстройство представляет собой волчанку, волчаночный нефрит, ревматоидный артрит, диабет, склеродермию, анкилозирующий спондилит, псориаз, рассеянный склероз, болезнь Хашимото, менингит или воспалительное заболевание кишечника.

Дополнительные аспекты и преимущества будут очевидны для специалистов в данной области техники из обзора следующего подробного описания. Хотя способы, описанные в данном документе, допус-

кают варианты реализации в различных формах, описание в дальнейшем включает конкретные варианты реализации с пониманием того, что описание является иллюстративным и не ограничивает изобретение конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображена рентгеновская дифрактограмма порошкового продукта (XRPD) для формы А (мономалеат соединения G, полученный в этилацетате).

На фиг. 2 изображена термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) для формы А (мономалеат соединения G, полученный в этилацетате).

На фиг. 3 изображена кривая термогравиметрического анализа ("ТГА") для формы А (мономалеат соединения G, полученный в этилацетате).

На фиг. 4 изображен изотермический график ДСП для формы А (относительная влажность от 40 до 95%).

На фиг. 5 изображена дифрактограмма XRPD для формы В (гидратная форма мономалеата соединения G, полученная в 95% этаноле).

На фиг. 6 изображена термограмма ДСП для формы В (гидратная форма мономалеата соединения G, полученная в 95% этаноле).

На фиг. 7 изображена дифрактограмма XRPD для формы С (мономалеат соединения G, полученный в ацетоне).

На фиг. 8 изображена кривая ТГА (верхняя кривая) и термограмма ДСП (нижняя кривая) для формы С (мономалеат соединения G, полученный в ацетоне).

На фиг. 9 изображена дифрактограмма XRPD для формы D (мономалеат соединения G, полученный в ацетонитриле).

На фиг. 10 изображена кривая ТГА (верхняя кривая) и термограмма ДСП (нижняя кривая) для формы D (мономалеат соединения G, полученный в ацетонитриле).

На фиг. 11 изображена дифрактограмма XRPD для формы E (мономалеат соединения G, полученный в изопропиловом спирте).

На фиг. 12 изображена кривая ТГА (верхняя кривая) и термограмма ДСП (нижняя кривая) для формы E (мономалеат соединения G, полученный в изопропиловом спирте).

На фиг. 13 изображена дифрактограмма XRPD для формы В (гидрат мономалеата соединения G, полученный в 3% воде/ацетоне).

На фиг. 14 изображены дифрактограммы XRPD для формы В (гидрат мономалеата соединения G, полученный в 3% воде/ацетоне) при указанных условиях сушки.

На фиг. 15 изображены дифрактограммы XRPD для формы В (гидрат мономалеата соединения G, полученный в 3% воде/ацетоне) при указанных условиях сушки.

На фиг. 16 изображена кривая ТГА (верхняя кривая) и термограмма ДСП (нижняя кривая) для формы В (гидрат мономалеата соединения G, полученный в 3% воде/ацетоне) после сушки при комнатной температуре в течение ночи.

На фиг. 17 изображена кривая ТГА (верхняя кривая) и термограмма ДСП (нижняя кривая) для формы В (гидрат мономалеата соединения G, полученный в 3% воде/ацетоне) после сушки при 30°C в течение ночи.

На фиг. 18 изображен изотермический график динамической сорбции паров ("ДСП") для формы В (гидрат мономалеата соединения G, полученный в 3% воде/ацетоне).

На фиг. 19 изображена дифрактограмма XRPD для формы F (мономалеат соединения G, полученный в MeOH/MTBE).

На фиг. 20 изображена кривая ТГА (верхняя кривая) и термограмма ДСП (нижняя кривая) для формы F (мономалеат соединения G, полученный в MeOH/MTBE).

На фиг. 21 изображена дифрактограмма XRPD для формы G (монофумарат соединения G).

На фиг. 22 изображена кривая ТГА (верхняя кривая) и термограмма ДСП (нижняя кривая) для формы G (монофумарат соединения G).

На фиг. 23 изображены дифрактограммы XRPD для мономалеата соединения G, полученного в указанных растворителях (формы А и В) при использовании указанных отношений к малеиновой кислоте и высушенного в вакууме при комнатной температуре.

На фиг. 24 изображены дифрактограммы XRPD для формы F (мономалеат соединения G, полученный в MBTE) после вакуумной сушки и нагревания до 100°C по сравнению с формой А.

На фиг. 25 изображены дифрактограммы XRPD для формы С (мономалеат соединения G, полученный в ацетоне) после вакуумной сушки и нагревания до 100°C.

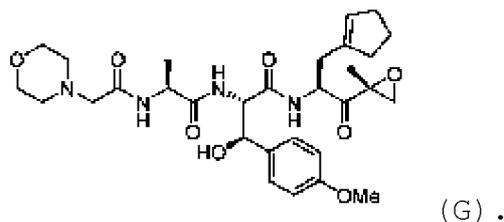
На фиг. 26 изображены дифрактограммы XRPD для формы А (мономалеат соединения G, полученный в EtOAc) после сушки при указанных условиях.

На фиг. 27 изображены дифрактограммы XRPD для формы А (мономалеат соединения G, полученный в EtOAc) до и после ДСП испытания.

Подробное описание

В данном документе предложены новые кристаллические формы соли и их гидраты (2S,3R)-N-

[(2S)-3-(циклопент-1-ен-1-ил)-1-[(2R)-2-метилоксиран-2-ил]-1-оксопропан-2-ил]-3-гидрокси-3-(4-метоксифенил)-2-[(2S)-2-[2-(морфолин-4-ил)ацетиламино]пропанамида]пропанамида ("соединение G"), пригодные в качестве ингибитора протеасомы



Кристаллическая форма соли соединения G, описанная в данном документе, является растворимой и стабильной в растворе даже при высоких концентрациях. Как таковая кристаллическая форма соли соединения G подходит для фармацевтических лекарственных форм, пригодных, например, для парентерального введения. Гидраты солей соединения G также подходят для фармацевтических лекарственных форм.

Используемый в данном документе термин "кристаллический" относится к твердому веществу, в котором составляющие атомы, молекулы или ионы расположены в регулярно упорядоченной повторяющейся схеме в трех измерениях.

Используемый в данном документе термин "гидрат" относится к форме вещества, которая содержит связь между веществом и водой. Гидрат является кристаллическим. Используемый в данном документе термин "моногидрат" относится к гидрату, который содержит одну молекулу воды на одну молекулу субстрата.

Термин "профилактическое или терапевтическое" лечение признан в данной области техники и включает введение хозяину одной или более рассматриваемых композиций. Если рассматриваемую композицию вводят до клинического проявления нежелательного состояния (например, заболевания или другого нежелательного состояния животного-хозяина), тогда лечение является профилактическим (т.е. оно защищает хозяина от развития нежелательного состояния), а если рассматриваемую композицию вводят после проявления нежелательного состояния, то лечение является терапевтическим (т.е. оно предназначено для уменьшения, улучшения или стабилизации существующего нежелательного состояния или его побочных эффектов).

"Терапевтически эффективное количество" соединения по отношению к рассматриваемому способу лечения относится к количеству соединения(й) в препарате, которое при введении в качестве части желаемой схемы дозирования (пациенту, например, человеку) облегчает симптом, улучшает состояние или замедляет возникновение болезненных состояний в соответствии с клинически приемлемыми стандартами для расстройства или болезни, подлежащей лечению, или для косметической цели, например, с целесообразным соотношением польза/риск, применимым к любому медицинскому лечению.

Используемый в данном документе термин "лечение" включает изменение, уменьшение или остановку симптомов, клинических признаков и лежащей в основе болезни патологии с целью улучшения или стабилизации состояния пациента.

Соединения, описанные в данном тексте, могут быть идентифицированы либо по их химической структуре и/или химическому названию в данном документе. Когда химическая структура и химическое название конфликтуют, химическая структура является определяющей для идентификации соединения.

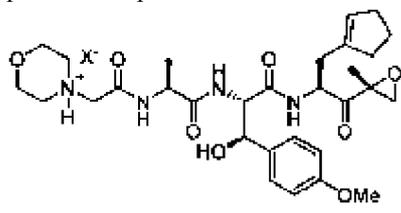
Если не указано иное, термины и сокращения, используемые в данном описании, включают в себя нормальное и традиционное значение в соответствующей области.

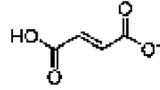
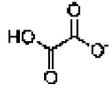
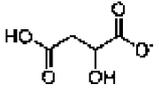
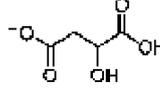
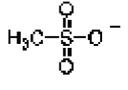
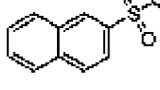
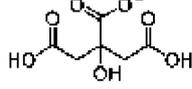
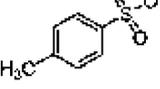
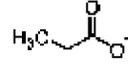
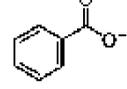
Поскольку вклад настоящего описания не ограничивается конкретными вариантами реализации или аспектами, описанными в данном документе, описание предоставляет специалисту в данной области техники дополнительные варианты реализации, включающие изменения и модификации для адаптации к различным применениям и условиям. Например, изменения и модификации материалов, способов синтеза или методик, описанных в данном документе, будут очевидны для специалиста в данной области.

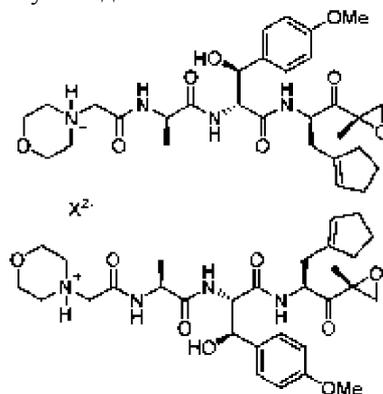
Диапазоны, используемые в данном документе для физических свойств, а именно молекулярной массы, или химических свойств, а именно химических формул, все комбинации и подкомбинации диапазонов и конкретные варианты реализации в них предназначены для включения.

Кристаллические соли соединения G и их гидраты

В одном аспекте, раскрытие предлагает кристаллические соли соединения G, имеющие структуру



где X^- представляет собой противоион. Примеры X^- включают, например,  ("малеат"),  ("фумарат"),  ("оксалат"),  или  ("малат"), SO_4^{2-} ("сульфат"),  ("метансульфонат"),  ("2-нафталинсульфонат"), PO_4^{3-} ("фосфат"), галогенид (например, хлорид, бромид, йодид, фтор),  ("цитрат"),  ("тозилат"),  ("пропионат"),  ("бензоат"). В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой двухвалентный анион (X^{2-}). В этих вариантах реализации изобретения мостиковая соль образуется с одной молекулой X^{2-} , образуя ионную связь с каждой из двух молекул соединения G

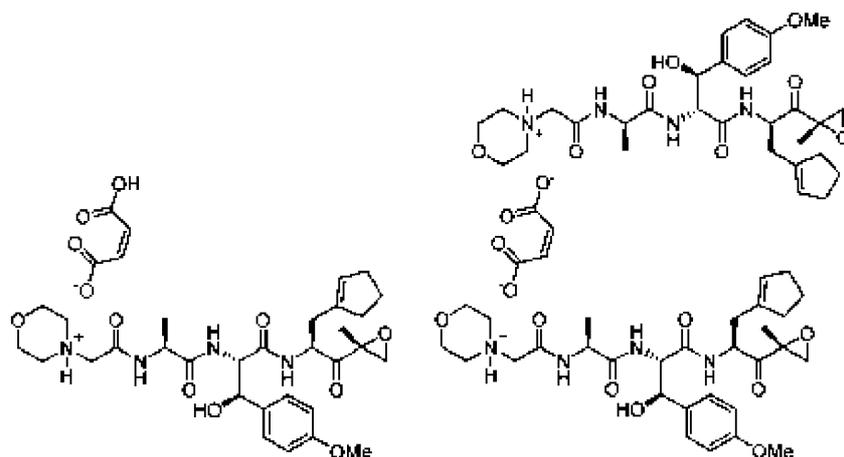


В другом аспекте раскрытие предлагает гидраты соединения G, а именно моногидраты соединения G или гидраты солей соединения G.

Мономалеаты и гидраты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой малеат. В этих вариантах реализации изобретения кристаллическая соль соединения G представляет собой мономалеат (показано ниже). Мономалеат соединения G имеет молекулярную массу 586,7 г/моль, pK_a 5, и представляет собой твердое вещество от белого до желтого цвета. Мономалеат соединения G имеет высокую растворимость в воде, которая превышает 100 мг/мл. Такая высокая растворимость является выгодной, поскольку она позволяет применять форму A в парентеральных фармацевтических композициях при высоких концентрациях.

Образование мономалеата было неожиданным, потому что малеиновая кислота имеет два протона кислоты, каждый из которых может образовывать ионную связь с морфолино-группой в соединении G с образованием мостикового малеата (показано ниже). Однако образуется не мостиковое соединение, а мономалеатные формы, независимо от того, используется ли при их получении молярное соотношение малеиновой кислоты к соединению G 0,5:1 или молярное соотношение 1:1. Следовательно, мономалеат действительно кристаллизуется во время производства, независимо от отношения используемой исходной малеиновой кислоты и несмотря на неоднородность реакционной смеси, которая образуется при добавлении малеиновой кислоты к соединению G во время его приготовления.



Мономалеат (образованный)

Мостиковый малеат (не образованный)

Мономалеат соединения G (кристаллический) является более предпочтительным, чем соединение G (аморфное), не только из-за своей кристалличности, но также потому, что оно имеет повышенную растворимость в воде. Например, мономалеат соединения G имеет растворимость в воде, превышающую 100 мг/мл при температуре окружающей среды (например, от 20 до 25°C). Напротив, растворимость соединения G в воде составляет всего 8,9 мг/мл. См табл. 1 ниже, для дополнительных данных по растворимости для соединения G, и табл. 2 ниже, для дополнительных данных по растворимости для мономалеата соединения G.

Таблица 1. Растворимость соединения G (аморфного)

Растворитель	pH	Растворимость (мг/мл)	Растворитель	pH	Растворимость (мг/мл)
Вода	7,4	8,9	PG, 100%		>100
0,9% физиологический раствор	7,6	9,4	PG, 67%		>100
PBS	7,2	7,6	PG, 33%		20,5
25 мМ цитрат натрия	4,9	46,0	PG, 10%		12,1

25 мМ цитрат натрия	5,1	32,0	PEG 400, 100%	>50
25 мМ цитрат натрия	5,2	24,8	PEG 400, 67%	>50
25 мМ цитрат натрия	5,4	19,5	PEG 400, 33%	17,4
25 мМ цитрат натрия	5,8	11,2	PEG 400, 10%	11,8
25 мМ цитрат натрия	6,3	9,8	Глицерин, 100%	Не растворимый
25 мМ цитрат натрия	6,8	8,8	Глицерин, 67%	5,4
NMP, 100%		>100	Глицерин, 33%	5,8
NMP, 67%		>100	Глицерин, 10%	8,6
NMP, 33%		>100	EtOH, 100%	>100
NMP, 10%		28,8	EtOH, 67%	>100
EtOH, 33%		20,0		
EtOH, 10%		13,7		

Таблица 2. Данные по растворимости мономалеата соединения G (кристаллического)

Растворитель	Растворимость (мг/мл)	Растворитель	Растворимость (мг/мл)
Ацетонитрил («АСН»)	1,30	2-метилтетрагидрофуран («ТНФ»)	1,76
Ацетон	3,19	Метил-трет-бутиловый эфир («МТБЕ»)	0,17
Дихлорметан («ДСМ»)	0,21	Изопропанол («ІРА»)	3,28
Этилацетат («ЕА»)	0,47	Изопропилацетат («ІРАс»)	0,13
Этанол («EtOH»)	6,97	Тетрагидрофуран («ТНФ»)	1,96
Метанол («MeOH»)	42,13	Толуол	0,02

Высокая растворимость мономалеата соединения G в воде неожиданна, поскольку кристаллическая соль более термодинамически стабильна, чем аморфная форма (соединение G), и, следовательно, ожидается, что она менее растворима в воде. Дополнительно малеаты известных соединений (например, алпренолола и празозина) имеют пониженную растворимость по сравнению с другими противоионами, а именно фумаратом. См., например, Olovson et al., Acta Pharmacol Toxicol 58 (1): 55-60 (1986) и Kumar et al., AAPS PharmSciTech 14 (1):141-150 (2013).

Мономалеат соединения G кристаллизуют, например, из этилацетата ("форма А"), 95% этанола или

3% воды/ацетона для получения моногидрата ("форма В"), ацетона ("форма С"), ацетонитрила ("форма D"), изопропилового спирта ("форма Е") или MeOH/MTBE ("форма F"). Каждая из этих форм может быть охарактеризована параметрами, описанными ниже. Каждую форму можно охарактеризовать с помощью порошковой рентгеновской дифрактометрии ("XRPD"), дифференциальной сканирующей калориметрии ("ДСК") или термогравиметрического анализа ("ТГА"), каждый из которых описан в разделе "Способы" ниже. Дегидратация кристаллических форм, происходящая и при ДСК, и при ТГА, является кинетическим процессом, на который влияют параметры эксперимента.

Форма А (кристаллизованная из этилацетата)

Форма А характеризуется дифрактограммой XRPD, полученной, как изложено в разделе "Способы", имеющей пики при около 6,9, 17,3 и 17,8 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α . Форма А также характеризуется дифрактограммой XRPD, имеющей пики при около 4,9, 6,8, 6,9, 7,7, 17,2 и 17,6 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α . Форма А необязательно дополнительно характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, имеющей дополнительные пики при около 10,9, 12,4, 13,5, 14,2, 16,1, 16,4, 18,5, 21,0, 22,0, 23,4, 23,7, 24,5, и 25,2 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α . В некоторых вариантах реализации изобретения, форма А характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 1.

Дополнительно или в альтернативном варианте, форма А характеризуется с помощью ДСК, полученной, как изложено в разделе "Способы". Форма А характеризуется термограммой ДСК, имеющей эндотерму дегидратации с началом в диапазоне от около 135°C до около 150°C, когда форму А (кристаллизованную из этилацетата) нагревают в алюминийном тигле. Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму А нагревают от около 30°C со скоростью около 10°C/мин, форма А характеризуется термограммой ДСК, изображающей процесс плавления с началом около 148°C и пиком при около 152°C, как изображено на фиг. 2 (кристаллизована из этилацетата). В некоторых вариантах реализации изобретения форма А характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 2 (кристаллизована из этилацетата).

Дополнительно или в альтернативном варианте форма А характеризуется с помощью ТГА, полученного, как изложено в разделе "способы". Форма А характеризуется потерей массы в диапазоне от около 1,5 до около 2,5% при температуре начала в диапазоне от около 10 до около 30°C. Например, форма А (кристаллизованная из этилацетата) характеризуется потерей массы около 0,8% с началом при температуре около 34°C, как изображено на фиг. 3. В некоторых вариантах реализации изобретения форма А (кристаллизованная из этилацетата) характеризуется кривой ТГА, по сути изображенной на фиг. 3.

Дополнительно или в альтернативном варианте форма А характеризуется с помощью динамической сорбции пара ("ДСП"). Например, при воздействии ДСП, как описано в разделе "способы", форма А характеризуется общим приростом массы около 3,5 мас.% при относительной влажности от около 40 до около 95%, как изображено на фиг. 4. Основываясь на поглощении около 1 моль воды на моль формы А во всем диапазоне влажности, обратимости этого процесса при дегидратации, низкой степени гистерезиса и наличии эндотермы дегидратации на фиг. 6 в диапазонах температур ниже процесса плавления, но не на фиг. 2, считается, что форма А легко взаимопереходит от безводной к гидратной версии формы А, и наоборот, в зависимости условий влажности. Безводную форму кристаллизуют, используя растворитель с плохой смешиваемостью с водой (а именно, например, этилацетат). Гидратную форму кристаллизуют, используя растворитель, содержащий воду (а именно, например, 95% этанол/5% вода или 3% ацетон/вода). Взаимный переход между формами выполняют после кристаллизации с помощью контролируемого воздействия влажности.

Форма В (гидратная форма мономалеата соединения G кристаллизуемая из 95% этанола)

В некоторых вариантах реализации изобретения форма В (кристаллизованная из 95% этанола) характеризуется дифрактограммой XRPD, имеющей пики при около 6,1, 6,6, 7,2, 7,7, 9,4, 9,9, 10,8, 12,8, 14,5, 16,0, 16,4, 17,0, 17,4, 18,4, 18,8, 19,8, 20,6, 21,8, 23,4, 26,6, 27,0 и 42,0 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α . В некоторых случаях форма В (кристаллизованная из 95% этанола) характеризуется рентгеновской дифрактограммой порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 5. Дополнительно или в альтернативном варианте форма В (кристаллизованная из 95% этанола) характеризуется с помощью ДСК, как изложено в разделе "Способы". Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму В (кристаллизованную из 95% этанола) нагревают от около 30°C со скоростью около 10°C/мин, форма В (кристаллизованную из 95% этанола) характеризуется термограммой ДСК, изображающей процесс плавления с началом при около 148°C и пиком при около 152°C, как изображено на фиг. 6. Конкретнее форма В (кристаллизованная из 95% этанола) характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 6. Форму В, гидрат мономалеата соединения G, также кристаллизуют из 3% воды/ацетона. В этих вариантах реализации изобретения, форма В характеризуется дифрактограммой XRPD, полученной, как изложено в разделе "Способы", имеющей пики при около 7,2, 18,4 и 22,0 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании излучения Cu K α . Форма В (кристаллизованная из 3% воды/ацетона) также характеризуется дифрактограммой XRPD, имеющей пики при около 6,8, 7,2, 18,4, 6,6, 13,6, 22,0, 17,4, 14,5, 18,0 и 5,0 $\pm 0,2^\circ$ 2 θ , при использовании Cu K α излучения. В некоторых вариантах реализации изобретения

форма В (кристаллизованная из 3% воды/ацетона) характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации изобретения форму В (кристаллизованную из 3% воды/ацетона) дополнительно перерабатывают и сушат для получения остатка, описанного в примере 9. Как изображено на фиг. 14 и 15, условия сушки не влияют на дифрактограмму. Дополнительно или в альтернативном варианте форма В (кристаллизованная из 3% воды/ацетона) характеризуется с помощью ДСК, как изложено в разделе "способы". Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму В (кристаллизованную из 3% воды/ацетона) нагревают от около 30°C со скоростью около 10°C/мин, форма В (кристаллизованная из 3% воды/ацетона) характеризуется с помощью ДСК, ТГА и ДСП, как описано в примере 9 и изображено на фиг. 16, 17 и 18 соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения форма В (кристаллизованная из 3% воды/ацетона) характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 17. Дополнительно или в альтернативном варианте форма В (кристаллизованная из 3% воды/ацетона) характеризуется ТГА, как описано в разделе "способы". В некоторых вариантах реализации изобретения форма В (кристаллизованная из 3% воды/ацетона) характеризуется кривой ТГА, по сути изображенной на фиг. 17.

Форма С (кристаллизованная из ацетона)

Форма С характеризуется дифрактограммой XRPD, полученной, как изложено в разделе "способы", имеющей пики при около 7,4, 13,2 и $20,1 \pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения $\text{Cu K}\alpha$. Форма С также характеризуется дифрактограммой XRPD, имеющей пики при около 6,6, 13,2, 7,4, 20,1, 13,6, 6,9, 16,9, 3,7, 17,9 и $19,9 \pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения $\text{Cu K}\alpha$. В некоторых вариантах реализации изобретения форма С характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 7. Дополнительно или в альтернативном варианте форма С характеризуется с помощью ДСК, как изложено в разделе "способы". Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму С нагревают от около 30°C со скоростью около 10°C/мин, форма С характеризуется термограммой ДСК, изображающей процесс плавления с началом при около 142°C и пиком при около 159°C, как изображено на фиг. 8. Конкретнее форма С характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 8. Дополнительно или в альтернативном варианте форма С характеризуется с помощью ТГА, как описано в разделе "способы". Следовательно, форма С характеризуется потерей массы около 6,0% при от около 29 до 130°C, как изображено на фиг. 8. В некоторых вариантах реализации изобретения форма С характеризуется кривой ТГА, по сути изображенной на фиг. 8.

Форма D (кристаллизованная из ацетонитрила)

Форма D характеризуется дифрактограммой XRPD, полученной, как изложено в разделе "способы", имеющей пики при около 4,9, 7,7, 10,9, 12,4, 13,6 и $15,3 \pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения $\text{Cu K}\alpha$. Форма D также характеризуется дифрактограммой XRPD, имеющей пики при около 6,8, 4,9, 17,4, 15,3, 7,7, 3,4, 17,7, 13,6, 12,4 и $10,9 \pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения $\text{Cu K}\alpha$. В некоторых вариантах реализации изобретения форма D характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 9. Дополнительно или в альтернативном варианте форма D характеризуется с помощью ДСК, как изложено в разделе "способы". Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму D нагревают от около 30°C со скоростью около 10°C/мин, форма D характеризуется термограммой ДСК, изображающей процесс плавления с началом при около 149°C и пиком при около 152°C, как изображено на фиг. 10. Конкретнее форма D характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 10. Дополнительно или в альтернативном варианте форма D характеризуется с помощью ТГА, как описано в разделе "способы". Следовательно, форма D характеризуется потерей массы около 0,3% при от около 27 до 130°C, как изображено на фиг. 10. В некоторых вариантах реализации изобретения форма D характеризуется кривой ТГА, по сути изображенной на фиг. 10.

Форма E (кристаллизованная из изопропилового спирта)

Форма E характеризуется дифрактограммой XRPD, полученной, как изложено в разделе "способы", имеющей пики при около 6,4, 7,3 и $19,8 \pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения $\text{Cu K}\alpha$. Форма E также характеризуется дифрактограммой XRPD, имеющей пики при около 6,5, 3,3, 7,3, 19,8, 6,8, 16,5, 12,1, 21,5, 4,0 и $13,0 \pm 0,2^\circ 2\theta$ при использовании излучения $\text{Cu K}\alpha$. В некоторых вариантах реализации изобретения форма E характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 11. Дополнительно или в альтернативном варианте форма E характеризуется с помощью ДСК, как изложено в разделе "способы". Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму E нагревают от около 30°C со скоростью около 10°C/мин, форма E характеризуется термограммой ДСК, изображающей процесс плавления с началом при около 138°C и пиком при около 148°C, как изображено на фиг. 12. Конкретнее форма E характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 12. Дополнительно или в альтернативном варианте форма E характеризуется с помощью ТГА, как описано в разделе "способы". Следовательно, форма E характеризуется потерей массы около 0,9% при от около 32 до 99°C, как показано на фиг. 12. В некоторых вариантах реализации изобретения форма E характеризуется кривой ТГА, по сути изображенной на фиг. 12.

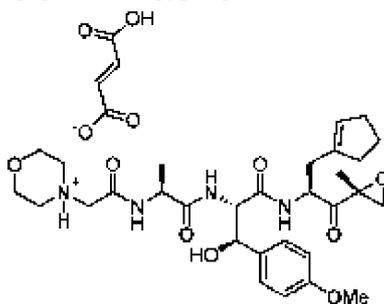
Форма F (кристаллизованная из MeOH/MTBE)

Форма F характеризуется дифрактограммой XRPD, полученной, как изложено в разделе "способы",

имеющей пики при около 6,3, 19,0 и 19,6 $\pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения Cu K α . Форма F также характеризуется дифрактограммой XRPD, имеющей пики при около 6,3, 7,1, 19,0, 17,5, 19,6, 17,9, 22,0, 13,5, 18,2 и 15,5 $\pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения Cu K α . В некоторых вариантах реализации изобретения форма F характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 19. Дополнительно или в альтернативном варианте форма F характеризуется с помощью ДСК, как изложено в разделе "способы". Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму F нагревают от около 30°C со скоростью около 10°C/мин, форма F характеризуется термограммой ДСК, изображающей процесс плавления с началом при около 128°C и пиком при около 135°C, как изображено на фиг. 20. Конкретнее форма F характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 20. Дополнительно или в альтернативном варианте форма F характеризуется с помощью ТГА, как описано в разделе "способы". Следовательно, форма F характеризуется потерей около 1,4% массы при от около 32 до 99°C, как изображено на фиг. 20. В некоторых вариантах реализации изобретения форма F характеризуется кривой ТГА, по сути изображенной на фиг. 20.

Монофумараты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой фумарат. В этих вариантах реализации изобретения кристаллическая соль соединения G представляет собой монофумарат (показан ниже). Конкретная кристаллическая форма монофумарата соединения G представляет собой форму G.



Монофумарат

Форма G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже.

Форма G характеризуется дифрактограммой XRPD, полученной, как изложено в разделе "Способы", имеющей пики при около 6,4, 7,2, 13,8, 16,0, 17,4, 18,5, 18,7, 20,0, 20,9, 21,9, 24,5 и 25,8 $\pm 0,2^\circ 2\theta$, при использовании излучения Cu K α . В вариантах реализации изобретения форма G характеризуется рентгеновской дифрактограммой для порошкового продукта, по сути изображенной на фиг. 21.

Дополнительно или в альтернативном варианте форма G охарактеризована с помощью ДСК. Термограммы ДСК получают, как изложено в разделе "способы". Дегидратация формы G представляет собой кинетический процесс, на который влияют параметры эксперимента. Следовательно, форма G характеризуется термограммой ДСК, имеющей эндотерму дегидратации с началом в диапазоне от около 75 до около 90°C, если форму G нагревают в завальцованном алюминиевом тигле. Например, в вариантах реализации изобретения, в которых форму G нагревают от около 25°C со скоростью около 10°C/мин, форма G характеризуется термограммой ДСК, имеющей эндотерму дегидратации с началом при около 82°C и пиком при около 101°C, как изображено на фиг. 22. В некоторых вариантах реализации изобретения форма G характеризуется термограммой ДСК, по сути изображенной на фиг. 22.

Оксалаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой оксалат. В некоторых случаях, кристаллическая соль соединения G представляет собой монооксалат. В различных случаях оксалат реагирует с морфолино-группами на двух разных молекулах соединения G с образованием мостиковой соли. Оксалат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "Способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Малаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой малат. В некоторых случаях кристаллическая соль соединения G представляет собой мономалат. В различных случаях малат реагирует с морфолино-группами на двух разных молекулах соединения G с образованием мостиковой соли. Малат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Сульфаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой сульфат. Сульфат соединения G может характеризоваться одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Метансульфонаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X⁻ представляет собой метансульфонат. Метансульфонат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе

"способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

2-Нафталинсульфонаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой 2-нафталинсульфонат. 2-Нафталинсульфонат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Фосфаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой фосфат. Фосфат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Галогениды соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой галогенид (например, хлорид, бромид, йодид, фторид). Галогенид соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Тартраты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой тартрат. Тартрат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Цитраты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой цитрат. Цитрат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "Способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Тозилаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой тозилат. Тозилат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "Способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Пропионаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой пропионат. Пропионат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "Способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Бензоаты соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения X представляет собой бензоат. Бензоат соединения G характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "Способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Гидраты солей соединения G

В некоторых вариантах реализации изобретения раскрытие предлагает гидрат соли соединения G или моногидрат в виде свободного основания соединения G. Гидрат соли или моногидрат в виде свободного основания соединения G является кристаллическим и характеризуется одним или более параметрами, описанными ниже в разделе "Способы" (например, XRPD, ДСК, ТГА и/или ДСП).

Способы получения кристаллических солей, гидратов и гидратов солей соединения G

Кристаллические соли, гидраты и гидраты солей соединения G получают различными способами, известными в области техники кристаллов. Следующее обсуждение кристаллических солей соединения G применяется к образованию гидратов кристаллических солей и к кристаллическим гидратам в виде свободного основания соединения G.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение G (аморфная форма) смешивают с соответствующей кислотой с X⁻ противоионом, НХ (например, малеиновой кислотой, фумаровой кислотой, соляной кислотой, щавелевой кислотой, серной кислотой, фосфорной кислотой, яблочной кислотой, метансульфоновой кислотой, 2-нафталинсульфокислотой, винной кислотой, лимонной кислотой, толуолсульфокислотой, пропионовой кислотой, бензойной кислотой) в растворителе для образованием суспензии. Молярное отношение соединения G к НХ находится в диапазоне от около 1:05 до около 1:2, а именно около 1:1.

Растворитель, который добавляют к соединению G и НХ, представляет собой любой растворитель, в котором могут образовываться целевые кристаллические соли. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются ими, метанол ("MeOH"), этанол ("EtOH"), изопропанол ("IPA"), этилацетат ("EtOAc"), изопрпилацетат ("IPAc"), тетрагидрофуран ("THF"), метил-трет-бутиловый эфир ("MTBE"), ацетон/н-гептан, ацетон, диэтиловый эфир ("Et₂O")/EtOAc, гексан/EtOAc, MTBE/EtOAc, толуол, 1,4-диоксан, ацетонитрил ("ACN"), 1-бутанол, водные смеси вышеуказанных и их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения растворитель представляет собой EtOAc, IPAc, EtOH, их водные смеси или их комбинации. Например, растворитель представляет собой EtOAc.

Этап смешивания происходит при температуре в диапазоне от около 0 до 80°C, или от около 30 до 70°C, или от около 40 до 60°C (например, около 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80°C). В некоторых случаях этап смешивания происходит при 50°C.

Этап смешивания длится в течение периода времени до около 6 ч, или до около 5 ч, или до около 4 ч,

или до около 3 ч, или до около 2 ч, или до около 1 ч. В некоторых вариантах реализации изобретения этап смешивания происходит в течение по меньшей мере 15 мин, или по меньшей мере 30 мин, или по меньшей мере 45 мин, или по меньшей мере 1 ч, или по меньшей мере 2 ч, или по меньшей мере 3 ч, или по меньшей мере 4 ч, или по меньшей мере 5 ч. В различных случаях этап смешивания происходит в течение от около 1 ч до около 6 ч, или от около 4 ч до около 6 ч, или от около 3 ч до около 5 ч.

Кристаллическую соль соединения G выделяют из суспензии путем охлаждения суспензии до температуры от около -10 до около 10°C, или от около -5 до около 5°C, или до около 0°C. В некоторых вариантах реализации изобретения охлажденную суспензию отфильтровывают для получения осадка. Затем осадок необязательно промывают, сушат или выполняют оба действия.

В некоторых случаях кристаллическую соль соединения G очищают перекристаллизацией. В различных случаях кристаллическую соль соединения G очищают путем (1) восстановления соединения G из осадка и (2) смешивания восстановленного соединения G с НХ и растворителем для восстановления кристаллической соли соединения G.

Как показано в разделе "примеры" ниже, множество растворителей были признаны пригодными для получения кристаллических солей соединения G, а именно мономалеатов соединения G, с хорошим выходом и чистотой.

Фармацевтические композиции и введение кристаллических солей соединения G

Другой аспект раскрытия предлагает фармацевтические композиции (в альтернативном варианте именуемые по всему тексту составы), которые содержат кристаллические соли, описанные в данном документе, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в данном документе для наименования тех лигандов, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения подходят для использования в контакте с тканями людей и животных, не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерные с разумным соотношением пользы/риска. Композиции, описанные в данном документе, составляют в любую лекарственную форму.

В некоторых вариантах реализации изобретения составы составляют для парентерального введения. Фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально", используемые в данном документе, означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрисуставную, внутриглазную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, инъекцию и вливание. Например, парентеральное введение включает внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную или подкожную инъекцию.

Парентеральные фармацевтические композиции представляют собой жидкие лекарственные формы или лиофилизированные лекарственные формы, которые восстанавливают до жидкости для парентеральных инъекций.

Высокая растворимость кристаллических солей соединения G, описанных в данном документе, делает соли подходящими для подкожного введения. Подкожное введение является предпочтительной формой введения, поскольку эти составы можно вводить самостоятельно в домашних условиях (вместо того, чтобы ездить в медицинское учреждение для вливания), что удобно для пациентов, и они также имеют меньше побочных эффектов (например, более слабые болевые ощущения в месте инъекции и кровоподтеки), чем при других видах введения жидкости (например, внутривенно или внутримышечно). И удобство, и снижение побочных эффектов при применении подкожных композиций приводят к лучшему соблюдению пациентом режима лечения. Однако подкожное введение имеет практический предел объема инъекции от около 0,3 до около 1,5 мл, например около 1,0 мл. Следовательно, часто в подкожные композиции, имеющие высокие концентрации лекарственного вещества, необходимо включать неактивные ингредиенты для доставки терапевтически эффективного количества лекарственного вещества. Например, доставка от около 10 до около 100 мг соединения G для лечения аутоиммунных расстройств подразумевает концентрацию подкожной инъекции от около 6 до около 100 мг/мл. Соответственно высокая растворимость кристаллических солей соединения G, описанных в данном документе (превышающая 100 мг/мл), делает их пригодными для подкожного введения.

Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит кристаллическую соль соединения G в концентрации в диапазоне от около 0,1 до около 200 мг/мл, или от около 1 до около 150 мг/мл, или от около 10 до около 70 мг/мл, или от около 30 до около 50 мг/мл, или от около 100 до около 200 мг/мл, или от около 75 до около 125 мг/мл. Например, концентрация составляет около 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 мг/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более эксципиентов включают поверхностно-активное вещество, регулятор тоничности, буфер или их комбинации. В вариантах реализации изобретения, в которых композиция представляет собой лиофилизированную лекарственную форму, один или более эксципиентов дополнительно включают криопротектор, объемобразующий агент или оба. Подходящие криопротекторы включают, но не ограничиваются ими, глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, маннитол, сорбитол, коллоидный диоксид кремния, мальтозу, поли(винилпирролидон), фруктозу,

декстран, глицерин, поливиниловый спирт, глицин, гидроксипропил-бета-циклодекстрин и желатин. Подходящие объемобразующие агенты включают, но не ограничиваются ими, сахара, а именно маннитол, лактозу, сахарозу, трегалозу, сорбитол, глюкозу и рафинозу; аминокислоты, а именно аргинин, глицин и гистидин; и полимеры, а именно декстран и полиэтиленгликоль.

Один или более эксципиентов включают поверхностно-активное вещество, а именно неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества полезны для стабилизации композиции от разрушения вследствие напряжения при транспортировке и хранения. Подходящие поверхностно-активные вещества для включения в фармацевтические композиции включают, но не ограничиваются ими, полисорбаты и простые полиэфиры. Например, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат (например, полисорбат 80 или полисорбат 20), полиоксил касторового масла, поли(алкилен)гликоль (например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль), каприлокапроил-полиоксилглицерид, полиоксиалкиленовый блок-сополимер (например, полиоксиэтилен-полиоксипропилен) и их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения поверхностно-активное вещество дополнительно представляет собой сорастворитель, а именно N-метил-2-пирролидон ("NMP").

Один или более эксципиентов включают регулятор тоничности (иногда именуемый изотоническим агентом). Регуляторы тоничности вводят в подкожные композиции, чтобы гарантировать, что состав имеет осмоляльность, которая соответствует клеткам пациента (например, от 250 до 350 мосм), чтобы минимизировать или предотвратить повреждение ткани в месте инъекции. Регуляторы тоничности включают соли и полиолы (например, сахара, а именно невосстанавливающие сахара, сахарные спирты и сахарные кислоты). Конкретно рассматриваемые регуляторы тоничности включают, но не ограничиваются ими, NaCl, KCl, глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, маннозу, рафинозу, маннитол, ксилитол, галактитол, глюкозитол, инозитол, сорбитол, трегалозу и глицерин. Соответственно в данном документе также предлагаются фармацевтические композиции, которые являются изотоническими.

Один или более эксципиентов включают буфер. Фармацевтически приемлемые буферы включают, но не ограничиваются ими, цитрат, фосфат, гистидин, сукцинат, ацетат, малеат, глюконат и их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения, pH композиции находится в диапазоне от около 3,0 до 8,0, или от около 4,0 до 7,0, или от около 4,0 до 6,5.

Составы кристаллических солей, раскрытые в данном документе, вводят субъекту, а именно субъекту-человеку или субъекту-животному. В некоторых вариантах реализации изобретения эти составы имеют биодоступность по меньшей мере около 45%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 55%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 65%, или по меньшей мере около 70%. В некоторых случаях составы, раскрытые в данном документе, имеют биодоступность до около 90%, или до около 85%, или до около 80%, или до около 75%, или до около 65%, или до около 60%. Например, составы проявляют биодоступность от около 45% до около 90%, или от около 50% до около 70%, или от около 50% до около 65%.

Раскрытые в данном документе кристаллические соли также составляют в фармацевтические композиции, имеющие формы и содержащие эксципиенты, подробно описанные ниже.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель. Фраза "фармацевтически приемлемый носитель", используемая в данном документе, подразумевает фармацевтически приемлемый материал, композицию или наполнитель, а именно жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал. Используемая в данном документе формулировка "фармацевтически приемлемый носитель" включает буфер, стерильную воду для инъекций, растворители, дисперсионные среды, кровные средства, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Каждый носитель должен быть "приемлемым" с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава и не причинять вреда пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают (1) сахара, а именно лактозу, глюкозу и сахарозу; (2) крахмалы, а именно кукурузный крахмал, картофельный крахмал и замещенный или незамещенный β -циклодекстрин; (3) целлюлозу и ее производные, а именно натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлозу и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) эксципиенты, а именно масло какао и воски для суппозиторной массы; (9) масла, а именно арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, а именно пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, а именно глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, а именно этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, а именно гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах. В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, предлагаемые в данном документе, являются непирогенными, то есть не вызывают значительного повышения температуры при введении пациенту.

В качестве эксципиентов в композициях также находятся смачивающие агенты, эмульгаторы и скользкие вещества, а именно лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, антиадгезивы, покровные агенты, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов-эксципиентов включают (1) водорастворимые антиоксиданты, а именно аскорбиновую кислоту, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, а именно аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (БНА), бутилированный гидрокситолуол (БНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) агенты, хелатирующие металлы, а именно лимонную кислоту, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), сорбитол, винную кислоту, фосфорную кислоту и т.п.

Фармацевтическая композиция также содержит вспомогательные вещества, а именно консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергаторы. Предотвращение влияния микроорганизмов обеспечивают посредством добавления различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также в композиции желательно включить регулирующие тоничность агенты, а именно сахара и т.п. Дополнительно длительной абсорбции инъекционной фармацевтической формы достигают добавлением агентов, которые замедляют абсорбцию, а именно моностеарата алюминия и желатина.

В некоторых случаях, чтобы продлить действие одного или более соединений, предлагаемых в данном документе, желательно замедлить абсорбцию соединения при подкожной или внутримышечной инъекции. Например, замедленной абсорбции парентерально вводимого соединения достигают посредством растворения или суспендирования соединения в масляном носителе.

Композиция должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, а именно бактерий и грибов. Предотвращения воздействия микроорганизмов достигают различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, а именно маннитол, сорбитол, и хлорид натрия. Замедленной абсорбции инъекционных композиций достигают посредством применения агентов, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем добавления при необходимости активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем введения активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления инъекционных стерильных растворов, способами получения являются сушка вымораживанием (лиофилизация), в результате которой получают порошок активного ингредиента, плюс любой дополнительный целевой ингредиент из его исходного раствора, стерилизованного фильтрованием.

Инъекционные депонируемые формы получают путем формирования микрокапсульных или нанокапсулированных матриц соединения, предлагаемого в данном документе, в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного препарата к полимеру и природы конкретного применяемого полимера скорость высвобождения лекарственного препарата можно контролировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают поли(ортоэфир) и поли(ангидриды). Инъекционные депонируемые составы также получают путем введения лекарственного средства в липосомы, микроэмульсии или наноэмульсии, которые являются совместимыми с тканями организма.

В одном варианте реализации изобретения терапевтические кристаллические соли получают с носителями, которые защищают терапевтические соединения от быстрого выведения из организма, а именно составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразлагаемые биосовместимые полимеры, а именно этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Такие составы получают, используя стандартные способы или коммерческим путем, например от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на выбранные клетки с моноклональными антителами к клеточным антигенам) также используются в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их получают согласно способам, известным специалистам в данной области, например, описанным в патенте США № 4522811, который полностью включен в данный текст посредством ссылки.

Фармацевтические композиции упаковывают в контейнер, упаковку или таблетницу вместе с инструкциями по применению.

Способы применения кристаллических солей соединения G

Раскрытые в данном документе кристаллические соли действуют как ингибиторы иммунопротеазы (ИП). В некоторых случаях раскрытые в данном документе кристаллические соли ингибируют субъединицу LMP7 ИП. Активность LMP7 может быть ингибирована по меньшей мере на 10%, по

меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 80%, как измерено при анализе субъединицы протеасомы, описанном ниже в примерах. Описанной в данном документе кристаллической солью ингибируют одну или более дополнительных субъединиц ИП, а именно LMP2, MECL-1, $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$. В различных вариантах реализации изобретения, кристаллическая соль, раскрытая в данном документе, ингибирует LMP7 и один или оба LMP2 и MECL-1. Раскрытые в данном документе соединения снижают активность или экспрессию цитокинов, например одного или более из IL-2, MHC-I, IL-6, TNF α и IFN- β . Следовательно, предложены способы, в которых соединение, раскрытое в данном документе, ингибирует экспрессию или активность одного или более из IL-2, MHC-I, IL-6, TNF α и IFN- β по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 80%.

В данном документе дополнительно предложены способы ингибирования иммунопротеасомы в клетке посредством контакта клетки с одной или более кристаллическими солями или композициями из них, описанными в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибируется иммунопротеасомная субъединица LMP7. Этап контактирования, описанный в данном документе, происходит *in vivo* или *in vitro*.

Существуют многочисленные биологические последствия ингибирования протеасомы. Ингибирование протеасомы предложено в качестве профилактики и/или лечения множества заболеваний, включая, но не ограничиваясь ими, нейротоксические/дегенеративные заболевания, болезнь Альцгеймера, ишемические болезни, воспаление, аутоиммунные заболевания, ВИЧ, отторжение трансплантированного органа, септический шок, ингибирование презентации антигена, снижение экспрессии вирусных генов, паразитарные инфекции, болезни, связанные с ацидозом, макулярную дегенерацию, легочные заболевания, мышечную атрофию, фиброзные заболевания и нарушение роста костей и волос. Следовательно, фармацевтические составы, содержащие кристаллические соли, описанные в данном документе, обеспечивают возможность введения солей пациенту для лечения этих болезней.

Соответственно этап контактирования в способах, раскрытых в данном документе, включает введение одной или более кристаллических солей или композиций из них, описанных в данном документе, субъекту, который страдает расстройством, связанным с aberrантной иммунопротеасомной активностью. Как более подробно описано ниже, расстройство представляет собой аутоиммунное заболевание или воспаление. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание представляет собой псориаз, дерматит, системную склеродермию, склероз, болезнь Крона, язвенный колит; синдром острой дыхательной недостаточности, менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; экзему, астму, хроническое воспаление; атеросклероз; недостаточность адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (СКВ); сахарный диабет; рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; синдром Шегрена; ювенильный диабет; туберкулез, саркоидоз, полимиозит, гранулематоз, васкулит; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); заболевание, включающее диapedез лейкоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганной недостаточности; гемолитическую анемию; миастению; заболевание, опосредованное комплексом антиген-антитело; легочно-почечный синдром; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пимфегоид; пемфигус; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром мышечной скованности; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; IgA нефропатию; полиневропатию IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП) или аутоиммунную тромбоцитопению. В некоторых случаях расстройство представляет собой волчанку, волчаночный нефрит, ревматоидный артрит, диабет, склеродермию, анкилозирующий спондилит, псориаз, рассеянный склероз, болезнь Хашимото, менингит или воспалительное заболевание кишечника.

Протеасома регулирует NF- κ B, который, в свою очередь, регулирует гены, вовлеченные в иммунную и воспалительную реакцию. Например, NF- κ B необходим для экспрессии гена легкой цепи иммуноглобулина, гена α -цепи рецептора IL-2, гена главного комплекса гистосовместимости класса I и ряда генов цитокинов, кодирующих, например, IL-2, IL-6, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и IFN- β (Palombella et al., Cell (1994) 78: 773-785). Следовательно, в данном документе предложены способы воздействия на уровень экспрессии IL-2, MHC-I, IL-6, TNF α , IFN- β или любого из других ранее упомянутых белков, причем каждый способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции, раскрытой в данном документе.

В данном документе также предложен способ лечения аутоиммунного заболевания у пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества кристаллической соли, описанной в данном документе. "Аутоиммунное заболевание", используемое в данном документе, представляет собой заболевание или расстройство, возникающее и направленное против собственных тканей человека. Примеры аутоиммунных заболеваний включают, но не ограничиваются ими, воспалительные реакции, а именно воспалительные заболевания кожи, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); системную склеродермию и склероз; реакции, связанные с воспалительным заболеванием кишеч-

ника (а именно болезнь Крона и язвенный колит); синдром острой легочной недостаточности (включая синдром острой легочной недостаточности у взрослых (ARDS)); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; аллергические состояния, а именно экзему и астму, и другие состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции; атеросклероз; недостаточность адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системную красную волчанку (СКВ); сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или инсулинозависимый сахарный диабет); рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; синдром Шегрена; ювенильный диабет; и иммунные реакции, связанные с острой и отсроченной гиперчувствительностью, опосредуемой цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно встречающимися при туберкулезе, саркоидозе, полимиозитах, гранулематозе и васкулите; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); заболевания, связанные с диapedезом лейкоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганной недостаточности; гемолитическую анемию (включая, но не ограничиваясь ими, криоглобинемию или анемию с положительным тестом Кумбса); миастению; заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело; легочно-почечный синдром; антифолилипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пимфегоид; пемфигус; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром мышечной скованности; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; IgA нефропатию; полиневропатии IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП) или аутоиммунную тромбоцитопению.

Иммунная система ищет аутологичные клетки, которые инфицированы вирусом, претерпели онкогенную трансформацию или имеют незнакомые пептиды на их поверхности. Внутриклеточный протеолиз генерирует небольшие пептиды для презентации Т-лимфоцитам, чтобы индуцировать иммунные реакции, опосредованные МНС класса I. Следовательно, в данном документе предложен способ применения кристаллической соли или композиции, предложенной в данном документе, в качестве иммуномодулирующего средства для ингибирования или изменения презентации антигена в клетке, включающий воздействие на клетку (или введение пациенту) соединения, описанного в данном документе. Конкретные варианты реализации изобретения включают способ лечения заболеваний, связанных с отторжением или трансплантацией, а именно болезнь "трансплантат против хозяина" или болезнь "хозяин против трансплантата", включающий введение терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе. Используемый в данном документе термин "трансплантат" относится к биологическому материалу, полученному от донора для трансплантации реципиенту. Трансплантаты включают такой разнообразный материал как, например, изолированные клетки, а именно островковые клетки; ткани, а именно амниотическую мембрану новорожденного; костный мозг; гематопозитические клетки-предшественники; глазную ткань, а именно ткань роговицы; и органы, а именно кожу, сердце, печень, селезенку, поджелудочную железу, доли щитовидной железы, легкие, почки и трубчатые органы (например, кишечник, кровеносные сосуды или пищевод). Трубчатые органы используют для замены поврежденных участков пищевода, кровеносных сосудов или желчных протоков. Кожные трансплантаты используют не только при ожогах, но и как повязку на поврежденную кишку или для закрытия определенных дефектов, а именно диафрагмальной грыжи. Трансплантат получают от любого млекопитающего, включая человека, от трупов или живых доноров. В некоторых случаях донором и реципиентом является один и тот же пациент. В некоторых вариантах реализации изобретения трансплантат представляет собой костный мозг или орган, а именно сердце, а донор трансплантата и хозяина подходят по антигенам HLA класса II.

Ингибирование протеасом также было связано с ингибированием активации NF-κB и стабилизацией уровней p53. Следовательно, кристаллические соли и композиции из них, предложенные в данном документе, также используются для ингибирования активации NF-κB и стабилизации уровней p53 в культуре клеток. Поскольку NF-κB является ключевым регулятором воспаления, он является привлекательной мишенью для противовоспалительного терапевтического вмешательства.

Следовательно, кристаллические соли и композиции из них, предложенные в данном документе, являются полезными для лечения болезней, связанных с воспалением, включая, но не ограничиваясь ими, ХНЗЛ, псориаз, астму, бронхит, эмфизему и муковисцидоз.

Раскрытые кристаллические соли и композиции из них используются для лечения болезней, опосредованных непосредственно протеолитической функцией протеасомы, а именно атрофии мышц, или опосредованно опосредованно через белки, которые обрабатываются протеасомой, а именно NF-κB. Протеасома участвует в быстром выведении и посттрансляционном процессинге белков (например, ферментов), участвующих в клеточной регуляции (например, клеточном цикле, транскрипции генов и метаболическом пути), межклеточной коммуникации и иммунной реакции (например, презентации антигена). Конкретные примеры, обсуждаемые ниже, включают β-амилоидный белок и регуляторные белки, а именно циклины и транскрипционный фактор NF-κB.

В некоторых вариантах реализации изобретения кристаллическая соль или композиция из нее, предложенная в данном документе, полезна при лечении нейродегенеративных заболеваний и болезней, включая, но не ограничиваясь ими, инсульт, ишемическое повреждение нервной системы, нейронную

травму (например, ударное повреждение головного мозга, травму спинного мозга и травматическое повреждение нервной системы), рассеянный склероз и другие иммуноопосредованные невропатии (например, синдром Гийена-Барре и его варианты, острую моторную аксональную невропатию, острую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию и синдром Фишера), комплекс ВИЧ/СПИД-деменция, аксономию, диабетическую невропатию, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, бактериальный, паразитарный, грибковый и вирусный менингит, энцефалит, сосудистую деменцию, мультиинфарктную деменцию, деменцию тела Леви, деменцию лобной доли, а именно болезнь Пика, подкорковую деменцию, а именно болезнь Хантингтон или прогрессирующий надъядерный паралич), фокальные корковые синдромы атрофии (а именно первичную афазию), метаболически-токсические деменции (а именно хронический гипотиреоз или дефицит В12) и деменции, вызванные инфекциями (а именно сифилис или хронический менингит).

Болезнь Альцгеймера характеризуется внеклеточными отложениями β -амилоидного белка (β -АР) в сенильных бляшках и сосудах головного мозга. β -АР представляет собой пептидный фрагмент из от 39 до 42 аминокислот, полученный из исходного амилоидного белка (АРР). Известны по меньшей мере три изоформы АРР (695, 751 и 770 аминокислоты). Альтернативное склеивание мРНК дает изоформы; нормальный процессинг влияет на часть последовательности β -АР, тем самым предотвращая образование β -АР. Считается, что аномальный процессинг белка протеасомой способствует распространению β -АР в мозге при болезни Альцгеймера. АРР-процессирующий фермент у крыс содержит около десяти различных субъединиц (от 22 кДа до 32 кДа). Субъединица 25 кДа имеет N-концевую последовательность X-Gln-Asn-Pro-Met-X-Thr-Gly-Thr-Ser, которая идентична β -субъединице мультикаталитической протеазы человека (Kojima S. et al., Fed. Eur. Biochem. Soc. (1992) 304: 57-60). АРР-процессирующий фермент расщепляется по связи Gln15 - Lys16; в присутствии иона кальция фермент также расщепляется по связи Met-1 - Asp1, а связи Asp1 - Ala2 освобождают внеклеточный домен β -АР.

Следовательно, в данном документе предложен способ лечения болезни Альцгеймера, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, раскрытой в данном документе. Такое лечение включает в себя снижение скорости процессинга β -АР, уменьшение скорости образования бляшек β -АР, уменьшение скорости образования β -АР и уменьшение клинических признаков болезни Альцгеймера.

В данном документе также предложены способы лечения кахексии и атрофии мышц. Протеасома расщепляет много белков в созревающих ретикулоцитах и растущих фибробластах. В клетках, лишенных инсулина или сыворотки, скорость протеолиза почти удваивается. Ингибирование протеасомы уменьшает протеолиз, тем самым уменьшая как потерю мышечного белка, так и азотную нагрузку на почки или печень. Ингибиторы пептидных протеасом (например, соединение или композиция, предложенные в данном документе) полезны при лечении болезней, а именно хронического инфекционного заболевания, лихорадки, мышечной дисфункции (атрофии) и денервации, повреждении нервов, голодании, почечной недостаточности, связанной с ацидозом, заболеванием почек и отказом печени. См., например, Goldberg, патент США № 5340736, который целиком включен в данный текст посредством ссылки. Способы лечения включают снижение скорости деградации мышечного белка в клетке, снижение скорости деградации внутриклеточного белка и снижение скорости деградации белка p53 в клетке. Каждый из этих способов включает контактирование клетки (in vivo или in vitro, например, мышцы у пациента) с эффективным количеством фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе, для снижения скорости деградации мышечного белка в клетке, уменьшения скорости внутриклеточной деградации белка в клетке и/или уменьшения скорости деградации белка p53 в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения способы включают введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или фармацевтической композиции из нее, раскрытой в данном документе.

Фиброз представляет собой чрезмерное и постоянное образование рубцовой ткани в результате гиперпролиферативного роста фибробластов и связан с активацией сигнального пути TGF- β . Фиброз включает обширное отложение внеклеточного матрикса и может происходить практически в любой ткани или в нескольких различных тканях. Обычно уровень внутриклеточного сигнального белка (Smad), который активирует транскрипцию генов-мишеней при стимуляции TGF- β , регулируется активностью протеасомы. Однако в условиях гиперпролиферации наблюдается ускоренная деградация сигнальных компонентов TGF- β . Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ лечения гиперпролиферативных болезней, а именно диабетической ретинопатии, макулярной дегенерации, диабетической нефропатии, гломерулосклероза, IgA-нефропатии, цирроза, атрезии желчевыводящих путей, застойной сердечной недостаточности, склеродермии, радиационно-индуцированный фиброза и фиброза легких (идиопатический легочный фиброз, заболевание соединительной ткани, саркоидоз, интерстициальные заболевания легких и внешние заболевания легких). Лечение жертв ожогов часто затрудняется фиброзом, следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения соединение, предложенное в данном документе, вводят путем местного или системного введения для лечения ожогов. Закрывание раны после операции часто связано с обезображивающими рубцами, которые могут быть предотвращены посредством ингибирования фиброза. Следовательно, в определенных вариантах реализа-

ции изобретения в данном документе предложен способ предотвращения или уменьшения рубцевания путем введения кристаллической соли или композиции из нее, раскрытой в данном документе.

Другой белок, который подвергается процессингу протеасомой, представляет собой NF-κB, член семейства белков Rel. Семейство Rel белков-активаторов транскрипции разделяют на две группы. Для первой группы необходим протеолитический процессинг и она включает p50 (NF-κB1, 105 кДа) и p52 (NF-κ2, 100 кДа). Для второй группы не требуется протеолитический процессинг и она включает p65 (RelA, Rel (c-Rel) и RelB). Как гомо-, так и гетеродимеры могут образовываться членами семьи Rel; NF-κB, например, представляет собой гетеродимер p50-p65. После фосфорилирования и убиквитинирования IκB и p105 оба белка разлагаются и подвергаются процессингу, соответственно с образованием активного NF-κB, который перемещается из цитоплазмы в ядро. Убиквитинированный p105 также подвергается процессингу очищенными протеасомами (Palombella et al., Cell (1994) 78: 773-785). Активный NF-κB образует стереоспецифический усиливающий комплекс с другими активаторами транскрипции и, например HMG I (Y), индуцируя селективную экспрессию определенного гена.

NF-κB регулирует гены, участвующие в иммунной и воспалительной реакции и митотических процессах. Например, NF-κB необходим для экспрессии гена κ легкой цепи иммуноглобулина, гена α-цепи рецептора IL-2, гена главного комплекса гистосовместимости класса I и ряда генов цитокинов, кодирующих, например, IL-2, IL-6, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и IFN-β (Palombella et al., Cell (1994) 78: 773-785). Некоторые варианты реализации изобретения включают способы воздействия на уровень экспрессии IL-2, MHC-I, IL-6, TNFα, IFN-β или любых других ранее упомянутых белков, причем каждый способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, раскрытой в данном документе. Комплексы, включающие p50, представляют собой нейромедиаторы быстрого реагирования на острые воспалительные и иммунные реакции (Thanos D. and Maniatis T., Cell (1995) 80: 529-532).

NF-κB также участвует в экспрессии генов клеточной адгезии, которые кодируют E-селектин, P-селектин, ICAM и VCAM-1 (Collins, T., Lab. Invest. (1993) 68:499-508). В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ ингибирования клеточной адгезии (например, клеточной адгезии, опосредованной E-селектином, P-селектином, ICAM или VCAM-1), включающий контактирование клетки с эффективным количеством кристаллической соли или фармацевтической композиции из нее, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ ингибирования клеточной адгезии (например, клеточной адгезии, опосредованной E-селектином, P-селектином, ICAM или VCAM-1), включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе.

Ишемия и реперфузионное повреждение приводят к гипоксии, состоянию, при котором наблюдается дефицит кислорода, достигающего тканей организма. Это состояние вызывает повышенную деградацию IκBα, что приводит к активации NF-κB. Было показано, что тяжесть повреждения, приводящего к гипоксии, уменьшается при введении ингибитора протеасомы. Следовательно, в данном документе предложен способ лечения ишемического заболевания или реперфузионного повреждения, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, предложенной в данном документе. Примеры таких заболеваний или повреждений включают, но не ограничиваются ими, острый коронарный синдром (уязвимые бляшки), окклюзию артерий (окклюзия сердца, головного мозга, периферических артерий и сосудов), атеросклероз (коронарный склероз, заболевание коронарной артерии), инфаркты, сердечную недостаточность, панкреатит, гипертрофию миокарда, стеноз и рестеноз.

NF-κB также специфически связывается с усилителем/промотором ВИЧ. По сравнению с Nef mac239 регуляторный белок ВИЧ Nef pbj14 отличается двумя аминокислотами в области, которая контролирует связывание протеинкиназы. Считается, что протеинкиназа сигнализирует о фосфорилировании IκB, вызывая деградацию IκB через убиквитин-протеасомный путь. После деградации NF-κB высвобождается в ядро, тем самым усиливая транскрипцию ВИЧ (Cohen, J., Science, (1995) 267:960). В данном документе предложен способ ингибирования или ослабления ВИЧ-инфекции у пациента и способ снижения уровня экспрессии вирусного гена, причем каждый способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, раскрытой в данном документе.

Вирусные инфекции способствуют патологии многих заболеваний. Сердечные заболевания, а именно продолжающийся миокардит и дилатационная кардиомиопатия, были связаны с вирусом Коксаки В3. В сравнительном полногеномном микроматричном анализе инфицированных сердец мышей специфические протеасомные субъединицы были равномерно активированы в сердцах мышей, у которых развился хронический миокардит (Szalay et al., Am J. Pathol 168:1542-52, 2006). Некоторые вирусы используют убиквитин-протеасомную систему на этапе проникновения вируса, где вирус выделяется из эндосомы в цитозоль. Вирус гепатита мыши (MHV) принадлежит к семейству Coronaviridae, которое также включает коронивирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS). Yu и Lai (J Virol 79:644-648, 2005) показали, что обработка клеток, инфицированных MHV, ингибитором протеасомы приводит к

уменьшению репликации вируса, что соотносится со сниженным титром вируса по сравнению с таковым у необработанных клеток. Вирус гепатита В человека (ВГВ), член семейства вирусов *Herpesviridae*, для размножения также нуждается в кодируемых вирусом оболочечных белках. Ингибирование пути биодegradации протеасомы вызывает значительное снижение количества секретируемых оболочечных белков (Simsek et al., *J Virol* 79:12914-12920, 2005). Дополнительно к ВГВ другие вирусы гепатита (А, С, D и Е) также могут использовать убиквитин-протеасомный путь биодegradации для секреции, морфогенеза и патогенеза. Соответственно в определенных вариантах реализации изобретения предложен способ лечения вирусной инфекции, а именно SARS или гепатита А, В, С, D и Е, включающий контактирование клетки с эффективным количеством кристаллической соли или композиции из нее, раскрытой в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ лечения вирусной инфекции, а именно SARS или гепатита А, В, С, D и Е, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, раскрытой в данном документе.

Повышенная выработка липополисахаридных (LPS)-индуцированных цитокинов, а именно $TNF\alpha$, считается центральной в процессах, связанных с септическим шоком. Дополнительно считается общепризнанным то, что первым этапом активации клеток LPS является связывание LPS со специфическими мембранными рецепторами, α - и β -субъединицы протеасомного комплекса 20S были идентифицированы как LPS-связывающие белки, что позволяет предположить, что индуцированная LPS трансдукция сигнала может быть важной терапевтической мишенью при лечении или предотвращении сепсиса (Qureshi, N. et al. *J. Immun.* (2003) 171: 1515-1525). Следовательно, в определенных вариантах реализации изобретения кристаллические соли и композиции из них, предложенные в данном документе, используются для ингибирования $TNF\alpha$ для предотвращения и/или лечения септического шока.

При внутриклеточном протеолизе образуются небольшие пептиды для презентации Т-лимфоцитам, чтобы вызвать иммунные реакции, опосредованные МНС класса I. Иммунная система проверяет наличие аутологических клеток, которые инфицированы вирусом или подверглись онкогенной трансформации. Один вариант реализации изобретения представляет собой способ ингибирования презентации антигена в клетке, включающий воздействие на клетку композиции, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка контактирует с эффективным количеством соединения или композиции, предложенной в данном документе, для ингибирования презентации антигена в клетке. Дополнительный вариант реализации изобретения представляет собой способ подавления иммунной системы пациента (например, ингибирование отторжения трансплантата, аллергии, астмы), включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества композиции, описанной в данном документе. Кристаллические соли и композиции, предложенные в данном документе, также используют для лечения аутоиммунных заболеваний, а именно волчанки, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, и воспалительных заболеваний кишечника, а именно язвенного колита и болезни Крона.

Другой вариант реализации изобретения представляет собой способ изменения спектра антигенных пептидов, образуемых протеасомой или другим Ntn с мультикаталитической активностью. Например, если пептидилглутамилпептидная гидролизующая активность протеасомы 20S выборочно ингибируется, протеасома образует другой набор антигенных пептидов, которые находятся в молекулах МНС на поверхностях клеток, чем были бы образованы и находились бы либо без какого-либо ингибирования фермента, либо с, например, выборочным ингибированием химотрипсиноподобной активности протеасомы.

Определенные ингибиторы протеасом блокируют как биодegradацию, так и процессинг убиквитинированного NF- κ B *in vitro* и *in vivo*. Ингибиторы протеасом также блокируют биодegradацию I κ B- α и активацию NF- κ B (Palombella, et al. *Cell* (1994) 78:773-785; и Traenckner, et al., *EMBO J.* (1994) 13:5433-5441). В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ ингибирования биодegradации I κ B- α , включающий контактирование клетки с кристаллической солью или композицией из нее, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка контактирует с эффективным количеством кристаллической соли или композиции из нее для ингибирования биодegradации I κ B- α . Дополнительный вариант реализации изобретения представляет собой способ снижения клеточной концентрации NF- κ B в клетке, мышце, органе или пациенте, включающий контактирование клетки, мышцы, органа или пациента с кристаллической солью или композицией из нее, описанной в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка контактирует с эффективным количеством композиции для снижения клеточной концентрации NF- κ B в клетке.

Другие эукариотические факторы транскрипции, для которых необходим протеолитический процессинг, включают общий фактор транскрипции TFIIA, акцессорный белок вируса простого герпеса VP16 (фактор клетки-хозяина), вирус-индуцируемый белковый регуляторный фактор IFN 2 и белок 1, связывающий стеролрегулирующие элементы с мембраной.

Дополнительно в данном документе предложены способы воздействия на циклинзависимые эукариотические клеточные циклы, включая воздействие на клетку (*in vitro* или *in vivo*) композиции, раскрытой в данном документе. Циклины представляют собой белки, участвующие в контроле клеточного цикла. Протеасома участвует в биоразрушении циклинов. Примеры циклинов включают митотические циклины, циклины G1 и циклин В. Биоразрушение циклинов позволяет клетке выйти из одной стадии кле-

точного цикла (например, митоза) и перейти в другую (например, деление). Полагают, что все циклины связаны с протеинкиназой p34cdc2 или родственными киназами. Сигнал нацеливания протеолиза локализован на аминокислотах 42-RAALGNISEN-50 (бокс деструкции). Существуют доказательства того, что циклин превращается в форму, незащищенную от убиквитинлигазы, или что циклинспецифическая лигаза активируется во время митоза (Ciechanover A., Cell, (1994) 79:13-21). Ингибирование протеасомы ингибирует биоразрушение циклина и, следовательно, ингибирует пролиферацию клеток (Kumatori et al., Proc. Natl. Acad. Sci. США (1990), 87:7071-7075). В данном документе предложен способ лечения пролиферативного заболевания у пациента (например, псориаза или рестеноза), включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, раскрытой в данном документе. В данном документе также предложен способ лечения связанного с циклином воспаления у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, описанной в данном документе.

В другом варианте реализации изобретения раскрытые композиции полезны для лечения паразитарной инфекции, а именно инфекций, вызванных простейшими паразитами. Считается, что протеасома этих паразитов в основном участвует в операциях по дифференцировке и репликации клеток (Raugam et al., Trends Parasitol. 2003, 19 (2): 55-59). Дополнительно было показано, что особи энтамебы теряют способность к инкапсулированию при воздействии ингибиторов протеасом (Gonzales et al., Arch. Med. Res. 1997, 28, Spec №: 139-140). В определенных таких вариантах реализации изобретения раскрытые кристаллические соли и композиции из них полезны для лечения паразитарных инфекций у людей, вызванных простейшим паразитом, выбранным из вида Plasmodium (включая P. falciparum, P. vivax, P. malariae и P. ovale, которые вызывают малярию), вида Trypanosoma (включая T. cruzi, вызывающую болезнь Шагаса, и T. brucei, вызывающую африканскую сонную болезнь), вида Leishmania (включая L. amazonensis, L. donovani, L. infantum, L. mexicana и др.), Pneumocystis carinii (простейшее, известное как возбудитель пневмонии у больных СПИДом и других пациентов с подавленным иммунитетом), Toxoplasma gondii, Entamoeba histolytica, Entamoeba invadens и Giardia lamblia. В определенных вариантах реализации изобретения, раскрытые кристаллические соли и композиции из них полезны для лечения паразитарных инфекций у животных и домашнего скота, вызываемых простейшим паразитом, выбранным из Plasmodium hermani, вида Cryptosporidium, Echinococcus granulosus, Eimeria tenella, Sarcocystis neurona и Neurospora crassa. Другие соединения, полезные в качестве ингибиторов протеасом при лечении паразитарных заболеваний, описаны в WO 98/10779, который целиком включен в данный текст.

В определенных вариантах реализации изобретения раскрытые кристаллические соли и композиции из них необратимо ингибируют активность протеасом у паразита. Было показано, что такое необратимое ингибирование вызывает прекращение ферментативной активности эритроцитов и лейкоцитов без восстановления. В определенных таких вариантах реализации изобретения длительное время полужизни клеточных элементов крови обеспечивает продолжительную защиту в отношении терапии против повторяющегося воздействия паразитов. В определенных вариантах реализации изобретения длительное время полужизни клеточных элементов крови обеспечивает продолжительную защиту в отношении химиопрофилактики против будущей инфекции.

Прокариоты имеют то, что эквивалентно протеасомной частице 20S эукариота. Хотя состав субъединицы частицы 20S прокариота проще, чем у эукариот, она обладает способностью гидролизовать пептидные связи аналогичным образом. Например, нуклеофильная атака пептидной связи происходит через остаток треонина на N-конце β -субъединиц. В некоторых вариантах реализации изобретения предложен способ лечения прокариотических инфекций, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, предложенной в данном документе. Прокариотические инфекции включают заболевания, вызванные микобактериями (а именно туберкулез, проказа или язва Бурули) или архебактериями.

Также было продемонстрировано, что ингибиторы, которые связываются с протеасомой 20S, стимулируют образование костей в культурах костных органов. Дополнительно, когда такие ингибиторы вводили мышам системно, некоторые ингибиторы протеасом увеличивали объем костной ткани и скорость костеобразования более чем на 70% (Garrett, I. R. et al., J. Clin. Invest. (2003) 111: 1771-1782), следовательно предполагается, что убиквитин-протеасомный механизм регулирует дифференцировку остеобластов и костеобразование. Следовательно, раскрытые кристаллические соли и композиции из них полезны при лечении и/или профилактике заболеваний, связанных с потерей костной массы, а именно остеопороза.

В данном документе предложен способ лечения заболевания или болезни, выбранных из аутоиммунного заболевания, болезни, связанной с трансплантацией или трансплантатом, нейродегенеративного заболевания, болезни, связанной с фиброзом, болезней, связанных с ишемией, инфекции (вирусной, паразитарной или прокариотической) и заболеваний, связанных с потерей костной ткани, включающий введение кристаллической соли или композиции из нее, предложенной в данном документе.

Костная ткань является отличным источником факторов, способных стимулировать костные клетки. Следовательно, экстракты бычьей костной ткани содержат не только структурные белки, которые отвечают за поддержание структурной целостности кости, но также биологически активные факторы

роста кости, которые могут стимулировать пролиферацию костных клеток. К числу этих последних факторов относится недавно описанное семейство белков, называемое костными морфогенетическими белками (BMP). Все эти факторы роста оказывают влияние на другие типы клеток, а также на костные клетки, включая то, что Hardy, M. H., et al., *Trans Genet* (1992) 8:55-61 описывает доказательства того, что костные морфогенетические белки (BMPs) дифференциально экспрессируются в волосных фолликулах во время развития. Harris, S. E., et al., *J. Bone Miner Res* (1994) 9:855-863 описывает влияние TGF- β на экспрессию BMP-2 и других веществ в костных клетках. Экспрессия BMP-2 в зрелых фолликулах также происходит во время созревания и после периода пролиферации клеток (Hardy, et al. (1992, выше). Следовательно, кристаллические соли и композиции из них, предложенные в данном документе, также являются полезными для стимуляции роста волосного фолликула.

В данном документе также предложен способ лечения лизосомной болезни накопления путем введения соединения, раскрытого в данном документе. Лизосомные болезни накопления представляют собой группу заболеваний, возникающих в результате аномального метаболизма различных субстратов, включая гликофинголипиды, гликоген, мукополисахариды и гликопротеины. Метаболизм экзо- и эндогенных высокомолекулярных соединений обычно происходит в лизосомах, и этот процесс обычно регулируется поэтапно с помощью ферментов разложения. Следовательно, недостаточная активность одного фермента может нарушать процесс, что приводит к накоплению определенных субстратов. Было показано, что ингибирование протеасомы улучшает функционирование определенных субстратов у пациентов, страдающих лизосомными болезнями накопления (Y. Shimada et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011) 415 (2) :274-8). Большинство из этих заболеваний клинически классифицированы по подтипам: 1) инфантильная форма; 2) юношеская форма или 3) возрастная форма. Инфантильные формы часто являются наиболее тяжелыми, как правило, без остаточной активности ферментов. Возрастные формы часто менее тяжелые с низкой, но часто выявляемой остаточной ферментативной активностью. Степень тяжести юношеских форм находится между инфантильными формами и возрастными формами. Неограничивающие примеры таких расстройств включают болезнь Помпе, болезнь Гоше, болезнь Фабри, GM1-ганглиозидоз, болезнь Тей-Сакса, болезнь Сандхоффа, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Краббе, болезнь Фарбера, метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Херлера-Шейе, болезнь Хантера, болезнь Санфилипо А, болезнь Санфилипо В, болезнь Санфилиппо С, болезнь Санфилиппо D, болезнь Моркио А, болезнь Моркио В, болезнь Маротмо-Лами, болезнь Слая, α -маннозидоз, β -маннозидоз, фукозидоз, сиалидоз и болезнь Шиндлера-Канзаки. Следовательно, один вариант реализации изобретения представляет собой способ лечения болезни Помпе, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической соли или композиции из нее, предложенной в данном документе.

Раскрытые кристаллические соли и композиции из них также полезны в качестве диагностических средств (например, в диагностических наборах или для использования в клинических лабораториях) для скрининга белков (например, ферментов, факторов транскрипции), обработанных Ntn-гидролазами, включая протеасому. Раскрытые кристаллические соли и композиции из них также полезны в качестве исследовательских реагентов для специфического связывания субъединицы X/MB1 или α -цепи и ингибирования связанных с ним протеолитических активностей. Например, может быть определена активность (и конкретные ингибиторы) других субъединиц протеасомы.

Большинство клеточных белков подвергаются протеолитическому процессингу во время созревания или активации. Раскрытые в данном документе ферментативные ингибиторы используют для определения того, регулируется ли клеточный, физиологический процесс, или процесс развития, или результат протеолитической активностью конкретной гидролазы Ntn. Один такой способ включает получение организма, препарата интактных клеток или клеточного экстракта; воздействие на организм, клеточный препарат или клеточный экстракт композиции, раскрытой в данном документе; воздействие сигнала на организм, клеточный препарат или клеточный экстракт, подвергшийся воздействию соединения; и мониторинг процесса или результата. Высокая селективность соединений, раскрытых в данном документе, позволяет быстро и точно исключить или задействовать Ntn (например, протеасому 20S) в данном клеточном процессе, процессе развития или физиологическом процессе.

Примеры

Следующие примеры приведены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1. Способы характеристики.

Данные порошковой рентгеновской дифрактометрии ("XRPD") получены на рентгеновском PANalytical X'Pert3 (фиг. 1, 21 и 22-27), Shimadzu XRD-7000 (фиг. 5) или на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D8Advance (фиг. 1, 9, 11, 13-15 и 19). Образцы сканировали в непрерывном режиме от 4 до 40° (2 θ) с размером шага 0,02° при 40 кВ и 40 мА с CuK α -излучением (1,54 Å) (фиг. 1). Образцы сканировали в непрерывном режиме от 3 до 40° (2 θ) с размером шага 0,013° при 45 кВ и 40 мА с CuK α -излучением (1,54 Å) (фиг. 21 и 23-27). Образцы сканировали в непрерывном режиме от 5 до 70° (2 θ) с размером шага 0,02° при 40 кВ и 35 мА с CuK α -излучением (1,54 Å) (фиг. 5). Образцы сканировали в непрерывном режиме от 3 до 40° (2 θ) с размером шага 0,02° при 40 кВ и 40 мА с CuK α -излучением (1,54

А) (фиг. 1, 9, 11, 13-15 и 19).

Дифференциальную сканирующую калориметрию ("ДСК") выполняли на калориметре TA Instruments Q2000 в алюминиевом завальцованном тигеле (фиг. 22), TA Q20 DSC в малогабаритном тигле Tzero (фиг. 2) или TA Instruments Q20 в алюминиевом тигле Tzero (фиг. 6) или в системе динамической сорбции пара с использованием завальцованного алюминиевого тигля (фиг. 8, 10, 12, 16, 17 и 20) в атмосфере сухого азота.

Термогравиметрический анализ (ТГА) выполняли на анализаторе TA Instruments Q500 (фиг. 22) или NETZSCH TG209 F1 (фиг. 3) в платиновом тигле (фиг. 22) или алюминиевом тигле Tzero (фиг. 3) в атмосфере сухого азота.

Данные по сорбции влаги собирали, используя SMS (системы измерения шероховатости поверхности) DVStrinsic (фиг. 4) или системы динамической сорбции пара (фиг. 18). Критерии равновесия составляли $\pm 0,002\%$ изменения массы (фиг. 4) за 10 мин с максимальным временем установления равновесия 180 мин.

¹H-ЯМР выполняли на приборе Varian 400 МГц. Твердые образцы растворяли в DMSO-d₆ и переносили в ЯМР-пробирки для анализа.

Пример 2. Отсеивание соли соединения G.

Соединение G реагирует с шестью различными кислотами, каждая из них находится в шести различных системах растворителей (всего 36 отсеивающих экспериментов), чтобы определить, может ли образоваться кристаллическая соль соединения G.

Конкретнее около 15 мг соединения G и эквивалентное молярное количество кислоты смешивают в 2,0 мл стеклянной пробирке. Около 1,0 мл соответствующей системы растворителей добавляют в пробирку. Полученные суспензии перемешивают при около 600 об/мин при комнатной температуре в течение около двух дней. Суспензии затем центрифугируют для выделения твердых веществ для XRPD-анализа. Результаты отсеивающих экспериментов представлены в табл. 3. Из шести протестированных кислот две приводят к образованию кристаллической соли соединения G: малеиновая кислота и фумаровая кислота.

Таблица 3. Результаты отсеивания соли соединения G

Растворитель Кислоты		ГРА	EtOAc	THF	MTBE	Ацетон/н-гептан	EtOH/H ₂ O
		1	HCl	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный
2	H ₃ PO ₄	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный
3	малеиновая кислота	кристаллы малеата	кристаллы малеата	кристаллы малеата	кристаллы малеата	кристаллы малеата	прозрачный
4	фумаровая кислота	прозрачный	кристаллы фумарата форма G	прозрачный	кристаллы фумарата форма G	кристаллы фумарата форма G	прозрачный
5	L-винная кислота	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный
6	лимонная кислота	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный	прозрачный

Прозрачный: твердое вещество отсутствует или находится в ограниченном количестве

Пример 3. Дополнительное отсеивание соли соединения G.

К соединению G (20 мг, предварительно растворенному в 140 мкл растворителя) добавляют 1 эквивалент кислоты (предварительно растворенной в от 40 до 240 мкл в растворителе) и смеси отстаивают в течение 96 ч в запаянной пробирке. Используют следующие растворители: толуол, этанол, метанол, изопропанол, гексан/этилацетат (1:1), 1,4-диоксан, ацетонитрил, 1-бутанол, этилацетат, ацетон, MTBE/этилацетат (1:1) и диэтиловый эфир/этилацетат (1:1). Используют следующие кислоты: серную, метансульфоновую, тозилловую (моногидрат), 2-нафталинсульфоновую, L-яблочную, пропионовую, бензойную, щавелевую и фосфорную. Твердый осадок наблюдают с комбинациями, представленными в табл. 4.

Таблица 4. Переменные отсеивания соли

Кислота	Система растворителей
Серная кислота	Et ₂ O/EtOAc
1-нафталинсульфо кислота	Гексан/EtOAc MTBE/EtOAc
Щевелевая кислота	Толуол Гексан/EtOAc MTBE/EtOAc Et ₂ O/EtOAc
Фосфорная кислота	Гексан/EtOAc MTBE/EtOAc Et ₂ O/EtOAc
L-яблочная кислота	Гексан/EtOAc

Пример 4. Линейное увеличение малеата соединения G.

Получение мономалеатной формы соединения G линейно увеличивают следующим образом. Соединение G (около 200 мг) подвергают взаимодействию с малеиновой кислотой при молярном соотношении 1:1 или 1:2 путем отвешивания обоих исходных материалов в стеклянную пробирку. В каждую стеклянную пробирку добавляют объем MTBE или ацетона и полученную суспензию перемешивают на магнитной пластине. Затем суспензию сушат в вакууме при комнатной температуре, чтобы получить форму B.

Соединение G (около 200 мг) также подвергают взаимодействию с малеиновой кислотой (около 20 мг; молярное соотношение 1:0,5), используя EtOAc в качестве растворителя. Полученную суспензию перемешивают на магнитной пластине со скоростью около 600 об/мин при комнатной температуре. Если после перемешивания выделяется белое твердое вещество, к суспензии добавляют около 9,0 мл EtOAc. Суспензию перемешивают в течение двух дней, а затем выделяют центрифугированием. Выделенные твердые вещества сушат на воздухе или при 50°C в вакууме в течение ночи, чтобы получить форму A.

Краткое описание малеатов соединения G, полученных в линейно увеличенных экспериментах, представлено в табл. 5.

Таблица 5. Экспериментальные данные по линейному увеличению для малеата соединения G

Расход кислоты (соединение G: кислота)		MTBE	Ацетон
1	Малеиновая кислота (1:1)	Малеат формы A, смешанный с аморфным	Малеат Формы B
2	Малеиновая кислота (1:2)	Малеат формы A, смешанный с аморфным	Малеат Формы B
Расход кислоты (соединение G:кислота)		EtOAc	
3	Малеиновая кислота (1:0,5)	Малеат Формы A	
4	Малеиновая кислота (1:0,5)	Малеат Формы A	
5	Малеиновая кислота (1:0,5)	Малеат Формы A	

Результаты XRPD по экспериментам линейного увеличения малеатов изображены на фиг. 23. Сопоставляющиеся дифрактограммы наблюдаются для малеата из одного и того же растворителя. Малеат из MTBE (форма A) показывает слабую кристалличность, а малеат из ацетона (форма B) показывает немного отличную XRPD от XRPD для кристаллизованного в EtOAc (форма A). Однако после термообработки до 100°C при ТГА, как изображено на фиг. 24 и 25, XRPD мономалеата соединения G, кристаллизованного из MTBE (форма A) и ацетона (форма B), хорошо совпадает с XRPD для мономалеата, кристаллизованного из EtOAc (форма A).

Пример 5. Дальнейшая обработка и характеристика формы А.

Различные условия сушки (воздушная сушка, вакуумная сушка, циклическое воздействие влаги) используют для обработки формы А (кристаллизованной из EtOAc). Полученные кристаллические соли характеризуют XRPD (фиг. 25 и 26), ДСК и ТГА. Малеаты после вакуумной сушки также характеризуют ¹H-ЯМР для определения стехиометрии свободного основания/малеиновой кислоты. Результаты XRPD на фиг. 26 показывают, что все образцы при разных условиях сушки обладают одинаковой дифрактограммой. Испытание на динамическую сорбцию пара (ДСП) также применяют для характеристики формы А из EtOAc, что изображено на фиг. 4. Характеристики для этих экспериментов приведены в табл. 6.

Таблица 6. Характеристики формы А (из EtOAc) при соотношении 1:0,5

Условия сушки	Потеря массы при ТГА (% мас.)	Эндотерма на ДСК (°С)	Стехиометрия по ЯМР (свободная форма/кислота)
цикл влажности *	1,8	138,8	/
КТ вакуум	2,5	92,1, 140,7	1,0:1,0
воздух	2,5	145,1	/
50°С вакуум	0,4	147,6	1,0:1,0
воздух	2,3	144,5	/
50°С вакуум	2,1	145,5	1,0:1,1

*Цикл влажности (ДСП) представляет собой 40% ОВ-95% ОВ-0% ОВ-95% на воздухе

Пример 6. Способы синтеза.

Способ 1. Получение мономалеата соединения G с изопропилацетатом/этанолом.

К соединению G (3,6 кг в 37,88 кг IPAc) добавляют EtOH (11,5 кг). Полученный раствор нагревают до 50°С и через 15 мин добавляют малеиновую кислоту (1,62 кг 12,4 мас.% раствора в EtOH), а затем затравку (18,0 г) целевого соединения. Суспензию перемешивают в течение 0,5 ч при 50°С и в течение 3 часов добавляют малеиновую кислоту (4,90 кг 13,4 мас.% раствора в EtOH). Смесь перемешивают при 50°С в течение 4 ч, охлаждают до -3°С в течение 9,5 ч, выдерживают при -2-3°С в течение 2 ч, фильтруют и промывают IPAc/EtOH (2:1, 12,0 кг) при -5-5°С. Отфильтрованный осадок сушат в вакууме при 40-45°С в течение 17 ч для получения мономалеата соединения G (3,86 кг, чистота 99,0%).

Способ 2. Разложение соли для получения формы А с этилацетатом.

К форме А (3,56 кг) добавляют IPAc (37,8 кг) при 15-25°С с последующим добавлением 3,5% NaHCO₃ (37,8 кг) и полученную суспензию перемешивают в течение 1 ч, чтобы получить раствор. Водный слой удаляют и органический слой промывают 5% Na₂SO₄ (водным, 36,9 кг) при 15-25°С. Водный слой удаляют и органический слой концентрируют до 4-7 л при ниже 45°С. Органический слой трижды экстрагируют этилацетатом (32,0 кг) при 15-25°С и раствор концентрируют до около 7-11 л при ниже 45°С. Затем добавляют этилацетат (28,8 кг) и раствор нагревают до 45-55°С. Малеиновую кислоту (720 г) растворяют в 19,4 кг этилацетата и 1/10 этого раствора добавляют в течение 30 мин при 45-55°С. Затравку (9,09 г) добавляют при 45-55°С и смесь перемешивают в течение 30 мин. Оставшуюся часть раствора малеиновой кислоты добавляют при 45-55°С в течение 1 ч. Смесь перемешивают в течение дополнительных 2 ч при 45-55°С, затем охлаждают до 1°С в течение 8 ч. Смесь перемешивают в течение 1 ч при -5-5°С, затем фильтруют, промывают этилацетатом (13,0 кг) и сушат при 40-50°С в вакууме в течение 26-28 ч для получения 3,42 кг малеата (99,1% чистоты) в виде бесцветного твердого вещества. XRPD-дифрактограмма изображена на фиг. 1, характеристики ДСК изображены на фиг. 2, данные ТГА изображены на фиг. 3.

Способ 3. Получение мономалеата соединения G с использованием 0,5 экв. малеиновой кислоты (форма А).

К соединению G (100 мг, 0,170 ммоль) в THF (0,5 мл) добавляют малеиновую кислоту (0,085 ммоль, 9,9 мг в THF (0,5 мл)). Смесь отстаивают в течение ночи и фильтруют для получения мономалеата соединения G (50,5 мг) в виде бесцветного твердого вещества.

Способ 4. Перекристаллизация мономалеата соединения G.

К форме А (0,05 г, 0,0852 ммоль) добавляют этанол (0,5 мл), раствор нагревают с обратным холодильником в течение 5 мин и оставляют охлаждаться до 20°С в течение ночи. Очищенное соединение выделяют в виде бесцветного твердого вещества (42 мг).

Аналогичный способ перекристаллизации осуществляют с использованием следующих растворителей для получения мономалеата соединения G: THF, iPrOH-EtOAc (1:1), iPrOH, iPrOH-толуол (1:1), диоксан и ацетонитрил.

Пример 7. Исследование ФК с использованием формы А.

Форму А составляют для подкожного введения при концентрации 45 мг/мл, как описано в табл. 7. Биодоступность формы А, выраженная в процентах (% F), когда каждый препарат вводят в виде однократной подкожной дозы около 3 мг/кг яванским макакам (3 самца/доза) также представлены в табл. 7.

Таблица 7. Составы, используемые для исследования ФК макак

Состав	pH	% F (макак)
10% полисорбат 80 (водн.)	4,5	59,0 ± 10,1
10% KOLLIPHORE EL (водн.)	4,5	62,3 ± 17,8
10% полисорбат 80/10% N-метил-2-пирролидон (водн.)	5	76,2 ± 7,8
10% KOLLIPHORE EL/10% N-метил-2-пирролидон (водн.)	5	68,3 ± 8,1
вода	3,6	70,4 ± 15,1
1:1 (об./об.) LABRASOL/пропиленгликоль	нет отклика	45,2 ± 3,3

Пример 8. Контроль полиморфности.

Способ А. Около 30 мг соединения G добавляют к растворителю, указанному в табл. 8, затем встряхивают при 50°C со скоростью 700 об/мин. Остатки соединения разделяют центрифугированием (5 мин при 9000 об/мин) и исследуют с помощью XRPD, ДСК и ТГА через 7 дней, что изображено в табл. 8 и на фиг. 7-13.

Способ В. К 50 мг соединения G добавляют метанол (1,0 мл), а затем МТВЕ (0,5 мл). После выдерживания смеси в течение ночи осадок собирают и исследуют с помощью XRPD, ДСК и ТГА, что изображено в табл. 8 и на фиг. 19 и 20.

Таблица 8. Контроль полиморфности

форма	Способ	Кристаллизация/ шлам в растворителе	XRPD ($2\theta \pm$ $0,2^\circ$)	ТГА	ДСК
В	А	3% H ₂ O/ацетон	6,8, 7,2, 18,4, 6,6, 13,6, 22,0, 17,4, 14,5, 18,0 и 5,0 (Фиг. 13)		
С	А	Ацетон	6,6, 13,2, 7,4, 20,1, 13,6, 6,9, 16,9, 3,7, 17,9 и 19,9 (Фиг. 7)	Потеря 6,0% массы наблюдается от 29,2 до 130,0°C (Фиг. 8)	Стандартный : 67,2 Дж/г Начало: 141,9 °C Пик: 148,63°C (Фиг. 8)
Д	А	Ацетонитрил	6,8, 4,9, 17,4, 15,3, 7,7, 3,4, 17,7, 13,6, 12,4 и 10,9 (Фиг. 9)	Потеря 0,3% массы наблюдается от 26,8 до 130,0°C (Фиг. 10)	Стандартный : 86,20 Дж/г Начало: 148,53 °C Пик: 151,75°C (Фиг. 10)
Е	А	Изопропиловый спирт	6,5, 3,3, 7,3, 19,8, 6,8, 16,5, 12,1, 21,5, 4,0 и 13,0 (Фиг. 11)	Потеря 0,9% массы наблюдается от 32,5 до 99,3°C (Фиг. 12)	Стандартный : 57,8 Дж/г Начало: 138,2 °C Пик: 147,61°C (Фиг. 12)
Ф	В	MeOH/MTBE	6,3, 7,1, 19,0, 17,5, 19,6, 17,9, 22,0, 13,5, 18,2 и 15,5 (Рис. 19)	Потеря 1,4% массы наблюдается от 31,9 до 99,4°C (Фиг. 20)	Стандартный : 71,2 Дж/г Начало: 128,05°C Пик: 135,46°C (Фиг. 20)
					(Фиг. 20)

Пример 9. Дальнейшая обработка и характеристика формы В.

Способ: 2 г соединения Г добавляют к 3% воды в ацетоне (20 мл), затем встряхивают при 50°C со скоростью 700 об/мин в течение ночи. Остаток исследуют с помощью XRPD, ДСК и ТГА.

Остаток сушат в вакууме при комнатной температуре или 30°C в течение 1, 4 или 24 ч. Результаты

XRPD на фиг. 14-15 показывают, что все образцы при разных условиях сушки обладают одинаковой дифрактограммой. Результаты ДСК/ТГА для образца, высушенного при комнатной температуре в течение ночи, изображены на фиг. 16, и высушенные в течение ночи при 30°C изображены на фиг. 17. Испытание динамической сорбции пара (ДСП) также применяется для характеристики формы F из 3% H₂O/аcetона, что изображено на фиг. 18. После сушки в течение ночи при комнатной температуре тест Карла Фишера показывает, что содержание воды в форме F составляет 2,51%.

Пример 10. Характеристические пики для форм А и С-Г.

В табл. 9 ниже представлены пики XRPD, которые являются уникальными для каждого полиморфа.

Таблица 9. Полиморфное отсеивание

Форма	Уникальные XRPD пики ($2\theta \pm 0,2^\circ$)	Высота
А	6,9	6261
	17,3	1237
	17,8	1030
В	7,2	7829
	18,4	4173
	22,0	1251
С	7,4	2147
	13,2	2206
	20,1	1386
D	4,9	2818
	7,7	1637
	10,9	1033
	12,4	1259
	13,6	1445
	15,3	1975
Е	6,4	17796
	7,3	1906
	19,8	1831
F	6,3	6553
	19,0	1690
	19,6	1155

Пример 11. Стабильность формы А.

Стабильность формы А и ее свободного основания испытывают при условиях окружающей среды (25°C и 40% относительной влажности, "ОВ") и при повышенной температуре и влажности (40°C и 75% ОВ) в течение более одного месяца. Форма свободного основания быстро разлагается при повышенной температуре и влажности. Однако при тех же условиях и за тот же период времени не наблюдается никаких изменений в форме А. См табл. 10, ниже. Следовательно, форма А проявляет большую стабильность по сравнению со своим свободным основанием.

Таблица 10. Сравнение стабильности формы А и ее свободного основания

Форма	Условия	Партия №	% Чистоты при t=0	% Чистоты за 1 месяц	% Разложения
Свободное основание	25 ⁰ С/40% ОВ	1	95,1	93,2	1,9
	25 ⁰ С/40% ОВ	2	85,6	84,0	1,6
	25 ⁰ С/40% ОВ	3	93,7	92,3	1,4
	40 ⁰ С/75% ОВ	1	95,1	92,3	67,5
	40 ⁰ С/75% ОВ	2	85,6	92,3	28,8
	40 ⁰ С/75% ОВ	3	93,7	72,5	21,1
Малеат	25 ⁰ С/40% ОВ	4	99,1	99,1	0,0
	25 ⁰ С/40% ОВ	5	99,4	99,3	0,1
	40 ⁰ С/75% ОВ	4	99,1	98,9	0,2
	40 ⁰ С/75% ОВ	5	99,4	99,3	0,1

Представленное выше описание приведено лишь для ясности понимания, и оно не подразумевает никаких излишних ограничений, поскольку специалистам в данной области техники будут понятны различные модификации в пределах объема данного изобретения.

В документе данного описания и следующей формулы изобретения, если из контекста не следует иное, термин "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", следует понимать как включающий указанный элемент, или этап, или группу элементов или этапов, но не как исключаящий любой другой элемент, или этап, или группу элементов или этапов.

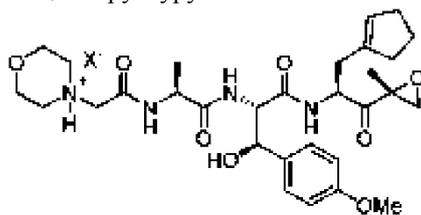
В документе описания, в котором композиции описаны как содержащие компоненты или материалы, предусмотрено, что композиции также состоят в основном из или состоят из любой комбинации перечисленных компонентов или материалов, если не указано иное. Аналогично, если способы описаны как включающие определенные этапы, предусмотрено, что способы также состоят в основном из или состоят из любой комбинации перечисленных этапов, если не указано иное. Изобретение, иллюстративно описанное в данном документе, может быть должным образом осуществлено на практике в отсутствие какого-либо элемента или этапа, которые не описаны в явном виде в данном документе.

Практическое осуществление способа, раскрытого в данном документе, и его отдельных этапов может быть реализовано вручную и/или с помощью автоматических приспособлений, обеспечиваемых электронным оборудованием. Несмотря на то, что способы описаны со ссылкой на конкретные варианты реализации, специалистам в данной области техники понятно, что можно использовать другие способы осуществления действий, связанных с указанными способами. Например, порядок различных этапов можно изменять без отступления от объема или сущности способа, если не описано иное. Дополнительно некоторые из отдельных этапов можно объединять, опускать или дополнительно подразделять на дополнительные этапы.

Все патенты, публикации и ссылки, процитированные в данном документе, полностью включены в данный текст посредством ссылки. В случае противоречий между данным раскрытием и включенными патентами, публикациями и ссылками, следует руководствоваться данным раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая соль, имеющая структуру

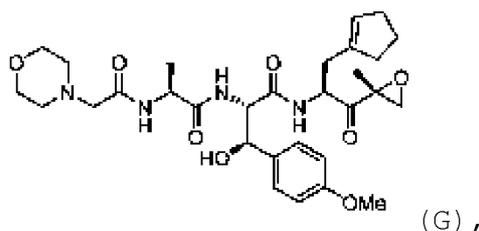


где X⁻ представляет собой малеат, и кристаллическая соль представляет собой соль мономалеата, имеющую рентгеновскую дифрактограмму для порошкового продукта ("XRPD"), включающую пики при 6,9, 17,3 и 17,8 ± 0,2° 2θ, при использовании излучения Cu Kα ("форма А").

2. Кристаллическая соль по п.1, дополнительно включающая пики при 4,9, 6,8 и 7,7 ± 0,2° 2θ, при использовании излучения Cu Kα

3. Способ получения кристаллической соли по п.1, включающий смешивание:

(а) соединения G



(б) малеиновой кислоты и

(в) растворителя

для получения суспензии.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что молярное отношение соединения G к малеиновой кислоте находится в диапазоне от около 1:0,5 до 1:2.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что молярное отношение составляет 1:1.

6. Способ по любому из пп.3-5, отличающийся тем, что растворитель выбирают из группы, состоящей из метанола ("MeOH"), этанола ("EtOH"), изопропанола ("IPA"), этилацетата ("EtOAc"), изопропил-ацетата ("IPAc"), тетрагидрофурана ("THF"), метил-трет-бутилового эфира ("MTBE"), ацетона/н-гептана, ацетона, диэтилового эфира ("Et₂O")/EtOAc, гексана/EtOAc, MTBE/EtOAc, толуола, 1,4-диоксана, ацетонитрила ("ACN"), 1-бутанола, водных смесей вышеуказанных и их комбинаций.

7. Способ по любому из пп.3-6, отличающийся тем, что смешивание происходит при температуре в диапазоне от 0 до 80°C.

8. Способ по любому из пп.3-7, отличающийся тем, что смешивание происходит в течение до около 6 ч.

9. Способ по любому из пп.3-8, дополнительно включающий охлаждение суспензии до 0°C.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий фильтрацию суспензии с образованием осадка.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий промывание, сушку или и промывание, и сушку осадка.

12. Способ по п.11, дополнительно включающий перекристаллизацию осадка.

13. Способ по п.11, дополнительно включающий

(1) восстановление соединения G из осадка;

(2) смешивание восстановленного соединения G, малеиновой кислоты и растворителя для образования кристаллической соли.

14. Фармацевтический состав, содержащий кристаллическую соль по любому из пп.1, 2 и один или несколько эксципиевтов.

15. Фармацевтический состав по п.14 в виде жидкой лекарственной формы.

16. Фармацевтический состав по п.14 в виде лиофилизированной лекарственной формы, отличающийся тем, что лиофилизированную лекарственную форму восстанавливают до жидкой лекарственной формы.

17. Фармацевтический состав по п.15 или 16, отличающийся тем, что кристаллическая соль имеет концентрацию в диапазоне от около 1 до около 150 мг/мл в жидкой лекарственной форме или в восстановленной лиофилизированной лекарственной форме в перерасчете на массу свободного основания кристаллической соли.

18. Фармацевтический состав по п.17, отличающийся тем, что концентрация находится в диапазоне от около 10 до около 70 мг/мл.

19. Фармацевтический состав по любому из пп.14-18, отличающийся тем, что один или более эксципиевтов выбраны из группы, состоящей из поверхностно-активного вещества, регулятора тоничности, буфера и их комбинаций.

20. Фармацевтический состав по п.19, отличающийся тем, что лиофилизированная лекарственная форма дополнительно содержит криопротектор, объемообразующий агент или оба.

21. Фармацевтический состав по п.19, отличающийся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, полиоксил кастрового масла, поли(алкилен)гликоль, каприлокапроил полиоксилглицерид, полиоксилалкиленовые блок-сополимеры и их комбинации.

22. Фармацевтический состав по любому из пп.14-21, отличающийся тем, что жидкая или восстановленная лиофилизированная лекарственная форма является изотонической.

23. Фармацевтический состав по п.19, отличающийся тем, что буфер выбран из группы, состоящей из цитрата, фосфата, гистидина, сукцината, ацетата, малеата, глюконата и их комбинации.

24. Фармацевтический состав по любому из пп.14-21, отличающийся тем, что жидкая лекарственная форма или восстановленная лиофилизированная лекарственная форма имеет pH в диапазоне от около 3,0 до около 8,0.

25. Фармацевтический состав по любому из пп.15-24, отличающийся тем, что жидкая лекарственная

форма или восстановленная лиофилизированная лекарственная форма подходят для парентерального введения субъекту.

26. Фармацевтический состав по п.25, отличающийся тем, что парентеральное введение является внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным или подкожным.

27. Фармацевтический состав по любому из пп.14-26, отличающийся тем, что состав проявляет биодоступность по меньшей мере 55%.

28. Способ ингибирования иммунопротеасомы клетки, включающий контакт клетки с кристаллической солью по любому из пп.1, 2 или составом по любому одному из пп.14-27.

29. Способ по п.28, отличающийся тем, что иммунопротеасома LMP7 ингибирована.

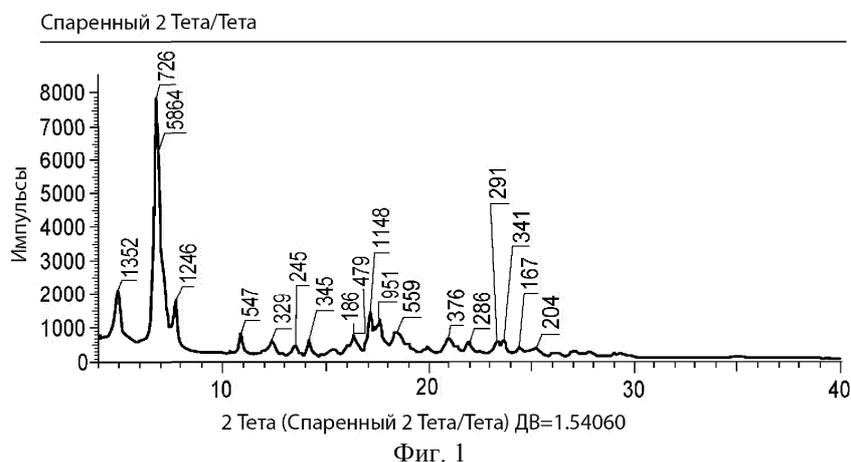
30. Способ по п.28, отличающийся тем, что контактирование включает введение субъекту, страдающему расстройством, связанным с aberrантной иммунопротеасомной активностью.

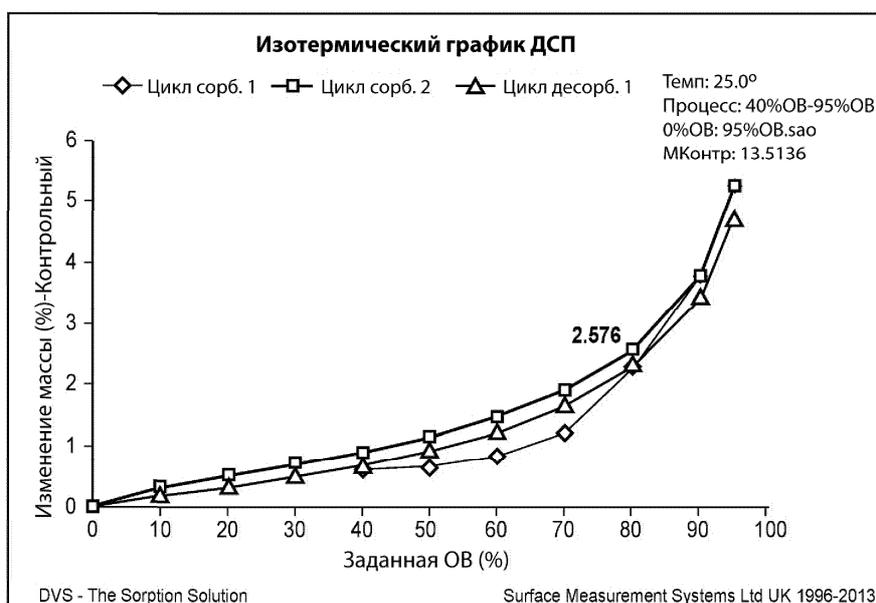
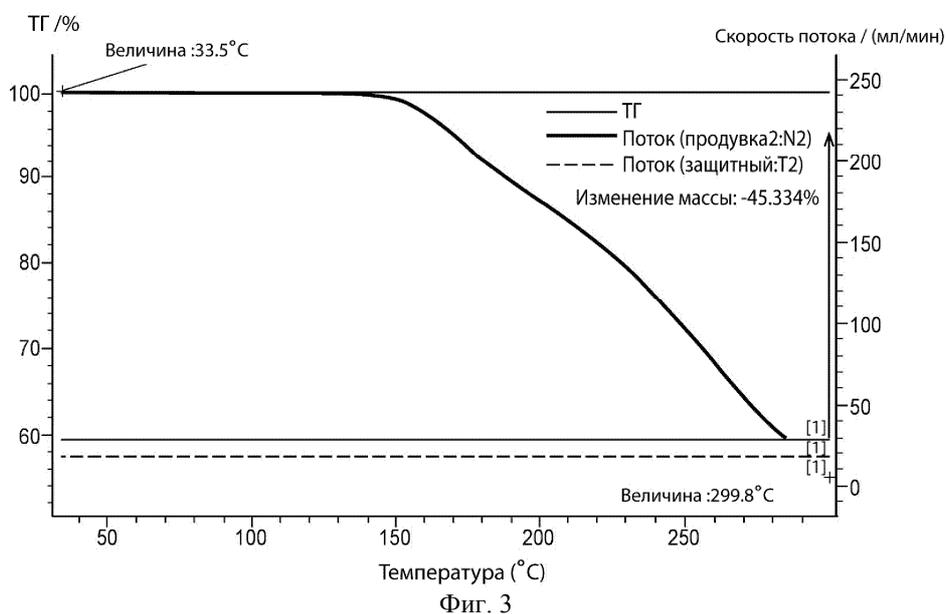
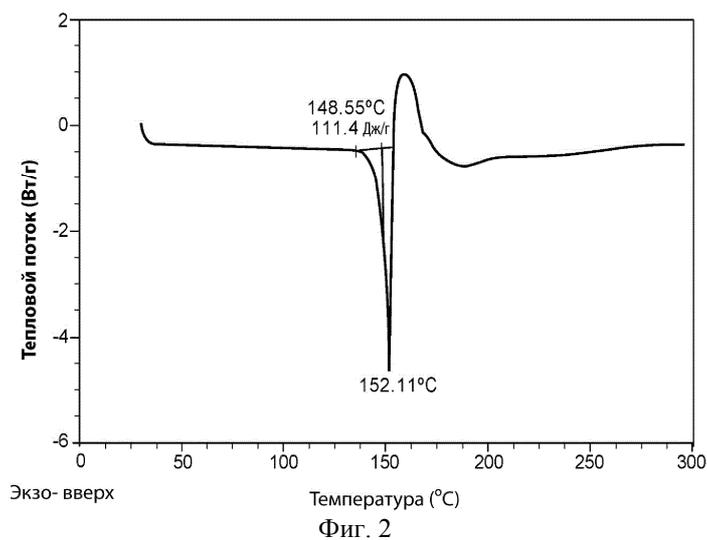
31. Способ по п.30, отличающийся тем, что расстройство представляет собой аутоиммунное заболевание или воспаление.

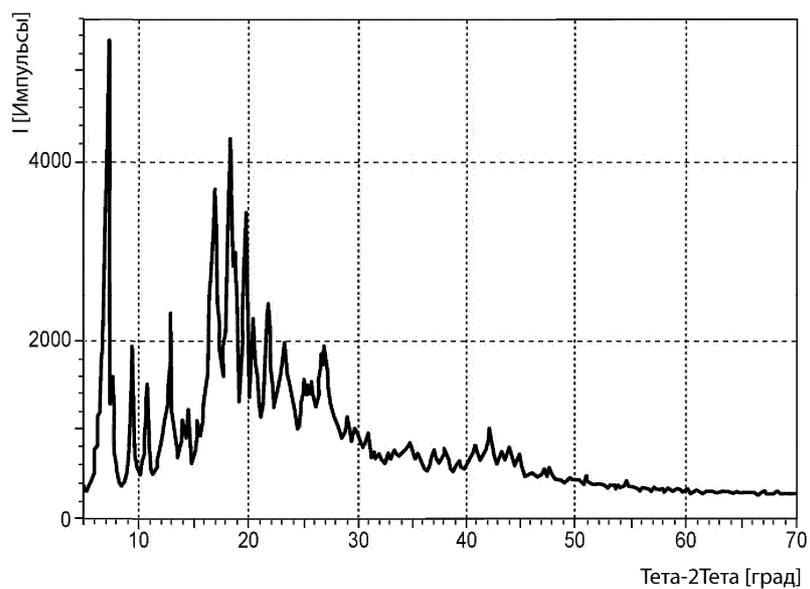
32. Способ по п.31, отличающийся тем, что расстройство представляет собой псориаз, дерматит, системную склеродермию, склероз, болезнь Крона, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит; синдром дыхательной недостаточности, менингит; энцефалит; увеит; колит; гломерулонефрит; экзему, астму, хроническое воспаление; атеросклероз; недостаточность адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; анкилозирующий спондилит; системную красную волчанку (СКВ); сахарный диабет; рассеянный склероз; синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; болезнь Хашимото; аллергический энцефаломиелит; синдром Шегрена; ювенильный диабет; туберкулез, саркоидоз, полимиозит, гранулематоз, васкулит; пернициозную анемию (болезнь Аддисона); заболевание, включающее диапедез лейкоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганной недостаточности; гемолитическую анемию; миастению; заболевание, опосредованное комплексом антиген-антитело; легочно-почечный синдром; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; буллезный пемфигоид; пемфигус; аутоиммунные полиэндокринопатии; болезнь Рейтера; синдром мышечной скованности; болезнь Бехчета; гигантоклеточный артериит; иммуно-комплексный нефрит; IgA нефропатия; полиневропатии IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП) или аутоиммунную тромбоцитопению.

33. Применение кристаллической соли по любому из пп.1, 2 или состава по любому одному из пп.14-27 для производства лекарственного средства для лечения аутоиммунного заболевания или воспаления.

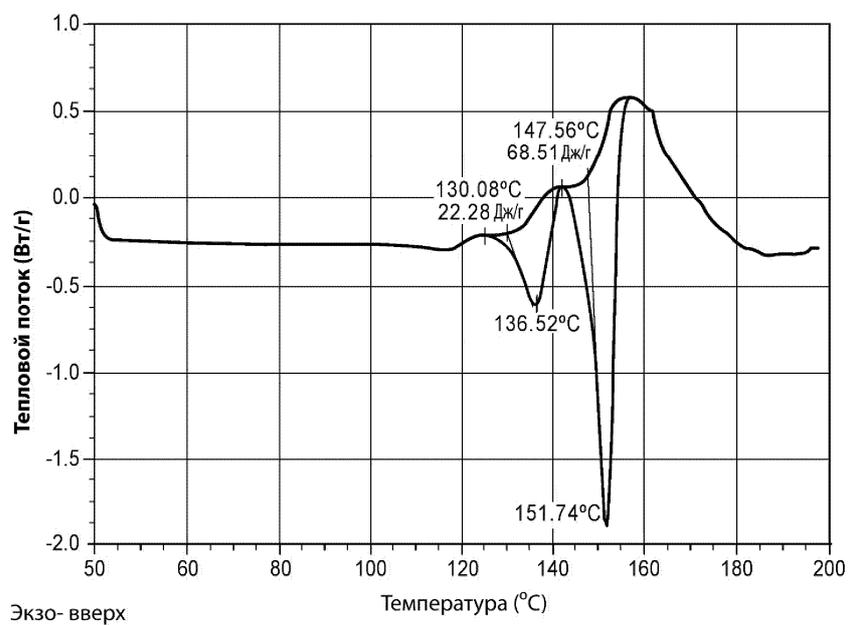
34. Применение кристаллической соли по любому из пп.1, 2 или состава по любому одному из пп.14-27 для лечения аутоиммунного заболевания или воспаления.



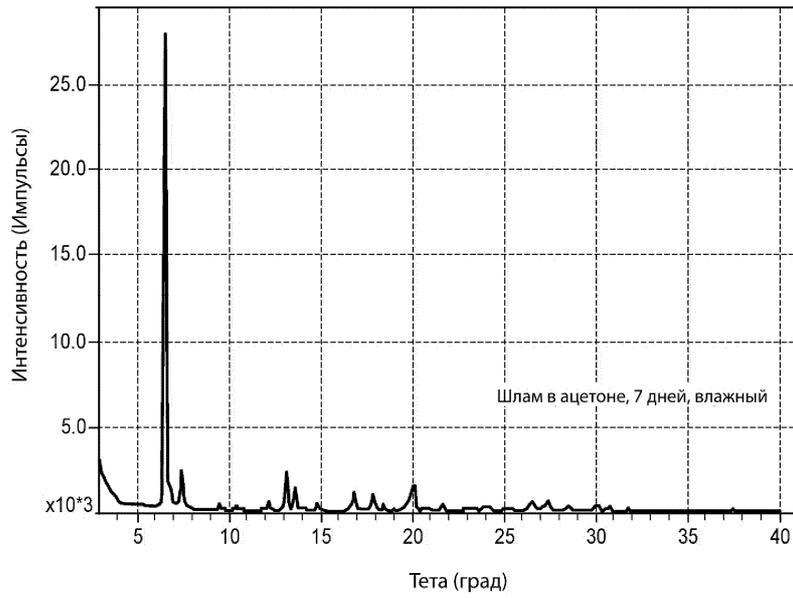




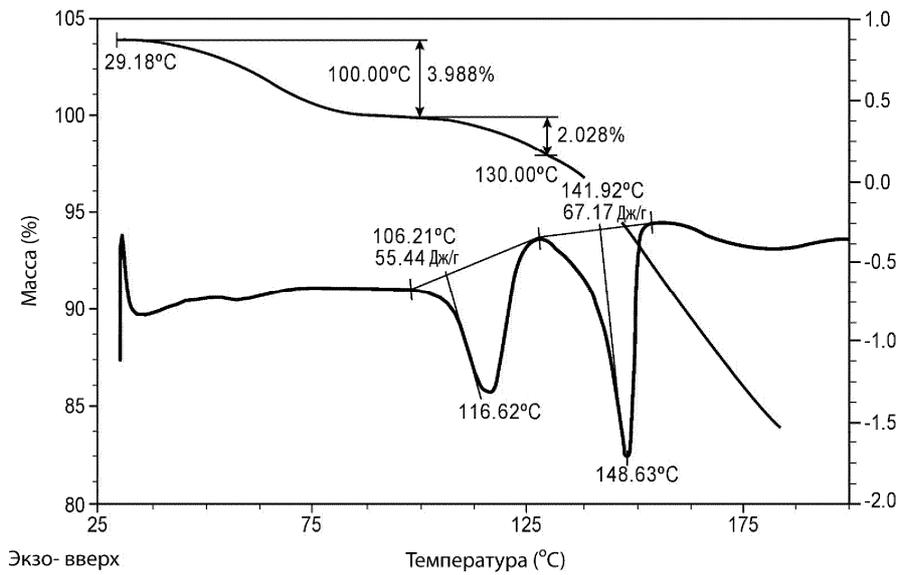
Фиг. 5



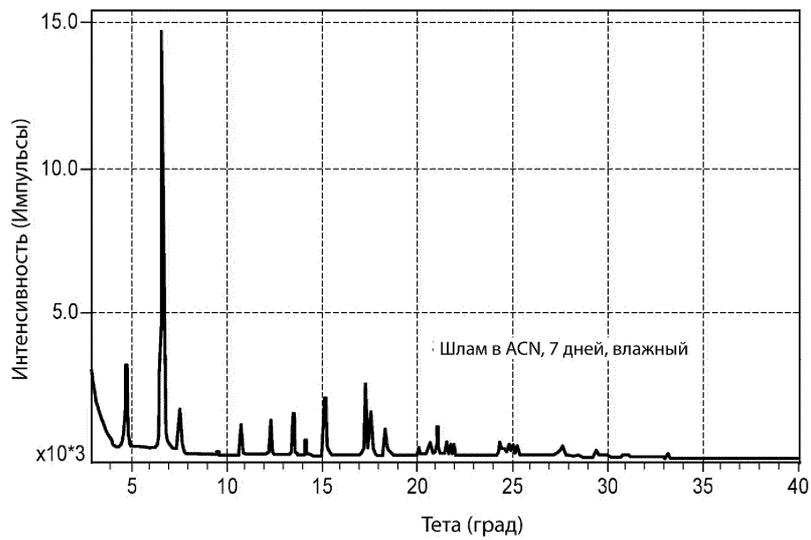
Фиг. 6



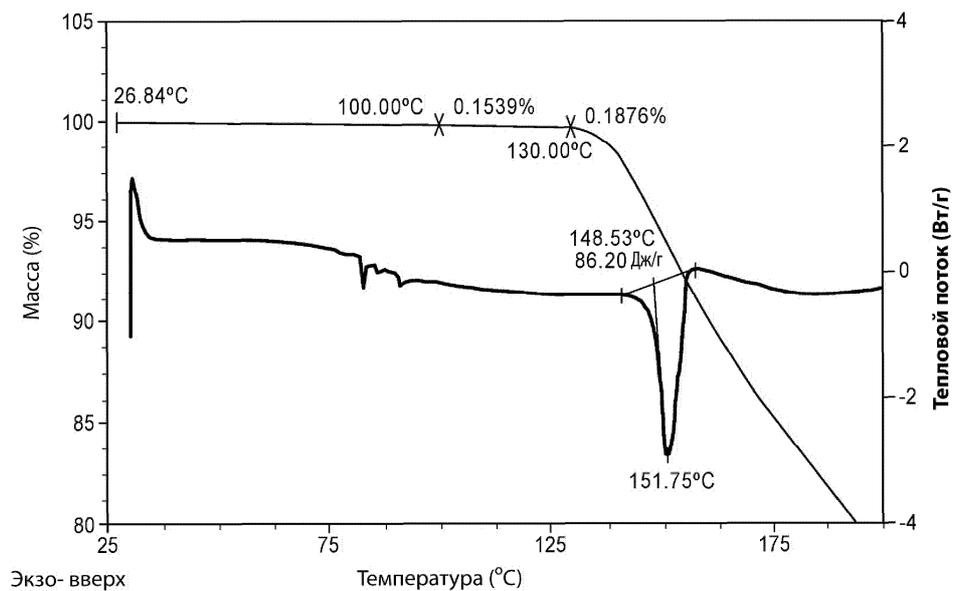
Фиг. 7



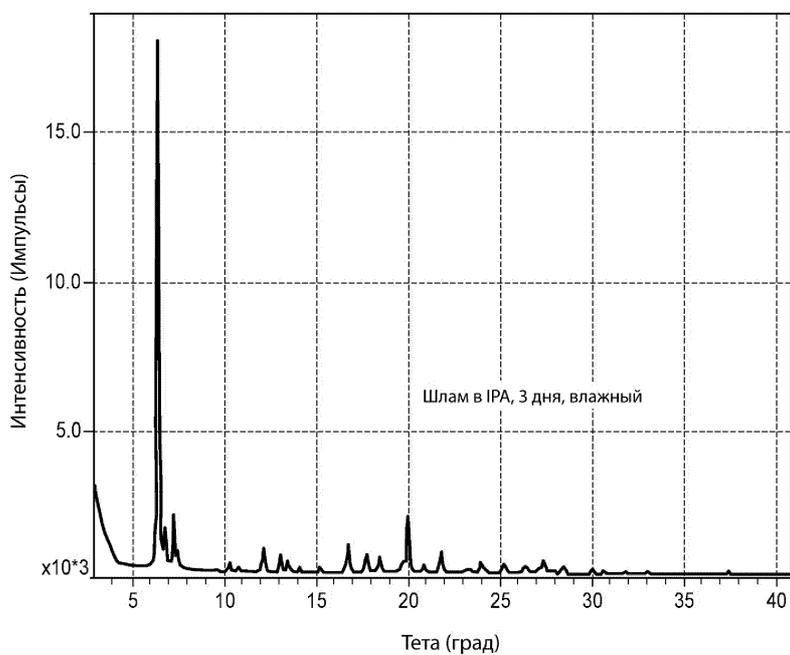
Фиг. 8



Фиг. 9

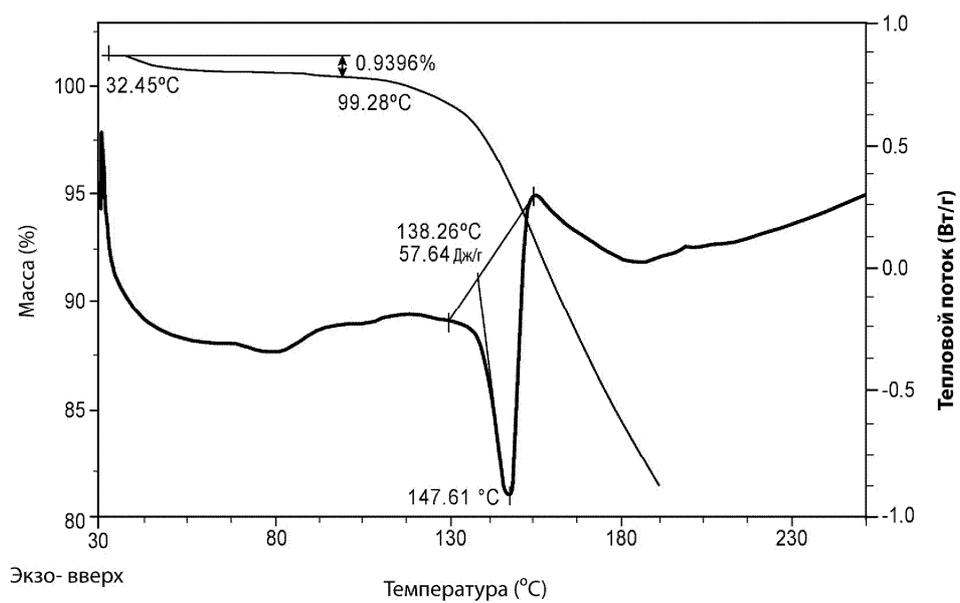


Фиг. 10

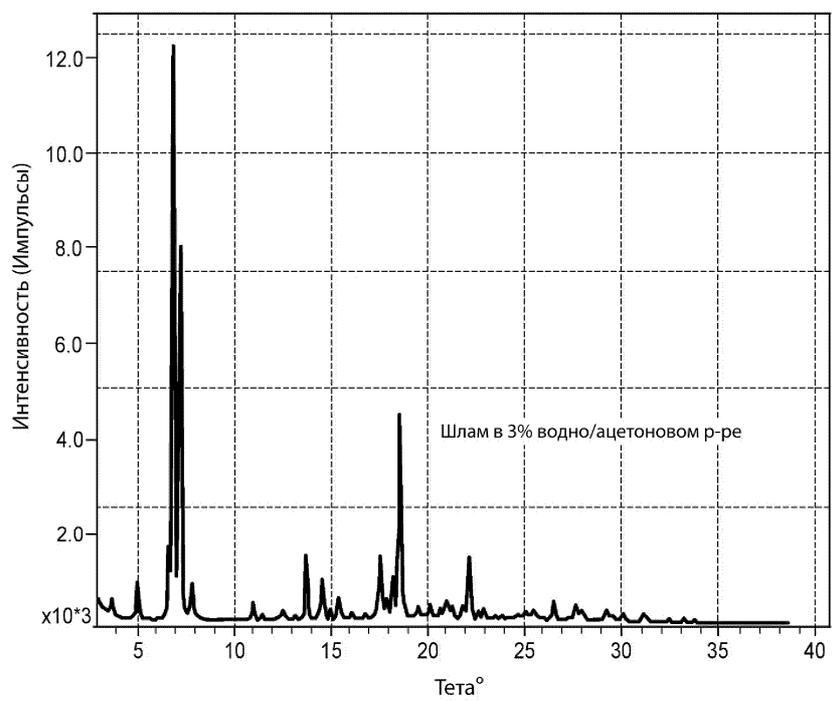


Фиг. 11

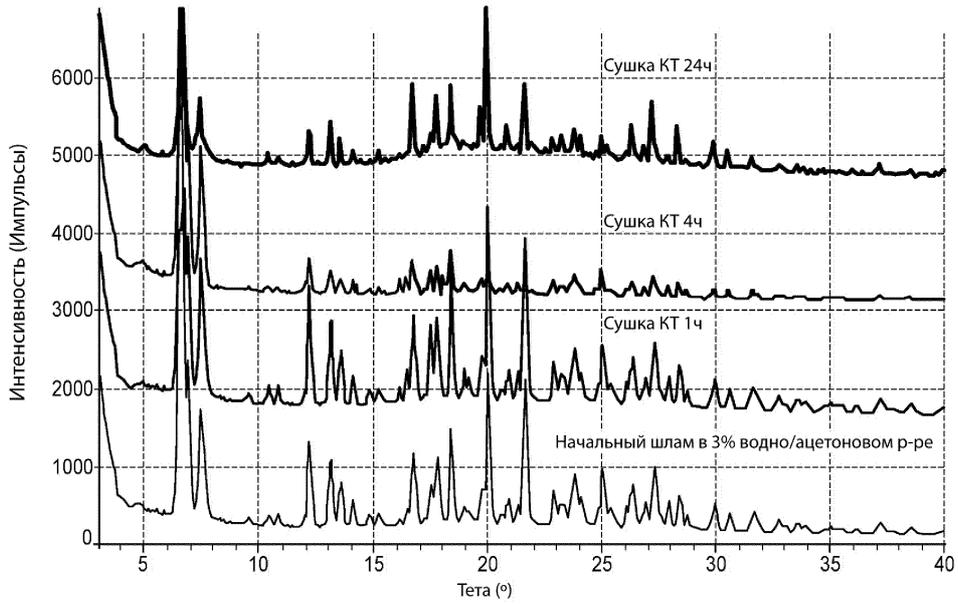
040138



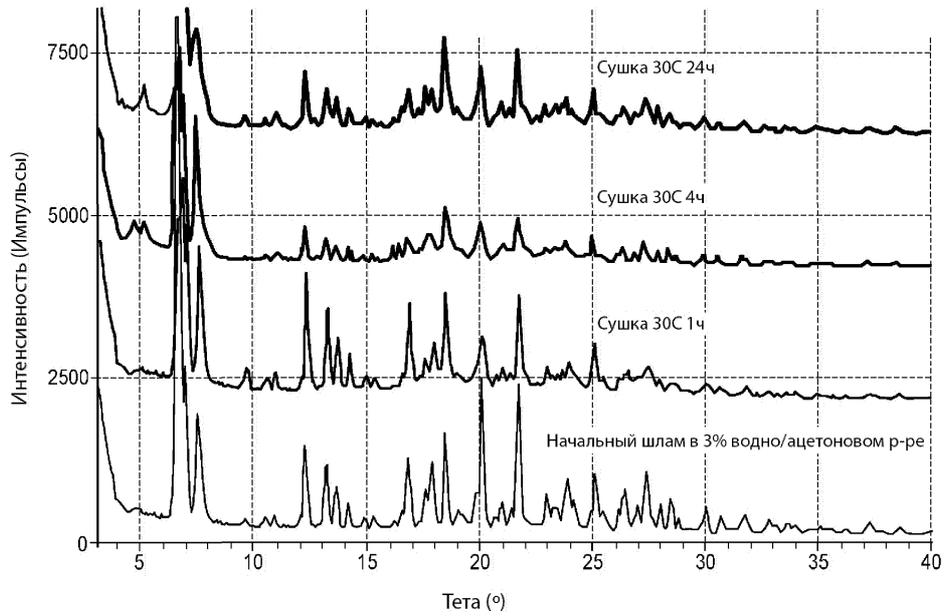
Фиг. 12



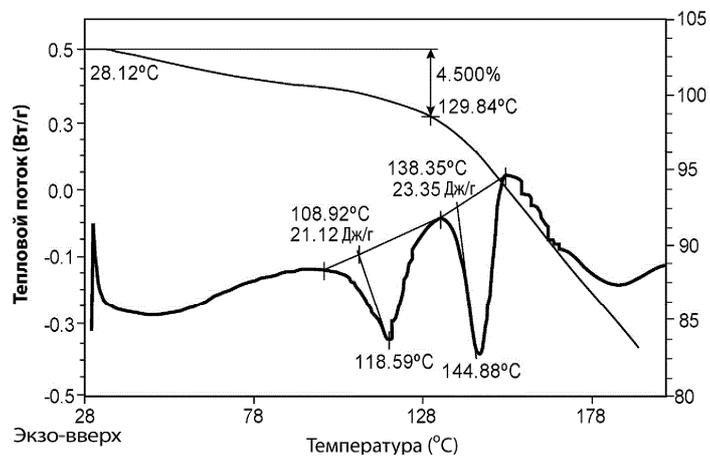
Фиг. 13



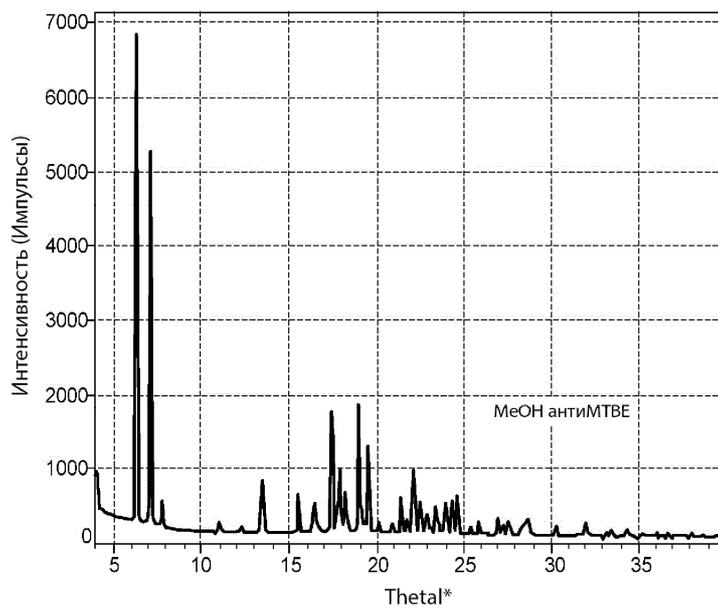
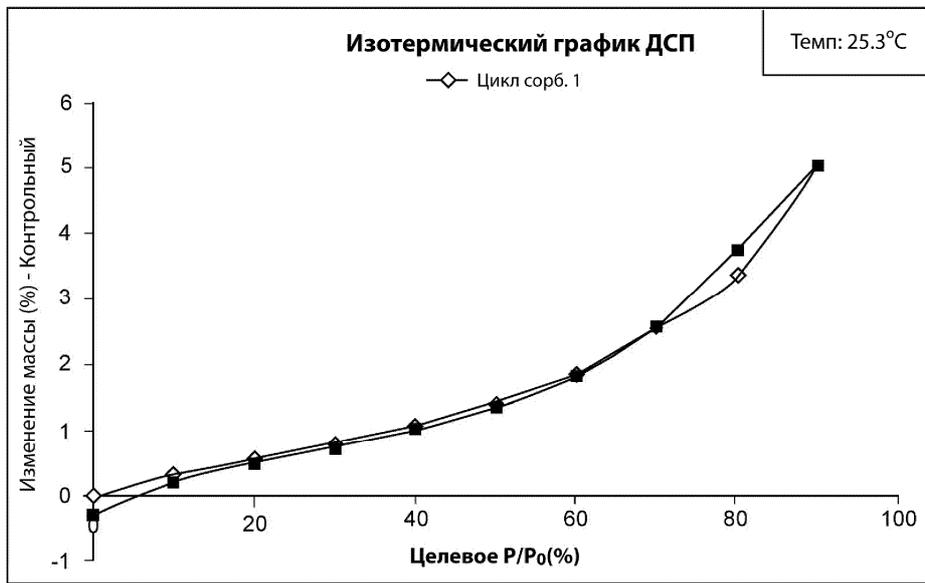
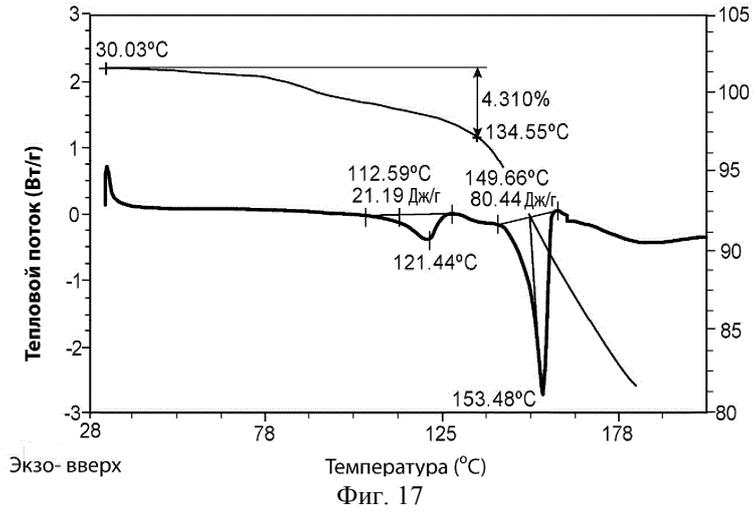
Фиг. 14

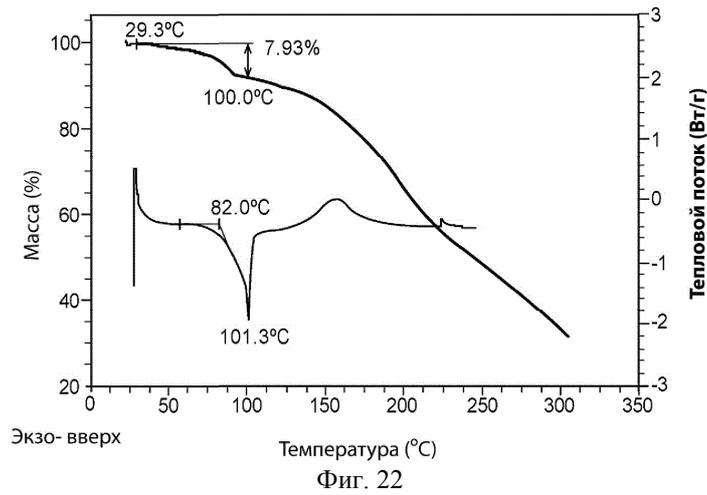
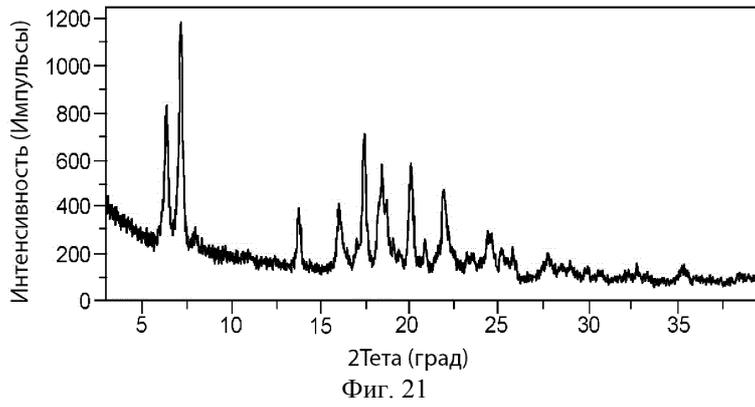
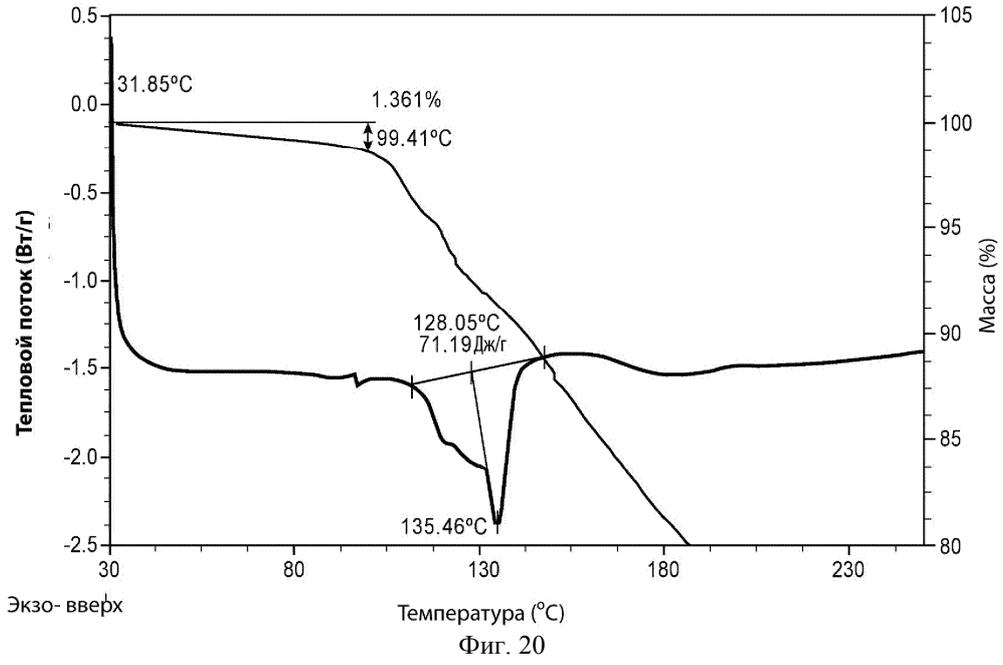


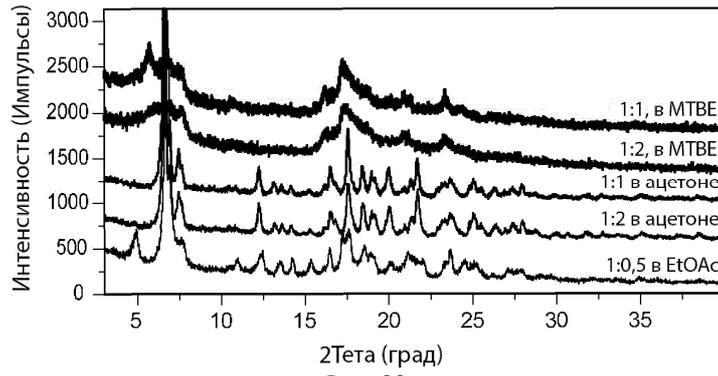
Фиг. 15



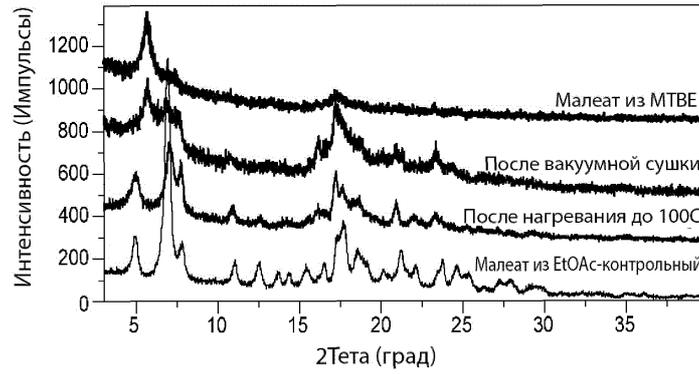
Фиг. 16



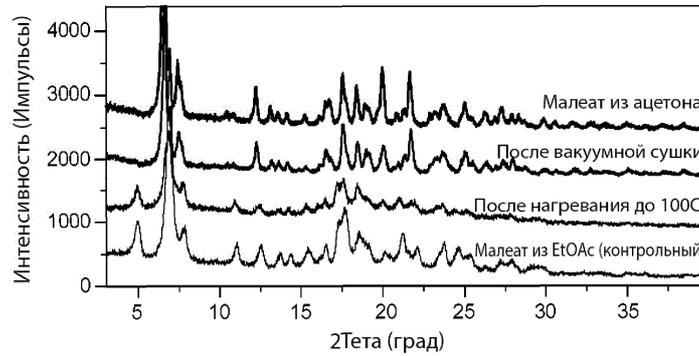




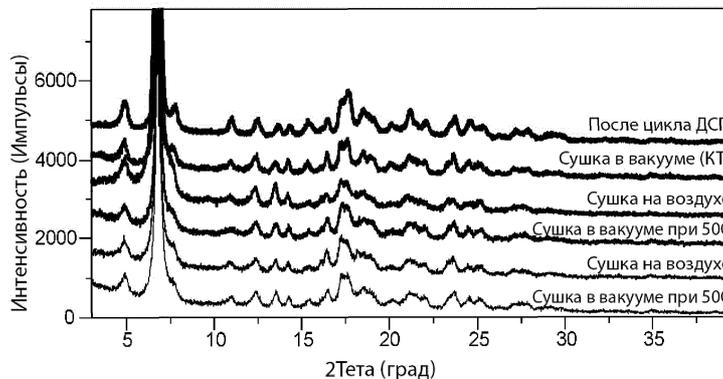
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26

