

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041006**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.29

(51) Int. Cl. **C07D 487/04** (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791923

(22) Дата подачи заявки
2016.02.26

(54) **КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СОЛЬ, СПОСОБ ЕЁ ПОЛУЧЕНИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЕЁ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ И
ЛЕЧЕНИЯ С ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ**

(31) **62/121,697**

(56) **US-A1-2014249132**

(32) **2015.02.27**

(33) **US**

(43) **2018.03.30**

(86) **PCT/US2016/019741**

(87) **WO 2016/138363 2016.09.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНСАЙТ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Цяо Лэй, Вен Линкай, Ши Чуншэн
Эрик, Мелони Дэвид, Лин Циянь,
Ксиа Майкл, Шариф Вакар, Фритце
Уилльям, Цзя Чжунцзян, Пань
Юнчунь, Лю Пинли, Юэ Тай-Юйэнь,
Чжоу Цзячэн (US)**

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

(57) В изобретении предложена кристаллическая солянокислая соль (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она, которая пригодна в качестве ингибитора фосфоинозитид-3-киназы-дельта (PI3Kδ), содержащая ее фармацевтическая композиция, а также способы ее применения и получения.

041006

B1

041006

B1

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/121697, поданной 27 февраля 2015 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Область техники

В изобретении предложена кристаллическая солянокислая соль (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она, которая пригодна в качестве ингибитора фосфоинозитид-3-киназы-дельта (PI3K δ), а также способы ее применения и получения.

Уровень техники

Фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) принадлежат к большому семейству липидных сигнальных киназ, которые фосфорилируют фосфоинозитиды в положении D3 инозитольного кольца (Cantley, *Science*, 2002, 296(5573):1655-7). PI3K подразделяются на три класса (класс I, II и III) в соответствии с их структурой, регуляцией и субстратной специфичностью. Класс I PI3K, который включает PI3K α , PI3K β , PI3K γ и PI3K δ , представляет собой семейство липидных киназ и протеинкиназ с двойной специфичностью, которые катализируют фосфорилирование фосфатидилинозит-4,5-бифосфата (PIP₂), давая фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфат (PIP₃). PIP₃ функционирует как вторичный посредник, регулирующий ряд клеточных процессов, в том числе рост, выживание, адгезию и миграцию. Все четыре изоформы класса I PI3K существуют в виде гетеродимеров, состоящих из каталитической субъединицы (p110) и жестко связанной регуляторной субъединицы, которая регулирует их экспрессию, активацию и внутриклеточное расположение. PI3K α , PI3K β и PI3K δ связаны с регуляторной субъединицей, известной как p85, и активируются факторами роста и цитокинами посредством механизма, зависящего от тирозинкиназ (Jimenez, et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(44):41556-62), тогда как PI3K γ связана с двумя регуляторными субъединицами (p101 и p84), и ее активация запускается активацией рецепторов, сопряженных с G-белком (Brock, et al., *J. Cell. Biol.*, 2003, 160(1):89-99). PI3K α и PI3K β экспрессируются повсеместно. В отличие от этого PI3K γ и PI3K δ преимущественно экспрессируются в лейкоцитах (Vanhaesebroeck, et al., *Trends Biochem Sci.*, 2005, 30(4):194-204).

Различное распределение изоформ PI3K в тканях приводит к их различным биологическим функциям. Генетическое отсутствие как PI3K α , так и PI3K β приводит к гибели эмбриона, указывая на то, что PI3K α и PI3K β обладают существенно важными и незаменимыми функциями, по меньшей мере, при развитии (Vanhaesebroeck, et al., 2005). В отличие от этого мыши, у которых отсутствуют PI3K γ и PI3K δ , жизнеспособны, способны к размножению и имеют нормальную продолжительность жизни, хотя у них изменена иммунная система. Дефицит PI3K γ приводит к нарушению рекрутинга макрофагов и нейтрофилов к участкам воспаления, а также нарушению активации Т-клеток (Sasaki, et al., *Science*, 2000, 287(5455):1040-6). Мыши с мутантной PI3K δ имеют специфические нарушения сигнальной системы В-клеток, которые приводят к нарушениям развития В-клеток и ослаблению ответов антител после антигенной стимуляции (Clayton, et al., *J. Exp. Med.* 2002, 196(6):753-63; Jou, et al., *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22(24):8580-91; Okkenhaug, et al., *Science*, 2002, 297(5583):1031-4).

Фенотипы мышей с мутантными PI3K γ и PI3K δ свидетельствуют, что эти ферменты могут играть роль в воспалении и других заболеваниях, связанных с иммунной системой, и это подтверждается в доклинических моделях. Мыши с мутантной PI3K γ в значительной мере защищены от заболевания в мышечных моделях ревматоидного артрита (РА) и астмы (Camps, et al., *Nat. Med.* 2005, 11(9):936-43; Thomas, et al., *Eur. J. Immunol.* 2005, 35(4):1283-91). Дополнительно было показано, что лечение мышей дикого типа селективным ингибитором PI3K γ ослабляет гломерулонефрит и улучшает выживаемость в модели системной красной волчанки (СКВ) на мышцах MRL-lpr и подавляет воспаление и повреждение суставов в моделях РА (Barber, et al., *Nat. Med.* 2005, 11(9):933-5; Camps, et al., 2005). Подобным образом, показано, что как у мышей с мутантной PI3K δ , так и у мышей дикого типа, которых лечили селективным ингибитором PI3K δ , наблюдается ослабленное аллергическое воспаление дыхательных путей и гиперреактивность на мышечной модели астмы (Ali, et al., *Nature*. 2004, 431(7011):1007-11; Lee, et al., *FASEB J.* 2006, 20(3):455-65), и наблюдается ослабленная форма заболевания в модели РА (Randis, et al., *Eur. J. Immunol.*, 2008, 38(5):1215-24).

Показано, что пролиферация В-клеток играет ключевую роль в развитии воспалительных аутоиммунных заболеваний (Puri, *Frontiers in Immunology* (2012), 3(256), 1-16; Walsh, *Kidney International* (2007) 72, 676-682). Например, В-клетки поддерживают аутореактивность Т-клеток, важный компонент воспалительных аутоиммунных заболеваний. После активации и созревания В-клетки могут перемещаться к участкам воспаления и рекрутировать клетки зоны воспаления или дифференцироваться в плазмобласты. Таким образом, на активность В-клеток можно повлиять, воздействуя на цитокины, стимулирующие В-клетки, рецепторы на поверхности В-клеток или путем подавления В-клеток. Показано, что ритуксимаб, химерное моноклональное антитело мыши/человека IgG1 κ , направленное против рецептора CD20 на поверхности В-клеток, подавляет CD20+ В-клетки. Показано, что использование ритуксимаба эффективно при лечении идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, аутоиммунной гемолитической ане-

мии или васкулита. Например, лечение ритуксимабом приводило к ремиссии заболевания у пациентов, страдающих от ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА) системного васкулита (ААСВ) с продемонстрированным подавлением В-клеток в периферической крови (Walsh, 2007; Lovric, *Nephrol Dial Transplant* (2009) 24:179-185). Аналогично, сообщалось о полном отклике у от одной трети до двух третей пациентов, страдающих от смешанного криоглобулинемического васкулита, после лечения ритуксимабом, включая пациентов, страдающих от тяжелой формы васкулита, которая устойчива к или характеризуется непереносимостью других способов лечения (Casoub, *Ann Rheum Dis* 2008; 67:283-287). Аналогично, показано, что ритуксимаб эффективен при лечении пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой (или иммунной тромбоцитопенической пурпурой) (Garvey, *British Journal of Haematology*, (2008) 141, 149-169; Godeau, *Blood* (2008), 112(4), 999-1004; Medeo, *European Journal of Haematology*, (2008) 81, 165-169) и аутоиммунной гемолитической анемией (Garvey, *British Journal of Haematology*, (2008) 141, 149-169).

Передача сигнала с помощью P13Kδ связана с выживаемостью, миграцией и активацией В-клеток (Puri, *Frontiers in Immunology*, 2012, 3(256), 1-16, at pages 1-5; и Clayton, *J. Exp. Med.*, 2002, 196(6):753-63). Например, P13Kδ необходима для зависимой от антигена активации В-клеток, запускаемой В-клеточным рецептором. Путем блокирования адгезии, выживаемости, активации и пролиферации В-клеток ингибирование P13Kδ может нарушать способность В-клеток активировать Т-клетки, предотвращая их активацию и уменьшая секрецию аутоантител и провоспалительных цитокинов. Следовательно, вследствие их способности ингибировать активацию В-клеток, ожидается, что ингибиторы P13Kδ будут лечить заболевания, опосредованные В-клетками, которые поддаются лечению подобными способами, такими как подавление В-клеток ритуксимабом. Действительно, показано, что ингибиторы P13Kδ являются эффективными в мышинных моделях различных аутоиммунных заболеваний, которые также поддаются лечению ритуксимабом, таких как артрит (Puri (2012)). Дополнительно, подобные врожденным В-клетки, которые связаны аутоиммунитетом, чувствительны к активности P13Kδ, поскольку клетки MZ и B-1 практически отсутствуют у мышей, у которых отсутствует ген p110δ (Puri (2012)). Ингибиторы P13Kδ могут уменьшать направленную миграцию и активацию клеток MZ и B-1, которые вовлечены в аутоиммунные заболевания.

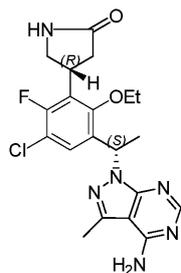
В дополнение к их возможной роли в воспалительных заболеваниях все четыре изоформы P13K класса I могут играть роль при раке. Ген, кодирующий p110α, часто мутирует при распространенных типах рака, включая рак молочной железы, предстательной железы, толстой кишки и эндометрия (Samuels, et al., *Science*, 2004, 304(5670):554; Samuels, et al., *Curr Opin Oncol*. 2006, 18(1):77-82). Восемьдесят процентов этих мутаций представлены одной из трех аминокислотных замен в спиральном или киназном доменах фермента и приводят к значительной положительной регуляции киназной активности, приводящей к онкогенной трансформации в клеточной культуре и на животных моделях (Kang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005, 102(3):802-7; Bader, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006, 103(5):1475-9). Ни одной из этих мутаций не было обнаружено в других изоформах P13K, хотя имеются факты, что они могут давать вклад в развитие и прогрессирование злокачественных новообразований. Соответствующая сверхэкспрессия P13Kδ наблюдается при остром миелобластном лейкозе (Sujobert, et al., *Blood*, 2005, 106(3):1063-6), а ингибиторы P13Kδ могут предотвращать рост лейкозных клеток (Billottet, et al., *Oncogene*. 2006, 25(50):6648-59). Повышенная сверхэкспрессия P13Kγ наблюдается при хроническом миелоидном лейкозе (Hickey, et al., *J. Biol. Chem*. 2006, 281(5):2441-50). Изменение экспрессии P13Kβ, P13Kγ и P13Kδ также наблюдается при раке мозга, толстой кишки и мочевого пузыря (Benistant, et al., *Oncogene*, 2000, 19(44):5083-90; Mizoguchi, et al., *Brain. Pathol.* 2004, 14(4):372-7; Knobbe, et al., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2005, 31(5):486-90).

Дополнительно показано, что все эти изоформы являются онкогенными в клеточной культуре (Kang, et al., 2006).

Вследствие этих причин существует необходимость в разработке новых ингибиторов P13K, которые можно использовать при воспалительных расстройствах, аутоиммунных заболеваниях и раке. Данное изобретение направлено на удовлетворение этой и других потребностей.

Краткое описание сущности изобретения

В изобретении предложена солянокислая соль соединения формулы I



I

которая является кристаллической.

В изобретении также предложены фармацевтические композиции, обладающие способностью ингибировать активность киназы PI3K δ , содержащие кристаллическую соль соляной кислоты, описанную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении дополнительно предложены способы ингибирования активности киназы PI3K, включающие приведение киназы в контакт с кристаллической солянокислой солью соединения формулы I.

В изобретении также предложены способы лечения заболевания у пациента, причем указанное заболевание связано с аномальной экспрессией или активностью киназы PI3K, включающие введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества кристаллической солянокислой соли соединения формулы I.

В изобретении также предложен способ получения кристаллической солянокислой соли соединения формулы I, включающий приведение соединения формулы I



I

в контакт с соляной кислотой с образованием взвеси; нагрев взвеси с образованием раствора; и охлаждение раствора для кристаллизации соли.

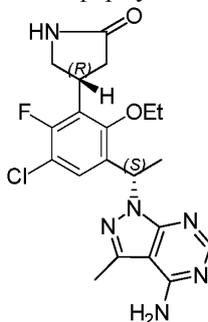
Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена термограмма ДСК, типичная для соли примера 3, на фиг. 2 - данные ТГА, типичные для соли примера 3, на фиг. 3 - дифрактограмма ПРД, типичная для соли примера 3.

Подробное описание сущности изобретения

Соль.

В изобретении предложена соль соединения формулы I



I

где Et представляет собой этил, которая является кристаллической.

Более конкретно, в изобретении предложена солянокислая соль (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пирозоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она, которая является кристаллической. В некоторых вариантах реализации изобретения соль представляет собой стехиометрическое отношение 1:1 (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пирозоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она к соляной кислоте.

Различные формы одного и того же вещества имеют различные объемные свойства, что относится,

например, к гигроскопичности, растворимости, стабильности и т.п. Формы с высокими точками плавления часто обладают хорошей термодинамической стабильностью, что полезно для продления срока хранения лекарственных составов, содержащих твердую форму. Формы с более низкими точками плавления часто менее термодинамически стабильны, но удобны тем, что обладают повышенной растворимостью в воде, что соответствует повышенной биодоступности лекарственного средства. Формы, которые являются слабо гигроскопичными, целесообразны вследствие их стабильности при нагревании и действии влаги, и они устойчивы к деградации при длительном хранении.

Солянокислая соль соединения формулы I, предложенная в данном документе, является кристаллической. При использовании в данном документе "кристаллический" или "кристаллическая форма" относится к определенной конфигурации решетки кристаллического вещества. Различные кристаллические формы одного и того же вещества, как правило, имеют различные кристаллические решетки (например, единичные ячейки), соответствующие различным физическим свойствам, которые являются характерной особенностью каждой из кристаллических форм. В некоторых случаях различные конфигурации решетки характеризуются различным содержанием воды или растворителя.

Различные солевые формы могут быть идентифицированы с помощью методов исследования твердого состояния, таких как порошковая рентгеновая дифракция (ПРД). Другие методы исследования, такие как дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), термогравиметрический анализ (ТГА), динамическая сорбция паров (ДСП) и т.п., дополнительно помогают устанавливать форму, а также помогают определять стабильность и содержание растворителя/воды.

Набор отражений ПРД (порошковая рентгеновая дифракция) (пики), как правило, считают характерным признаком конкретной кристаллической формы. Хорошо известно, что относительные интенсивности пиков ПРД могут сильно изменяться, среди прочего, в зависимости от способа получения образца, распределения кристаллов по размерам, различных используемых фильтров, способа установки образца и конкретного применяемого прибора. В некоторых случаях можно наблюдать появление новых пиков или исчезновение существующих пиков в зависимости от типа прибора или параметров. При использовании в данном документе термин "пик" относится к отражению, имеющему относительную высоту/интенсивность, составляющую по меньшей мере около 4% от максимальной высоты/интенсивности пика. Кроме того, смена оборудования и другие факторы могут повлиять на значения 2θ . Таким образом, заданные значения пиков, как, например, представленные в данном документе, могут отличаться на плюс или минус около $0,2^\circ$ (2θ), и термин "практически" или "около" при использовании в связи с ПРД в данном документе охватывает вышеуказанные колебания.

В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет по меньшей мере один пик ПРД в единицах 2θ , выбранный из около $11,3^\circ$, около $16,4^\circ$, около $21,0^\circ$, около $23,0^\circ$, около $28,1^\circ$, около $31,2^\circ$ и около $32,8^\circ$. В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет по меньшей мере два пика ПРД в единицах 2θ , выбранных из около $11,3^\circ$, около $16,4^\circ$, около $21,0^\circ$, около $23,0^\circ$, около $28,1^\circ$, около $31,2^\circ$ и около $32,8^\circ$. В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет по меньшей мере три пика ПРД в единицах 2θ , выбранных из около $11,3^\circ$, около $16,4^\circ$, около $21,0^\circ$, около $23,0^\circ$, около $28,1^\circ$, около $31,2^\circ$ и около $32,8^\circ$. В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет по меньшей мере четыре пика ПРД в единицах 2θ , выбранных из около $11,3^\circ$, около $16,4^\circ$, около $21,0^\circ$, около $23,0^\circ$, около $28,1^\circ$, около $31,2^\circ$ и около $32,8^\circ$. В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет по меньшей мере пять пиков ПРД в единицах 2θ , выбранных из около $11,3^\circ$, около $16,4^\circ$, около $21,0^\circ$, около $23,0^\circ$, около $28,1^\circ$, около $31,2^\circ$ и около $32,8^\circ$. В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет практически такую же дифрактограмму ПРД, как показано на фиг. 3.

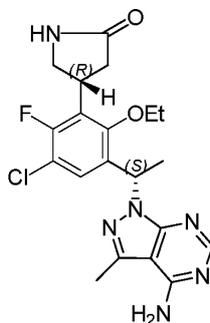
Таким же образом показания температуры в связи с ДСК, ТГА или другими термическими экспериментами могут изменяться на около $\pm 3^\circ\text{C}$ в зависимости от оборудования, конкретных параметров, пробоподготовки и т.д. Следовательно, кристаллическая форма, описанная в данном документе, имеет термограмму ДСК "практически" такую же, как показано на любой из фигур, или считают, что термин "около" компенсирует такое отличие. В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет термограмму ДСК, на которой наблюдается эндотермический пик при около 207°C . В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет термограмму ДСК практически такую же, как показано на фиг. 1. В некоторых вариантах реализации изобретения солянокислая соль соединения формулы I имеет термограмму ТГА практически такую же, как показано на фиг. 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения соль, описанная в данном документе (солянокислая соль соединения формулы I), выделена в значительной степени. Под "выделены в значительной степени" понимают, что соль, по меньшей мере частично или в значительной степени, отделена от среды, в которой оно было получено или обнаружено. Частичное отделение может включать, например, композицию, обогащенную солью, описанной в данном документе. Отделение в значительной степени может включать композиции, содержащие по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей

мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97% или по меньшей мере около 99% по массе соли, описанной в данном документе. Способы выделения солей известны в данной области техники.

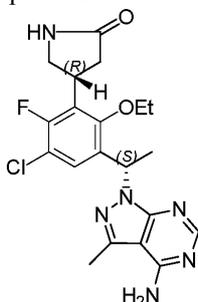
Способы.

В изобретении дополнительно предложен способ получения кристаллической соли соединения формулы I



I .

В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает приведение соединения формулы I



I

в контакт с соляной кислотой с получением указанной соли.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанная соляная кислота представляет собой 1M водный раствор соляной кислоты.

В некоторых вариантах реализации изобретения на 1 экв. соединения формулы I используют от около 3,3 до около 3,7 экв. соляной кислоты.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное приведение в контакт осуществляют при температуре от около 45 до около 55°C.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает стадии, в которых к соединению формулы I при комнатной температуре добавляют соляную кислоту с образованием взвеси;

нагревают указанную взвесь до температуры от около 45 до около 55°C с образованием раствора и охлаждают раствор до температуры от около 0 до около 5°C для кристаллизации указанной соли.

Понятно, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в различных вариантах реализации изобретения, также могут быть объединены в один вариант реализации изобретения (хотя предполагается, что варианты реализации объединены, как если бы были записаны в многозависимой форме). С другой стороны, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в одном варианте реализации изобретения, также могут быть представлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации.

Разделение рацемических смесей соли может быть проведено любым из многочисленных способов, известных в данной области техники. Иллюстративный способ включает фракционную перекристаллизацию с использованием хиральной разделяющей кислоты, которая является оптически активной солеобразующей органической кислотой. Пригодные разделяющие агенты для способов фракционной перекристаллизации представляют собой, например, оптически активные кислоты, такие как D- и L-формы винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты или различных оптически активных камфорсульфокислот, таких как β-камфорсульфокислота. Другие разделяющие агенты, пригодные для способов фракционной перекристаллизации, включают стереоизомерно чистые формы α-метилбензиламина (например, S- и R-формы или диастереомерно чистые формы), 2-фенилглицинол, норэфедрин, эфедрин, N-метилэфедрин, циклогексилэтиламин, 1,2-диаминоциклогексан и т.п.

Разделение рацемических смесей также может быть проведено элюированием на колонке, содержащей оптически активный разделяющий агент (например, динитробензоилфенилглицин). Специалист в

данной области техники может определить подходящий состав растворителей для элюирования.

Соль по данному изобретению может также содержать все изотопы атомов, которые встречаются в промежуточных или конечных солях или соединениях. Изотопы включают те атомы, которые имеют одинаковый атомный номер, но различные массовые числа. Например, изотопы водорода включают тритий и дейтерий.

В некоторых вариантах реализации изобретения соль может находиться вместе с другими веществами, такими как вода и растворители (например, гидраты и сольваты), или могут быть выделены.

В некоторых вариантах реализации изобретения соль, описанная в данном документе (солянокислая соль соединения формулы I), выделена в значительной степени. Под "выделены в значительной степени" понимают, что соль, по меньшей мере частично или в значительной степени, отделена от среды, в которой она была получена или обнаружена. Частичное отделение может включать, например, композицию, обогащенную соединениями по данному изобретению. Отделение в значительной степени может включать композиции, содержащие по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 99% по массе соединений по данному изобретению или их солей. Способы выделения соединений и их солей известны в данной области техники.

Фразу "фармацевтически приемлемый" в данном документе используют для обозначения таких соединений, веществ, композиций и/или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерно с разумным соотношением пользы/риска.

Необходимо понимать, что соль, представленная в данном документе, может быть получена с использованием известных методик органического синтеза и может быть синтезирована в соответствии с любым из различных возможных синтетических подходов. Способы, описанные в данном документе, можно контролировать в соответствии с любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, за образованием продукта можно следить с помощью спектроскопии, такой как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия или спектрофотометрия (например, УФ и видимой области); или с помощью хроматографии, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография (ТСХ), или с помощью других родственных методов.

При использовании в данном документе термин "приведение в контакт" используется так, как это известно в данной области техники и, как правило, относится к объединению химических реагентов таким образом, что обеспечивается возможность их взаимодействия на молекулярном уровне для достижения химического или физического преобразования. В некоторых вариантах реализации изобретения приведение в контакт включает два реагента, причем используют один или более эквивалентов второго реагента по сравнению с первым реагентом. Стадии реакций способов, описанных в данном документе, могут быть осуществлены в течение времени и в условиях, пригодных для получения указанного продукта.

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть осуществлены в подходящих растворителях, которые легко могут быть подобраны специалистом в области органического синтеза. Подходящими растворителями могут быть растворители, практически не реагирующие с исходными веществами (реагентами), промежуточными соединениями или продуктами при температурах проведения реакций, например при температурах, которые могут изменяться от температуры заморозки растворителя до температуры кипения растворителя. Данную реакцию можно проводить в одном растворителе или в смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции могут быть подобраны пригодные растворители для конкретной стадии реакции.

Пригодные растворители могут включать галогенированные растворители, такие как тетрагидрофуран, 1,3-диоксан, 1,4-диоксан, фуран, диэтиловый эфир, диметилловый эфир этиленгликоля, диэтиловый эфир этиленгликоля, диметилловый эфир диэтиленгликоля, диэтиловый эфир диэтиленгликоля, диметилловый эфир триэтиленгликоля, анизол, метил-трет-бутиловый эфир, их смеси и т.п.

Подходящие эфирные растворители включают: диметоксиметан, тетрагидрофуран, 1,3-диоксан, 1,4-диоксан, фуран, диэтиловый эфир, диметилловый эфир этиленгликоля, диэтиловый эфир этиленгликоля, диметилловый эфир диэтиленгликоля, диэтиловый эфир диэтиленгликоля, диметилловый эфир триэтиленгликоля, анизол, метил-трет-бутиловый эфир, их смеси и т.п.

Пригодные протонные растворители могут включать в качестве примера и без ограничения воду, метанол, этанол, 2-нитроэтанол, 2-фторэтанол, 2,2,2-трифторэтанол, этиленгликоль, 1-пропанол, 2-пропанол, 2-метоксиэтанол, 1-бутанол, 2-бутанол, изобутиловый спирт, трет-бутиловый спирт, 2-этоксиэтанол, диэтиленгликоль, 1-, 2- или 3-пентанол, неопентиловый спирт, трет-пентиловый спирт, монометиловый эфир диэтиленгликоля, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля, циклогексанол, бензиловый спирт, фенол или глицерин.

Пригодные апротонные растворители могут включать в качестве примера и без ограничения тетрагидрофуран (ТГФ), N,N-диметилформамид (ДМФА), N,N-диметилацетамид (ДМА), 1,3-диметил-3,4,5,6-

тетрагидро-2(1H)-пиримидинон (DMPU), 1,3-диметил-2-имидазолидинон (DMI), N-метилпирролидинон (NMP), формамид, N-метилацетамид, N-метилформамид, ацетонитрил, диметилсульфоксид, пропионитрил, этилформиат, метилацетат, гексахлорацетон, ацетон, метилэтилкетон, этилацетат, сульфолан, N,N-диметилпропионамид, тетраметилмочевину, нитрометан, нитробензол или гексаметилфосфорамид.

Пригодные углеводородные растворители включают бензол, циклогексан, пентан, гексан, толуол, циклогептан, метилциклогексан, гептан, этилбензол, м-, о- или п-ксилол, октан, индан, нонан или нафталин.

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть проведены при подходящих температурах, которые легко могут быть определены специалистом в данной области техники. Температуры реакции зависят, например, от температур плавления и кипения реагентов и растворителя, при его наличии; термодинамики реакции (например, для проведения бурных экзотермических реакций могут потребоваться пониженные температуры); и кинетики реакции (например, при высоком активационном энергетическом барьере могут потребоваться повышенные температуры).

Выражения "температура окружающей среды" и "комнатная температура" или "кт", при использовании в данном документе, понятны в данной области и относятся, как правило, к температуре, например температуре реакции, которая примерно равна температуре в комнате, в которой проводят реакцию, например температуре от около 20 до около 30°C.

Реакции способов, описанных в данном документе, могут быть проведены на воздухе или в инертной атмосфере. Как правило, реакции, включающие реагенты или продукты, которые в значительной степени взаимодействуют с воздухом, могут быть проведены с использованием чувствительных к воздуху синтетических приемов, хорошо известных специалистам в данной области техники.

Способы применения.

Соль по данному изобретению может модулировать активность одной или более из различных киназ, в том числе, например, фосфоинозитид-3-киназ (PI3K). Термин "модулировать" относится к способности увеличивать или уменьшать активность одного или более членов семейства PI3K. Следовательно, соль по данному изобретению можно использовать в способах модулирования PI3K путем приведения PI3K в контакт с одной или более солями, соединениями или композициями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения соль по настоящей заявке может действовать как ингибитор одной или более PI3K. В дополнительных вариантах реализации изобретения соль по данному изобретению можно использовать для модулирования активности PI3K у индивида, который нуждается в модулировании рецептора, путем введения модулирующего количества соли по данному изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения модулирование представляет собой ингибирование.

В связи с тем, что на рост и выживаемость клеток рака влияют многочисленные сигнальные пути, настоящее изобретение подходит для лечения болезненных состояний, которые характеризуются мутантами киназ, устойчивыми к лекарственным средствам. Дополнительно различные ингибиторы киназ, которые модулируют активность различных киназ, можно использовать в комбинации. Этот подход может оказаться высокоэффективным при лечении болезненных состояний путем воздействия на несколько сигнальных путей, уменьшать вероятность возникновения устойчивости к лекарственным средствам в клетке и уменьшать токсичность лечения заболевания.

Киназы, которые соль по настоящему изобретению связывает и/или модулирует (например, ингибируют), включают любого члена семейства PI3K. В некоторых вариантах реализации изобретения PI3K представляет собой PI3K α , PI3K β , PI3K δ или PI3K γ . В некоторых вариантах реализации изобретения PI3K представляет собой PI3K δ или PI3K γ . В некоторых вариантах реализации изобретения PI3K представляет собой PI3K δ . В некоторых вариантах реализации изобретения PI3K представляет собой PI3K γ . В некоторых вариантах реализации изобретения PI3K содержит мутацию. Мутация может представлять собой замену одной аминокислоты на другую или удаление одной или более аминокислот. В таких вариантах реализации изобретения мутация может присутствовать в киназном домене PI3K.

В некоторых вариантах реализации изобретения соль используют в комбинации с другим ингибитором киназы для ингибирования активности одной киназы (например, PI3K δ или PI3K γ).

В некоторых вариантах реализации изобретения соль используют в комбинации с другим ингибитором киназы для ингибирования активности более чем одной киназы (например, PI3K δ или PI3K γ), как, например, по меньшей мере двух киназ.

Соль по данному изобретению может быть селективной. "Селективный" означает, что соединение связывается с или ингибирует киназу с большей аффинностью или эффективностью, соответственно, по сравнению по меньшей мере с одной отличной киназой. В некоторых вариантах реализации изобретения соль по данному изобретению представляет собой селективный ингибитор PI3K δ или PI3K γ по сравнению с PI3K α и/или PI3K β . В некоторых вариантах реализации изобретения соль по данному изобретению представляет собой селективный ингибитор PI3K δ (например, по сравнению с PI3K α , PI3K β и PI3K γ). В некоторых вариантах реализации изобретения соль по данному изобретению представляет собой селективный ингибитор PI3K δ (например, по сравнению с PI3K α , PI3K β и PI3K γ). В некоторых ва-

риантах реализации изобретения селективность может представлять собой различие по меньшей мере в около 2 раз, 5 раз, 10 раз, по меньшей мере в около 20 раз, по меньшей мере в около 50 раз, по меньшей мере в около 100 раз, по меньшей мере в около 200 раз, по меньшей мере в около 500 раз или по меньшей мере в около 1000 раз. Селективность может быть измерена способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения селективность может быть исследована при концентрации K_m АТФ для каждого фермента. В некоторых вариантах реализации изобретения селективность соли по данному изобретению можно определить с использованием клеточных анализов, связанных с активностью конкретной киназы РІЗК.

Другой аспект настоящей заявки относится к способам лечения заболевания или расстройства, связанного с киназой (такой как РІЗК), у индивида (например, пациента) путем введения индивиду, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы соли по настоящей заявке или фармацевтической композиции на ее основе. Заболевание, связанное с РІЗК, может включать любое заболевание, расстройство или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью РІЗК, включая сверхэкспрессию и/или аномальную активность. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание может быть связано с Akt (протеинкиназа B), мишенью рапамицина в клетках млекопитающих (mTOR) или фосфоинозитидзависимой киназой 1 (PDK1). В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание, связанное с mTOR, может представлять собой воспаление, атеросклероз, псориаз, рестеноз, доброкачественную гипертрофию предстательной железы, поражения костей, панкреатит, ангиогенез, диабетическую ретинопатию, атеросклероз, артрит, иммунологические расстройства, заболевание почек или рак. Заболевание, связанное с РІЗК, может также включать любое заболевание, расстройство или патологическое состояние, которое можно предотвратить, ослабить или вылечить модулированием активности РІЗК. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание характеризуется аномальной активностью РІЗК. В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание характеризуется мутантной РІЗК. В таких вариантах реализации изобретения мутация может присутствовать в киназном домене РІЗК.

Примеры заболеваний, связанных с РІЗК, включают иммунные заболевания, в том числе системные, включая, например, ревматоидный артрит, аллергию, астму, гломерулонефрит, волчанку или воспаление, связанное с любым заболеванием из вышеперечисленных.

Дополнительные примеры заболеваний, связанных с РІЗК, включают рак, такой как рак молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, эндометрия, мозга, мочевого пузыря, кожи, матки, яичника, легкого, поджелудочной железы, почек, желудка или гемобластоз.

Дополнительные примеры заболеваний, связанных с РІЗК, включают заболевания легких, такие как острое повреждение легких (ОПЛ) и острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) у взрослых.

Дополнительные примеры РІЗК-связанных заболеваний включают остеоартрит, рестеноз, атеросклероз, поражения костей, артрит, диабетическую ретинопатию, псориаз, доброкачественную гипертрофию предстательной железы, воспаление, ангиогенез, панкреатит, заболевание почек, воспалительное заболевание кишечника, миастению гравис, рассеянный склероз или синдром Шегрена и т.п.

Дополнительные примеры заболеваний, связанных с РІЗК, включают идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), аутоиммунную гемолитическую анемию (АГА), васкулит, системную красную волчанку, волчаночный нефрит, пемфигус, мембранозную нефропатию, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), волосатоклеточный лейкоз, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому, экстранодальную лимфому из клеток маргинальной зоны, диффузную В-крупноклеточную лимфому из клеток, подобных активированным В-клеткам (АВК), или диффузную В-крупноклеточную лимфому из В-клеток зародышевого центра (ЗЦВ).

В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание выбрано из идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), аутоиммунной гемолитической анемии, васкулита, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, пемфигуса, аутоиммунной гемолитической анемии (АГА), мембранозной нефропатии, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), волосатоклеточного лейкоза, лимфомы из клеток мантийной зоны, лимфомы Беркитта, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфоплазмоцитарной лимфомы, экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфомы Ходжкина, макроглобулинемии Вальденстрема, пролимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, миелофиброза, лимфомы, возникающей из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), В-клеточной лимфомы, медиастинальной (тимической) В-крупноклеточной лимфомы, лимфогранулематоза, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, первичной выпотной лимфомы, внутрисосудистой В-крупноклеточной лимфомы, плазмноклеточного лейкоза, экстрамедуллярной плазмацитомы, тлеющей миеломы (также называемой бессимптомной миеломой), моноклональной гаммапатии неопределенного значения (МГНЗ) и В-клеточной лимфомы.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ представляет собой способ лечения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), выбранной из рецидивирующей ИТП и рефрактерной ИТП.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ представляет собой способ лечения васкулита, выбранного из болезни Бехчета, синдрома Когана, гигантоклеточного артериита, ревматической полимиалгии (РП), артериита Такаясу, болезни Бюргера (облитерирующего тромбангиита), васкулита центральной нервной системы, болезни Кавасаки, нодозного полиартериита, синдрома Чарга-Стросса, смешанного криоглобулинемического васкулита (эссенциального или вызванного вирусом гепатита С (ВГС)), пурпуры Шенлейна-Геноха (ПШГ), лейкоцитокластического васкулита, микроскопического полиангиита, гранулематоза Вегенера и ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА) системного васкулита (ААСВ).

В некоторых вариантах реализации изобретения способ представляет собой способ лечения неходжкинской лимфомы (НХЛ), выбранной из рецидивирующей НХЛ, рефрактерной НХЛ и вторичной фолликулярной НХЛ.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ представляет собой способ лечения В-клеточной лимфомы, причем указанная В-клеточная лимфома представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ).

В некоторых вариантах реализации изобретения способ представляет собой способ лечения В-клеточной лимфомы, причем указанная В-клеточная лимфома представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому из клеток, подобных активированным В-клеткам (АВК), или диффузную В-крупноклеточную лимфому из В-клеток зародышевого центра (ЗЦВ).

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное заболевание представляет собой остеоартрит, рестеноз, атеросклероз, поражения костей, артрит, диабетическую ретинопатию, псориаз, доброкачественную гипертрофию предстательной железы, воспаление, ангиогенез, панкреатит, заболевание почек, воспалительное заболевание кишечника, миастению гравис, рассеянный склероз или синдром Шегрена.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, аллергию, астму, гломерулонефрит, волчанку или воспаление, связанное с любым заболеванием из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанная волчанка представляет собой системную красную волчанку или волчаночный нефрит.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное заболевание представляет собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак мозга, рак мочевого пузыря, рак кожи, рак матки, рак яичника, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак почки, рак желудка или гемобластоз.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный гемобластоз представляет собой острый миелобластный лейкоз или хронический миелоидный лейкоз.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанный гемобластоз представляет собой В-клеточные лимфолейкозы, в том числе индолентную/агрессивную В-клеточную неходжкинскую лимфому (НХЛ) и лимфому Ходжкина (ХЛ).

В некоторых вариантах реализации изобретения указанное заболевание представляет собой острое повреждение легких (ОПЛ) или острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) у взрослых.

При использовании в данном документе термин "приведение в контакт" относится к объединению указанных фрагментов в системе *in vitro* или в системе *in vivo*. Например, "приведение в контакт" РІЗК с соединением по данному изобретению включает введение соли по настоящей заявке индивиду или пациенту, такому как человек, имеющему РІЗК, а также, например, введение соли по данному изобретению в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, содержащий РІЗК.

При использовании в данном документе термины "индивид" или "пациент", используемые взаимозаменяемо, относятся к любому животному, в том числе млекопитающим, предпочтительно мышам, крысам, другим грызунам, кроликам, собакам, котам, свиньям, крупному рогатому скоту, овцам, лошадям или приматам и наиболее предпочтительно людям.

При использовании в данном документе фраза "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного соединения или фармацевтического агента, которое вызывает биологический или медицинский отклик в ткани, системе, животном, индивиде или человеке, необходимый исследователю, ветеринару, врачу или другому клиницисту. В некоторых вариантах реализации изобретения дозировка соли, вводимая пациенту или индивиду, составляет от около 1 мг до около 2 г, от около 1 до около 1000 мг, от около 1 до около 500 мг, от около 1 до около 100 мг, от около 1 до 50 мг или от около 50 до около 500 мг.

При использовании в данном документе термин "лечить" или "лечение" относится к одному или более из (1) предупреждения заболевания; например предупреждения заболевания, патологического состояния или расстройства у индивида, который может быть предрасположен к заболеванию, патологическому состоянию или расстройству, но еще не ощущает или не демонстрирует патологии или симптоматики заболевания; (2) ингибирования заболевания; например ингибирования заболевания, патологического состояния или расстройства у индивида, который ощущает или демонстрирует патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или расстройства (т.е. остановка дальнейше-

го развития патологии и/или симптоматологии); и (3) ослабления заболевания; например ослабления заболевания, патологического состояния или расстройства у индивида, который ощущает или демонстрирует патологию или симптоматологию заболевания, патологического состояния или расстройства (т.е. реверсия патологии и/или симптоматологии), такого как уменьшение тяжести заболевания.

Фармацевтические составы и лекарственные формы.

Когда соль по данному изобретению используется как фармацевтический препарат, ее можно вводить в форме фармацевтических композиций. Эти композиции можно получить при помощи способов, хорошо известных в области фармации, и их можно вводить различными способами в зависимости от того, необходимо местное или системное лечение, и от области, подвергаемой лечению. Введение может быть местным (в том числе трансдермальным, эпидермальным, через глаз и слизистые оболочки, включая интраназальную, вагинальную и ректальную доставку), пульмональным (например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в частности, с помощью распылителя; интратрахеальным или интраназальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутривнутрибрюшинную, внутримышечную инъекцию или инфузию; или интракраниальное, например интракраниальное или интравентрикулярное, введение. Парентеральное введение можно выполнять в форме единичной болюсной дозы или, например, непрерывно с помощью перфузионного насоса. Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Необходимыми или желательными могут быть традиционные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т.п.

Данное изобретение также включает фармацевтические композиции, которые содержат в качестве активного ингредиента соль по данному изобретению (а именно, солянокислую соль соединения формулы I) в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями (вспомогательными веществами). В некоторых вариантах реализации изобретения композиция пригодна для местного введения. Для приготовления композиций по данному изобретению активный ингредиент, как правило, смешивают со вспомогательным веществом, разбавляют вспомогательным веществом или включают в носитель в форме, например, капсулы, саше, бумажного пакета или другого контейнера. Когда вспомогательное вещество служит разбавителем, оно может быть твердым, полутвердым или жидким веществом, которое служит наполнителем, носителем или средой для активного ингредиента. Таким образом, композиции могут быть в форме таблеток, драже, порошков, пастилок, саше, крахмальных капсул, настоев, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей (твердых или в жидкой среде), мазей, содержащих, например, до 10 мас.% активного соединения, мягких и твердых желатиновых капсул, суппозиториев, стерильных инъекционных растворов и стерильных упакованных порошков.

Для получения состава соль можно размалывать, чтобы обеспечить подходящий размер частиц, до объединения с другими ингредиентами. Если соль практически нерастворима, ее можно размалывать до получения частиц размером менее 200 меш. Если соль хорошо растворяется в воде, размер частиц можно регулировать размалыванием, чтобы обеспечить практически однородное распределение в составе, например, около 40 меш.

Соль по данному изобретению можно размалывать, используя известные способы помола, такие как мокрый помол, для получения частиц с размером, подходящим для формирования таблеток и для составов другого типа. Тонкоизмельченные (в форме наночастиц) препараты соли по данному изобретению можно получать с использованием способов, известных в данной области техники, см., например, международную заявку № WO 2002/000196.

Некоторые примеры подходящих вспомогательных веществ включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, патоку и метилцеллюлозу. Составы также могут дополнительно содержать смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; смачивающие агенты; эмульгирующие и суспендирующие агенты; консерванты, такие как метил- и пропилгидроксibenзоат; подсластители; и ароматизаторы. Композиции по данному изобретению могут быть разработаны так, что будут обеспечивать быстрое, замедленное или отсроченное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту с использованием способов, известных в данной области техники.

Композиции могут быть разработаны в виде единичной лекарственной формы, причем каждая доза содержит от около 5 до около 1000 мг (1 г), обычно от около 100 до около 500 мг активного ингредиента. Термин "единичные лекарственные формы" относится к физически дискретным объектам, пригодным в качестве разовых дозировок для людей и других млекопитающих, причем каждая единичная доза содержит заранее заданное количество активного вещества, рассчитанное так, чтобы оно производило желаемый терапевтический эффект, в сочетании с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению содержат от около 5 до около 50 мг активного ингредиента. Специалист в данной области техники должен понимать, что это охватывает композиции, содержащие от около 5 до около 10, от около 10 до около 15, от около

15 до около 20, от около 20 до около 25, от около 25 до около 30, от около 30 до около 35, от около 35 до около 40, от около 40 до около 45 или от около 45 до около 50 мг активного ингредиента.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению содержат около 2,5, около 5, около 7,5, около 10, около 12,5, около 15, около 17,5, около 20, около 22,5 или около 25 мг активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению содержат около 5 мг активного ингредиента. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции по данному изобретению содержат около 10 мг активного ингредиента.

Аналогичные дозировки можно использовать для соли, описанной в данном документе, в способах и вариантах применения изобретения.

Соль может быть эффективна в широком интервале дозировок, и ее, как правило, вводят в фармацевтически эффективном количестве. Однако понятно, что количество соли, которое фактически вводится, обычно определяется врачом в соответствии с имеющимися обстоятельствами, в том числе патологическим состоянием, которое подвергают лечению, выбранным путем введения, конкретной водимой солью, возрастом, массой и откликом конкретного пациента, тяжестью симптомов пациента и т.п.

Для получения твердых композиций, таких как таблетки, главный активный ингредиент смешивают с фармацевтическим вспомогательным веществом, чтобы получить твердую композицию предварительного состава, содержащую гомогенную смесь соли по настоящей заявке. Когда указывают, что эти композиции предварительных составов гомогенные, то понимают, что активный ингредиент, как правило, диспергирован равномерно по всей композиции, так что ее легко можно разделить на равноэффективные единичные лекарственные формы, такие как таблетки, драже и капсулы. Этот твердый предварительный состав затем разделяют на единичные лекарственные формы представленных выше типов, содержащие, например, от около 0,1 до около 1000 мг активного ингредиента по настоящей заявке.

Таблетки или драже по настоящей заявке могут быть покрыты или модифицированы другим способом для получения лекарственной формы, обладающей преимуществом пролонгированного действия. Например, таблетка или драже может содержать внутренний компонент дозировки и внешний компонент дозировки, причем последний в форме оболочки для первого. Два компонента могут разделяться энтеросолюбильным слоем, который препятствует разложению в желудке и позволяет внутреннему компоненту в неизменном виде попасть в двенадцатиперстную кишку или высвободиться отсрочено. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий можно использовать различные вещества, такие вещества включают ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими веществами, как шеллак, цетиловый спирт или ацетилцеллюлоза.

Жидкие формы, в состав которых могут быть включены соль и композиции по настоящей заявке, для перорального введения или введения путем инъекции включают водные растворы, подходящим образом ароматизированные сиропы, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии с пищевыми маслами, такими как хлопковое масло, сезамовое масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также настои и подобные фармацевтические носители.

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, описанные выше. В некоторых вариантах реализации изобретения композиции вводят перорально или в дыхательные пути через нос для местного или системного эффекта. Композиции можно распылять, используя инертные газы. Распыленные растворы можно вдыхать непосредственно из устройства для распыления, или устройство для распыления можно присоединить к маске для лица, кислородной палатке или дыхательному аппарату с перемежающимся положительным давлением. Растворы, суспензии или порошковые композиции можно вводить перорально или через нос, используя устройства, которые доставляют состав соответствующим образом.

Составы для местного применения могут содержать один или более традиционных носителей. В некоторых вариантах реализации изобретения мази могут содержать воду и один или более гидрофобных носителей, выбранных, например, из жидкого парафина, алкилового эфира полиоксиэтилена, пропиленгликоля, белого вазелина и т.п. Носители для композиций кремов могут быть на основе воды в сочетании с глицерином и одним или более другими компонентами, например глицерилмоностеаратом, ПЭГ-глицерилмоностеаратом и цетилстеариловым спиртом. Гели можно приготовить, используя изопропиловый спирт и воду в комбинации с другими подходящими компонентами, такими как, например, глицерин, гидроксипропилцеллюлоза и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения составы для местного применения содержат по меньшей мере около 0,1, по меньшей мере около 0,25, по меньшей мере около 0,5, по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2 или по меньшей мере около 5 мас.% соли по данному изобретению. Составы для местного применения могут быть упакованы в подходящие тубики, вместимостью, например, 100 г, которые необязательно могут содержать инструкцию для лечения выбранного симптома, например псориаза или другого патологического состояния кожи.

Количество соли или композиции, вводимое пациенту, будет изменяться в зависимости от того, что вводится, цели введения, как, например, профилактика или терапия, состояния пациента, способа введения и т.п. Для терапевтических целей композиции можно вводить пациенту, уже страдающему от забо-

лечения, в количестве, достаточном для лечения или, по меньшей мере частичного, ослабления симптомов заболевания или его осложнений. Эффективные дозы будут зависеть от патологического состояния, подвергаемого лечению, а также от заключения лечащего врача, исходя из таких факторов, как тяжесть заболевания, возраст, масса и общее состояние пациента и т.п.

Композиции, вводимые пациенту, могут быть в форме фармацевтических композиций, описанных выше. Эти композиции можно стерилизовать, используя традиционные способы стерилизации или используя стерилизующее фильтрование. Водные растворы можно упаковывать для применения в неизменном виде или лиофилизировать, причем лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным носителем до введения. Значения pH препаратов с соединениями, как правило, должны составлять от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 и наиболее предпочтительно от 7 до 8. Понятно, что использование некоторых из вышеупомянутых вспомогательных веществ, носителей или стабилизаторов будет приводить к образованию фармацевтически приемлемых солей.

Терапевтическая дозировка соли по настоящему изобретению может изменяться, например, в соответствии с конкретной целью, для которой осуществляется лечение, способом введения соли, состоянием здоровья и патологическим состоянием пациента и заключением лечащего врача. Доля или концентрация соли по данному изобретению в фармацевтической композиции может изменяться в зависимости от ряда факторов, в том числе дозировки, химических характеристик (например, гидрофобности) и способа введения. Например, соль по данному изобретению может находиться в водном физиологическом буферном растворе, содержащем от около 0,1 до около 10% (масса к объему) соли, для парентерального введения. Некоторые типичные дозы находятся в интервалах от около 1 мкг/кг до около 1 г/кг массы тела в сутки. В некоторых вариантах реализации изобретения доза находится в интервале от около 0,01 до около 100 мг/кг массы тела в сутки. Дозировка может зависеть от таких факторов, как тип и степень прогрессирования заболевания или расстройства, общее состояние здоровья конкретного пациента, относительная биологическая эффективность выбранного соединения, состав вспомогательных веществ и способ введения. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости "доза-ответ", полученных *in vitro*, или из тестовых модельных систем на животных.

Изобретение будет более подробно описано на конкретных примерах. Следующие примеры служат для иллюстративных целей, и никоим образом не предназначены для ограничения данного изобретения. Специалисты в данной области техники легко найдут множество некритичных параметров, которые можно изменить или модифицировать, чтобы получить точно такие же результаты. Установлено, что солянокислая соль соединения формулы I и соединение формулы I являются ингибиторами Р1ЗК в соответствии по меньшей мере с одним анализом, описанным в данном документе.

Примеры

Изобретение будет более подробно описано на конкретных примерах. Следующие примеры служат для иллюстративных целей и никоим образом не предназначены для ограничения данного изобретения. Соединения примеров или их соли, содержащие один или более хиральных центров, были получены в рацемической форме или в виде смесей изомеров, если не указано иное.

Общие методики.

Очистку некоторых полученных соединений с помощью препаративной ЖХ/МС выполняли на системах фракционирования Waters с масс-спектрометрическим детектором. Основное оборудование, протоколы и управляющее программное обеспечение для эксплуатации этих систем подробно описаны в литературе. См., например, "Two-Pump At Column Dilution Configuration for Preparative LC-MS", K. Blom, J. Combi. Chem., 4, 295 (2002); "Optimizing Preparative LC-MS Configurations and Methods for Parallel Synthesis Purification", K. Blom, R. Sparks, J. Doughty, G. Everlof, T. Haque, A. Combs, J. Combi. Chem., 5, 670 (2003); и "Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Combi. Chem., 6, 874-883 (2004). Выделенные соединения, как правило, подвергали анализу с использованием аналитической жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ЖХ/МС) для определения чистоты при следующих условиях: прибор; Agilent серии 1100, ЖХ/МСД, колонка: Waters Sunfire™ C₁₈ 5 мкм, 2,1×50 мм, буферные растворы: подвижная фаза А: 0,025% ТФУ в воде, и подвижная фаза В: ацетонитрил; градиент от 2 до 80% В за 3 мин со скоростью потока 2,0 мл/мин.

Некоторые полученные соединения также разделяли в препаративном масштабе с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектором или флэш-хроматографии (силикагель), как указано в примерах. Типичные условия препаративной колоночной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) представлены ниже.

Очистка при pH 2: колонка Waters Sunfire™ C₁₈ 5 мкм, 19×100 мм, элюирование подвижной фазой А: 0,1% ТФУ (трифторуксусной кислоты) в воде, и подвижная фаза В: ацетонитрил; скорость потока составляла 30 мл/мин, разделяющий градиент оптимизировали для каждого соединения с использованием протокола оптимизации методики, специфичной к соединению, как описано в литературе [см. "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A.

Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)]. Как правило, скорость потока, используемая для колонки 30×100 мм, составляла 60 мл/мин.

Очистка при pH 10: колонка Waters XBridge C₁₈ 5 мкм, 19×100 мм, элюирование подвижной фазой А: 0,15% NH₄OH в воде, и подвижная фаза В: ацетонитрил; скорость потока составляла 30 мл/мин, разделяющий градиент оптимизировали для каждого соединения с использованием протокола оптимизации методики, специфичной к соединению, как описано в литературе [см. "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)]. Как правило, скорость потока, используемая для колонки 30×100 мм, составляла 60 мл/мин.

Некоторые из полученных соединений также анализировали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Типичные параметры оборудования для ДСК являются следующими:

прибор для дифференциальной сканирующей калориметрии TA Instrument, модель Q200 с автоматическим пробоотборником: 30-350°C при 10°C/мин; алюминиевый тигель для образцов с крышкой Т-зег; поток газообразного азота со скоростью 50 мл/мин,

прибор для дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) 822 производства Mettler Toledo: 40-340°C со скоростью нагрева 10°C/мин.

Некоторые из полученных соединений также анализировали с помощью термогравиметрического анализа (ТГА). Типичные параметры оборудования для ТГА являются следующими:

термогравиметрический анализатор TA Instrument, модель Pyris: диапазон температур от 25 до 300°C при 10°C/мин; поток газообразного азота для продувки со скоростью 60 мл/мин; керамический тигель для образцов для ТГА,

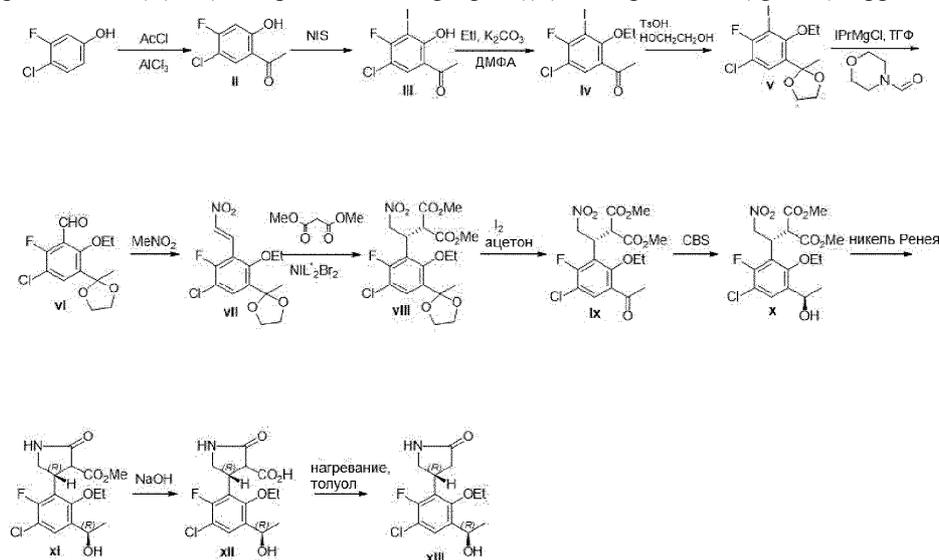
прибор TA Instruments Q500: диапазон температур от 20 до 300°C при 10°C/мин.

Некоторые из полученных соединений также анализировали с использованием порошковой рентгеновской дифракции (ПРД). Типичные параметры оборудования для ПРД являются следующими:

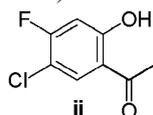
порошковый рентгеновский дифрактометр Bruker D2 PHASER: длина волны рентгеновского излучения: 1,05406 Å CuKAl; мощность рентгеновского излучения: 30 кВ, 10 мА; порошкообразный образец: диспергирован в держателе для образца с нулевым фоном; общие условия измерений: начальный угол 5°, предельный угол 60°, шаг 0,015°, скорость сканирования 2°/мин.

Порошковый дифрактометр Rigaku Miniflex: Cu при 1,054056 Å с κβ-фильтром; общие условия измерений: начальный угол 3°, предельный угол 45°, шаг 0,02°, скорость сканирования 2°/мин.

Пример 1. Синтез (R)-4-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)пирролидин-2-она



Стадия 1. 1-(5-Хлор-4-фтор-2-гидроксифенил)этанон (ii)

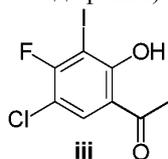


В колбу вместимостью 5 л при комнатной температуре помещали 4-хлор-3-фторфенол (i, 166 г, 1,11 моль) и ацетилхлорид (107 мл, 1,50 моль). Реакционную смесь перемешивали, и она превращалась в прозрачный раствор, в то время как было зарегистрировано, что температура смеси уменьшилась до 6°C. Затем реакционную смесь нагревали до 60°C в течение 2 ч. К реакционной смеси добавляли нитробензол (187,5 мл, 1,82 моль), а затем охлаждали до комнатной температуры. Затем к смеси добавляли хлорид алюминия (160 г, 1,2 ммоль) тремя порциями (50 г, 50 г и 60 г с интервалами 5 мин). После завершения добавления температура смеси увеличилась до 78°C. Затем реакционную смесь нагревали при 100-120°C

в течение 3 ч, в этот момент ВЭЖХ-анализ показал, что реакция завершена. Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли смесь изомеров гексана (0,45 л), этилацетат (0,55 л), а затем медленно при комнатной температуре добавляли 1,0н. водный раствор соляной кислоты (1,0 л). Добавление водного раствора соляной кислоты было экзотермическим, и температура смеси увеличилась с 26 до 60°C. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Слои разделяли и органический слой последовательно промывали 1,0н. водным раствором соляной кислоты (2×600 мл) и водой (400 мл). Затем органический слой экстрагировали 1,0н. водным раствором гидроксида натрия (2×1,4 л). Объединенный основной раствор подкисляли до pH 2 путем добавления 12н. водного раствора соляной кислоты до того, пока не прекращал образовываться осадок. Полученное твердое вещество отделяли фильтрованием, промывали водой и сушили на фильтр-воронке под вакуумом, что давало соединение ii) в виде желтого твердого вещества (187,4 г, 89,5%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 12,44 (д, J=1,4 Гц, 1H), 7,78 (д, J=8,1 Гц, 1H), 6,77 (д, J=10,2 Гц, 1H), 2,61 (с, 3H).

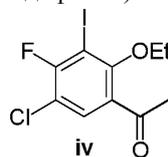
Стадия 2. 1-(5-Хлор-4-фтор-2-гидрокси-3-йодофенил)этанон (iii)



1-(5-Хлор-4-фтор-2-гидроксифенил)этанон (ii, 100,0 г, 530,3 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (302 мл) и к раствору добавляли N-йодсукцинимид (179,2 г, 796,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при от около 61 до около 71°C в течение 2 ч, в этот момент ВЭЖХ-анализ показал, что реакция завершена. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли воду (613 мл) и полученную взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Продукт собирали с помощью фильтрования и промывали водой, чтобы получить коричневое твердое вещество. Влажный продукт растворяли в уксусной кислоте (400 мл) при 60°C. К раствору добавляли (в течение 15 мин.) воду (800 мл) для осаждения чистого продукта. Продукт собирали с помощью фильтрования и промывали водой (100 мл). Продукт сушили на фильтр-воронке под вакуумом в течение 18 ч, что давало соединение iii) в виде коричневого твердого вещества (164,8 г, выход 95,0%).

¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆) δ 13,34 (с, 1H), 8,26 (д, J=8,4 Гц, 1H), 2,68 (с, 3H).

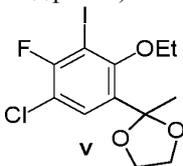
Стадия 3. 1-(5-Хлор-2-этокси-4-фтор-3-йодофенил)этанон (iv)



В трехгорлой круглодонной колбе вместимостью 5 л, оснащенной холодильником и термометром, 1-(5-хлор-4-фтор-2-гидрокси-3-йодофенил)этанон (iii, 280 г, 840 ммоль) растворяли в N,N-диметилформамиде (600 мл). В процессе растворения внутренняя температура упала с 19,3 до 17,0°C. К полученной смеси добавляли йодэтан (81,2 мл, 1020 ммоль). Затем к реакционной смеси добавляли карбонат калия (234 г, 1690 ммоль) в течение 2 мин, в температуре смеси не наблюдали никаких изменений. Реакционную смесь нагревали до 60°C в течение 3 ч, в этот момент ВЭЖХ-анализ показал, что реакция завершена. Реакционной смеси давали охладиться до комнатной температуры и продукт собирали с помощью фильтрования. Твердые вещества растворяли в смеси ДХМ (1,0 л), гексана (500 мл) и воды (2,1 л). Двухфазную систему перемешивали при 20°C в течение 20 мин. Слои разделяли и водный слой экстрагировали ДХМ (1,0 л). Объединенный органический слой промывали водой (2×250 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (60 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме досуха, что давало соединение iv в виде желтого твердого вещества (292 г, выход 94%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,69 (д, J=8,4 Гц, 1H), 3,95 (к, J=7,0 Гц, 2H), 2,62 (с, 3H), 1,49 (т, J=7,0 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₀H₁₀ClFIO₂ (M+H)⁺: m/z=342,9.

Стадия 4. 2-(5-Хлор-2-этокси-4-фтор-3-йодфенил)-2-метил-1,3-диоксолан (v)



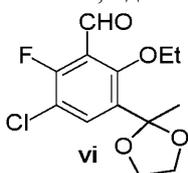
Раствор 1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-йодфенил)этанона (iv, 250,0 г, 693,4 ммоль) и 1,2-этандиола (58,0 мл, 1040 ммоль) в толуоле (1,5 л) обрабатывали моногидратом п-толуолсульфоновой кислоты (10,6 г, 55,5 ммоль). На реакционную колбу устанавливали ловушку Дина-Старка и смесь нагревали с обрат-

ным холодильником в течение 7 ч. ЖХ/МС-анализ показал, что реакционная смесь содержала 8,3% исходного вещества и 91,7% продукта. Реакционную смесь охлаждали до 106°C и с помощью шприца добавляли дополнительное количество 1,2-этандиола (11,6 мл, 208 ммоль). Затем реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение еще 8 ч. ЖХ/МС-анализ показал, что реакционная смесь содержала 3,6% исходного вещества и 96,4% продукта. Реакционную смесь охлаждали до 106°C и с помощью шприца добавляли дополнительное количество 1,2-этандиола (7,73 мл, 139 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение еще 15,5 ч. ЖХ/МС-анализ показал, что реакционная смесь содержала 2,2% исходного вещества и 97,8% продукта.

Затем реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли воду (200 мл) и водный насыщенный раствор NaHCO_3 (300 мл), чтобы довести pH смеси до 9. Добавляли ДХМ (200 мл) и смесь перемешивали в течение 10 мин. Слои разделяли и водный слой экстрагировали толуолом (300 мл). Объединенный органический слой последовательно промывали смесью воды (200 мл) и насыщенного водного раствора NaHCO_3 (200 мл), водой (300 мл), насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме досуха, чтобы получить неочищенное соединение *v* в виде светло-коричневого твердого вещества (268 г, выход 100%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,59 (д, $J=8,6$ Гц, 1H), 4,26-3,96 (м, 4H), 3,92-3,72 (м, 2H), 1,74 (с, 3H), 1,50 (т, $J=7,0$ Гц, 3H). ЖХ/МС для $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{ClFIO}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z=387,0$.

Стадия 5. 3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)бензальдегид (*vi*)



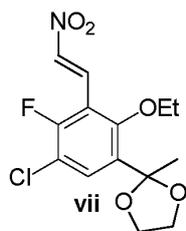
К раствору 2-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-йодфенил)-2-метил-1,3-диоксолана (*v*, 135,0 г, 349,2 ммоль) (чистота, определенная с помощью ВЭЖХ, 86,8% с 5,5% кетона) в безводном тетрагидрофуране (300 мл) при от около 0 до около 3°C при перемешивании медленно добавляли комплекс изопропилмагнийхлорида и хлорида лития в ТГФ с концентрацией 1,3М (322,3 мл, 419,0 ммоль) в течение 1 ч.

Реакционную смесь перемешивали при от около 0 до около 5°C в течение 30 мин, в этот момент ВЭЖХ-анализ показал, что реакция замещения йода на магний завершена. Затем к реакционной смеси добавляли N-формилморфолин (71,1 мл, 700 ммоль) в течение 1 ч при от около 0 до около 8°C. Реакционную смесь перемешивали при от около 0 до около 8°C в течение еще 1 ч, в этот момент ЖХ/МС- и ВЭЖХ-анализ показали, что исходное вещество было израсходовано, и наблюдалось значительное количество побочного продукта дейодирования, 2-(5-хлор-2-этокси-4-фторфенил)-2-метил-1,3-диоксолана. Реакцию гасили водным раствором лимонной кислоты (120,8 г, 628,6 ммоль) в воде (1,20 л) при 0°C. Погашенную реакционную смесь затем экстрагировали EtOAc (2×600 мл). Фазы легко разделяли. Объединенный органический слой последовательно промывали водой (300 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (500 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле с использованием 0-10% EtOAc /гексан, что давало неочищенный продукт (*vi*) в виде бледно-желтого твердого вещества, которое представляло собой смесь, содержащую необходимый продукт, 3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)бензальдегид (*vi*, 80 г, 80%), и 36 мол. % побочного продукта дейодирования, 2-(5-хлор-2-этокси-4-фторфенил)-2-метил-1,3-диоксолана, что установлено с помощью ЯМР-анализа. Неочищенный продукт (*vi*) дополнительно очищали путем образования соответствующего аддукта с гидросульфитом натрия.

Гидросульфит натрия (36,91 г, 354,7 ммоль) растворяли в воде (74,3 мл, 4121 ммоль). К раствору неочищенного 3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)бензальдегида (*vi*, 80,00 г, 177,3 ммоль) в этилацетате (256,0 мл) при перемешивании одной порцией добавляли свежеприготовленный раствор гидросульфита натрия. Раствор перемешивали в течение около 10 мин и наблюдали образование осадка. Взвесь затем перемешивали в течение еще 1 ч. Аддукт альдегида с гидросульфитом собирали с помощью фильтрования, промывали EtOAc и сушили под вакуумом и в атмосфере азота в течение 20 ч, что давало белое твердое вещество (58,2 г, выход 83,6%). К аддукту альдегида с гидросульфитом (58,2 г, 148 ммоль), который перемешивали в 1,0М водном растворе гидроксида натрия (296 мл, 296 ммоль), добавляли метил-трет-бутиловый эфир (600 мл) (МТБЭ). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 мин, что давало прозрачную двухфазную смесь, и перемешивание продолжали в течение еще 5 мин. Органическую фазу собирали, а водный слой экстрагировали МТБЭ (2×300 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (300 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме досуха, что давало чистое соединение (*vi*) в виде белого кристаллического вещества (31,4 г, выход 73,4%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 10,27 (с, 1H), 7,78 (д, $J=8,5$ Гц, 1H), 4,10-3,96 (м, 4H), 3,87-3,76 (м, 2H), 1,72 (с, 3H), 1,44 (т, $J=7,0$ Гц, 3H). ЖХ/МС для $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{ClFO}_4$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z=289,0$.

Стадия 6. (E)-2-(5-Хлор-2-этокси-4-фтор-3-(2-нитровинил)фенил)-2-метил-1,3-диоксолан (*vii*)



В четырехгорлую круглодонную колбу вместимостью 5 л, оснащенную верхнеприводной мешалкой, мембраной, термопарой, отверстием для подвода азота и холодильником, помещали 3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)бензальдегид (vi, 566,2 г, 1961 ммоль), нитрометан (1060 мл, 19600 ммоль) и ледяную уксусную кислоту (1120 мл). Затем к реакционной смеси добавляли бензиламин (53,6 мл, 490 ммоль) и полученную смесь нагревали до 60°C, за реакцией следили с помощью ЖХ/МС в течение 5,5 ч. Первоначальный анализ исходного уровня выполняли при t=0. Реакцию контролировали через 2 ч и 5 ч. Через 2 ч осталось около 20% непрореагировавшего исходного альдегида. Через 5 ч профиль реакции был следующим: исходное соединение vi (<2%), промежуточный имин (<4%), полученное соединение vii (>93%) и аддукт Михаэля бензиламина (не обнаружен). Через 5,5 ч реакцию считали завершённой. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли этилацетатом (3,0 л). Для обработки смесь разделяли пополам вследствие большого задействованного объема.

Каждую половину обрабатывали в соответствии со следующей методикой. Вначале реакционную смесь промывали 1,5М раствором NaCl в воде (2×1500 мл; после каждого промывания выходной объем водного раствора увеличивался по сравнению с вводимым, что указывало на удаление уксусной кислоты и/или нитрометана). Затем смесь охлаждали до около 15°C и промывали 4М водным раствором NaOH (4×300 мл) до того, пока водный экстракт не достиг pH 8-9. При первоначальных промываниях водный слой оставался кислотным, но по мере того, как водный слой становился немного основным при последующих промываниях, смесь нагревалась и экстракт становился темным. Слои разделяли. Затем органический слой после корректировки pH промывали 1,5М раствором хлорида натрия в воде (1000 мл) и водой (500 мл). В процессе этих заключительных промываний наблюдали образование эмульсии и медленное разделение. Органическую фазу сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученную янтарную вязкую жидкость помещали под высокий вакуум на ночь. Вязкая жидкость затвердевала, было получено 740 г неочищенного продукта.

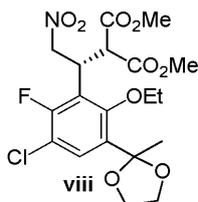
К неочищенному продукту добавляли гептан (1,3 л), получая взвесь, которую нагревали на водяной бане с температурой 60°C, пока не растворились все твердые вещества. Полученный раствор фильтровали на мелкопористом фильтре в чистую четырехгорлую круглодонную колбу вместимостью 3 л, оснащенную верхнеприводной мешалкой и отверстием для подвода азота. Фильтр промывали гептаном (40 мл). Отфильтрованный раствор охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 5 ч. Наблюдало образование осадка и взвесь охлаждали до 0°C на ледяной бане в течение 1 ч. Продукт собирали с помощью фильтрования и полученный влажный осадок на фильтре промывали 500 мл ледяного гептана. Продукт частично сушили на фильтре под вакуумом и дополнительно сушили под высоким вакуумом в течение ночи. Фильтрат и промывной раствор концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток подвергали очистке на колонке.

Твердые вещества, полученные при кристаллизации в гептане, растворяли в небольшом объеме ДХМ и 20% EtOAc/гексан и вводили в колонку, содержащую около 1 кг силикагеля. Колонку элюировали смесью 20% EtOAc/гексан. Необходимые фракции объединяли и концентрировали при пониженном давлении, что давало желтое твердое вещество. Твердое вещество сушили под высоким вакуумом в течение ночи, что давало 497 г продукта (vii) в виде бледно-желтого кристаллического вещества.

Концентрированный фильтрат и промывную жидкость от кристаллизации в гептане загружали в ту же самую колонку с использованием 20% EtOAc/гексан. Колонку элюировали с использованием той же системы растворителей для удаления исходных примесей и остаточной уксусной кислоты. Необходимые фракции объединяли и концентрировали при пониженном давлении, что давало красновато-янтарное масло. Масло помещали под высокий вакуум и получали около 220 г неочищенного продукта. Этот неочищенный продукт растворяли в гептане (500 мл) и затравливали небольшим количеством первой порции твердого продукта. Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, а затем охлаждали на ледяной бане в течение 3 ч. Вторую порцию продукта собирали с помощью фильтрования. Продукт сушили под высоким вакуумом и получали 110 г продукта в виде желтого твердого вещества. Общее количество продукта (vii) составило 607 г (выход 93,3%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 7,94 (с, 2H), 7,68 (д, J=8,9 Гц, 1H), 4,07-3,95 (м, 4H), 3,82-3,73 (м, 2H), 1,65 (с, 3H), 1,39 (т, J=7,0 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₄H₁₆ClFNO₅ (M+H)⁺: m/z=332,0.

Стадия 7. (R)-Диметил-2-(1-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)фенил)-2-нитроэтил)малонат (viii)

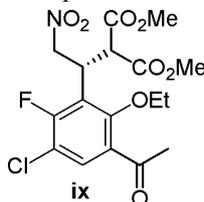


В круглодонную колбу вместимостью 2 л с магнитной мешалкой и отверстием для подвода азота, содержащую (E)-2-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-(2-нитровинил)фенил)-2-метил-1,3-диоксолан (vii, 352,8 г, 1064 ммоль), добавляли безводный тетрагидрофуран (1,06 л) и диметилмалонат (146 мл, 1280 ммоль). К реакционной смеси добавляли (1S,2S)-N,N'-дибензилциклогексан-1,2-диаминдихлорникель (катализатор Эванса, 21,4 г, 26,6 ммоль). Реакционная смесь становилась коричневого цвета и наблюдалось образование гомогенного раствора. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18,5 ч. Через 18,5 ч реакционную смесь анализировали с помощью ВЭЖХ. Непрореагировавшее исходное вещество, соединение (vii), присутствовало в количестве 2%. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления ТГФ и полученный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (для загрузки использовали ДХМ/смесь изомеров гексана, для этой колонки использовали 1422 г силикагеля, и колонку элюировали смесью 10%-20% EtOAc/гексан; за фракциями из колонки наблюдали с помощью ТСХ, используя 30% EtOAc/гексан в качестве элюента и визуализировали с помощью УФ). Необходимые фракции объединяли и концентрировали при пониженном давлении. Остаток сушили под высоким вакуумом. Со временем вязкая жидкость превращалась в светло-желтые твердые вещества (503,3 г), отбирали образец для хирального ВЭЖХ-анализа. Хиральная чистота составляла 95,7% требуемого (R)-энантиомера и 4,3% нежелательного (S)-энантиомера. К твердым веществам добавляли этанол (1,0 л) и смесь нагревали на водяной бане с температурой 60°C, пока не растворились все твердые вещества. Раствор фильтровали на мелкопористом фильтре с использованием фильтровальной бумаги № 1 Whatman в чистую четырехгорлую круглодонную колбу вместимостью 3 л. Отфильтрованный раствор охлаждали до комнатной температуры при перемешивании. После 30 мин перемешивания наблюдали образование кристаллов и взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Взвесь охлаждали на ледяной бане в течение 1 ч. Продукт собирали с помощью фильтрования и полученный осадок на фильтре промывали ледяным этанолом (500 мл) и частично сушили на фильтре. Твердые вещества сушили под высоким вакуумом, что давало требуемый продукт (viii) (377,5 г) в виде белых кристаллических веществ. Хиральная чистота, определенная с помощью хиральной ВЭЖХ, составляла 100% требуемого (R)-энантиомера и 0% нежелательного (S)-энантиомера.

Фильтрат и промывную жидкость объединяли и концентрировали при пониженном давлении, получая масло (118,9 г). Масло растворяли в этаноле (475,0 мл) (4 мл/г) и затравливали первой порцией кристаллов. Полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, а затем охлаждали на ледяной бане в течение 5,5 ч. Вторую порцию продукта выделяли с помощью фильтрования и частично сушили на фильтре. Ее сушили под высоким вакуумом, что давало вторую порцию продукта (31,0 г). Хиральная чистота, определенная с помощью хиральной ВЭЖХ, составляла 98,3% требуемого (R)-энантиомера и 1,7% нежелательного (S)-энантиомера. Объединенный выход первой и второй порций продукта составлял 408,5 г (выход 82,8%).

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 7,51 (д, J=9,0 Гц, 1H), 5,20-4,81 (м, 2H), 4,62 (м, 1H), 4,14-4,03 (м, 2H), 4,03-3,97 (м, 2H), 3,95-3,88 (м, 1H), 3,84-3,72 (м, 2H), 3,70 (с, 3H), 3,38 (с, 3H), 1,61 (с, 3H), 1,39 (т, J=6,9 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₉H₂₄ClFO₉ (M+H)⁺: m/z=463,9.

Стадия 8. (R)-Диметил-2-(1-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)фенил)-2-нитроэтил)малонат (ix)

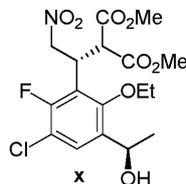


К раствору (R)-диметил-2-(1-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)фенил)-2-нитроэтил)малоната (viii, 244,0 г, 526,0 ммоль) в ацетоне (1,2 л) в трехгорлой круглодонной колбе вместимостью 5 л, оснащенной механической мешалкой, при перемешивании добавляли йод (13,4 г, 52,6 ммоль) при комнатной температуре. Полученный коричневый раствор нагревали при 50°C на водяной бане в течение 30 мин, в этот момент ЖХ/МС-анализ показал завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, а затем гасили раствором тиосульфата натрия (17,0 г, 108 ммоль) в воде (160 мл), что давало бледно-желтый прозрачный раствор. В этот момент в погашенный раствор добавляли дополнительное количество воды (1,2 л) и полученную белую взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем твердое вещество собирали с помощью фильтрования и повторно растворяли в ацетоне (1,4 л) при 40°C. Раствор охлаждали до комнатной температуры, а затем добав-

ляли дополнительное количество воды (1,4 л). Полученную белую взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Твердое вещество собирали с помощью фильтрования и промывали водой (3×100 мл). Твердый продукт сушили на фильтр-воронке под вакуумом в потоке азота в течение 46 ч, что давало соединение ix) в виде белого твердого вещества (212 г, выход 96%).

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,54 (д, J=8,6 Гц, 1H), 5,09-4,67 (м, 3H), 4,10-3,83 (м, 3H), 3,90 (с, 3H), 3,57 (с, 3H), 2,57 (с, 3H), 1,46 (т, J=7,0 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₇H₂₀ClFNO₈ (M+H)⁺: m/z=420,1.

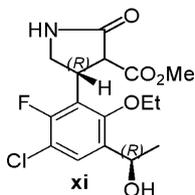
Стадия 9. Диметил-2-((R)-1-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)-2-нитроэтил)малонат (x)



К раствору (3aS)-1-метил-3,3-дифенилтетрагидро-3H-пирроло[1,2-c][1,3,2]оксаборола, ((S)-MeCBS, 16,39 г, 59,12 ммоль, 0,1 экв.) в безводном ТГФ (100 мл) в круглодонной колбе вместимостью 5 л при перемешивании при комнатной температуре добавляли 1,0M раствор комплекса боран-ТГФ в ТГФ (591 мл, 591 ммоль, 1 экв.), а затем эфират трифторида бора (3,75 мл, 29,6 ммоль, 0,05 экв.). Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем по каплям с помощью капельной воронки в течение 60 мин добавляли раствор диметил-[(1R)-1-(3-ацетил-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)-2-нитроэтил]малоната (ix, 253,0 г, 591,2 ммоль) в безводном ТГФ (1,7 л). Колбу, которая содержала кетон ix), промывали безводным ТГФ (135 мл) и раствор по каплям добавляли с помощью капельной воронки к реакционной смеси. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение еще 10 мин, в этот момент ЖХ/МС-анализ показал полное превращение кетона в спирт. Реакционную смесь гасили путем добавления по каплям метанола (71,8 мл, 1770 ммоль) при 0°C. Погашенную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин до того, как ее концентрировали под вакуумом, что давало неочищенный продукт. Неочищенные продукты из этой загрузки и аналогичной загрузки (с использованием 200 г исходного вещества) объединяли и очищали с помощью хроматографии на колонке из силикагеля с использованием 0-5% MeOH/ДХМ в качестве элюента, что давало соединение x) в виде белого твердого вещества (437 г, выход 97,9%).

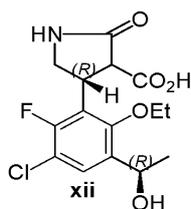
¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,50 (д, J=8,8 Гц, 1H), 5,13 (к, J=6,3 Гц, 1H), 5,01-4,65 (м, 3H), 4,14-3,89 (м, 3H), 3,79 (с, 3H), 3,57 (с, 3H), 1,57-1,42 (м, 6H). ЖХ/МС для C₁₇H₂₁ClFNO₈NaO₈ (M+Na)⁺: m/z=444,0.

Стадия 10. (4R)-Метил-4-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)-2-оксопирролин-3-карбоксилат (xi)



3-Горлую круглодонную колбу Моргана, содержащую диметил-((1R)-1-{3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-[(1R)-1-гидроксиэтил]фенил}-2-нитроэтил)малонат (x, 100,0 г, 237,1 ммоль) в тетрагидрофуране (800,0 мл) и никель Ренея (120 г после удаления воды с помощью пипетки), оснащали холодильником, механической мешалкой (стеклянный стержень для перемешивания и тефлоновая опора) и двумя шарами, заполненными газообразным водородом (продувка после вакуумирования). Колбу помещали на масляную баню при 65°C. Смесь энергично перемешивали в течение 16 ч, а шары периодически снимали и снова наполняли водородом. Отбирали образец и анализировали с помощью ВЭЖХ. Продукт, соединение xi), присутствовал в количестве 83%. В реакционной смеси присутствовало 7,8% не замкнутого в цикл амина и 5,5% гидроксилamina в качестве побочных продуктов. Катализатор отфильтровывали (необходимо следить за тем, никель Ренея не высыхал и не подвергался воздействию воздуха). Фильтрат испаряли досуха, что давало 91 г неочищенного продукта в виде белой пены. Неочищенный продукт (91 г, чистота 82,6% по площади) объединяли с такой же порцией неочищенного продукта (93 г, чистота 72,8%) для очистки. Объединенный неочищенный продукт (184 г) очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан в качестве элюента), что давало соединение xi) (101,1 г, чистота, определенная с помощью ВЭЖХ, 93%, выход неочищенного продукта 59,3%). Неочищенное вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС для C₁₆H₂₀ClFNO₅ (M+H)⁺: m/z=360,0.

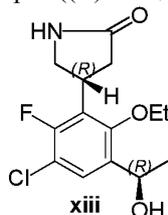
Стадия 11. (4R)-4-(3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)-2-оксопирролин-3-карбоновая кислота (xii)



В четырехгорлую круглодонную колбу вместимостью 5 л, оснащенную верхнеприводной мешалкой и отверстием для подвода азота, помещали раствор (4R)-метил-4-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)-2-оксопирролидин-3-карбоксилат (xi), 268 г, 581 ммоль) в тетрагидрофуране (2150 мл, 26500 ммоль). К раствору добавляли 1,0М раствор гидроксида натрия в воде (1420 мл, 1420 ммоль). Полученный мутный раствор становился прозрачным в течение 1 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь анализировали с помощью ЖХ/МС через 15 ч, и реакцию считали завершенной, поскольку не наблюдалось исходного вещества. Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане до внутренней температуры 9,5°C и смесь подкисляли до pH 1-2 путем добавления 6,0М водного раствора соляной кислоты (237,0 мл, 1422 ммоль) с помощью капельной воронки в течение 30 мин. Реакционную смесь разделяли пополам и каждую половину экстрагировали этилацетатом (2×1 л). Объединенные водные слои дополнительно экстрагировали этилацетатом (500 мл). Два органических слоя промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (20 мас.% NaCl/ вода, 2×1000 мл), сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали, что давало неочищенную промежуточную кислоту xii) в виде желтоватой пены, которую использовали непосредственно на следующей стадии реакции.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 12,68 (ш. с, 1H), 8,26 (с, 1H), 7,52 (д, J=8,0 Гц, 1H), 5,27 (ш. с, 1H), 4,90 (к, J=6,3 Гц, 1H), 4,28 (к, J=8,8 Гц, 1H), 3,92-3,81 (м, 1H), 3,76-3,65 (м, 1H), 3,57 (т, J=9,6 Гц, 1H), 3,46 (д, J=9,4 Гц, 1H), 3,23 (к, J=9,5 Гц, 1H), 1,33 (т, J=6,9 Гц, 3H), 1,28 (д, J=6,4 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₅H₁₇ClFNNaO₅ (M+Na)⁺: m/z=368,0.

Стадия 12. (R)-4-(3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)пирролидин-2-он (xiii)



Неочищенное соединение xii) растворяли в 1,4-диоксане (976 мл) и толуоле (976 мл) и полученный желтый раствор нагревали при 100°C. По мере протекания реакции цвет раствора становился коричневым. Образцы отбирали в моменты времени: 1ч, 2 ч и 2,5 ч. Через 2,5 ч ВЭЖХ-анализ показал, что кислота, соединение 12, присутствовала в количестве 0,38%, а требуемый продукт, соединение xiii), в количестве 78,8%. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали на мелкопористом фильтре в чистую круглодонную колбу вместимостью 3 л. Затем раствор концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток помещали под высокий вакуум, что давало коричневую пену (254 г).

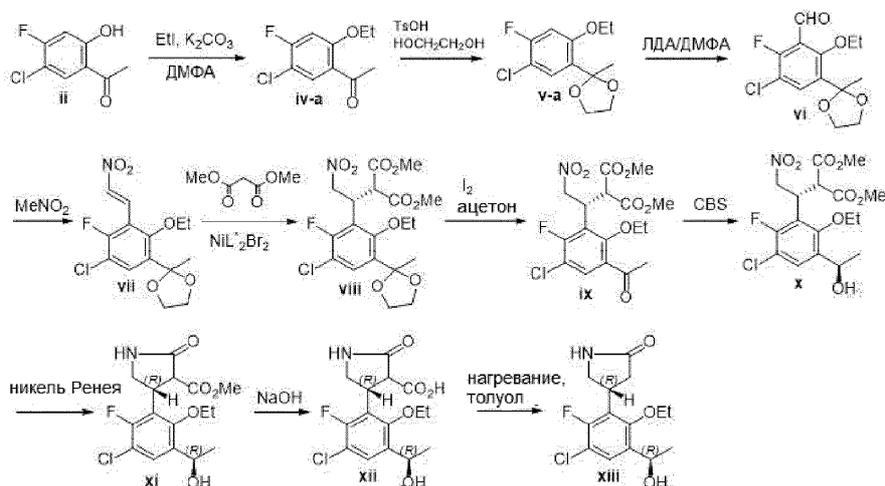
К коричневой вязкой жидкости добавляли ацетонитрил (350 мл) и нагревали на водяной бане при 65°C до растворения. Раствор охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Твердые вещества отделяли от раствора. Полученную взвесь охлаждали на ледяной бане в течение 1 ч. Продукт собирали с помощью фильтрации и полученный осадок на фильтре промывали 400 мл ледяного ацетонитрила. Твердые вещества, по-видимому, гигроскопичны. Твердое вещество растворяли в ДХМ (2,0 л) и концентрировали до вязкой жидкости, которую помещали под высокий вакуум, что давало соединение xiii) в виде белой пены (106,4 г).

Фильтрат концентрировали до темной вязкой жидкости (около 120 г), которую очищали с помощью флэш-хроматографии (колонки из силикагеля 4×330 г, вводили с использованием ДХМ, элюировали смесью от 50 до 100% EtOAc/гексан, контролировали с помощью ТСХ с использованием 100% EtOAc в качестве элюента). Фракции, полученные при хроматографировании, концентрировали при пониженном давлении и помещали под высокий вакуум, что давало светло-коричневую пену (54,4 г). К пене добавляли МТБЭ (400 мл) и MeOH (10 мл) и нагревали на водяной бане при 56°C в течение 15 мин, осталось некоторое количество твердых веществ. Взвесь охлаждали до комнатной температуры при перемешивании. Взвесь фильтровали для удаления нерастворимых веществ. Фильтрат концентрировали до вязкой жидкости и помещали под высокий вакуум, что давало пену. К пене добавляли ацетонитрил (72 мл, 1,5 мл/г) и нагревали на водяной бане при 60°C, пока раствор не становился гомогенным. Раствор охлаждали до комнатной температуры при перемешивании, твердые вещества осаждались из раствора, и он становился очень густым. Добавляли дополнительное количество ацетонитрила (24 мл) так, чтобы разбавление со-

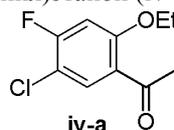
ставляло 2 мл/г. Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, а затем охлаждали на ледяной бане в течение 1 ч. Продукт собирали с помощью фильтрования и промывали ацетонитрилом. Соединение xiii) (25 г) получали в виде второй порции. Всего было получено 131,4 г соединения xiii) с выходом 74,9% из соединения xi).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,83 (с, 1H), 7,47 (д, $J=8,7$ Гц, 1H), 5,24 (д, $J=4,5$ Гц, 1H), 4,96-4,85 (м, 1H), 4,08-3,92 (м, 1H), 3,80 (кв, $J=6,9, 3,5$ Гц, 2H), 3,61-3,51 (м, 1H), 3,25 (т, $J=9,1$ Гц, 1H), 2,61-2,50 (м, 1H), 2,35-2,26 (м, 1H), 1,33 (т, $J=7,0$ Гц, 3H), 1,27 (д, $J=6,4$ Гц, 3H). ЖХ/МС для $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClFNO}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z=302,0$.

Пример 2. Альтернативный синтез (R)-4-(3-хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)пирролидин-2-она



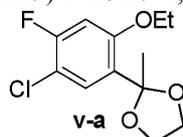
Стадия 1. 1-(5-Хлор-2-этокси-4-фторфенил)этанон (iv-a)



1-(5-Хлор-4-фтор-2-гидроксифенил)этанон (соединение ii из примера 1, стадия 1, 1350 г, 7160 ммоль), N,N -диметилформамид (3,32 л), йодэтан (1340 г, 8590 ммоль) и карбонат калия (1980 г, 14300 ммоль) смешивали вместе и перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Температура смеси повысилась с 22 до 55°C. Реакционную смесь нагревали до 60°C в течение 1 ч (температура смеси достигла 67°C через 30 мин, а затем упала до 60°C). ВЭЖХ-анализ показал, что было израсходовано все исходное вещество. Одной порцией добавляли воду (10 л) (взбалтывание прекратится, если воду добавлять порциями). Полученную взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Продукт собирали с помощью фильтрования и промывали водой (3 л). Продукт сушили на фильтре под вакуумом в течение 5 дней, что давало соединение iv-a в виде желтовато-коричневого твердого вещества (1418 г).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,69 (д, $J=8,9$ Гц, 1H), 7,30 (д, $J=11,6$ Гц, 1H), 4,15 (к, $J=7,0$ Гц, 2H), 2,51 (с, 3H), 1,37 (т, $J=7,0$ Гц, 3H).

Стадия 2. 2-(5-Хлор-2-этокси-4-фторфенил)-2-метил-1,3-диоксолан (v-a)



Раствор 1-(5-хлор-2-этокси-4-фторфенил)этанона (iv-a, 1481,0 г, 6836,3 ммоль) растворяли в толуоле (6 л). К раствору добавляли 1,2-этандиол (953 мл, 17100 ммоль) и моногидрат p -толуолсульфоновой кислоты (104 г, 547 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником при 104-110°C в течение 17,4 ч с использованием ловушки Дина-Старка для удаления воды. ВЭЖХ-анализ показал, что осталось 37% непрореагировавшего исходного вещества. Отгоняли около 600 мл дистиллята и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение еще 5 ч (всего 22 ч). ВЭЖХ-анализ показал, что реакция более не протекала.

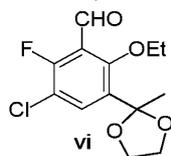
Предположили, что остаточное количество K_2CO_3 в исходном соединении iv-a может останавливать реакцию. Поэтому реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и промывали 1н. водным раствором соляной кислоты (3×6,66 л). После промывания водным раствором кислоты органический слой переносили назад в реакционный сосуд. Добавляли 1,2-этандиол (381 мл, 6840 ммоль) и моногидрат p -толуолсульфоновой кислоты (104 г, 547 ммоль) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником.

ником в течение 16 ч. ВЭЖХ-анализ показал, что осталось около 20% непрореагировавшего исходного вещества. Отгоняли около 100 мл дистиллята. Добавляли 1,2-этанediол (380 мл, 6800 ммоль) и кипятили с обратным холодильником в течение 6 ч (всего 22 ч). ВЭЖХ показала, что осталось 7% непрореагировавшего исходного вещества. Отгоняли около 125 мл дистиллята. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 6 ч (всего 28 ч). ВЭЖХ показала, что осталось 5,4% непрореагировавшего исходного вещества. Отгоняли около 125 мл дистиллята. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение еще 7 ч. ВЭЖХ-анализ показал, что осталось 3,5% непрореагировавшего исходного вещества. Отгоняли около 80 мл дистиллята. В этот момент времени реакцию считали завершённой.

Реакционную смесь промывали 1н. водным раствором хлорида натрия (2×5,5 л). Первый основной промывной раствор экстрагировали толуолом (2,1 л). Объединенный толуольный раствор промывали водой (7 л) и концентрировали, что давало 2153 г темного масла. ВЭЖХ-анализ показал, что чистота продукта составляла 93,8% с 1,90% исходного вещества и 0,79% продукта дейодирования. ¹H ЯМР-анализ показал, что в продукте осталось около 0,5 экв. толуола (около 256 г). Скорректированный выход соединения v-a составлял 88,0%.

¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,51 (д, J=8,8 Гц, 1H), 6,70 (д, J=11,0 Гц, 1H), 4,17-3,92 (м, 4H), 3,91-3,80 (м, 2H), 1,75 (с, 3H), 1,46 (т, J=7,0 Гц, 3H).

Стадия 3. 3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-(2-метил-1,3-диоксолан-2-ил)бензальдегид (vi)



В высушенную в печи четырехгорлую круглодонную колбу вместимостью 3 л, оснащённую верхнеприводной мешалкой, капельной воронкой вместимостью 500 мл, отверстием для подвода азота, мембраной и термопарой, помещали N,N-диизопропиламин (87,8 мл, 626 ммоль) и безводный тетрагидрофуран (1090 мл, 13500 ммоль). Этот раствор охлаждали до -72°C и к нему добавляли 2,5М н-бутиллития в смеси изомеров гексана (261 мл, 652 ммоль). Раствор н-бутиллития добавляли в течение 18 мин. Максимальная внутренняя температура в процессе добавления составляла -65°. Баню, содержащую сухой лёд и ацетон, заменяли на баню, содержащую лёд и воду, и реакционную смесь нагревали до от около -5 до около 0°C и выдерживали в течение 15 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до -74,5°C.

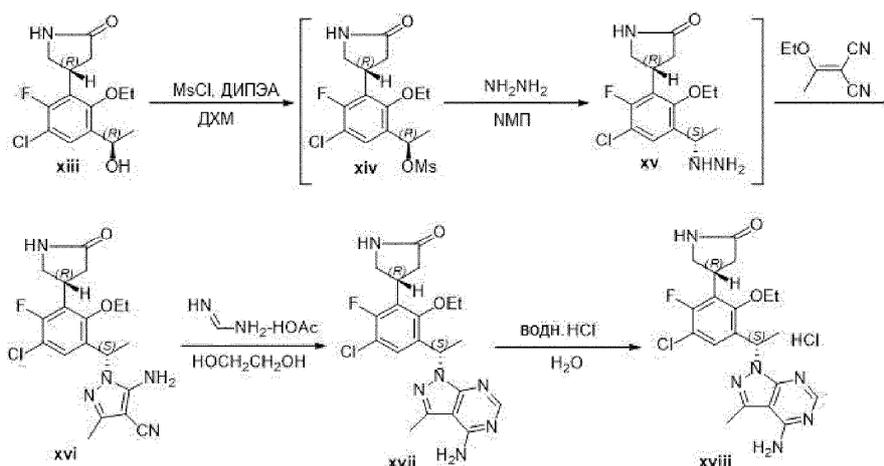
В отдельную круглодонную колбу вместимостью 1 л, содержащую 2-(5-хлор-2-этокси-4-фторфенил)-2-метил-1,3-диоксолан (v-a, 136,1 г, 522,1 ммоль), добавляли безводный тетрагидрофуран (456 мл) для растворения твердых веществ. Полученный раствор охлаждали на ледяной бане до около 0°C. Раствор, содержащий соединение v-a, переносили в раствор ЛДА (диизопропиламида лития) в течение 40 мин с помощью иглы, при этом поддерживая температуру реакции между -70 и -72,5°C. Реакционная смесь становилась желтой взвесью, и ее перемешивали в течение 37 мин при -74°C. Одной порцией с помощью шприца добавляли N,N-диметилформамид (60,6 мл, 783 ммоль), это добавление приводило к выделению тепла и повышению температуры от -74,5 до -66,5°C. Реакцию контролировали с помощью ВЭЖХ через 90 мин после добавления. Исходное вещество присутствовало в количестве 2,9%. Охлаждающую баню убирали и реакционную смесь нагревали до температуры окружающей среды. Через 3 ч отбирали образец реакционной смеси и его анализировали, непрореагировавшее исходное вещество присутствовало в количестве 1,5%. Реакцию считали завершённой и гасили путем добавления реакционного раствора в ледяную воду (1,4 л), разбавляли этилацетатом (1,5 л). Водный слой экстрагировали этилацетатом (1,5 л), а органические слои объединяли и промывали насыщенным раствором хлорида натрия (20 мас.% водн. NaCl, 2×600 мл) и сушили над безводным MgSO₄. MgSO₄ удаляли фильтрованием и фильтрат концентрировали до масла, в котором присутствовало некоторое количество твердых веществ. Остаток растворяли в метилхлориде и вносили в слой силикагеля (586 г). Слой силикагеля элюировали смесью 2% EtOAc/ДХМ (следали с помощью ТСХ с использованием 100% ДХМ в качестве элюента). Необходимые фракции объединяли и концентрировали при пониженном давлении, что давало светло-янтарное масло. Масло помещали под высокий вакуум, что давало соединение vi в виде желтого твердого вещества (146,5 г, выход 95,1%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,27 (с, 1H), 7,78 (д, J=8,5 Гц, 1H), 4,10-3,96 (м, 4H), 3,87-3,76 (м, 2H), 1,72 (с, 3H), 1,44 (т, J=7,0 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₃H₁₅ClFO₄ (M+H)⁺: m/z=289,1.

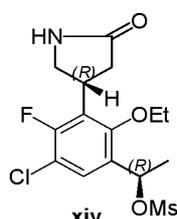
Стадии 4-10. (R)-4-(3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)пирролидин-2-он (xiii).

Целевое соединение получали с использованием методик, аналогичных описанным в примере 1, стадии 6-12.

Пример 3. (R)-4-(3-((S)-1-(4-Амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она гидрохлорид

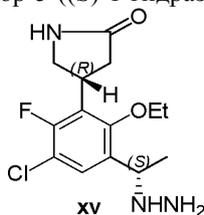


Стадия 1. (R)-1-(5-Хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этилметансульфонат (xiv)



(R)-4-(3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-((R)-1-гидроксиэтил)фенил)пирролидин-2-он (**xiii**, 172,0 г, 570,0 ммоль) (состоит из 147 г, 99,83%: хиральная чистота 0,09%, химическая чистота 99,33%; и 25 г, 87,46%: хиральная чистота 12,54%, химическая чистота 86,74%) растворяли в метилхлориде (860 мл). К раствору добавляли *N,N*-диизопропилэтиламин (149 мл, 855 ммоль) при температуре от около -7 до около 2°C . К реакционной смеси в течение 25 мин по каплям добавляли метансульфонилхлорид (57,4 мл, 741 ммоль). Суспензия превращалась в прозрачный раствор. Через 30 мин протекания реакции ВЭЖХ показала завершение реакции. Реакционную смесь, содержащую соединение **xiv**, использовали непосредственно на следующей стадии.

Стадия 2. (R)-4-(3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-((S)-1-гидразинилэтил)фенил)пирролидин-2-он (**xv**)

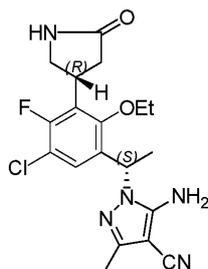


При 0°C одной порцией добавляли гидразин (178,9 мл, 5,7 моль), а затем *N*-метилпирролидинон (860 мл) к реакционной смеси, содержащей соединение **xiv** из стадии 1. Реакционная смесь становилась мутной, и образовывалось некоторое количество осадка. Смесь нагревали до $40-57^\circ\text{C}$ в атмосфере азота в течение 90 мин. ВЭЖХ показала, что весь мезилат был израсходован.

Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли насыщенный раствор гидрокарбоната натрия (28,3 г) в воде (300 мл). Смесь перемешивали в течение 20 мин, после чего добавляли дихлорметан (300 мл). Органический слой отделяли и перемешивали с раствором гидрокарбоната натрия (14,2 г) в воде (150 мл). Водный слой экстрагировали дихлорметаном (200 мл \times 2). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (80 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 (311 г), концентрировали и перегоняли в виде азеотропной смеси с толуолом (250 мл), что давало бесцветный раствор, содержащий соединение **xv** в *N*-метилпирролидиноне, который использовали непосредственно для следующей реакции. Образец очищали для ЯМР-анализа.

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6), δ 7,88 (с, 1H), 7,66 (д, $J=8,5$ Гц, 1H), 4,42 (к, $J=6,7$ Гц, 1H), 4,06-3,88 (м, 2H), 3,79-3,66 (м, 1H), 3,65-3,51 (м, 1H), 3,24 (т, $J=8,8$ Гц, 1H), 2,60-2,46 (м, 1H), 2,36-2,25 (м, 1H), 1,37 (т, $J=6,9$ Гц, 3H), 1,26 (д, $J=6,8$ Гц, 3H). ЖХ/МС для $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClFN}_3\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z=316,1$.

Стадия 3. 5-Амино-1-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)-3-метил-1H-пиразол-4-карбонитрил (**xvi**)



xvi

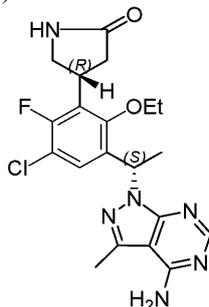
При перемешивании к раствору соединения xv из стадии 2 в N-метилпирролидине порциями добавляли (1-этоксиэтилиден)малонитрил (101 г, 741 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота. Через 15 мин ВЭЖХ-анализ показал 11% исходного гидразина, соединения xv относительно продукта, соединения xvi. Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (15 мл, 86 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. ВЭЖХ-анализ показал, что осталось 5,6% непрореагировавшего исходного вещества. Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (5 мл, 30 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч. ВЭЖХ показала, что осталось 5,6% исходного вещества. Реакционную смесь перемешивали в течение 2,5 дней и объединяли с двумя подобными порциями, обрабатывали вместе.

Объединяли реакционные смеси трех порций соединения xvi. Добавляли 0,5М водный раствор гидроксида натрия (3,8 л) при 10-20°C и перемешивали в течение 5 мин. ВЭЖХ показала, что было израсходовано все исходное вещество, (1-этоксиэтилиден)малонитрил. Добавляли этилацетат (4,0 л) и смесь перемешивали в течение 15 мин. Слои разделяли. Органический слой промывали 0,5М раствором гидроксида натрия в воде (2,38 л). Слои разделяли. Объединенный органический слой экстрагировали этилацетатом (2×2 л). Объединенные органические слои промывали 1,0М водным раствором соляной кислоты (3,56 л), и значение pH полученного водного слоя составляло 2-3. Органический слой промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия (5 л), сушили над безводным Na₂SO₄, концентрировали и сушили под высоким вакуумом в течение 40 ч, что давало соединение xvi в виде светло-коричневого пенищегося твердого вещества (702,7 г).

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,78 (с, 1H), 7,44 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,53 (с, 2H), 5,64 (к, J=6,7 Гц, 1H), 3,96 (м, 1H), 3,74 (м, 1H), 3,34 (м, 1H), 3,58 (м, 2H), 2,59-2,50 (м, 1H), 2,29 (м, 1H), 2,04 (с, 3H), 1,57 (д, J=6, 8 Гц, 3H), 1,37 (т, J=6,9 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₉H₂₂ClFN₅O₂ (M+H)⁺: m/z=406,1.

Рассчитано, что общий выход соединения xvi за три стадии (мезилирование, гидразинолиз и образование пиразола), составлял 72,8% от общего вводимого количества соединения xiii. Чистота, определенная с помощью ВЭЖХ, составляла около 80%. ВЭЖХ-анализ указал на продукт, находящийся в основном водном слое, который последовательно экстрагировали EtOAc (2 л), промывали 1,0М водным раствором соляной кислоты и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным сульфатом натрия, концентрировали и сушили с помощью высоковакуумного насоса в течение 40 ч, чтобы получить соединение xvi в виде коричневого масла (134 г, 13,9%).

Стадия 4. (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-он (xvii)



xvii

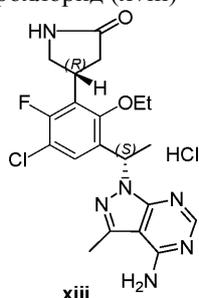
В реакционный сосуд с формамида ацетатом (1802 г, 17,31 моль) и 1,2-этандиолом (3,51 л) добавляли 5-амино-1-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)-3-метил-1Н-пиразол-4-карбонитрил (xvi, 702,7 г, 1731 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 102-103°C при перемешивании в течение 18 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли этилацетат (7 л) и воду (6 л), двухфазную смесь перемешивали в течение 15 мин. Органический слой отделяли и водный слой разбавляли дополнительным количеством воды (4,5 л) и этилацетата (3 л), перемешивали в течение 10 мин. Органический слой отделяли. Водный слой дополнительно экстрагировали этилацетатом (2 л). Органические слои объединяли и смешивали с водой (4,5 л). Водный слой отделяли и органический слой фильтровали через слой целита (около 1 кг). Органический слой экстрагировали 1,0М

водным раствором соляной кислоты (7 л) путем перемешивания смеси в течение 10 мин. Водный слой отделяли. Прозрачный коричневый органический слой перемешивали с дополнительным количеством 1,0М водного раствора соляной кислоты (3 л) в течение 10 мин. Водный слой отделяли. Водные кислые слои объединяли и промывали толуолом (500 мл). Водный кислый раствор охлаждали на бане со льдом и водой и добавляли метилхлорид (4 л). Медленно добавляли раствор гидроксида натрия (530 г) в воде (530 мл) (50%-й раствор NaOH) при 5-15°C, пока значение pH раствора не составило 11-12. Наблюдалось образование осадка. Добавляли дополнительное количество метилхлорида (3,5 л) и метанола (300 мл) и смесь перемешивали в течение 10-15 мин. Твердый продукт собирали фильтрованием и сушили на фильтре под вакуумом в течение 16 ч, что давало соединение xvii (289,7 г) в виде коричневого твердого вещества.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,11 (с, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,52 (д, J=8,5 Гц, 1H), 7,30 (ш. с, 2H), 6,23 (к, J=7,0 Гц, 1H), 3,97 (п, J=9,2 Гц, 1H), 3,90-3,73 (м, 2H), 3,57 (т, J=9,9 Гц, 1H), 3,25 (дд, J=9,2, 8,7 Гц, 1H), 2,48 (с, 3H), 2,60-2,50 (м, 1H), 2,36-2,20 (м, 1H), 1,69 (д, J=7,1 Гц, 3H), 1,39 (т, J=6,9 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₂₀H₂₃ClFN₆O₂ (M+H)⁺: m/z=433,3.

Фильтрат переносили в делительную воронку и органический слой отделяли. Водный слой перемешивали с метилхлоридом (5 л) и метанолом (200 мл). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, концентрировали, сушили с использованием высоковакуумного насоса в течение 16 ч, что давало дополнительное количество 259,3 г в виде коричневого твердого вещества. Общий выход xvii составил 548,3 г (выход 73,2%).

Стадия 5. (R)-4-(3-((S)-1-(4-Амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она гидрохлорид (xviii)



1,0М водный раствор соляной кислоты (HCl, 5,0 л, 5,0 моль) добавляли к (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-ону (xvii, 609,8 г, 1,409 моль) при комнатной температуре. Затем полученную густую суспензию нагревали до 50°C, чтобы получить прозрачный раствор. К прозрачному раствору при 50°C дополнительно добавляли 1,82 л 1,0М водного раствора соляной кислоты (HCl, 1,82 л, 1,82 моль; всего 6,82 л, 6,82 моль, 4,84 экв.), а затем раствор фильтровали через мелкопористый фильтр при приблизительно 50°C. Отфильтрованную на мелкопористом фильтре реакционную смесь постепенно охлаждали до комнатной температуры в течение 2 ч, прежде чем ее дополнительно охлаждали до 0-5°C. Реакционную смесь перемешивали при 0-5°C в течение по меньшей мере 20 мин для инициирования образования осадка. Полученные твердые вещества собирали фильтрованием, промывали порцией холодного маточного раствора, затем 1,0М водным раствором соляной кислоты (HCl, 200 мл) и сушили на фильтр-воронке при комнатной температуре под вакуумом до постоянной массы (в течение около 39 ч), чтобы получить солянокислую соль соединения формулы I: (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она гидрохлорид (xviii, 348,7 г, теоретически 661,2 г, 52,7%) в виде белого кристаллического порошка.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,39 (ш. с, 1H), 9,05 (ш. с, 1H), 8,50 (с, 1H), 7,84 (с, 1H), 7,59 (д, J=8,4 Гц, 1H), 6,28 (к, J=6,9 Гц, 1H), 3,95 (м, 1H), 3,79 (м, 2H), 3,55 (м, 1H), 3,22 (м, 1H), 2,59 (с, 3H), 2,55 (дд, J=16,8, 10,3, 2,3 Гц, 1H), 2,28 (дд, J=16,8, 8,6, 1,5 Гц, 1H), 1,73 (д, J=7,0 Гц, 3H), 1,38 (т, J=6,9 Гц, 3H) м.д. ¹³C ЯМР (100 МГц, ДМСО-d₆) δ 175,3, 156,4 (J_{CF}=249,8 Гц), 153,8 (J_{CF}=7,0 Гц), 152,4, 150,8, 147,3, 144,3, 131,4 (J_{CF}=3,5 Гц), 127,3, 126,4 (J_{CF}=12,6 Гц), 116,1 (J_{CF}=18,4 Гц), 98,0, 72,1, 49,1, 46,6, 36,0, 29,4, 21,0, 15,4, 14,6 м.д. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ДМСО-d₆) δ - 113,6 (д, J_{FN}=7,7 Гц) м.д. C₂₀H₂₃Cl₂FN₆O₂ (мол. мас. 469,34); ЖХ/МС (ЭИ) т/е 433,2 (M⁺+H; точная масса xvii: 432,15). Содержание воды по методу КФ (титрование по Карлу Фишеру): 3,63% по массе; содержание хлоридов (Cl⁻), определенное с помощью титрования: 7,56% по массе (теоретическое 7,56%).

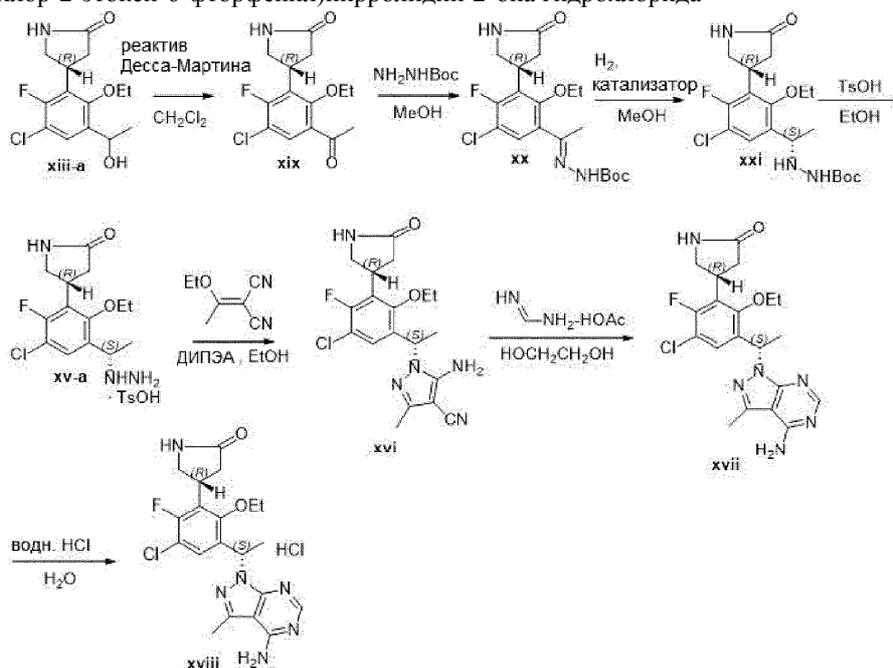
Интервал плавления/разложения кристаллической формы соли (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она гидрохлорида определяли с помощью ДСК от исходной температуры 30°C до конечной температуры 350°C, используя скорость нагрева 10°C/мин. На термограмме ДСК наблюдался один эндотермический процесс с началом при 194,37°C и пиком при 206,55°C, как показано на фиг. 1.

Термограмма ТГА показала общую потерю массы, составляющую 4,3% до 210°C. Выше 210°C соль начинает разлагаться, как показано на фиг. 2.

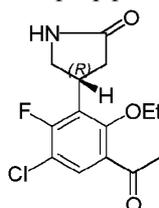
Типичная дифрактограмма, полученная с помощью порошковой рентгеновской дифракции (ПРД), показана на фиг. 3, а таблица демонстрирует соответствующие пики и интенсивности.

2-тета	Относительная интенсивность	2-тета	Относительная интенсивность	2-тета	Относительная интенсивность
5,739	2,20%	25,098	2,20%	42,916	2,40%
7,133	1,20%	25,66	7,00%	43,373	0,50%
7,736	0,10%	25,895	4,00%	44,148	0,40%
10,225	2,30%	27,168	3,10%	45,29	0,30%
11,283	99,00%	27,792	8,50%	46,089	1,40%
11,303	94,10%	28,1	10,00%	47,572	0,40%
13,666	2,90%	28,464	5,50%	48,897	0,70%
14,166	0,90%	30,134	3,20%	49,647	0,50%
14,833	0,10%	31,239	13,70%	50,589	0,30%
15,364	3,80%	31,918	1,30%	51,042	0,10%
16,354	9,70%	32,827	9,50%	51,687	0,40%
17,136	0,50%	33,818	0,70%	52,624	0,40%
16,866	2,70%	34,198	2,80%	53,287	0,50%
17,435	5,50%	35,033	2,10%	54,104	0,20%
17,635	3,30%	35,423	2,10%	54,127	0,10%
18,811	5,10%	36,226	0,30%	54,159	0,20%
18,898	6,60%	36,676	0,90%	55,42	0,30%
19,603	1,50%	37,47	0,90%	56,821	0,10%
20,157	1,80%	37,951	0,50%		
20,593	0,50%	38,457	1,70%		
21,039	11,10%	39,055	0,20%		
21,308	3,80%	39,968	0,20%		
22,169	7,50%	40,184	0,30%		
23,002	11,50%	40,962	0,20%		
24,628	6,60%	42	1,30%		

Пример 4. Альтернативный синтез (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она гидрохлорида



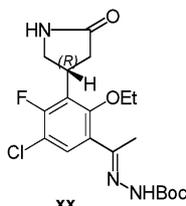
Стадия 1. (R)-4-(3-ацетил-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-он (xix)



xix

(4R)-4-[3-Хлор-6-этокси-2-фтор-5-(1-гидроксиэтил)фенил]пирролидин-2-он (в виде смеси двух диастереомеров с R-конфигурацией на пирролидиноне и R- или S-конфигурациями на вторичном спирте) (xiii, 16,7 г, 55,3 ммоль) растворяли в дихлорметане (167 мл). Раствор охлаждали на бане со льдом и водой и небольшими порциями добавляли периодинан Десса-Мартина (35,2 г, 83,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, в этот момент ВЭЖХ-анализ показал, что реакция завершена. К реакционной смеси добавляли раствор сульфита натрия (28 г, 220 ммоль) в воде (70 мл) и смесь перемешивали в течение 20 мин. К смеси добавляли 1,0M раствор гидроксида натрия и перемешивали в течение 10 мин. Слой давали отстояться и органический слой отделяли и последовательно промывали 1M водным раствором гидроксида натрия (66 мл) и водой (60 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия. Осушитель удаляли фильтрованием и фильтрат концентрировали, что давало (R)-4-[3-ацетил-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил]пирролидин-2-он в виде масла, которое использовали для следующей реакции без дополнительной очистки.

Стадия 2. (R,E)-трет-Бутил-2-(1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-(5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этилиден)гидразинкарбоксилат (xx)

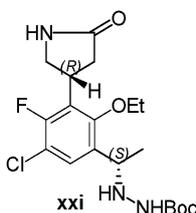


xx

Неочищенный (R)-4-[3-ацетил-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил]пирролидин-2-он (соединение xix из стадии 1) растворяли в метаноле (60 мл) и к раствору добавляли трет-бутилкарбазат (8,04 г, 60,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 65°C в течение 3,5 дней, в этот момент ВЭЖХ-анализ показал, что реакция завершена. Смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя смесью 0-5% метанола в этилацетате, что давало (R,E)-трет-бутил-2-(1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-(5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этилиден)гидразинкарбоксилат (xx, 19,5 г, 85%).

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,83 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,36 (д, J=8,6 Гц, 1H), 4,07 (п, J=9,1 Гц, 1H), 3,84-3,69 (м, 2H), 3,59 (т, J=9,5 Гц, 1H), 3,28 (т, J=9,5 Гц, 1H), 2,54 (м, 1H), 2,33 (м, 1H), 2,14 (с, 3H), 1,46 (с, 9H), 1,25 (т, J=7,0 Гц, 3H). ЖХ/МС для C₁₉H₂₅ClFN₃NaO₄ (M+Na)⁺: m/z=436,1.

Стадия 3. трет-Бутил-2-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)гидразинкарбоксилат (xxi)



xxi

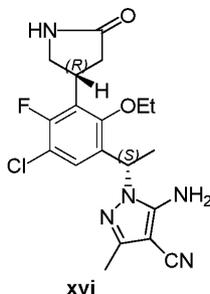
(R,E)-трет-Бутил-2-(1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-(5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этилиден)гидразинкарбоксилат (xx, 0,5 г, 1,2 ммоль) растворяли в метаноле (25 мл) и через раствор барботировали газообразный азот в течение 5 мин. К раствору добавляли бис(1,5-циклооктадиен)родия(I) тетрафторборат (35 мг, 0,086 ммоль) и (R)-(-)-1-((S)-2-[бис(4-трифторметилфенил)фосфин]ферроценил)этил-ди-трет-бутилфосфин (64 мг, 0,094 ммоль) и через полученную реакционную смесь барботировали газообразный азот в течение 30 мин. Затем реакционную смесь встряхивали под давлением водорода (386 кПа (56 фунтов на кв.дюйм)) в течение 2,5 дней. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и полученный остаток очищали с помощью хроматографии на колонке с силикагелем, элюируя смесью метанола (0-10%) в этилацетате. Требуемые фракции концентрировали, что давало трет-бутил-2-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)гидразинкарбоксилат (xxi, 428 мг, выход 85%).

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,18 (с, 1H), 7,78 (с, 1H), 7,53 (д, J=8,2 Гц, 1H), 4,73 (с, 1H), 4,41 (ш, с, 1H), 3,98 (м, 1H), 3,75 (м, 2H), 3,61 (м, 1H), 3,26 (м, 1H), 2,53 (м, 1H), 2,29 (дд, J=17,6, 8,6 Гц, 1H), 1,32

(с, 12H), 1,10 (д, J=6,5 Гц, 1H). ЖХ/МС для $C_{19}H_{27}ClFN_3NaO_4$ (M+Na)⁺: m/z=437,9.

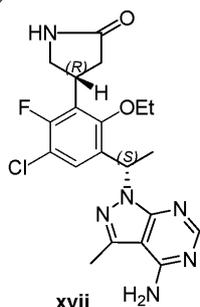
Хиральный ВЭЖХ-анализ показал, что продукт содержал требуемый диастереомер трет-бутил-2-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)гидразинкарбоксилат (xxi) в количестве 85,6% и нежелательный диастереомер трет-бутил-2-((R)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)гидразинкарбоксилат в количестве 14,3%.

Стадия 4. 5-Амино-1-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)-3-метил-1H-пиразол-4-карбонитрил (xvi)



трет-Бутил-2-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)гидразинкарбоксилат (xxi, 130 мг, 0,31 ммоль) и моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (86 мг, 0,45 ммоль) добавляли к этанолу (3 мл) и реакционную смесь нагревали при 50°C в течение 20 ч. ВЭЖХ-анализ показал, что осталось около 88% непрореагировавшего исходного вещества. Добавляли дополнительное количество п-толуолсульфоновой кислоты (86 мг, 0,45 ммоль) и реакционную смесь нагревали до 60°C в течение 24 ч. ВЭЖХ-анализ показал полное снятие Вос-защиты. К этой реакционной смеси добавляли (1-этоксиэтилиден)малонитрил (61 мг, 0,45 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (260 мкл, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ВЭЖХ показала завершение образования пиразольного кольца. К реакционной смеси добавляли 1,0M водный раствор гидроксида натрия и перемешивали в течение 20 мин. К смеси добавляли этилацетат (20 мл) и перемешивали. Двухфазной смеси давали отстояться. Этилацетатный слой собирали и водный слой экстрагировали этилацетатом (10 мл). В объединенный этилацетатный раствор добавляли 1M водный раствор соляной кислоты (5 мл) и перемешивали в течение 15 мин. Двухфазной смеси давали отстояться и органический слой собирали и сушили над безводным сульфатом натрия. Сульфат натрия удаляли фильтрованием и фильтрат концентрировали, что давало 5-амино-1-((S)-1-(5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-((R)-5-оксопирролидин-3-ил)фенил)этил)-3-метил-1H-пиразол-4-карбонитрил (xvi, 126 мг, количественный выход неочищенного продукта), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 5. (R)-4-(3-((S)-1-(4-Амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-он (xvii)



К 5-амино-1-((S)-1-[5-хлор-2-этокси-4-фтор-3-(5-оксопирролидин-3-ил)фенил]этил)-3-метил-1H-пиразол-4-карбонитрилу (xvi, 126 мг, 0,31 ммоль) добавляли формамидина ацетат (323 мг, 3,1 ммоль) и 1,2-этанediол (2 мл). Реакционную смесь нагревали при 104-105°C при перемешивании. Через 18 ч ВЭЖХ-анализ показал, что осталось около 44% исходного соединения xvi. Реакционную смесь нагревали до 115°C в течение 24 ч. ВЭЖХ-анализ показал, что реакция завершена. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли этилацетат (10 мл) и воду (5 мл). Двухфазную смесь перемешивали. Слой позволяли разделиться. Органический слой собирали, а водный слой экстрагировали этилацетатом (5 мл). Объединенный этилацетатный раствор промывали водой (5 мл), сушили над безводным сульфатом натрия. Сульфат натрия удаляли фильтрованием и фильтрат концентрировали до остатка. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле. Колонку элюировали смесью метанола (0-5%) в метилхлориде. Требуемые фракции объединяли и испаряли, что давало (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-он (xvii, 94 мг, выход 69,9%).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,11 (с, 1H), 7,82 (с, 1H), 7,52 (д, J=8,5 Гц, 1H), 7,30 (ш. с, 2H), 6,23 (к, J=7,0 Гц, 1H), 3,97 (п, J=9,2 Гц, 1H), 3,90-3,73 (м, 2H), 3,57 (т, J=9,9 Гц, 1H), 3,25 (дд, J=9,2, 8,7 Гц, 1H), 2,48 (с, 3H), 2,60-2,50 (м, 1H), 2,36-2,20 (м, 1H), 1,69 (д, J=7,1 Гц, 3H), 1,39 (т, J=6,9 Гц, 3H). ЖХ/МС

для $C_{20}H_{23}ClFN_6O_2$ (M+H)⁺: m/z=433,3.

Хиральный ВЭЖХ-анализ продукта показал, что он содержал требуемый диастереомер (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-он (xvii) в количестве 87% и нежелательный диастереомер (R)-4-(3-((R)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-он в количестве 13%.

Стадия 6. (R)-4-(3-((S)-1-(4-Амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она гидрохлорид.

Целевой продукт получали в соответствии с методикой, описанной в примере 3, стадия 5. Полученная гидрохлоридная соль хорошо соответствует веществу, полученному с использованием способа синтеза, описанного в примере 3, в каждом сопоставимом аспекте, включая химическую чистоту, хиральную чистоту и характеристики твердого состояния.

Пример А1. Анализ ферментов PI3K.

Набор для люминесцентного анализа PI3-киназы, включающий липидный субстрат для киназы, D-миофосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PtdIns(4,5)P₂), D (+)-sn-1,2-ди-О-октаноилглицерил, 3-О-фосфосвязанный (PIP₂), биотинилированный I(1,3,4,5)P₄, белок для обнаружения PI(3,4,5)P₃, приобретен в Echelon Biosciences (Солт-Лейк-Сити, Юта). Набор для обнаружения TST AlphaScreen™, включающий донорные и акцепторные шарики, приобретен в PerkinElmer Life Sciences (Уолтем, Массачусетс). PI3Kδ (p110δ/p85α) приобретена в Millipore (Бедфорд, Массачусетс). АТФ, MgCl₂, ДТТ, ЭДТК, HEPES и CHAPS приобретены в Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури).

Анализ AlphaScreen™ для PI3Kδ.

Реакцию с киназой проводят в 384-луночном планшете REMP производства Thermo Fisher Scientific, конечный объем составляет 40 мкл. Ингибиторы вначале последовательно разбавляют ДМСО и добавляют в лунки планшета до добавления других компонентов реакции. Конечная концентрация ДМСО для анализа составляет 2%. Анализ PI3K проводят при комнатной температуре в 50 мМ HEPES, pH 7,4, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ и 0,04% CHAPS. Реакции инициируют добавлением АТФ, при этом конечную реакционную смесь, которая состоит из 20 мкМ PIP₂, 20 мкМ АТФ, 1,2 нМ PI3Kδ, инкубируют в течение 20 мин. 10 мкл реакционной смеси затем переносят к 5 мкл биотинилированного I(1,3,4,5)P₄ с концентрацией 50 нМ в буфере для гашения: 50 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТК, 5 мМ ДТТ, 0,1% Твин-20, затем добавляют 10 мкл донорных и акцепторных шариков AlphaScreen™, суспендированных в буфере для гашения, содержащем 25 нМ белка для обнаружения PI(3,4,5)P₃. Конечная концентрация как донорных, так и акцепторных шариков составляет 20 мг/мл. После запечатывания планшетов их инкубируют в темном месте при комнатной температуре в течение 2 ч. Активность продукта определяют на ридере для микропланшетов Fusion-alpha (Perkin-Elmer). Определение IC₅₀ выполняют с помощью аппроксимации кривой зависимости доли от активности контрольного образца (в процентах) от логарифма концентрации ингибитора, используя программное обеспечение GraphPad Prism 3.0.

Пример А2. Анализ ферментов PI3K.

Вещества.

Липидный субстрат для киназы, фосфоинозитол-4,5-бифосфат (PIP₂), приобретен в Echelon Biosciences (Солт-Лейк-Сити, Юта). Изоформы PI3K α, β, δ и γ приобретены в Millipore (Бедфорд, Массачусетс). АТФ, MgCl₂, ДТТ, ЭДТК, MOPS и CHAPS приобретены в Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури).

Реакции с киназой проводят в 96-луночном планшете с прозрачным дном производства Thermo Fisher Scientific, конечный объем составляет 24 мкл. Ингибиторы вначале последовательно разбавляют ДМСО и добавляют в лунки планшета до добавления других компонентов реакции. Конечная концентрация ДМСО для анализа составляет 0,5%. Анализ PI3K проводят при комнатной температуре в 20 мМ MOPS, pH 6,7, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ и 0,03% CHAPS. Реакционную смесь готовят так, чтобы она содержала 50 мкМ PIP₂, киназу и различные концентрации ингибиторов. Реакции инициируют добавлением АТФ, содержащего 2,2 мкКи [γ -³³P]АТФ так, чтобы конечная концентрация составляла 1000 мкМ. Конечные концентрации изоформ PI3K α, β, δ и γ для анализа составляют 1,3, 9,4, 2,9 и 10,8 нМ соответственно. Реакционные смеси инкубируют в течение 180 мин и реакции завершают путем добавления 100 мкл буфера для гашения, содержащего 1М фосфата калия, pH 8,0, 30 мМ ЭДТК. Аликвоту 100 мкл реакционного раствора затем переносят в 96-луночный фильтрующий планшет из ПВДФ с размером пор 0,45 мкм Millipore Multiscreen IP (фильтрующий планшет предварительно по очереди смачивают 200 мкл 100% этанола, дистиллированной воды и 1М раствора фосфата калия с pH 8,0). Жидкость из фильтрующего планшета аспирируют под вакуумом с использованием Millipore Manifold и планшет промывают 18×200 мкл промывочного буферного раствора, содержащего 1М фосфата калия с pH 8,0 и 1 мМ АТФ. После высушивания с помощью аспирации и впитывания планшет сушат на воздухе в термостате при 37°C в течение ночи. Затем к планшету присоединяют адаптер Packard TopCount (Millipore) после добавления 120 мкл сцинтилляционного коктейля Microscint 20 (Perkin Elmer) в каждую лунку. После запечатывания планшета определяют радиоактивность продукта путем подсчета сцинтилляций на приборе Topcount (Perkin-Elmer). Определение IC₅₀ выполняют с помощью аппроксимации кривой зависимости

доли от активности контрольного образца (в процентах) от логарифма концентрации ингибитора, используя программное обеспечение GraphPad Prism 3.0.

В анализе примера А2 исследовали солянокислую соль (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она, было установлено, что она является селективным ингибитором РІЗКδ.

В анализе примера А2 исследовали солянокислую соль (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она, было установлено, что она является в 100 раз более селективным ингибитором РІЗКδ по сравнению с каждой из РІЗКα, РІЗКβ и РІЗКγ.

Пример А3. Сцинтилляционный проксимальный анализ РІЗКδ.

Вещества.

[γ-³³P]АТФ (10 мКи/мл) приобретен в Perkin-Elmer (Уолтем, Массачусетс). Липидный субстрат для киназы, D-мио-фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат (PtdIns(4,5)P₂), D(+)-sn-1,2-ди-О-октаноилглицерил, 3-О-фосфосвязанный (PIP₂), CAS 204858-53-7, приобретен в Echelon Biosciences (Солт-Лейк-Сити, Юта). РІЗКδ (p110δ/p85α) приобретена в Millipore (Бедфорд, Массачусетс). АТФ, MgCl₂, ДТТ, ЭДТК, MOPS и CHAPS приобретены в Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). Сцинтилляционные шарики для SPA-анализа с иммобилизованным агглютинином зародышей пшеницы (А3П) и YSi приобретены в GE Healthcare Life Sciences (Пискатавэй, Нью-Джерси).

Реакцию с киназой проводили в 384-луночном матричном белом полистирольном планшете производства Thermo Fisher Scientific, конечный объем составлял 25 мкл. Ингибиторы вначале последовательно разбавляли ДМСО и добавляли в лунки планшета до добавления других компонентов реакции. Конечная концентрация ДМСО для анализа составляла 0,5%. Анализ РІЗК проводили при комнатной температуре в 20 мМ MOPS, рН 6,7, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ и 0,03% CHAPS. Реакции инициировали добавлением АТФ, конечная реакционная смесь состояла из 20 мкМ PIP₂, 20 мкМ АТФ, 0,2 мКи [γ-³³P] АТФ, 4 нМ РІЗКδ. Реакционные смеси инкубировали в течение 210 мин и реакции завершали путем добавления 40 мкл шариков для SPA-анализа, суспендированных в буфере для гашения: 150 мМ фосфата калия, рН 8,0, 20% глицерина, 25 мМ ЭДТК, 400 мкМ АТФ. Конечная концентрация шариков для SPA-анализа составляла 1,0 мг/мл. После запечатывания планшетов их встряхивали в течение ночи при комнатной температуре и центрифугировали при 1800 об/мин в течение 10 мин, радиоактивность продукта определяли путем подсчета сцинтилляций на приборе Topcount (Perkin-Elmer). Определение IC₅₀ выполняли с помощью аппроксимации кривой зависимости доли активности контрольного образца (в процентах) от логарифма концентрации ингибитора, используя программное обеспечение GraphPad Prism 3.0. Установлено, что соединение формулы I в анализе примера А3 имеет IC₅₀, составляющую ≤10 нМ.

Пример В1. Анализ пролиферации В-клеток.

Для получения В-клеток человеческие МКПК выделяют из периферической крови здоровых доноров, не принимающих лекарственных средств, с помощью стандартного центрифугирования в градиенте плотности на Ficoll-NuPAGE (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси) и инкубируют с микрошариками с иммобилизованными анти-CD19 (Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния). Затем В-клетки очищают с помощью положительного иммуносортинга с использованием autoMacs (Miltenyi Biotech) в соответствии с инструкцией производителя.

Очищенные В-клетки (2×10⁵/лунка/200 мкл) культивируют в 96-луночных планшетах со сверхнизким связыванием (Corning, Корнинг, Нью-Йорк) в среде RPMI1640, содержащей 10% ФБС и козьи F(ab')₂ против человеческих IgM (10 мкг/мл) (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния), в присутствии различных количеств исследуемых соединений в течение трех дней. Затем к культурам В-клеток еще на 12 ч добавляют [³H]-тимидин (1 мКи/лунка) (PerkinElmer, Бостон, Массачусетс) в ФСБ, после чего введенную радиоактивность отделяют с помощью фильтрования с водой через фильтры GF/B (Packard Bioscience, Мерилен, Коннектикут) и определяют путем подсчета сцинтилляций в жидкой фазе с использованием TopCount (Packard Bioscience).

Пример В2. Анализ пролиферации клеток Pfeiffer.

Клеточная линия Pfeiffer (диффузная В-крупноклеточная лимфома) приобретена в АТСС (Манассас, Вирджиния), и ее культивируют в рекомендуемой питательной среде (RPMI и 10% ФБС). Для измерения антипролиферативной активности соединений клетки Pfeiffer высевают в питательной среде (2×10³ клеток/лунка/200 мкл) в 96-луночные планшеты со сверхнизким связыванием (Corning, Корнинг, Нью-Йорк) в присутствии или в отсутствие исследуемых соединений в различных концентрациях. Через 3-4 дня к культуре клеток еще на 12 ч добавляют [³H]-тимидин (1 мКи/лунка) (PerkinElmer, Бостон, Массачусетс) в ФСБ, после чего введенную радиоактивность отделяют с помощью фильтрования с водой через фильтры GF/B (Packard Bioscience, Мерилен, Коннектикут) и определяют путем подсчета сцинтилляций в жидкой фазе с использованием TopCount (Packard Bioscience).

Пример В3. Анализ пролиферации клеток SUDHL-6.

Клеточная линия SUDHL-6 (диффузная В-крупноклеточная лимфома) приобретена в АТСС (Манассас, Вирджиния), и ее культивировали в рекомендуемой питательной среде (RPMI и 10% ФБС). Для

измерения антипролиферативной активности соединений посредством количественного определения АТФ клетки SUDHL-6 высевали в питательной среде (5000 клеток/лунка/ на 200 мкл) в 96-луночном полистирольном прозрачном черном планшете, обработанном для культивирования тканей (Greiner-bio-one посредством VWR, Нью-Джерси), в присутствии или в отсутствие исследуемых соединений в различных концентрациях. Через 3 дня в каждую лунку на 10 мин при комнатной температуре добавляли агент для клеточных культур Cell Titer-GLO (люминесцентный) (Promega, Мадисон, Висконсин) для стабилизации люминесцентного сигнала. Данный анализ определяет количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, который указывает на присутствие метаболически активных клеток. Люминесценцию измеряли с помощью TopCount 384 (Packard Bioscience посредством Perkin Elmer, Бостон, Массачусетс).

Пример С. Анализ фосфорилирования Akt.

Клетки Ramos (В-лимфоциты полученные из лимфома Беркитта) получены в АТСС (Манассас, Вирджиния), и их культивируют в среде RPMI1640 и 10% ФБС. Клетки (3×10^7 клеток/пробирка/3 мл в RPMI) инкубируют с различными количествами исследуемых соединений в течение 2 ч при 37°C, а затем стимулируют козыми F(ab')₂ против IgM человека (5 мкг/мл) (Invitrogen) в течение 17 мин на водяной бане с температурой 37°C. Стимулированные клетки центрифугируют при 4°C и готовят цельный клеточный экстракт с использованием 300 мкл буфера для лизиса (Cell Signaling Technology, Данверс, Массачусетс). Полученные лизаты обрабатывают ультразвуком и собирают надосадочные жидкости. Уровень фосфорилирования Akt в надосадочных жидкостях определяют с использованием наборов PathScan phospho-Akt1 (Ser473) для проведения ИФА "сэндвич"-типа (Cell Signaling Technology) в соответствии с инструкцией производителя.

Для специалистов в данной области техники из предыдущего описания будут очевидны различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном документе. Предполагается, что такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Каждый источник, включая все патенты, патентные заявки и публикации, цитируемые в настоящей заявке, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соль, которая представляет собой солянокислую соль (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она, которая является кристаллической.

2. Соль по п.1, которая представляет собой стехиометрическое отношение 1:1 (R)-4-(3-((S)-1-(4-амино-3-метил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-5-хлор-2-этокси-6-фторфенил)пирролидин-2-она к соляной кислоте.

3. Соль по п.1 или 2, которая характеризуется термограммой ДСК, на которой наблюдается эндотермический пик при $207 \pm 3^\circ\text{C}$.

4. Соль по любому из пп.1-3, имеющая термограмму ДСК, по существу, такую же, как показано на фиг. 1.

5. Соль по любому из пп.1-4, имеющая термограмму ТГА, по существу, такую же, как показано на фиг. 2.

6. Соль по любому из пп.1-5, характеризующаяся по меньшей мере одним пиком ПРД в единицах 2θ , выбранным из $11,3 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$, $21,0 \pm 0,2^\circ$, $23,0 \pm 0,2^\circ$, $28,1 \pm 0,2^\circ$, $31,2 \pm 0,2^\circ$ и $32,8 \pm 0,2^\circ$.

7. Соль по любому из пп.1-5, характеризующаяся по меньшей мере двумя пиками ПРД в единицах 2θ , выбранными из $11,3 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$, $21,0 \pm 0,2^\circ$, $23,0 \pm 0,2^\circ$, $28,1 \pm 0,2^\circ$, $31,2 \pm 0,2^\circ$ и $32,8 \pm 0,2^\circ$.

8. Соль по любому из пп.1-5, характеризующаяся по меньшей мере тремя пиками ПРД в единицах 2θ , выбранными из $11,3 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$, $21,0 \pm 0,2^\circ$, $23,0 \pm 0,2^\circ$, $28,1 \pm 0,2^\circ$, $31,2 \pm 0,2^\circ$ и $32,8 \pm 0,2^\circ$.

9. Соль по любому из пп.1-5, характеризующаяся по меньшей мере четырьмя пиками ПРД в единицах 2θ , выбранными из $11,3 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$, $21,0 \pm 0,2^\circ$, $23,0 \pm 0,2^\circ$, $28,1 \pm 0,2^\circ$, $31,2 \pm 0,2^\circ$ и $32,8 \pm 0,2^\circ$.

10. Соль по любому из пп.1-5, характеризующаяся по меньшей мере пятью пиками ПРД в единицах 2θ , выбранными из $11,3 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$, $21,0 \pm 0,2^\circ$, $23,0 \pm 0,2^\circ$, $28,1 \pm 0,2^\circ$, $31,2 \pm 0,2^\circ$ и $32,8 \pm 0,2^\circ$.

11. Соль по любому из пп.1-5, имеющая дифрактограмму ПРД, по существу, такую же, как показано на фиг. 3.

12. Фармацевтическая композиция, обладающая способностью ингибировать активность киназы Р1ЗК δ , содержащая терапевтически эффективное количество кристаллической соли по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ ингибирования активности киназы Р1ЗК δ , включающий приведение киназы в контакт с кристаллической солью по любому из пп.1-11.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что указанная соль представляет собой селективный ингибитор Р1ЗК δ по сравнению с одной или более из Р1ЗК α , Р1ЗК β или Р1ЗК γ .

15. Способ лечения заболевания у пациента, в котором указанное заболевание связано с аномальной экспрессией или активностью киназы Р1ЗК δ , включающий введение указанному пациенту терапевтиче-

ски эффективного количества кристаллической соли по любому из пп.1-11.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что заболевание выбрано из идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), аутоиммунной гемолитической анемии, васкулита, системной красной волчанки, волчаночного нефрита, пемфигуса, аутоиммунной гемолитической анемии (АГА), мембранозной нефропатии, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), волосатоклеточного лейкоза, лимфомы из клеток мантийной зоны, лимфомы Беркитта, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфоплазмоцитарной лимфомы, экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, лимфомы Ходжкина, макроглобулинемии Вальденстрема, пролимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, миелофиброза, лимфомы, возникающей из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), В-клеточной лимфомы, медиастинальной (тимической) В-крупноклеточной лимфомы, лимфогранулематоза, лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки, первичной выпотной лимфомы, внутрисосудистой В-крупноклеточной лимфомы, плазмноклеточного лейкоза, экстрамедуллярной плазмацитомы, тлеющей миеломы (также называемой бессимптомной миеломой), моноклональной гаммапатии неопределенного значения (МГНЗ) и В-клеточной лимфомы.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что представляет собой способ лечения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), выбранной из рецидивирующей ИТП и рефрактерной ИТП.

18. Способ по п.16, отличающийся тем, что представляет собой способ лечения васкулита, выбранного из болезни Бехчета, синдрома Когана, гигантоклеточного артериита, ревматической полимиалгии (РП), артериита Такаясу, болезни Бюргера (облитерирующего тромбангиита), васкулита центральной нервной системы, болезни Кавасаки, нодозного полиартериита, синдрома Чарга-Стросса, смешанного криоглобулинемического васкулита (эссенциального или вызванного вирусом гепатита С (ВГС)), пурпуры Шенлейна-Геноха (ПШГ), лейкоцитокластического васкулита, микроскопического полиангиита, гранулематоза Вегенера и ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (АНЦА) системного васкулита (ААСВ).

19. Способ по п.16, отличающийся тем, что представляет собой способ лечения неходжкинской лимфомы (НХЛ), выбранной из рецидивирующей НХЛ, рефрактерной НХЛ и вторичной фолликулярной НХЛ.

20. Способ по п.16, отличающийся тем, что представляет собой способ лечения В-клеточной лимфомы, причем указанная В-клеточная лимфома представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ).

21. Способ по п.16, отличающийся тем, что представляет собой способ лечения В-клеточной лимфомы, причем указанная В-клеточная лимфома представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому из клеток, подобных активированным В-клеткам (АВК), или диффузную В-крупноклеточную лимфому из В-клеток зародышевого центра (ЗЦВ).

22. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой остеоартрит, рестеноз, атеросклероз, поражения костей, артрит, диабетическую ретинопатию, псориаз, доброкачественную гипертрофию предстательной железы, воспаление, ангиогенез, панкреатит, заболевание почек, воспалительное заболевание кишечника, миастению гравис, рассеянный склероз или синдром Шегрена.

23. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, аллергию, астму, гломерулонефрит, волчанку или воспаление, связанное с любым заболеванием из вышеперечисленных.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что волчанка представляет собой системную красную волчанку или волчаночный нефрит.

25. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак мозга, рак мочевого пузыря, рак кожи, рак матки, рак яичника, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак почки, рак желудка или гемобластоз.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что указанный гемобластоз представляет собой острый миелобластный лейкоз или хронический миелоидный лейкоз.

27. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой острое повреждение легких (ОПЛ) или острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) у взрослых.

28. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой фолликулярную лимфому.

29. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой экстранодальную лимфому из клеток маргинальной зоны или лимфому из клеток маргинальной зоны селезенки.

30. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанное заболевание представляет собой лимфому из клеток мантийной зоны.

31. Способ получения кристаллической соли по любому из пп.1-11, включающий взаимодействие соединения формулы I

041006



I

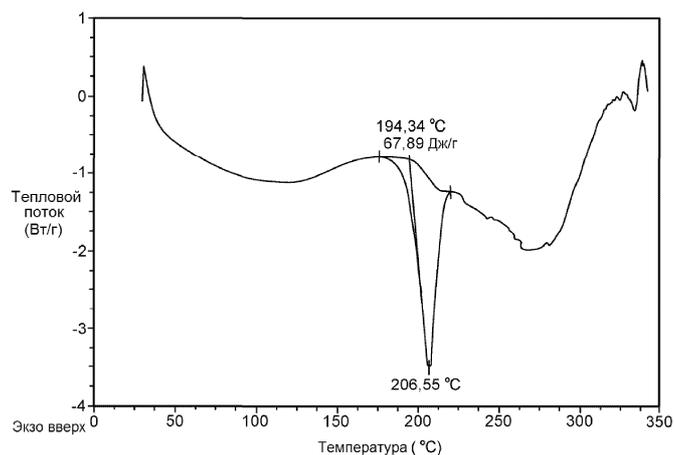
с соляной кислотой с образованием взвеси;
нагрев взвеси с образованием раствора и
охлаждение раствора для кристаллизации соли.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что указанная соляная кислота представляет собой 1М водный раствор соляной кислоты.

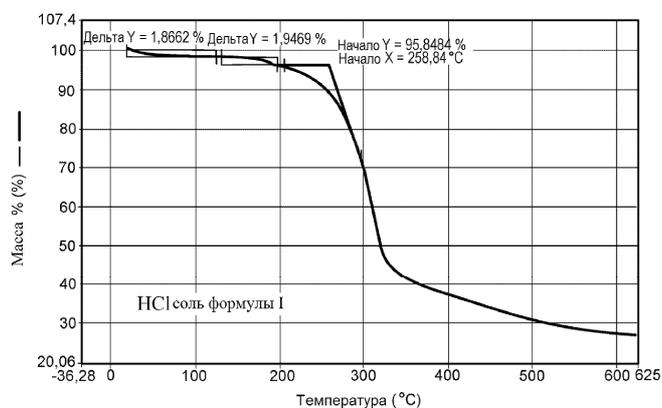
33. Способ по п.31 или 32, отличающийся тем, что взаимодействие соляной кислоты с соединением формулы I осуществляют при комнатной температуре.

34. Способ по любому из пп.31-33, отличающийся тем, что взвесь нагревают до температуры от 45 до 55°C.

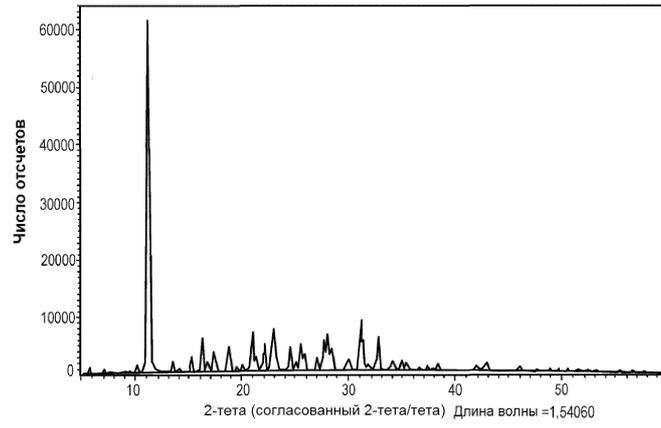
35. Способ по любому из пп.31-34, отличающийся тем, что раствор охлаждают до температуры от 0 до 5°C для кристаллизации соли.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

