

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 041344

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.12

(21) Номер заявки
201990519

(22) Дата подачи заявки
2017.08.15

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ ФОРМА (S)-7-(1-АКРИЛОИЛПИПЕРИДИН-4-ИЛ)-2-(4-ФЕНОКСИФЕНИЛ)-4,5,6,7-ТЕТРАГИДРОПИРАЗОЛО[1,5-a]ПИРИМИДИН-3-КАРБОКСАМИДА, ЕЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2016/095510

(32) 2016.08.16

(33) CN

(43) 2019.08.30

(86) PCT/IB2017/054955

(87) WO 2018/033853 2018.02.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЕЙДЖИН, ЛТД. (КУ)

(72) Изобретатель:
Ван Чживэй, Го Юньхан, Ши Гунинь
(CN)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.
(RU)

(56) WO-A1-2014173289
WO-A2-0119829
WO-A1-2016105582
WO-A1-2016100914
WO-A1-2007026720

(57) Изобретение относится к кристаллической форме (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамида для ингибирования Btk, способам ее получения и фармацевтическим композициям и к применению описанной выше кристаллической формы в лечении заболевания или в производстве лекарственного средства для лечения заболевания.

041344 B1

041344 B1

041344

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к кристаллической форме (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамида. Настоящее изобретение относится к способам получения кристаллической формы и к способам применения кристаллической формы в качестве ингибитора Btk (тирозинкиназы Брутона).

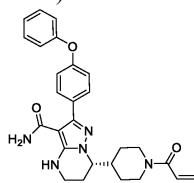
Предшествующий уровень техники

Тирозинкиназа Брутона (Btk) принадлежит к Тес-семейству тирозинкиназ (Vetrie et al., Nature 361: 226-233, 1993; Bradshaw, Cell Signal. 22: 1175-84, 2010). Btk в основном экспрессируется в большинстве гематоопоэтических клеток, таких как В-лимфоциты, тучные клетки и макрофаги (Smith et al., J. Immunol. 152: 557-565, 1994), и локализована в костном мозге, селезенке и ткани лимфатических узлов. Btk играет важную роль в путях передачи сигнала рецепторов В-лимфоцитов (BCR) и FcR, которые вовлечены в развитие и дифференцировку В-лимфоцитов (Khan, Immunol. Res. 23: 147, 2001). Btk активируется на предшествующем этапе киназами Src-семейства. Будучи активированной Btk, в свою очередь, фосфорилирует PLC гамма, что приводит к воздействию на функционирование и выживание В-лимфоцитов (Humphries et al., J. Biol.Chem. 279: 37651, 2004).

Эти пути передачи сигнала должны быть точно отрегулированы. Мутации в гене, кодирующем Btk, вызывают у людей наследственное В-лимфоцит-специфичное иммунодефицитное заболевание, известное как X-сцепленная агаммаглобулинемия (XLA) (Conley et al., Annu. Rev. Immunol. 27: 199-227, 2009). Аберрантная BCR-опосредованная передача сигнала может привести в результате к нарушенной регуляции активации В-лимфоцитов, приводящей к ряду аутоиммунных и воспалительных расстройств. В доклинических исследованиях показано, что мыши с дефицитом Btk резистентны к развитию индуцированного коллагеном артрита. Более того, в клинических исследованиях ритуксана, представляющего собой антитело к CD20 для истощения популяции зрелых В-лимфоцитов, выявлена ключевая роль В-лимфоцитов в ряде воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и рассеянный склероз (Gurcan et al., Int. Immunopharmacol. 9: 10-25, 2009). Поэтому ингибиторы Btk можно применять для лечения аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний.

Кроме того, аберрантная активация Btk играет важную роль в патогенезе В-клеточных лимфом, что свидетельствует о пользе ингибирования Btk в лечении гематологических злокачественных новообразований (Davis et al., Nature 463: 88-92, 2010). Результаты предварительных клинических исследований показали, что ингибитор Btk PCI-32765 был эффективен в лечении нескольких типов В-клеточной лимфомы (например, тезисы 54-й ежегодной конференции Американского общества гематологов (ASH), декабрь 2012: 686 The Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) Inhibitor, Ibrutinib (PCI- 32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase I Study). Поскольку Btk играет центральную роль в качестве медиатора в многочисленных путях передачи сигнала, ингибиторы Btk представляют большой интерес в качестве противовоспалительных и/или противораковых средств (Mohamed et al., Immunol. Rev. 228: 58-73, 2009; Pan, Drug News perspect 21: 357-362, 2008; Rokosz et al., Expert Opin. Ther. Targets 12: 883-903, 2008; Uckun et al., Anti-cancer Agents Med. Chem. 7: 624-632, 2007; Lou et al, J. Med. Chem. 55, 10), 4539-4550, 2012).

В международной заявке WO 2014173289 А раскрыта серия конденсированных гетероциклических соединений в качестве ингибиторов Btk. В частности, в WO 2014173289 А раскрыт (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамид (далее в настоящем документе соединение 1)



Соединение 1

Соединение 1 является активным, специфичным и необратимым ингибитором ВТК киназы. Данные, полученные в доклинических исследованиях, основанных на биохимических, клеточных методах и исследованиях животных, позволяют предположить, что соединение 1 может обеспечить существенное преимущество в ингибировании опухолевого роста при В-клеточных злокачественных новообразованиях. Поскольку было показано, что соединение 1 обладает большей селективностью ингибирования ВТК, чем ибрутиниб, в сравнении с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), FGR, FRK, HER2, HER4, ИТК, JAK3, LCK и ТЕС, ожидают, что в условиях клинического применения он вызывает меньше побочных эффектов, чем ибрутиниб. Кроме того, показано, что соединение 1 характеризуется существенно меньшим ингибированием индуцированной ритуксимабом антигензависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), чем ибрутиниб, за счет более слабого ингибирования ИТК и, следовательно, может обеспечить лучшую эффективность при комбинировании с ритуксимабом или другим ADCC-зависимым антителом в лечении В-клеточных злокачественных новообразований.

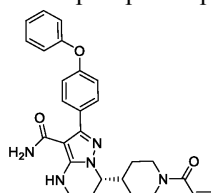
При доклинической оценке безопасности в обоих видах исследований токсичности с применением однократной и повторной дозы у крыс и собак продолжительностью до 28 дней продемонстрировано, что в отношении общей переносимости и тяжелых токсических действий соединение 1 более безопасно, чем ибрутиниб. Кроме того, соединение 1 обладает лучшей биодоступностью, при этом отсутствуют проблемы, связанные с накоплением, которые наблюдаются для ибрутиниба. Эти уникальные характеристики обуславливают проведение дальнейшей оценки соединения 1 в клинических исследованиях.

Тем не менее было обнаружено, что соединение 1, полученное в соответствии со способом получения соединения 27, описанным в WO 2014173289 A, находится в аморфной форме, что было дополнительно подтверждено порошковой рентгеновской дифрактограммой, представленной на фиг. 7А. Было показано, что аморфная форма имеет низкую температуру стеклования, как показано на фиг. 7В, что свидетельствует о некоторых затруднениях при приготовлении лекарственного препарата из аморфной формы, таких как низкая стабильность и трудность очистки. Поэтому необходимо разработать новую форму соединения 1, которая обладает характеристиками, такими как высокая температура плавления и лучшая стабильность, пригодными для приготовления лекарственного препарата.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы изобретения неожиданно обнаружили кристаллическую форму соединения 1, которая обладает высокой температурой плавления и характеризуется крайне высоким профилем стабильности в условиях хранения при температуре 25°C/относительной влажности (ОВ) 60% в течение вплоть до 24 месяцев или хранения при 40°C/ОВ 75% в течение вплоть до 6 месяцев.

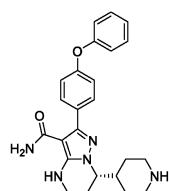
В первом аспекте в настоящем изобретении раскрыта кристаллическая форма соединения 1



Соединение 1.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма соединения 1 представляет собой кристаллический ангидрат (далее в настоящем документе называемый "кристаллической формой А").

Во втором аспекте изобретения в настоящем документе раскрыта кристаллическая форма соединения BG-13, которая характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой по существу в соответствии с фиг. 11

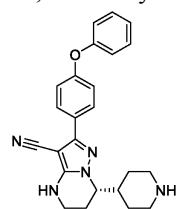


1/2 L-DBTA (2R,3R)-Дибензонил винная кислота

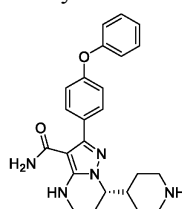
Соединение BG-13

В третьем аспекте в настоящем документе раскрыт способ получения соединения 1.

В настоящем документе также раскрыто промежуточное соединение формулы Ie или его соль или соединение формулы If или его соль, используемые для получения соединения 1



Формула Ie



Формула If

В четвертом аспекте в настоящем документе раскрыт способ получения соединения 1.

В пятом аспекте в настоящем документе раскрыта фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество кристаллической формы А, раскрытой в настоящем документе.

В шестом аспекте в настоящем документе раскрыт способ лечения заболевания, связанного с нежелательной активностью Btk у субъекта, путем введения субъекту раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А.

В седьмом аспекте в настоящем документе раскрыт способ лечения заболевания, выбранного из аллергического заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, злокачественного новообразования или комбинации двух или более из них, у субъекта путем введения субъекту раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А.

В восьмом аспекте в настоящем документе раскрыт способ лечения В-клеточного пролиферативного заболевания, выбранного из В-клеточных злокачественных новообразований или рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований у субъекта, путем введения субъекту раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А. В некоторых воплощениях данного аспекта в настоящем документе раскрыт способ лечения В-клеточного пролиферативного заболевания, выбранного из хронического лимфоцитарного лейкоза, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза, лейкоза по типу лимфомы Беркитта или комбинации двух или более из них, путем введения субъекту раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А.

В девятом аспекте раскрыто применение раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А в производстве лекарственного средства для лечения по меньшей мере одного заболевания, связанного с нежелательной активностью Btk у субъекта.

В десятом аспекте в настоящем документе раскрыто применение раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А в производстве лекарственного средства для лечения у субъекта заболевания, выбранного из аллергического заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, злокачественного новообразования или комбинации двух или более из них.

В одиннадцатом аспекте раскрыто применение раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А в производстве лекарственного средства для лечения у субъекта В-клеточного пролиферативного заболевания, выбранного из В-клеточных злокачественных новообразований или рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований. В некоторых воплощениях данного аспекта в настоящем документе раскрыто применение раскрытой в настоящем документе кристаллической формы А в производстве лекарственного средства для лечения у субъекта В-клеточного пролиферативного заболевания, выбранного из хронического лимфоцитарного лейкоза, неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, лимфомы из клеток маргинальной зоны, волосатоклеточного лейкоза, лейкоза по типу лимфомы Беркитта или комбинации двух или более из них.

В двенадцатом аспекте в настоящем документе раскрыт способ получения кристаллической формы соединения 1, включающий смешивание аморфной формы соединения 1 с описанной ниже системой растворителей до получения прозрачного раствора; выдерживание раствора при комнатной температуре или нагревание при перемешивании или без перемешивания в течение определенного периода времени до осаждения кристаллической формы А, где система растворителей представляет собой

этилацетат : гексан = 1:0,6-0,7 по отношению объемов;
этилацетат : гептан = 1:0,6-0,7 по отношению объемов;
этилацетат : циклогексан = 1:0,6-1,2 по отношению объемов;
этилацетат : гексан = 1:0,6-1,2 по отношению объемов;
толуол : гексан = 1,0:0,2-0,4 по отношению объемов;
толуол : циклогексан = 1,0:0,1-0,2 по отношению объемов;
метилацетат : циклогексан = 0,6-0,8:1,0 по отношению объемов;
IPAC : циклогексан = 1,0:0,2-1,0 по отношению объемов или
изобутилацетат: циклогексан = 1,0:0,2-1,0 по отношению объемов.

В одном воплощении изобретения аморфная форма соединения 1 характеризуется величиной энантиомерного избытка (эи) более 90%. В другом воплощении изобретения аморфная форма соединения 1 характеризуется величиной эи 97%.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А.

На фиг. 2 показана кривая дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) кристаллической формы А.

На фиг. 3 показана кривая термогравиметрического анализа (ТГА) кристаллической формы А.

На фиг. 4 показан ¹H-ядерный магнитный резонанс (ЯМР) кристаллической формы А.

На фиг. 5 показан углеродный-ЯМР кристаллической формы А.

На фиг. 6 показана диаграмма динамической сорбции паров (ДСП) кристаллической формы А.

На фиг. 7А показана порошковая рентгеновская дифрактограмма аморфной формы соединения 1.

На фиг. 7В показана кривая дифференциальной сканирующей калориметрии в термомодулированном режиме (мДСК) аморфной формы соединения 1, показывающая, что температура стеклования аморфной формы составляет 79,7°C (средний показатель температуры).

На фиг. 8 показана абсолютная структура монокристалла BG-13.

На фиг. 9 показаны водородные связи монокристалла BG-13.

На фиг. 10 показана кристаллическая упаковка монокристалла BG-13.

На фиг. 11 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма монокристалла BG-13.

Подробное описание изобретения

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что соединение 1 в кристаллической форме, названной кристаллической формой А, может быть получено только в определенных условиях в зависимости от этих исходных веществ и соотношения соразтворителей и т.д. Исследование полиморфов было также проведено способами медленного выпаривания, добавления антирастворителей, медленного охлаждения, диффузии из паровой фазы и индуцированной полимером кристаллизации. В большинстве экспериментов кристаллическую форму получить не удалось, что указывает на невозможность получения кристаллической формы А прямым способом.

На основании дополнительных результатов характеристики выявлено, что кристаллическая форма А представляет собой ангидрат с температурой плавления $139,4 \pm 2^\circ\text{C}$ (температура начала плавления). Для оценки стабильности образец кристаллической формы А хранили в условиях 80°C в течение 2 суток, $25^\circ\text{C}/\text{ОВ } 60\%$ в течение до 24 месяцев или $40^\circ\text{C}/\text{ОВ } 75\%$ в течение до 6 месяцев и характеризовали методом ПРД (порошковая рентгеновская дифракция) в ходе испытания и после испытания на стабильность. Результаты показали, что в течение всех указанных выше периодов наблюдения кристаллическая форма не изменяется, что свидетельствует о высокой физической стабильности кристаллической формы А в условиях хранения при 80°C или при $25^\circ\text{C}/\text{ОВ } 60\%$ в течение до 24 месяцев, или при $40^\circ\text{C}/\text{ОВ } 75\%$ в течение до 6 месяцев.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики дифракции, имеющие углы 2θ , независимо выбранные из приблизительно $14,8 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$ и $21,4 \pm 0,2^\circ$.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики дифракции, имеющие углы 2θ , независимо выбранные из приблизительно $14,8 \pm 0,2^\circ$, $15,6 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$ и $21,4 \pm 0,2^\circ$.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики дифракции, имеющие углы 2θ , независимо выбранные из приблизительно $12,2 \pm 0,2^\circ$, $12,9 \pm 0,2^\circ$, $14,8 \pm 0,2^\circ$, $15,6 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$ и $21,4 \pm 0,2^\circ$.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики дифракции, имеющие углы 2θ , независимо выбранные из приблизительно $12,2 \pm 0,2^\circ$, $12,9 \pm 0,2^\circ$, $14,8 \pm 0,2^\circ$, $15,6 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$, $17,7 \pm 0,2^\circ$, $18,5 \pm 0,2^\circ$, $20,7 \pm 0,2^\circ$ и $21,4 \pm 0,2^\circ$.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой по существу в соответствии с фиг. 1.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, сводные данные которой представлены в табл. 1.

Таблица 1. Порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы А

№ пика	Угол дифракции (2-тета)	Расстояние	Относительная интенсивность
1	5,432	16,26908	7,37
2	10,799	8,19295	2,40
3	12,188	7,26191	13,19
4	12,942	6,84040	13,51
5	14,820	5,97780	28,09
6	15,587	5,68534	19,63
7	16,350	5,42177	29,30
8	17,662	5,02158	13,62
9	18,452	4,80853	11,39
10	18,689	4,74791	8,26
11	20,729	4,28515	11,07
12	21,420	4,14847	100,00
13	22,035	4,03409	7,59
14	22,864	3,88958	6,70
15	23,684	3,75673	5,24
16	25,111	3,54646	2,43
17	26,525	3,36044	5,13
18	26,906	3,31381	6,41
19	27,126	3,28741	6,92
20	29,641	3,01393	4,61
21	30,755	2,90724	2,58
22	36,421	2,46692	1,29

В некоторых предпочтительных воплощениях изобретения кристаллическая форма А имеет температуру плавления $139\pm 2^{\circ}\text{C}$ (температура начала плавления).

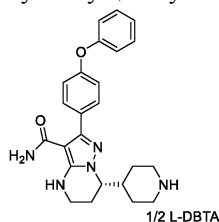
В некоторых предпочтительных воплощениях изобретения кристаллическая форма А характеризуется ДСК по существу в соответствии с фиг. 2.

В некоторых предпочтительных воплощениях изобретения кристаллическая форма А характеризуется ТГА по существу в соответствии с фиг. 3.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А обладает незначительной гигроскопичностью. В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А является несольватированной.

В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А имеет по существу такую же порошковую рентгеновскую дифрактограмму (ПРД) после хранения при 40°C и ОВ 75% в течение до 6 месяцев. В некоторых воплощениях изобретения кристаллическая форма А имеет по существу такую же порошковую рентгеновскую дифрактограмму (ПРД) после хранения при 25°C и ОВ 60% в течение до 24 месяцев.

В настоящем документе также раскрыта кристаллическая форма соединения BG-13, которая имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму по существу в соответствии с фиг. 11



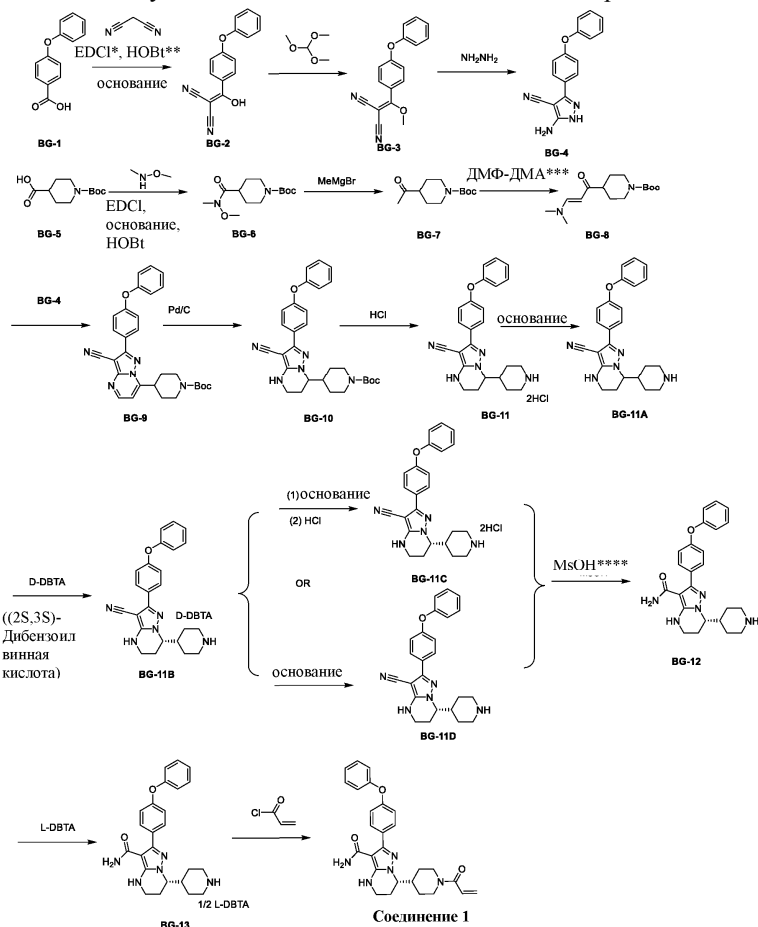
Соединение BG-13.

В некоторых из воплощений изобретения кристаллическая форма BG-13 представляет собой монокристалл, который имеет размеры элементарной ячейки, включающие: $a=16,7939(4) \text{ \AA}$, $b=7,9871(2) \text{ \AA}$, $c=23,5438(5) \text{ \AA}$, $\alpha=90,00$ град., $\beta=108,0460(10)$ град., $\gamma=90,00$ град.

На основании рентгеноструктурного анализа монокристалла промежуточного соединения BG-13 авторы изобретения сделали вывод, что абсолютной конфигурацией соединения 1 должна быть S-конфигурация.

В настоящем документе также раскрыт способ получения соединения 1 и меченного дейтерием соединения 1, например методики, показанные на схеме 1. Новые способы синтеза и методики кристаллизации/перекристаллизации соединения 1 через кристаллическую форму А, раскрытую в настоящем документе, позволяют преодолеть многочисленные проблемы, связанные с описанными ранее способами, такие как получение ключевого хирального промежуточного соединения с оптической чистотой более 98%, повышение чистоты соединения 1 до достижения критериев приемлемости спецификации, контроль содержания примесей соединения 1, и обеспечивает многочисленные преимущества по сравнению с существующими способами. В частности, раскрытые в настоящем документе способы особенно приемлемы для воспроизводимого процесса производства соединения 1 в промышленном масштабе высокого качества и с высокими выходами. В альтернативном способе соединение BG-9 или его аналоги на схеме 1 могут быть асимметрично восстановлены с энантиоселективностью от низкой до превосходной степени (от 5 до 95% эи). Процессы на других стадиях аналогичны приведенным на схеме 1.

Схема 1. Получение соединения 1 и меченного дейтерием соединения 1

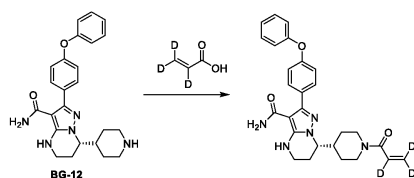


* 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид,

**** Гидроксibenзотриазол.**

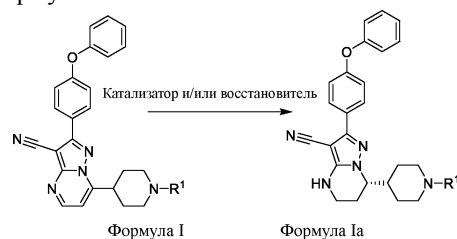
*** N,N-диметилформаида диметилацеталь,

**** Метансульфоновая кислота



Меченное дейтерием соединение 1

В настоящем документе также раскрыт способ получения соединения формулы Ia, включающий асимметрическое восстановление соединения формулы I в присутствии катализатора и/или восстановителя с получением соединения формулы Ia



где R^1 представляет собой атом водорода или защитную группу аминогруппы.

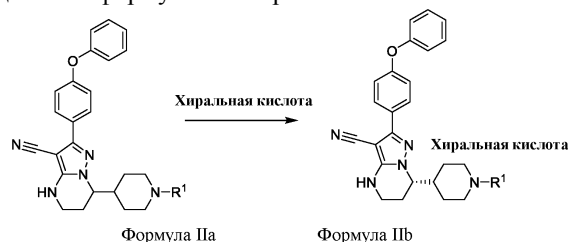
В некоторых воплощениях изобретения защитная группа аминокислоты включает, но не ограничена ими, ацетил, пропионил, бутирил, фенилацетил, бензоил, толуил, феноксиацетил (POA), метоксикарбонил, этоксикарбонил, 2,2,2-трихлорэтоксикарбонил, трет-бутилоксикарбонил (BOC), 2-йодэтоксикарбонил, карбобензоксид (CBZ), 4-метоксибензилоксикарбонил, (флуорен-9-илметокси)карбонил (Fmoc), 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил (Mtr), бензил, метил или 4-метоксибензил.

В некоторых воплощениях изобретения катализатор представляет собой нейтральную каталитическую систему или катионную каталитическую систему. В некоторых предпочтительных воплощениях изобретения катализатор представляет собой иридиевую каталитическую систему, включающую, но не

ограниченную ими, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -MeO-Biphep, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Binap, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Tol-Binap, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -xyl-Binap, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{S},\text{S}$ или $\text{R},\text{R})$ -Diop, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -P-Phos, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Tol-P-Phos, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Xyl-P-Phos, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -Me-DuPhos, $[\text{Ir}(\text{COD})\text{Cl}]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -SegPhos, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Ship, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Siphos, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Siphos-PE, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -MonoPhos, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -tol-SDP, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{S},\text{S}$ или $\text{R},\text{R})$ -Diop, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{S},\text{R}$ или $\text{R},\text{S})$ -Josiphos, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Binap, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -MeO-Biphep, $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -Synphos, или $[\text{Ir}(\mu\text{-Cl})(\text{cod})]_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -дифторфосфор $[\text{Ir}(\text{cod})_2]^+\text{X}^-$ (X : например, BF_4 , NO_3 , OTf , PF_6 , SbF_6 и BarF) и соответствующие лиганды, как описано выше (Wen-Bo et al., J. AM. CHEM. SOC. 125, 10536-10537 2003. Damien et al., J. Org. Chem. 77, 4544-4556 2012. Milos et al., Org. Process Res. Dev. 16, 1293-1300, 2012.); родиевую каталитическую систему, включающую, но не ограниченную ими, $[\text{Rh}(\text{COD})_2]\text{BF}_4$ с описанными выше лигандами (Xiang-Ping et al., Top Organomet Chem 36, 313-354, 2011); или рутениевую каталитическую систему, включающую, но не ограниченную ими, $\text{RuCl}_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -BINAP/ $(\text{R}$ или $\text{S})$ -DAIPEN, $\text{RuCl}_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -BINAP/ $(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -DPEN, $\text{RuCl}_2/(\text{S}$ или $\text{R})$ -BINAP (S,S или $\text{R},\text{R})$ -DACH, $\text{RuCl}_2/[(\text{R}$ или $\text{S})$ -Tol-BINAP] $[(\text{S},\text{S}$ или $\text{R},\text{R})$ -DPEN], $\text{RuCl}_2/(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -Me-DuPHOS/ $(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -DPEN, $\text{RuCl}_2/(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -Et-DuPHOS/ $(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -DPEN, $\text{RuCl}_2/(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -Et-DuPHOS/ $(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -DACH, $\text{RuCl}_2/(\text{S},\text{S}$ или $\text{R},\text{R})$ -i-Pr-DuPHOS/ $(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -DPEN, $\text{RuCl}_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -HexaPHEMP/ $(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -DPEN, $\text{RuCl}_2/(\text{R}$ или $\text{S})$ -MeO-BIPHEP/ $(\text{R},\text{R}$ или $\text{S},\text{S})$ -DPEN (Christopher et al., Adv. Synth. Catal. 345, 195-201 2003. Julian et al., Adv. Synth. Catal. 345, 300-307, 2003).

Было обнаружено, что описанный выше способ приводит к превосходной энантиоселективности вплоть до 95% эи за счет использования описанного выше катализатора, особенно нейтральной или катионной иридиевой каталитической системы.

В настоящем документе также раскрыт способ разделения соединения формулы IIa с получением соединения формулы IIb или повышения хиральной чистоты соединения формулы IIb, включающий обработку рацемического соединения формулы IIa хиральной кислотой



где R^1 представляет собой атом водорода, метил, бензил, 4-метоксибензил или другие традиционные защитные группы аминогруппы, как упомянуто выше.

В некоторых воплощениях изобретения хиральная кислота включает, но не ограничена ими, L-яблочную кислоту, D-яблочную кислоту, L-миндальную кислоту, D-миндальную кислоту, L-камфорсульфоновую кислоту, D-камфорсульфоновую кислоту, L-винную кислоту, D-винную кислоту, L-DBTA, D-DBTA, L-DTTA (ди-п-толуол-L-винная кислота) или D-DTTA (ди-п-толуол-D-винная кислота).

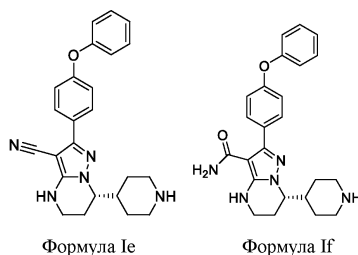
В настоящем документе также раскрыт способ разделения соединения формулы Ic с получением соединения формулы Id или повышения хиральной чистоты соединения формулы Id, включающий обработку рацемического соединения формулы Ic хиральной кислотой



где R^1 представляет собой атом водорода, метил, бензил, 4-метоксибензил или другие традиционные защитные группы аминогруппы, как упомянуто выше.

В некоторых воплощениях изобретения хиральная кислота включает, но не ограничена ими, L-яблочную кислоту, D-яблочную кислоту, L-миндальную кислоту, D-миндальную кислоту, L-камфорсульфоновую кислоту, D-камфорсульфоновую кислоту, L-винную кислоту, D-винную кислоту, L-DBTA, D-DBTA, L-DTTA или D-DTTA.

В настоящем документе также раскрыто соединение формулы Ie или его соль, или соединение формулы If, или его соль, используемые для получения соединения 1



Дополнительно в настоящем документе также предложены способы получения кристаллической формы А. Раскрытая в настоящем документе кристаллическая форма может быть получена путем кристаллизации раскрытого в настоящем документе соединения из подходящей системы растворителей, включающей по меньшей мере один растворитель, которая может быть достигнута способами самопроизвольного осаждения (выпаривания), охлаждения и/или добавления антирастворителя (в котором раскрытое в настоящем документе соединение обладает относительно низкой растворимостью), чтобы достичь перенасыщения в системе растворителей. Кристаллизация может быть также достигнута путем применения или без применения затравочных кристаллов в зависимости от пригодности для кристаллизации раскрытых в настоящем документе кристаллических форм.

В некоторых воплощениях изобретения способ получения кристаллической формы А включает стадии растворения (S)-7-(1-акилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамида (соединения 1) в ДХМ (дихлорметан), замену растворителя на ЭА (этилацетат), перекристаллизацию из ЭА/МТБЭ (этилацетат/метил-трет-бутиловый эфир) с получением требуемой кристаллической формы.

В некоторых воплощениях изобретения способ получения кристаллической формы А включает стадии растворения соединения 1 в ЭА, добавления гексана с получением требуемой кристаллической формы.

В некоторых воплощениях изобретения способ получения кристаллической формы А осуществляют путем добавления антирастворителя в раствор твердого соединения 1 или неочищенной формы А в растворителе для растворения твердого вещества, где антирастворитель включает, но не ограничен ими, H₂O и н-гептан, а растворитель твердого вещества включает, но не ограничен ими, ацетон, DMAc (N,N-диметилацетамид), EtOAc (этилацетат), ДХМ, толуол и 2-Ме-ТГФ (2-метилтетрагидрофуран).

В некоторых воплощениях изобретения способ получения кристаллической формы А осуществляют путем добавления раствора твердого соединения 1 или неочищенной формы А в растворителе к антирастворителю и оставляют на достаточный период времени для взаимодействия органического пара с раствором в герметичном реакторе, где растворитель включает, но не ограничен ими, ацетон и EtOAc, а антирастворитель включает, но не ограничен ими, н-гептан.

В настоящем документе также раскрыта фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество кристаллической формы А и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых воплощениях изобретения фармацевтическую композицию применяют путем перорального введения. В некоторых предпочтительных воплощениях изобретения фармацевтическая композиция включает от 1 до 99 мас.% кристаллической формы А. В некоторых более предпочтительных воплощениях изобретения фармацевтическая композиция включает от 1 до 70 мас.% кристаллической формы А. В некоторых наиболее предпочтительных воплощениях изобретения фармацевтическая композиция включает от 10 до 30 мас.% кристаллической формы А.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения или профилактики заболевания, связанного с нежелательной активностью Btk у субъекта путем введения субъекту кристаллической формы А.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения или профилактики заболевания, выбранного из аллергического заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, рака или комбинации двух или более из них, у субъекта путем введения субъекту кристаллической формы А.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения или профилактики В-клеточного пролиферативного заболевания у субъекта путем введения субъекту кристаллической формы А.

В некоторых воплощениях изобретения В-клеточное пролиферативное заболевание выбрано из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мантийноклеточной лимфомы (МКЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (ВМ), лимфомы из клеток маргинальной зоны (МЗЛ), волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), лейкоза по типу лимфомы Беркитта (БЛ).

В некоторых воплощениях изобретения В-клеточное пролиферативное заболевание представляет собой рецидивирующее/рефрактерное (Р/Р) В-клеточных злокачественных новообразований, включающих, но не ограниченных ими, Р/Р МКЛ, Р/Р ХЛЛ, Р/Р МЛЛ, Р/РВМ.

Раскрытую в настоящем документе кристаллическую форму А можно применять в производстве лекарственного средства для лечения по меньшей мере одного заболевания, связанного с нежелательной активностью Btk у субъекта.

Раскрытую в настоящем документе кристаллическую форму А можно применять в производстве лекарственного средства для лечения у субъекта заболевания, выбранного из аллергического заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, рака или комбинации двух или более из них.

Раскрытую в настоящем документе кристаллическую форму А можно применять в производстве лекарственного средства для лечения у субъекта В-клеточного пролиферативного заболевания, выбранного из В-клеточных злокачественных новообразований или рецидивирующих/рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразований.

Обновленные данные клинических исследований по-прежнему показывают, что соединение 1 хорошо переносится при лечении ранее не подвергавшихся лечению (НПЛ) и рецидивирующих/рефрактерных (Р/Р) В-клеточных злокачественных новообразований, например при ВМ, с очень высокой частотой частичного ответа (ОВЧО) более 40% в подлежащей оценке популяции из 42 пациентов и общей частотой ответа (ОЧО) 90% у 42 пациентов, подлежащих оценке эффективности, при медиане периода последующего наблюдения 12,3 месяца, и при ХЛЛ/МЛЛ с очень высокой общей частотой ответа (94%) и очень низкой частотой прекращения лечения (3%) при медиане периода последующего наблюдения для оценки эффективности, составляющей 10,5 месяцев.

Определения

Если где-либо в данном документе не указано иное, все остальные технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понятное обычным специалистам в области техники, к которой относится изобретение.

При использовании в настоящем документе, в том числе в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают их соответствующие ссылки на множественное число, если контекст явным образом не требует иного. Так, например, ссылка на "кристаллическую форму" включает одну или более таких различных кристаллических форм, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные обычным специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или заменены способами, описанными в настоящем документе.

Как раскрыто в настоящем документе, кристаллическая форма представляет собой практически чистую кристаллическую форму. Используемый в настоящем документе термин "практически чистая" относится к по меньшей мере 85 мас.%, предпочтительно по меньшей мере 95 мас.%, более предпочтительно по меньшей мере 99 мас.% кристаллической формы А, раскрытой в настоящем документе.

Для раскрытых в настоящем документе кристаллических форм представлены сводные данные только для основных пиков (т.е. наиболее характерных, значимых, уникальных и/или воспроизводимых пиков); в спектрах рентгеновской дифракции, полученных традиционными способами, могут быть выявлены дополнительные пики. Описанные выше основные пики могут быть воспроизведены в пределах границ погрешности (± 2 от последнего знака после запятой или $\pm 0,2$ от указанной величины).

Как раскрыто в настоящем документе, "порошковая рентгеновская дифрактограмма по существу соответствует фиг. 1" относится к порошковой рентгеновской дифрактограмме, на которой выявлены такие же основные пики, как на фиг. 1, где основные пики относятся к пикам с относительной интенсивностью более 10%, предпочтительно более 20% относительно наибольшего пика (интенсивность которого принимают за 100%) на фиг. 1.

Во всем тексте данного описания и последующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "включать" и его варианты, такие как "включает" и "включающий", следует понимать как означающие включение указанного целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа, или стадии, или группы целых чисел или стадий. Используемый в настоящем документе термин "включающий" может быть заменен термином "содержащий" или иногда при использовании в настоящем документе термином "имеющий".

Используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или расстройства является достаточным, чтобы такое лечение повлияло на заболевание, расстройство или симптом. "Терапевтически эффективное количество" может изменяться в зависимости от соединения, заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, тяжести заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста подлежащего лечению субъекта и/или массы тела подлежащего лечению субъекта. Соответствующее количество в любом конкретном случае может быть очевидным специалистам в данной области техники или может быть определено с помощью стандартных экспериментов. В случае комбинированной терапии "терапевтически эффективное количество" относится к общему количеству объектов комбинации для действенного лечения заболевания, расстройства или состояния.

Фармацевтическую композицию, включающую раскрытое в настоящем документе соединение, можно вводить нуждающемуся в этом субъекту пероральным, ингаляционным, ректальным, паренте-

ральным или местным путем. Для перорального введения фармацевтическая композиция может представлять собой стандартную твердую лекарственную форму, такую как таблетка, порошок, гранула, капсула и т.п., жидкую лекарственную форму, такую как водная или масляная суспензия, или другую жидкую лекарственную форму, такую как сироп, раствор, суспензия и т.п.; для парентерального введения фармацевтическая композиция может представлять собой раствор, водный раствор, концентрат масляной суспензии, лиофилизированный порошок и т.п. Предпочтительно лекарственная форма фармацевтической композиции выбрана из таблетки, таблетки, покрытой оболочкой, капсулы, суппозитория, назального спрея или инъекционного препарата, более предпочтительно таблетки или капсулы. Фармацевтическая композиция может представлять собой отдельную единицу для введения в точной дозе. Кроме того, фармацевтическая композиция может дополнительно включать дополнительные активные ингредиенты.

Все лекарственные формы раскрытой в настоящем документе фармацевтической композиции могут быть получены традиционными способами в области фармацевтики. Например, активный ингредиент можно смешивать с одним или более эксципиентов и впоследствии получать желаемую лекарственную форму. "Фармацевтически приемлемый эксципиент" относится к традиционным фармацевтическим носителям, подходящим для желаемой фармацевтической лекарственной формы, например, к разбавителю, раствору-носителю, такому как вода, различные органические растворители и т.д., наполнителю, такому как крахмал, сахароза и т.д., к связующему веществу, такому как производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон (ПВП); смачивающему агенту, такому как глицерин; разрыхлителю, такому как агар, карбонат кальция и бикарбонат натрия; усилителю всасывания, такому как соединение четвертичного аммония; поверхностно-активному веществу (ПАВ), такому как гексадеканол; абсорбирующему носителю, такому как каолин и жирная глина; смазывающему веществу, такому как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, полиэтиленгликоль и т.д. Кроме того, фармацевтическая композиция дополнительно содержит другие фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как диспергирующий агент, стабилизатор, загуститель, комплексообразующий агент, буферный агент, усилитель проницаемости, полимер, ароматическое вещество, подсластитель и краситель.

Термин "заболевание" относится к любому заболеванию, дискомфорту, недомоганию, симптомам или показаниям и может быть взаимозаменяемым с термином "расстройство" или "состояние".

Сокращения:

AcOH	Уксусная кислота
НЯ	Нежелательные явления
2 р/сут	Два раза в сутки
ХЛЛ	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Конц.	Концентрированный
D-DBTA	(2S,3S)-Дибензоил винная кислота
DDQ	2,3-Дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон
ДХМ	Дихлорметан
DIEA	N,N-диизопропилэтиламин
ДВККЛ	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома
DMAc	N,N-диметилацетамид
ДМФ	N,N-диметилформамид
ДМФ-ДМА	N,N-диметилформамида диметилацеталь
DMCO	Диметилсульфоксид
ДСК	Дифференциальная сканирующая калориметрия
ДСП	Динамическая сорбция паров
ЭА	Этилацетат, EtOAc
EDCI	1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид
EtOH	Этанол
ФЛ	Фолликулярная лимфома
ГХ	Газовый хроматограф
ГХМС	Газовая хроматография с масс-спектрометрией
HOAc	Уксусная кислота
NOBt	Гидроксibenзотриазол
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
IPA	Изопропиловый спирт
IPAc	Изопропилацетат
ВПК	Внутрипроизводственный контроль
КФ	Метод Карла-Фишера

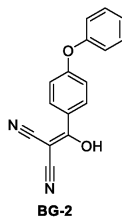
L-DBTA	(2R,3R)-Дибензоил винная кислота
ПКО	Предел количественного определения
МКЛ	Мантийноклеточная лимфома
MeCN или ACN	Ацетонитрил
MeMgBr	Метилмагния бромид
MeOH	Метанол
2-Ме-ТГФ	2-Метилтетрагидрофуран
МИБЭ	4-метил-2-пентанон
MsOH	Метансульфоновая кислота
МТБЭ	Метил-трет-бутиловый эфир
НХЛ	Неходжкинская лимфома
НМ	Не менее
NMP	1-Метил-2-пирролидон
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
НБ	Не более
ОЧО	Общая частота ответа
Pd	Палладий
pH	Концентрация иона водорода
РОА	Феноксиацетил
1 р/сут	Один раз в сутки
ОВ	Относительная влажность
МКЛ	Мелкоклеточная лимфома
КТ	Комнатная температура
ТЭА	Триэтиламин
ТГА	Термогравиметрический анализ
ТГФ	Тетрагидрофуран
НПЛ	Ранее не получавшие лечение
ОВЧО	Очень высокий частичный ответ
ПРД	Порошковая рентгеновская дифракция
ВМ	Макроглобулинемия Вальденстрема

Примеры

В настоящем изобретении дополнительно приведены описанные ниже примеры, иллюстрирующие изобретения, но не ограниченные ими.

Пример 1. Получение (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоамида (соединения 1) и его кристаллической формы А

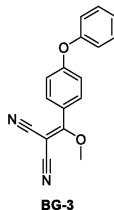
Стадия 1. Синтез соединения BG-2



В атмосфере азота к раствору ЭА (5 об.), НОВТ (1,2 экв.), EDCI (1,2 экв.), 4-феноксibenзойной кислоты (BG-1, 80 кг, 1,0 экв.) и малонитрила (1,2 экв.) добавляют ТЭА (2,4 экв.) при 10°C. Впоследствии смесь перемешивают при КТ до завершения реакции. Затем смесь центрифугируют, и осадок промывают ЭА. Фильтрат дважды промывают водным раствором NaHCO₃ и NH₄Cl. Органическую фазу дважды промывают 1,5н. H₂SO₄ и перемешивают. Раствор концентрируют, осаждают из метанола и очищенной воды. Твердое вещество собирают центрифугированием и высушивают в вакууме. Таким образом, получают 79,9 кг BG-2.

¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,62 (d, J=8,6 Гц, 2H), 7,46-7,38 (m, 2H), 7,18 (t, J=7,4 Гц, 1H), 7,06 (d, J=8,0 Гц, 2H), 6,94 (d, J=8,6 Гц, 2H).

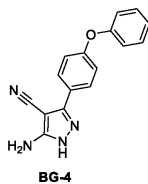
Стадия 2. Синтез соединения BG-3



В атмосфере азота раствор BG-2 (79,9 кг, 1,0 экв.) в MeCN (5,0 об.) добавляют в триметоксиэтан (12,0 об.) при 85°C. Полученную в результате смесь перемешивают при КТ до завершения реакции. Отбирают образец на анализ ВЭЖХ. Концентрируют в вакууме. Остаток осаждают из i-PrOH и гексана. Смесь центрифугируют, и осадок промывают гексаном и высушивают в вакууме. Таким образом, получают 71,7 кг BG-2.

¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,70 (d, J=8,4 Гц, 2H), 7,52-7,45 (m, 2H), 7,28 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,22-7,06 (m, 4H), 3,93 (s, 3H).

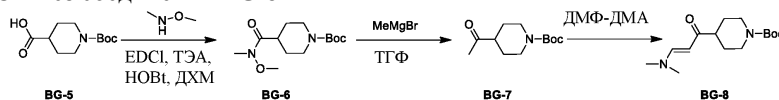
Стадия 3. Синтез соединения BG-4



В атмосфере азота к раствору BG-3 (71,6 кг, 1,0 экв.) в этаноле (2,5 об.) гидроксида гидразиния (1,0 экв.) в этаноле (0,6 об.) по каплям загружают в реактор при температуре ниже 15°C. Раствор нагревают до КТ и перемешивают до завершения реакции. В реактор добавляют воду (4,0 об.). Затем раствор охлаждают до 5°C, центрифугируют, и осадок промывают водой (1,0 об.). Осадок высушивают в вакууме. Таким образом, было получено 66,9 кг продукта.

¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 12,11 (br s, 1H), 7,80 (d, J=8,8 Гц, 2H), 7,46-7,39 (m, 2H), 7,18 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,12-7,04 (m, 4H), 6,43 (br s, 2H).

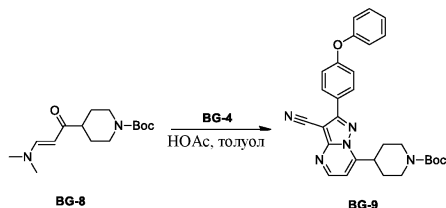
Стадии 4-6. Синтез соединения BG-8



В смесь ДХМ (8,0 об.), BG-5 (80,0 кг, 1,0 экв.), N,O-диметилгидроксиламина гидрохлорида (1,2 экв.), HOBT (1,2 экв.) и EDCI (1,2 экв.) загружают по каплям ТЭА (2,6 экв.) при температуре ниже 15°C, смесь перемешивают при КТ до завершения реакции, центрифугируют и осадок дважды промывают ДХМ (1,0 об.). Фильтрат промывают 20% водным раствором NH₄Cl (3×4,0 об.). Фильтрат концентрируют в вакууме с получением неочищенного продукта BG-6, который используют в следующей стадии без дополнительной очистки. Остаток растворяют в смеси толуола (5,0 об.) и ТГФ (1,0 об.), охлаждают до 10°C, загружают по каплям MeMgBr (1,4 экв.) при 10°C, а затем перемешивают при КТ до завершения реакции. Раствор охлаждают до температуры ниже 10°C. Загружают по каплям насыщенный водный раствор NH₄Cl при температуре ниже 10°C. Смесь центрифугируют, разделяют, фильтруют, и органическую фазу дважды промывают водным раствором NaCl. Органическую фазу концентрируют в вакууме с получением неочищенного продукта, который используют в следующей стадии без дополнительной очистки. Раствор остатка в ДМФ (2,5 об.) и в смеси ДМФ-ДМА (2,5 об.) перемешивают при 110°C до завершения реакции. Реакционную смесь охлаждают, концентрируют, а затем добавляют ДХМ. Конечную смесь промывают насыщенным водным раствором NH₄Cl. Органический слой концентрируют и осаждают путем загрузки гексана. Смесь центрифугируют и собирают осадок. Осадок высушивают в вакууме. Таким образом, было получают 82,2 кг желаемого продукта.

¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 7,49 (d, J=12,6 Гц, 1H), 5,01 (d, J=12,6 Гц, 1H), 3,99-3,82 (m, 2H), 3,14-2,94 (m, 2H), 2,89-2,61 (m, 6H), 2,49-2,37 (m, 1H), 1,66-1,56 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,39-1,20 (m, 2H).

Стадия 7. Синтез соединения BG-9

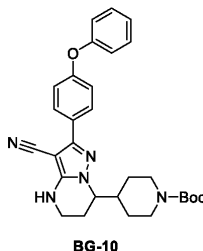


В атмосфере азота смесь толуола (8,0 об.), AcOH (0,5 об.), BG-8 (1,2 экв.) и BG-4 (66,9 кг, 1,0 экв.) нагревают до 95°C и перемешивают до завершения реакции. Смесь охлаждают, концентрируют и осаж-

дают из метанола. Затем смесь центрифугируют, и осадок промывают метанолом. Осадок высушивают в вакууме. Таким образом, было получено 107,8 кг продукта.

^1H ЯМР (ДМСО- d_6) δ 8,78 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 8,15-8,07 (m, 2H), 7,51-7,41 (m, 2H), 7,34 (d, $J=4,6$ Гц, 1H), 7,27-7,19 (m, 3H), 7,17-7,10 (m, 2H), 4,24-4,02 (m, 2H), 3,81-3,69 (m, 1H), 3,12-3,82 (m, 2H), 2,15-2,04 (m, 2H), 1,76-1,60 (m, 2H), 1,43 (s, 9H).

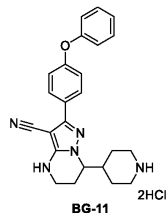
Стадия 8. Синтез соединения BG-10



В смесь ТГФ (10,0 об.), BG-9 (13,0 кг, 1,0 экв.) и D-DBTA (1,0 экв.) в атмосфере N_2 загружают Pd/C (10% мас./мас.), в реактор вводят газ водород и давление водорода поддерживают при 1,8 МПа. Реактор медленно нагревают до 40°C и перемешивают до завершения реакции. Смесь охлаждают, фильтруют и осадок промывают ТГФ. Фильтрат собирают и концентрируют в вакууме. Добавляют ДХМ. Остаток промывают водным раствором NaHCO_3 , концентрируют и осаждают из МТБЭ и гексана, затем центрифугируют. Осадок собирают и высушивают в вакууме с получением желаемого соединения (выход: 94,8% и чистота: 98,5%).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ 7,82-7,76 (m, 2H), 7,56-7,51 (m, 1H), 7,45-7,37 (m, 2H), 7,21-7,14 (m, 1H), 7,12-7,03 (m, 4H), 4,09-3,91 (m, 3H), 3,30-3,22 (m, 2H), 2,82-2,55 (m, 2H), 2,18-1,99 (m, 2H), 1,98-1,86 (m, 1H), 1,69-1,58 (m, 1H), 1,56-1,45 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,32-1,13 (m, 2H).

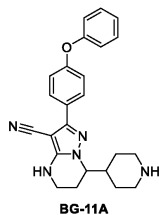
Стадия 9. Синтез соединения BG-11



К раствору BG-10 (100,0 кг, 1,0 экв.) в ДХМ (6,0 об.) добавляют по каплям раствор HCl в EtOH (20,9% мас./мас., 2,0 об.) в атмосфере азота. Смесь перемешивают до завершения реакции. К раствору добавляют МТБЭ (4,0 об.), охлаждают. Осадки собирают центрифугированием и промывают гексаном (2,0 об.), затем указанный осадок суспендируют в гексане (5 об.) и снова центрифугируют. Осадок промывают гексаном (2,0 об.) и высушивают в вакууме. Таким образом, получают 85,2 кг продукта.

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ 9,25-8,85 (m, 2H), 7,84-7,70 (m, 2H), 7,47-7,37 (m, 2H), 7,18 (t, $J=7,4$ Гц, 1H), 7,12-7,03 (m, 4H), 5,73 (br s, 2H), 4,12-4,03 (m, 1H), 3,25-3,19 (m, 4H), 2,90-2,73 (m, 2H), 2,28-2,12 (m, 1H), 2,10-2,00 (m, 1H), 1,99-1,86 (m, 1H), 1,84-1,52 (m, 4H).

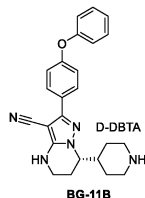
Стадия 10. Синтез соединения BG-11A



Смесь BG-11 (85,0 кг, 1,0 экв.) в воде (6,0 об.) и NaOH (3,0 экв.) перемешивают до завершения реакции при КТ. Осадок собирают и суспендируют в МТБЭ (6,0 об.). Затем смесь центрифугируют, чтобы собрать осадок. Осадок высушивают в вакууме. Таким образом, было получено 71,3 кг продукта.

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ 7,82-7,74 (m, 2H), 7,54-7,49 (m, 1H), 7,45-7,38 (m, 2H), 7,21-7,14 (m, 1H), 7,12-7,04 (m, 4H), 4,03-3,95 (m, 1H), 3,29-3,21 (m, 2H), 3,00-2,87 (m, 2H), 2,46-2,31 (m, 2H), 2,11-1,83 (m, 3H), 1,58-1,12 (m, 4H).

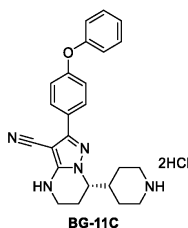
Стадия 11. Синтез соединения BG-11B



Смесь этанол/вода/уксусная кислота (7:3:1, 46 об.) и BG-11A (30 кг, 1,0 экв.) в реакторе нагревают до $70 \pm 5^\circ\text{C}$ в атмосфере азота, затем добавляют по каплям раствор D-DBTA (1,20 экв.) в смеси этанол/вода/уксусная кислота (7:3:1, 4 об.) при температуре не менее 65°C . Полученный в результате раствор перемешивают в течение 16 ч при $60-65^\circ\text{C}$, затем охлаждают до КТ. Твердое вещество собирают центрифугированием и промывают этанолом (2,0 об.). Осадок суспендируют в смешанном растворителе этанол/вода/АсОН (7:3:1, 20 об.) в течение 16 ч при 55°C и охлаждают до КТ. Твердое вещество собирают центрифугированием, промывают этанолом (2,0 об.). Осадок высушивают в вакууме (выход: 37,9%).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ 8,76 (br s, 2H), 7,99-7,89 (m, 4H), 7,83-7,75 (m, 2H), 7,66-7,57 (m, 3H), 7,52-7,45 (m, 4H), 7,45-7,39 (m, 2H), 7,21-7,14 (m, 1H), 7,13-7,03 (m, 4H), 5,64 (s, 2H), 4,08-4,00 (m, 1H), 3,29-3,19 (m, 4H), 2,85-2,72 (m, 2H), 2,21-1,40 (m, 7H).

Стадия 12. Синтез соединения BG-11C

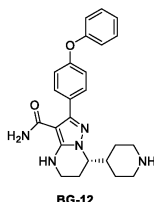


К смеси дихлорметана (15,0 об.) и 20,0% водного раствора КОН (3,0 об.) добавляют порциями BG-11B (48,0 кг, 1,0 экв.) в атмосфере азота при КТ. После завершения реакции органический слой собирают, и водный слой экстрагируют дихлорметаном (5,0 об.). Органические слои объединяют. Конц. HCl (0,36 об.) добавляют к указанным выше органическим слоям при КТ. Полученную в результате смесь перемешивают до завершения реакции. Твердое вещество собирают центрифугированием и промывают дихлорметаном (1,0 об.). Собранное твердое вещество суспендируют МТБЭ (6,0 об.). Твердое вещество собирают центрифугированием и промывают МТБЭ (1,0 об.), затем высушивают в вакууме. Таким образом, было получено 31,5 кг продукта (выход: 100%).

Стадия 12. Синтез соединения BG-11D (альтернативное промежуточное соединение)

ACN (5,0 об.), мягкую воду (10,0 об.), КОН (5,0 экв.) загружают в реактор и перемешивают в течение по меньшей мере 15 мин. В реактор порциями загружают BG-11B (1,0 экв.). Смесь перемешивают до завершения реакции. Осадок собирают центрифугированием, суспендируют в смеси ACN (1,0 об.) и мягкой воды (5,0 об.) и высушивают в вакууме с получением продукта.

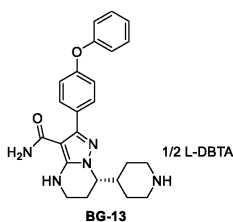
Стадия 13. Синтез соединения BG-12



Раствор BG-11C (15,0 кг, 1,0 экв.) в MsOH (2,5 об.) перемешивают при 85°C в атмосфере азота до завершения реакции. После охлаждения до 5°C в систему добавляют по каплям очищенную воду (4,0 об.) и поддерживают температуру не более 35°C (очевидно, температуру поднимают). Полученный в результате раствор перемешивают в течение 16 ч при 30°C , а затем промывают ДХМ (2 раза по 3,0 об.). Водную фазу собирают. К водной фазе добавляют ДХМ (6,0 об.), смесь охлаждают до 5°C . Значение pH доводят до 11-12 20% водным раствором NaOH (очевидно, температуру поднимают) при перемешивании при температуре не выше 30°C . Органическую фазу отделяют и собирают. Водную фазу экстрагируют ДХМ (3,0 об.). Органические слои объединяют и концентрируют. К остатку добавляют МТБЭ (4,0 об.). Смесь концентрируют и осаждают из н-гептана. Твердое вещество собирают центрифугированием и высушивают в вакуумной печи. Таким образом, получают 12,55 кг продукта (выход: 94,9%).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ 7,52-7,46 (m, 2H), 7,45-7,38 (m, 2H), 7,21-7,13 (m, 1H), 7,12-7,03 (m, 4H), 6,64 (s, 1H), 3,99-3,90 (m, 1H), 3,29-3,22 (m, 2H), 3,03-2,90 (m, 2H), 2,48-2,36 (m, 2H), 2,03 (dd, $J=13,9, 5,6$ Гц, 2H), 2,14-1,99 (m, 1H), 1,97-1,85 (m, 1H), 1,65-1,15 (m, 3H).

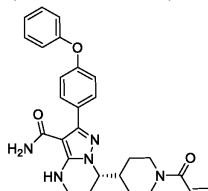
Стадия 14. Синтез соединения BG-13



Смесь MeOH (13,5 об.), очищенной воды (4,5 об.) и BG-12 (8,5 кг, 1,0 экв.) в реакторе нагревают до

50°C в атмосфере N₂. В смесь загружают по каплям раствор L-DBTA (0,7 экв.) в смеси MeOH/очищенная вода (1,5 об./0,5 об.), поддерживая при этом температуру при 50°C. После добавления смесь перемешивают в течение по меньшей мере 2 ч при 50°C, а затем охлаждают до КТ и перемешивают в течение по меньшей мере 16 ч при КТ. Осадок собирают центрифугированием и промывают MeOH (2,0 об.). Осадок высушивают в вакуумной печи. Таким образом, было получено 9,08 кг продукта (выход: 74,8%, значение эи более 98%).

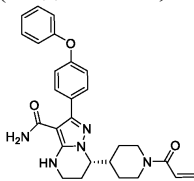
Стадия 15. Синтез (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропирозоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамид (соединения 1)



В атмосфере N₂ в реактор добавляют ACN (12,0 об.), воду (12,5 об.), BG-13 (8,0 кг, 1,0 экв.) и NaHCO₃ (2,5 экв.). Затем смесь охлаждают до температуры ниже -5-0°C. К смеси по каплям добавляют раствор акрилоилхлорида (1,1 экв.) в MeCN (0,5 об.) и перемешивают до завершения реакции. Затем в реактор добавляют ЭА (6,0 об.) и перемешивают. Органическую фазу собирают. Водный слой дополнительно экстрагируют ЭА (3,0 об.). Органические фазы объединяют и промывают раствором хлорида натрия. Органический слой объединяют и концентрируют.

Остаток очищают на колонке с силикагелем (2 массы), элюируя 3% мас./мас., метанола в ДХМ (21,0 об.). Раствор соединения 1 собирают и концентрируют в вакууме. Остаток осаждают из ЭА/МТБЭ (2,0 об.). Осадок собирают центрифугированием в качестве продукта.

Стадия 15. Синтез (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропирозоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамид (соединения 1, альтернативный способ)



Смесь CH₃CN (10,0 об.), очищенной воды (5,0 об.), NaOH (1,5 экв.) и BG-13 (1,0 экв.) перемешивают до получения прозрачного раствора. Затем EtOAc (6,0 об.) загружают в реакционную смесь и разделяют фазы. Органическую фазу собирают и дважды промывают 15% раствором хлорида натрия (3,0 об.). Органическую фазу, полученную, как описано выше, концентрируют и растворитель заменяют CH₃CN (остаточный объем: НБ 5,0 об.). Загружают CH₃CN (7,5 об.) и очищенную воду (12,5 об.) и охлаждают до 15-20°C. В реакционную смесь загружают L-(+)-винную кислоту (0,5 экв.) и NaHCO₃ (2,5 экв.). В реакционную смесь загружают по каплям раствор акрилоилхлорида (1,1 экв.) в CH₃CN (0,5 об.). После завершения реакции в реакционную смесь загружают EtOAc (6,0 об.), и органический слой собирают. Водную фазу дополнительно экстрагируют ЭА (3,0 об.). Органические слои объединяют, промывают 15% раствором хлорида натрия (5,0 об.) и концентрируют. Растворитель заменяют ДХМ (объем остатка: 1,5-2,0 об.) и очищают на колонке с силикагелем (силикагель: 100-200 меш, 2,0 мас./мас.; элюент: 3% мас./мас. MeOH в ДХМ (около 50 об.)). Собранный раствор концентрируют и заменяют растворитель EtOAc (4,0 об.). В остаток загружают по каплям МТБЭ (6,4 об.) при 50°C. Затем смесь охлаждают до 5°C, и осадок собирают центрифугированием (1,0 об.).

Стадия 16. Получение кристаллической формы А соединения 1

Осадок соединения 1, полученный, как описано выше, растворяют в 7,0 объемах ДХМ, а затем заменяют растворитель на ЭА. После перекристаллизации из ЭА/МТБЭ осадки собирают центрифугированием и высушивают в вакууме. Таким образом, было получено 4,44 кг продукта (выход: 70,2%).

Затем определяют характеристики продукта методом порошковой рентгеновской дифракции (ПРД), при этом дифрактограммы получают на рентгеновском порошковом дифрактометре PANalytical Empyrean со следующими параметрами ПРД: Длина волны рентгеновского излучения (Cu, Kα, Kα1 (Å): 1,540598, Kα2(Å): 1,544426; отношение интенсивности Kα2/Kα1: 0,50); заданные параметры рентгеновской трубки (45 КВ, 40 мА); щель расходимости (автоматическая); режим сканирования (непрерывный); диапазон сканирования (°2Θ) (3°-40); размер шага (°2Θ) (0,0131); скорость сканирования (°/мин) (около 10). Результат ПРД показал полученный в результате продукт в виде кристаллического вещества, показанного на фиг. 1.

Кривые дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), показанные на фиг. 2, были получены на ДСК TA Q2000 производства компании TA Instruments. Используемые параметры ДСК включают: температуру (25°C - желаемая температура); скорость нагревания (10°C/мин); способ (быстрое линейное изменение); кювета для образцов (алюминий, укупорка); газ для продувки (N₂). Результат ДСК

показал отчетливую точку плавления при 139,4°C (температура начала плавления).

Кривые термогравиметрического анализа (ТГА), показанные на фиг. 3, были получены на анализаторе ТГА TA Q5000 производства компании TA Instruments. Используемые параметры ДСК включают температуру (КТ - желаемая температура); скорость нагревания (10°C/мин); способ (быстрое линейное изменение); кювета для образцов (платина, открытая); газ для продувки (N₂). Результат ТГА показал безводное вещество без потери массы даже при температуре вплоть до 110°C.

Протонный ядерный магнитный резонанс (¹H-ЯМР), показанный на фиг. 4, снимают на спектрометре ЯМР Bruker 400 М в ДМСО-d₆. ¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) δ 7,50 (d, J=8,6 Гц, 2H), 7,46-7,38 (m, 2H), 7,17 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,08 (d, J=7,6 Гц, 2H), 7,05 (d, J=8,8 Гц, 2H), 6,85-6,72 (m, 1H), 6,67 (s, 1H), 6,07 (dd, J=16,8, 2,2 Гц, 1H), 5,64 (dd, J=10,4 Гц, 2,2 Гц, 1H), 4,55-4,38 (m, 1H), 4,17-3,94 (m, 2H), 3,33-3,22 (m, 2H), 3,08-2,88 (m, 1H), 2,67-2,51 (m, 1H), 2,36-2,15 (m, 1H), 2,12-1,82 (m, 2H), 1,79-1,65 (m, 1H), 1,63-1,49 (m, 1H), 1,38-1,08 (m, 2H).

Углеродный ядерный магнитный резонанс (¹³C-ЯМР), показанный на фиг. 5, снимают на спектрометре ЯМР Bruker 400М в ДМСО-d₆. ¹³C-ЯМР спектры для кристаллической формы А соединения 1.

Пример 2. Получение кристаллической формы А соединения 1

(S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамид (соединение 1) был получен способом, раскрытым в WO 2014173289 А, а затем дополнительно лиофилизирован с получением аморфной формы соединения 1. Раствор соединения 1 (200 мг, значение эи более 97%) в ЭА (8 мл) нагревают до 50°C, к раствору, полученному, как описано выше, добавляют по каплям гексан (8 мл) при температуре 50°C. Смесь охлаждают до КТ и перемешивают в течение 16 ч, затем фильтруют с получением 110 мг в виде белого твердого вещества. Полученное твердое вещество было охарактеризовано ПРД как форма А.

Пример 3. Получение кристаллической формы А соединения 1 (добавление антирастворителя)

Готовят навеску около 15 мг образца (кристаллическая форма А) в стеклянном флаконе емкостью 20 мл с последующим добавлением 0,4-1,2 мл соответствующего растворителя (см. табл. 2) до полного растворения твердого вещества. Затем смесь перемешивают с помощью магнитной мешалки со скоростью 800 об/мин до получения прозрачного раствора при КТ. Впоследствии к раствору добавляют соответствующий антирастворитель (см. табл. 2) до индукции осаждения или до достижения ввода всего количества антирастворителя 15,0 мл. Если осаждение не происходило, раствор переносят в условия медленного выпаривания при КТ. Полученное твердое вещество было охарактеризовано ПРД как форма А.

Таблица 2. Эксперименты с добавлением антирастворителя

Номер эксперимента	Растворитель	Антирастворитель
1	Ацетон	H ₂ O
2	DMAc	H ₂ O
3	EtOAc	н-гептан
4	ДХМ	н-гептан
5	Толуол	н-гептан
6	2-Ме-ТГФ	н-гептан

Пример 4. Получение кристаллической формы А соединения 1 (диффузия раствора из паровой фазы)

Около 15 мг образца (кристаллическая форма А) растворяют в 0,5-1,5 мл соответствующего растворителя (ацетона или EtOAc) до получения прозрачного раствора во флаконе емкостью 3 мл. Впоследствии раствор помещают во флакон емкостью 20 мл с 3 мл соответствующего антирастворителя (н-гептана). Флакон емкостью 20 мл герметично закрывают крышкой и выдерживают при КТ, предоставляя достаточно времени для взаимодействия органического пара с раствором. По окончании 11 дней прозрачные растворы переносят для выпаривания при КТ. Полученное твердое вещество было охарактеризовано ПРД как форма А.

Пример 5. Испытание на стабильность кристаллической формы А соединения 1 и чистоту соединения 1

(1) Испытание на физическую стабильность

Для испытания на термостабильность кристаллическую форму А соединения 1 выдерживают при 80°C в течение двух суток, и дифрактограммы ПРД до и после испытания показали отсутствие изменений кристаллической формы.

Исследования долгосрочной стабильности кристаллической формы А соединения 1 показало, что значительных изменений химической чистоты в условиях хранения при 25°C/ОВ 60% в течение вплоть до 24 месяцев не происходило (% площади пика: T₀ = 99,2% и T₁₂ = 99,2%) и в условиях хранения при 40°C/ОВ 75% в течение вплоть до 6 месяцев (% площади пика: T₀ = 99,1% и T₆ = 99,4%). Кроме того, изменений кристаллической формы и оптической чистоты не наблюдают в условиях хранения при 25°C/ОВ 60% в течение вплоть до 24 месяцев и в условиях хранения при 40°C/ОВ 75% в течение вплоть

до 6 месяцев.

(2) Испытание на гигроскопичность

Диаграммы динамической сорбции паров (ДСП), показанные на фиг. 6, были получены с помощью прибора ДСП SMS (Surface Measurement Systems) (система измерения шероховатости поверхности) DVS Intrinsic. Используемые параметры ДСП включают температуру (25°C); dm/dt (0,002%/мин); минимальная продолжительность стабильности dm/dt (10 мин); максимальное время уравнивания (180 мин); диапазон ОВ (ОВ 0% - ОВ 95%); размер шага ОВ (ОВ 10% от ОВ 0% до ОВ 90%, ОВ 5% от ОВ 90% до ОВ 95%). Как показано на фиг. 6, масса кристаллической формы А соединения I при ОВ 80% возрастает лишь незначительно, то есть приблизительно на 0,8%.

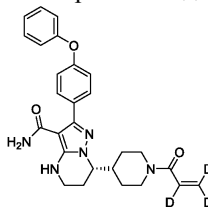
(3) Кристаллизация/перекристаллизация через форму А для улучшения чистоты соединения I

Кристаллизация/перекристаллизация через форму А является эффективным путем улучшения чистоты соединения I и контроля примесей в соединении I до достижения критериев приемлемости спецификации. См. пример, приведенный в табл. 3.

Таблица 3. Изменение чистоты после кристаллизации/перекристаллизации через форму А

Условия	Чистота соединения I
После очистки хроматографией на силикагеле	98,5 % площади
После первой перекристаллизации	99,3 % площади
После второй перекристаллизации	99,5 % площади

Пример 6. Синтез меченного дейтерием (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамида (меченного дейтерием соединения I)



К раствору 2,3,3- d_3 -акриловой кислоты (50 мг, 0,67 ммоль) и ДМФ (одна капля) в ДХМ (20 мл) добавляют по каплям оксалилхлорид (1,6н., 40,9 мл, 65,5 ммоль) при 0-5°C, затем перемешивают в течение 2 ч при КТ. Смесь концентрируют при пониженном давлении с получением неочищенного акрилоил- d_3 -хлорида.

К раствору (S)-2-(4-феноксифенил)-7-(пиперидин-4-ил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамида (диссоциировавшего из BG-13, см. стадию 15, альтернативный способ; 278 мг, 0,67 ммоль) в ДХМ (20 мл) и водного раствора NaHCO_3 (10 мл) добавляют по каплям раствор указанного выше акрилоил- d_3 -хлорида в ДХМ (5 мл) при 0-5°C и перемешивают в течение 2 ч при КТ. Объединенные органические слои высушивают над безводным сульфатом натрия, фильтруют, концентрируют при пониженном давлении и очищают препаративной тонкослойной хроматографией (преп-ТСХ) с получением 55 мг (17,5%) (S)-7-(1-(акрилоил- d_3)пиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамида в виде беловатого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 7,50-7,44 (m, 2H), 7,42-7,35 (m, 2H), 7,17-7,10 (m, 1H), 7,09-6,99 (m, 4H), 6,64 (s, 1H), 4,52-4,40 (m, 1H), 4,10-3,95 (m, 2H), 2,29-3,25 (m, 2H), 3,04-2,86 (m, 1H), 2,63-2,50 (m, 1H), 2,32-2,13 (m, 1H), 2,06-1,81 (m, 2H), 1,75-1,45 (m, 2H), 1,35-1,08 (m, 2H). МС (ИЭР, m/e) $[\text{M}+1]^+$ 475,2.

Пример 7. Исследование полиморфов соединения I

(1) Исследование полиморфов на основании аморфной формы - получение формы А из аморфной формы соединения I

(S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамид (соединение I) был получен способом, раскрытым в WO 2014173289 A, а затем лиофилизирован с получением аморфной формы соединения I.

Для каждого эксперимента, результаты которых представлены в табл. 4а-4к, табл. 5а-5е и табл. 6, готовят навеску около 20 мг соединения I в виде аморфной формы в стеклянном флаконе с последующим добавлением соответствующего растворителя. При необходимости смесь нагревают до получения прозрачного раствора. Затем смесь выдерживают при КТ без перемешивания в течение 1-2 суток и наблюдают за образованием любого твердого вещества из прозрачного раствора. Твердое вещество наблюдают с помощью микроскопии в поляризованном свете.

Таблица 4. Соединение 1 (значение $\varepsilon_i = 90\%$) в качестве исходного вещества

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	ЭА (мл)	Гексан (мл)			
1–1	0,5	0,1	Да	----	Твердое вещество отсутствует
1–2	0,5	0,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
1–3	0,5	0,3	Нет	Да	Масло
1–4	0,5	0,4	Нет	Да	Масло
1–5	1	0,2	Да	----	Твердое вещество отсутствует
1–6	1	0,3	Да	----	Твердое вещество отсутствует
1–7	1	0,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует
1–8	1	0,5	У	----	Твердое
					вещество отсутствует
1–9	1	0,6	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
1–10	1	0,7	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
1–11	1	0,8	Нет	Да	Масло
1–12	1	0,9	Нет	Да	Масло

Таблица 4а

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	ЭА (мл)	Гептан (мл)			
2–1	0,5	0,1	Да	----	Твердое вещество отсутствует
2–2	0,5	0,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
2–3	0,5	0,3	Нет	Да	Масло
2–4	0,5	0,4	Нет	Нет	Масло
2–5	1	0,2	Да	----	Твердое вещество отсутствует
2–6	1	0,3	Да	----	Твердое вещество отсутствует
2–7	1	0,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует

Таблица 4б

2-8	1	0,5	Да	----	Твердое вещество отсутствует
2-9	1	0,6	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
2-10	1	0,7	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
2-11	1	0,8	Да	----	Масло
2-12	1	0,9	Нет	Да	Масло

Таблица 4с

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1- 2d)
	ЭА (мл)	Циклогексан (мл)			
3-1	0,5	0,2	Да	----	Твердого вещества нет
3-2	0,5	0,3	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
3-3	0,5	0,4	Да	----	Масло
3-4	0,5	0,5	Да	----	Масло
3-5	0,5	0,6	Нет	Да	Масло
3-6	1	0,6	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
3-7	1	0,8	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
					вещества
3-8	1	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
3-9	1	1,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
3-10	1	1,4	Да	----	Масло

Таблица 4d

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	ДХМ (мл)	Гексан (мл)			
4–1	0,5	0,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует
4–2	0,5	0,6	Да	----	Твердое вещество отсутствует
4–3	0,5	0,8	Да	----	Твердое вещество отсутствует
4–4	0,5	1,0	Нет	Да	Масло
4–5	1,0	1,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует
4–6	1,0	1,6	Да	----	Твердое вещество отсутствует
4–7	1,0	1,8	Да	----	Твердое вещество
					отсутствует
4–8	1,0	2,0	Нет	Да	Масло

Таблица 4е

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	1,2-Дихлорэтан (мл)	Гексан (мл)			
5–1	0,5	0,6	Да	----	Твердое вещество отсутствует
5–2	0,5	0,8	Да	----	Твердое вещество отсутствует
5–3	0,5	1,0	Да	----	Твердое вещество отсутствует
5–4	0,5	1,1	Нет	Да	Масло
5–5	1,0	1,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует
5–6	1,0	1,6	Да	----	Твердое вещество отсутствует
5–7	1,0	1,8	Да	----	Твердое вещество отсутствует
5–8	1,0	2,0	Да	----	Твердое вещество отсутствует
5–9	1,0	2,2	Нет	Да	Масло

Таблица 4f

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	MeOAc (мл)	Гексан (мл)			
6–1	0,5	0,3	Да	----	Небольшое

					количество твердого вещества
6-2	0,5	0,4	Да	----	Масло
6-3	0,5	0,5	Да	----	Масло
6-4	0,5	0,6	Нет	Да	Масло
6-5	1,0	0,6	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
6-6	1,0	0,8	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
6-7	1,0	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
6-8	1,0	1,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
6-9	1,0	1,4	Нет	Да	Масло

Таблица 4g

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	нагревание	Результат (1– 2d)
	Толуол (мл)	Гексан (мл)			
7-1	1,0	0,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
7-2	1,0	0,3	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
					вещества
7-3	1,0	0,4	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
7-4	1,0	0,5	Нет	Да	Масло
7-5	1,0	0,6	Нет	Да	Масло

Таблица 4h

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	Толуол (мл)	Циклогексан (мл)			
8–1	1,0	0,1	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
8–2	1,0	0,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
8–3	1,0	0,3	Да	----	Масло
8–4	1,0	0,4	Нет	Да	Масло
8–5	1,0	0,5	Нет	Да	Небольшое количество твердого вещества
8–6	1,5	0,4	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
8–7	1,5	0,5	Да	----	Небольшое количество твердого вещества

Таблица 4i

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	MeOAc (мл)	Циклогексан (мл)			
9–1	0,4	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
9–2	0,5	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
9–3	0,6	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
9–4	0,8	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
9–5	1,0	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества

Таблица 4j

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (2–3d)
	IPAC (мл)	Циклогексан (мл)			
10–1	1,0	0,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества

10-2	1,0	0,4	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
10-3	1,0	0,6	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
10-4	1,0	0,8	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
10-5	1,0	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
10-6	1,0	1,2	Нет	Да	Масло

Таблица 4к

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1-2d)
	Изобутилацетат (мл)	Циклогексан (мл)			
11-1	1,0	0,2	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
11-2	1,0	0,4	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
11-3	1,0	0,6	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
11-4	1,0	0,8	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
					количество твердого вещества
11-5	1,0	1,0	Да	----	Небольшое количество твердого вещества
11-6	1,0	1,2	Нет	Да	Масло

Да = наличие условия и нет = отсутствие условия.

Таблица 5. Соединение 1 (значение $\varepsilon_i = 97\%$) в качестве исходного вещества

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	ЭА (мл)	Гексан (мл)			
12–1	1	0,2	Да	----	Твердое вещество отсутствует
12–2	1	0,3	Да	----	Твердое вещество отсутствует
12–3	1	0,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует
12–4	1	0,5	Да	----	Твердое вещество отсутствует
12–5	1	0,6	Да	----	Твердое вещество
12–6	1	0,7	Да	----	Твердое вещество
12–7	1	0,8	Нет	Да	Масло
12–8	1	0,9	Нет	Да	Масло

Таблица 5a

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	ЭА (мл)	Гептан (мл)			
13–1	1	0,2	Да	----	Твердое вещество отсутствует
13–2	1	0,3	Да	----	Твердое вещество отсутствует
13–3	1	0,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует
13–4	1	0,5	Да	----	Твердое вещество отсутствует
13–5	1	0,6	Да	----	Твердое вещество
13–6	1	0,7	Да	----	Твердое вещество
13–7	1	0,8	Да	----	Масло
13–8	1	0,9	Нет	Да	Масло

Таблица 5b

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1–2d)
	MeOAc (мл)	Циклогексан (мл)			
14–1	0,4	1,0	Да	----	Твердое вещество отсутствует
14–2	0,5	1,0	Да	----	Твердое вещество отсутствует
14–3	0,6	1,0	Да	----	Твердое вещество
14–4	0,8	1,0	Да	----	Твердое вещество

Таблица 5c

14-5	1,0	1,0	Да	----	Твердое вещество отсутствует
14-6	1,0	1,5	Да	----	Твердое вещество
14-7	1,0	2,0	Да	----	Твердое вещество
14-8	1,0	2,2	Нет	Да	Масло

Таблица 5d

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1– 2d)
	ЭА (мл)	Циклогексан (мл)			
15-1	0,5	0,2	Да	----	Твердое вещество отсутствует
15-2	0,5	0,3	Да	----	Твердое вещество
15-3	0,5	0,4	Да	----	Масло
15-4	0,5	0,5	Да	----	Масло
15-5	0,5	0,6	Нет	Да	Масло
15-6	1	0,6	Да	----	Твердое вещество
15-7	1	0,8	Да	----	Твердое вещество
15-8	1	1,0	Да	----	Твердое вещество
15-9	1	1,2	Да	----	Твердое вещество
15-10	1	1,4	Да	----	Масло

Таблица 5e

Номер эксперимента	Растворитель		КТ	Нагревание	Результат (1– 2d)
	МеОAc (мл)	Гексан (мл)			
16-1	0,5	0,3	Да	----	Твердое вещество
16-2	0,5	0,4	Да	----	Твердое вещество отсутствует
16-3	0,5	0,5	Да	----	Твердое вещество отсутствует
16-4	0,5	0,6	Нет	Да	Твердое вещество отсутствует
16-5	1,0	0,6	Да	----	Твердое вещество
16-6	1,0	0,8	Да	----	Твердое вещество
16-7	1,0	1,0	Да	----	Твердое вещество
16-8	1,0	1,2	Да	----	Твердое вещество
16-9	1,0	1,4	Нет	Да	Масло

Да = наличие условия и нет = отсутствие условия.

Эксперименты в табл. 4а-4к и в табл. 5а-5е были проведены в одинаковом масштабе (т.е. количество исходного вещества аморфного соединения 1 составляет около 20 мг). Однако оказалось, что значение эи исходного вещества оказывает существенное влияние на количество твердого вещества, образующееся в каждом эксперименте. Как показывают результаты экспериментов в табл. 4а-4к, начиная с эи 90%

аморфного твердого вещества 1, твердые вещества из него образуются в небольшом количестве. Как показывают результаты экспериментов в табл. 5а-5е, начиная с эи 97% аморфного твердого вещества 1, в результате из соединения 1 образуется значительное количество твердого вещества. Твердое вещество, полученное в экспериментах, представленных в табл. 4а-4к, также характеризуется низким значением эи при кристаллизации из исходного вещества с эи 90%. В одном образце из табл. 4а-4к с использованием ЭА/гексана в качестве системы кристаллизации, показано значение эи лишь 45%.

Результаты, представленные в табл. 5а, были дополнительно подтверждены в эксперименте большего масштаба, аналогичного масштабу примера 2, в котором было подтверждено, что полученное в результате твердое вещество имеет желаемую кристаллическую форму (форму А).

Как показано в приведенных выше табл. 4а-4к и табл. 5а-5е, образование кристаллического твердого вещества может различаться в зависимости от конкретных растворителей, соотношения растворителей и т.д.

Результаты, представленные в табл. 6, дополнительно подтверждают, что образование кристаллического твердого вещества зависит от доли конкретного растворителя.

Таблица 6

Растворитель-1 (0,5 мл)	Гексан		МТБЭ		Гептан		Циклогексан		Н ₂ O		Эфир	
	V /мл	Результаты	V /мл	Результаты	V /мл	Результаты	V /мл	Результаты	V /мл	Результаты	V /мл	Результаты
ТГФ	0,4	Небольшое количество твердого вещества	2,0	Небольшое количество твердого вещества	0,4	Небольшое количество твердого вещества	0,4	Небольшое количество твердого вещества	----	----	2,0	Твердое вещество отсутствует
Me-ТГФ	0,4	Небольшое количество твердого вещества	1,5	Твердое вещество отсутствует	0,4	Твердое вещество отсутствует	----	----	----	----	----	----
ДМЭ	0,6	Небольшое количество твердого вещества	1,5	Твердое вещество отсутствует	0,6	Небольшое количество твердого вещества	0,8	Небольшое количество твердого вещества	----	----	1,5	Твердое вещество отсутствует
EtOH	2,0	Твердое вещество отсутствует	5,0	Твердое вещество отсутствует	2,5	Масло	2,0	Твердое вещество отсутствует	5,0	Твердое вещество отсутствует	5,0	Твердое вещество отсутствует
i-PrOH	1,5	Твердое вещество отсутствует	2,5	Твердое вещество отсутствует	----	----	2,0	Твердое вещество отсутствует	2,0	Небольшое количество твердого вещества	----	----
Пиридин	1,0	Твердое вещество отсутствует	4,0	Твердое вещество отсутствует	----	----	1,0	Твердое вещество отсутствует	2,0	Твердое вещество отсутствует	----	----
Пропилацетат	0,3	Твердое вещество отсутствует	0,8	Твердое вещество отсутствует	----	----	----	----	----	----	----	----
Изобутилацетат (мл)	0,2	Твердое вещество отсутствует	2,0	Твердое вещество отсутствует	----	----	----	----	----	----	----	----
n-BuOH	0,5	Твердое вещество отсутствует	2,0	Твердое вещество отсутствует	----	----	----	----	0,5	Твердое вещество отсутствует	----	----
1,2-Дихлорэтан (мл)	1,0	Твердое вещество отсутствует	5,0	Твердое вещество отсутствует	----	----	1,2	Твердое вещество отсутствует	----	----	----	----
ДХМ	1,0	Масло	5,0	Твердое вещество	----	----	1,2	Твердое вещество	----	----	----	----
				отсутствует				отсутствует				
Толуол	0,2	Масло и Небольшое количество твердого вещества	0,5	Твердое вещество отсутствует	0,2	Твердое вещество отсутствует	0,2	Масло и Небольшое количество твердого вещества	----	----	0,5	Твердое вещество отсутствует

(2) Исследование полиморфов из кристаллической формы - получение формы А из кристаллической формы

Медленное выпаривание

Готовят навеску около 15 мг образца (кристаллическая форма А) в стеклянном флаконе емкостью 3 мл с последующим добавлением соответствующего растворителя или смеси растворителей (см. табл. 7) до получения прозрачного раствора. Впоследствии флакон закрывают парафильмом с 3-4 отверстиями, проколотыми иглой, и выдерживают при КТ, позволяя растворителю медленно испаряться. Твердые вещества выделяют для анализа ПРД. Однако кристаллическая форма не была получена, как показывают сводные данные в табл. 7.

Таблица 7. Эксперименты с медленным выпариванием

Номер эксперимента	Растворитель (об./об.)	Форма твердого вещества
1	MeOH	Аморфная
2	EtOH	Аморфная
3	IPA	Аморфная
4	ACN	Аморфная
5	Ацетон	Масло
6	EtOAc	Масло
7	ТГФ	Масло
8	ДХМ	Аморфная
9	Толуол	Масло
10	Уксусная кислота	Масло
11	EtOH/H ₂ O (4:1)	Аморфная
12	Ацетон/H ₂ O (4:1)	Аморфная
13	ТГФ/H ₂ O (4:1)	Аморфная
14	ДХМ/н-гептан (4:1)	Аморфная
15	EtOH/н-гептан (4:1)	Аморфная
16	EtOAc/н-гептан (6,5:1)	Масло
17	ACN/MTБЭ (4:1)	Масло

Добавление антирастворителя

Готовят навеску около 15 мг образца (кристаллическая форма А) в стеклянном флаконе емкостью 20 мл с последующим добавлением 0,4-1,2 мл соответствующего растворителя (см. табл. 8). Затем смесь перемешивают с помощью магнитной мешалки со скоростью 800 об/мин до получения прозрачного раствора при КТ. Впоследствии к раствору добавляют соответствующий антирастворитель (см. табл. 8) до индукции осаждения или до достижения ввода всего количества антирастворителя 15,0 мл. Если осаждение не происходило, раствор переносят в условия медленного выпаривания при КТ. Сводные результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8. Эксперименты с добавлением антирастворителя

Номер эксперимента	Антирастворитель	Растворитель	Форма твердого вещества
1	H ₂ O	EtOH	Масло
2	H ₂ O	ТГФ	Масло
3	H ₂ O	Уксусная кислота	Масло
4	н-гептан	1,4-диоксан	Масло
5	MTБЭ	ACN	Масло
6	MTБЭ	NMP	Н/П
7	MTБЭ	EtOH	Масло
8	MTБЭ	ДХМ	Масло

Н/П: твердое вещество не получено.

Медленное охлаждение

Около 20 мг образца (кристаллическая форма А) суспендируют в 1,0 мл соответствующего растворителя (см. табл. 9) в стеклянном флаконе емкостью 3 мл при КТ. Суспензию переводят во взвесь при 50°C путем перемешивания на магнитной мешалке со скоростью 800 об/мин. Образец уравнивают при 50°C в течение 2 ч и фильтруют через нейлоновую мембрану 0,45 мкм. Впоследствии фильтрат медленно охлаждают с 50 до 5°C со скоростью 0,1°C/мин. Полученные твердые вещества выдерживают в изотермических условиях при температуре 5°C, после чего выделяют для анализа ПРД. Кристаллическая форма не была получена, как показывают сводные данные в табл. 9.

Таблица 9. Эксперименты с медленным охлаждением

Номер эксперимента	Растворитель (об./об.)	Форма твердого вещества
1	IPA	Н/П
2	MIBK	Н/П
3	IPAc	Н/П
4	Толуол	Н/П
5	EtOH/H ₂ O (1:2)	Гель
6	Ацетон/H ₂ O (1:2)	Гель
7	EtOAc/н-гептан (1:2)	Аморфная
8	CHCl ₃ /н-гептан (1:2)	Н/П
9	ТГФ/н-гептан (1:2)	Масло*
10	ACN/МТБЭ (1:2)	Масло*

Н/П: твердое вещество не получено.

*: Прозрачный раствор переводят в условия выпаривания при КТ.

Диффузия пара из раствора

Около 15 мг образца (кристаллическая форма А) растворяют в 0,5-1,5 мл соответствующего растворителя (см. табл. 10) во флаконе емкостью 3 мл до получения прозрачного раствора. Впоследствии раствор помещают во флакон емкостью 20 мл с 3 мл соответствующего антирастворителя. Флакон емкостью 20 мл герметично закрывают крышкой и выдерживают при КТ, предоставляя достаточно времени для взаимодействия органического пара с раствором. По окончании 11 дней прозрачные растворы переносят для выпаривания при КТ. Полученные твердые вещества были охарактеризованы ПРД. Сводные результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10. Эксперименты с диффузией пара из раствора

Номер эксперимента	Растворитель	Антирастворитель	Форма твердого вещества
1	EtOH	H ₂ O	Аморфная*
2	ACN	H ₂ O	Н/П
3	Ацетон	H ₂ O	Аморфная*
4	ТГФ	H ₂ O	Аморфная*
5	Уксусная кислота	H ₂ O	Масло
6	EtOH	н-гептан	Н/П
7	ТГФ	н-гептан	Аморфная*
5	ДХМ	н-гептан	Аморфная*
8	DMAc	МТБЭ	Н/П
9	IPA	МТБЭ	Н/П
10	1,4-Диоксан	МТБЭ	Н/П
11	Толуол	МТБЭ	Н/П
12	NMP	МТБЭ	Н/П

Н/П: твердое вещество не получено.

*: твердое вещество было получено посредством медленного выпаривания.

Эксперименты по кристаллизации, индуцированной полимером

Около 15 мг образца (кристаллическая форма А) растворяют в 1,0 мл соответствующего растворителя (см. табл. 11) во флаконе емкостью 3 мл до получения прозрачного раствора. Затем раствор фильтруют через нейлоновую мембрану 0,45 мкм. В фильтрат добавляют около 2 мг смеси полимеров. Смесь перемешивают при КТ, чтобы вызвать осаждение. Твердые вещества выделяют для анализа ПРД. Кристаллическая форма не была получена, как показывают сводные данные в табл. 11.

Таблица 11. Эксперименты по кристаллизации, индуцированной полимером

Номер эксперимента	Растворитель (об./об.)	Смесь полимеров	Форма твердого вещества
1	EtOH	A	Аморфная
2	ACN	A	Аморфная
3	Ацетон	A	Аморфная
4	ТГФ	A	Аморфная
5	ДХМ	A	Аморфная
6	EtOAc	A	Аморфная
7	EtOH	B	Аморфная
8	ACN	B	Аморфная
9	Ацетон	B	Аморфная
10	ТГФ	B	Аморфная
11	ДХМ	B	Аморфная
12	EtOAc	B	Аморфная

Смесь полимеров А: поливинилпирролидон (ПВП), поливиниловый спирт (ПВС), поливинилхлорид (ПВХ), поливинилацетат (ПВАЦ), гипромеллоза (ГПМЦ), метилцеллюлоза (МЦ) (соотношение по массе 1:1:1:1:1:1).

Смесь полимеров В: поликапролактон (ПКЛ), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поли(метилметакрилат) (ПММА), альгинат натрия (АН) и гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) (соотношение по массе 1:1:1:1:1).

Пример 8. Определение абсолютной конфигурации соединения 1

Получение монокристалла BG-13

Было проведено шесть отдельных экспериментов по выращиванию монокристалла (см. табл. 12) путем медленного охлаждения. Приемлемые монокристаллы BG-13 были получены путем медленного охлаждения в MeOH/H₂O (1:1, об./об.). Данные о кристалле и уточнении его структуры представлены в табл. 13.

Таблица 12. Эксперименты по выращиванию монокристалла

Номер эксперимента	Масса (мг)	Растворитель (1 мл, об./об)	Способ	Температура (°C)	Растворение (есть/нет*)	Результаты наблюдения
1	5,6	IPA/H ₂ O (3:1)	охлаждение	60	Нет	Блоковидный кристалл
2	5,5	IPA/H ₂ O (3:1)	охлаждение	60	Нет	Блоковидный кристалл
3	5,4	IPA/H ₂ O (3:1)	охлаждение	60	Нет	Блоковидный кристалл
4	5,5	IPA/H ₂ O (3:1)	охлаждение	60	Нет	Блоковидный кристалл
5	4,7	MeOH/H ₂ O (2:1)	охлаждение	60	Нет	Кристалл
6	5,5	MeOH/H ₂ O (1:1)	охлаждение	60	Нет	Кристалл

Таблица 13. Данные монокристалла и уточнения структуры BG-13

Данные монокристалла были получены на монокристалльном дифрактометре Bruker APEX DUO с ПЗС-детектором (Cu K α , $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$, 173,15 K).

Эмпирическая формула	C ₃₃ H ₃₄ N ₅ O ₆	-
Масса по формуле	596,65	
Температура	173,15	-
Длина волны	1,54178 $\text{\AA}$	-
Кристаллическая система, пространственная группа	моноклинная	C2
Размеры элементарной ячейки	a = 16,7939(4) $\text{\AA}$	альфа = 90,00 град.

	b = 7,9871(2) Å c = 23,5438(5) Å	бета = 108,0460 град. гамма = 90,00 град.
Объем	3002,69(12) Å ³	-
Z, расчетная плотность	4	1,320 мг/мм ³
Коэффициент поглощения	0,756 мм ⁻¹	-
F(000)	1260,0	-
Размер кристалла	0,3 × 0,21 × 0,08 мм ³	-
Диапазон угла тета для сбора данных	От 1,97 до 64,96 град.	-
Ограничительные индексы	-19 ≤ h ≤ 17 -7 ≤ k ≤ 9 -27 ≤ l ≤ 24	-
Полученные/уникальные отражения	5053/3756 [R(int) = 0,1062]	-
Полнота	92,8 %	-
Способ уточнения	Полноматричный метод наименьших квадратов на F ²	-
Данные/ограничители/параметры	3756/1/398	-
Критерий согласия	1,192	-
Конечные индексы R [I > 2 сигма I]	R ₁ = 0,0819	wR ₂ = 0,2294
Параметр Флэка для абсолютной структуры	0,0(3)	-
Наибольший пик и впадина дифракции	0,50 и -0,57 е.Å ³	-

Было подтверждено, что BG-13 представляет собой соль (2R,3R)-дibenзоилвинной кислоты (L-DBTA) и молярное отношение свободного основания к L-DBTA составляет 2:1. Было подтверждено, что конфигурация обоих атомов углерода (C32 и C32') в L-DBTA представляет собой R-конфигурацию. Конфигурация C6 в свободном основании была определена как S-конфигурация, как показано на фиг. 8-10. Способ порошковой рентгеновской дифракции также используют для определения характеристик структуры монокристаллов, как показано на фиг. 11.

Абсолютная конфигурация соединения 1

На основании результатов рентгеноструктурного анализа монокристалла промежуточного соединения BG-13 был сделан вывод, что абсолютной конфигурацией соединения 1 является S-конфигурация.

Пример 9. Хиральное разделение BG-11A



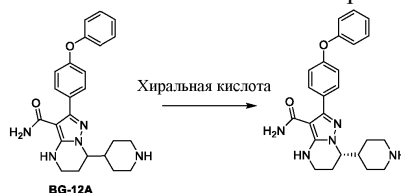
Общая методика:

К раствору соединения BG-11A в подготовленной системе растворителей добавляют хиральную кислоту при повышенной температуре. После перемешивания при этой температуре его охлаждают до КТ и перемешивают в течение ночи при КТ. Твердое вещество фильтруют и промывают подготовленной системой растворителей. Значение эи тестируют методом хиральной ВЭЖХ непосредственно из родственной соли или ее Вос-производного (см. табл. 14). Для других хиральных кислот или системы растворителей значение эи не было получено, получено низкое значение эи или отсутствовало желаемое хиральное соединение.

Таблица 14. Хиральное разделение BG-11A

Система растворителей	Количество 11A	Хиральная кислота	температура	значение эи	Выход
EtOH/H ₂ O/AcOH 7:3:1 (1,9 л)	40,0 г	D-DBTA (0,5 экв.)	70 °C – КТ	>85 % эи	42,2 %
i-PrOH/H ₂ O/AcOH 7:3:1 (25 мл)	500 мг	D-DBTA (1,0 экв.)	70 °C – КТ	>77 % эи	38,5 %
i-PrOH/H ₂ O/AcOH 7:3:1 (25 мл)	500 мг	D-DBTA (0,5 экв.)	70 °C – КТ	85 % эи	38,9 %
EtOH/H ₂ O/AcOH 7:3:1 (25 мл)	500 мг	D-DBTA (0,5 экв.)	70 °C – КТ	86 % эи	39,8 %
MeOH/H ₂ O/AcOH 7:3:1 (25 мл)	500 мг	D-DBTA (0,5 экв.)	70 °C – КТ	82 % эи	42,2 %
AcOH/H ₂ O 3:1 (40 мл)	1 г	D-DBTA (0,55 экв.)	60 °C – КТ	83 % эи	27,6 %
1,4-диоксан/H ₂ O 1:1 (2,5 мл)	25 мг	D-DBTA (2,0 экв.)	60 °C – КТ	Твердое вещество отсутствует	Твердое вещество отсутствует
MeOH/H ₂ O 1:1 (2,5 мл)	25 мг	D-DBTA (2,0 экв.)	60 °C – КТ	36 % эи	Не
CH ₃ CN/H ₂ O 9:1 (2,5 мл)	25 мг	D-DBTA (2,0 экв.)	60 °C – КТ	14 % эи	Не взвешивали
CH ₃ CN/H ₂ O 6:1 (2,5 мл)	25 мг	D-DBTA (2,0 экв.)	60 °C – КТ	89 % эи	Не взвешивали
i-PrOH/H ₂ O 1:1 (2,5 мл)	25 мг	D-DBTA (2,0 экв.)	60 °C – КТ	79 % эи	Не взвешивали
CH ₃ CN/H ₂ O 4:1 (1 мл)	50 мг	D-DBTA (1,0 экв.)	60 °C – КТ	24 % эи	46 %
CH ₃ CN/H ₂ O 4:1 (1,5 мл)	50 мг	D-DBTA (1,0 экв.)	60 °C – КТ	91 % эи	33,7 %

Пример 10. Хиральное разделение BG-12A и повышение хиральной чистоты



Общая методика:

К раствору соединения BG-12A в подготовленной системе растворителей добавляют хиральную кислоту при повышенной температуре. После перемешивания при этой температуре его охлаждают до КТ и перемешивают в течение ночи при КТ. Отфильтрованное твердое вещество промывают подготовленной системой растворителей. Хиральную чистоту тестируют методом хиральной ВЭЖХ непосредственно из родственной соли или свободного основания (см. табл. 15). Для других хиральных кислот или системы растворителей значение эи не было получено, получено низкое значение эи или отсутствовало желаемое хиральное соединение.

Таблица 15. Хиральное разделение BG-12A

Система растворителей	Количество BG-12A	Хиральная кислота	Температура	значение эи	Выход
MeOH/H ₂ O 3:1 (1500 мл)	50 мг	L-DBTA (0,35 экв.)	50 °C – КТ	85,6 % эи	43,1 %
EtOH/H ₂ O 6:1 (250 мл)	14,4 г	L-DBTA (0,55 экв.)	78 °C – КТ	79,1 % эи	41,8 %
n-BuOH/H ₂ O 6:1 (20 мл)	1 г	L-DBTA (0,8 экв.)	80 °C – КТ	95 % эи	20 %
MeOH (4 мл)	500 мг	L-DBTA (1,1 экв.)	Нагревают с обратным холодильником до КТ	Твердое вещество отсутствует	
EtOH (17 мл)	1,0 г	L-DBTA (1,1 экв.)	Нагревают с обратным холодильником до КТ	40 % эи	Не взвешивали
EtOH (30 мл)	500 мг	L-DBTA (2,2 экв.)	Нагревают с обратным холодильником до КТ	Эи отсутствует	Не взвешивали

Полученную соль L-DBTA (31 г, эи 85,6%) добавляют к смеси ТГФ/Н₂O (1:1, 1034 мл), суспензию подогревают до 70°C и перемешивают до полного растворения твердого вещества. Затем добавляют 517 мл воды. Затем раствор медленно охлаждают до 40°C и добавляют затравочный кристалл (10 мг). После перемешивания в течение около 2 ч раствор медленно охлаждают до температуры окружающей среды и перемешивают в течение 2 суток. Твердое вещество фильтруют, промывают смесью ТГФ/Н₂O=1:1 (20 мл) и высушивают при пониженном давлении с получением продукта в виде белого твердого вещества (22,5 г, выход 72%, значение эи более 98,5%).

Полученное свободное основание (6,02 г, эи 79,1%) растворяют в (1 г/15 мл) EtOH/Н₂O (6:1, 90 мл), перемешивают при 78°C до тех пор, пока все исходное вещество не растворилось. Затем добавляют раствор L-DBTA (2,84 г, 7,9 ммоль, 0,55 экв.) в смеси EtOH/Н₂O (6:1, 7 мл). Твердое вещество образовалось быстро, смесь перемешивают при этой температуре в течение 1 ч, после чего извлекают из нагревательной системы. Смесь оставляют для охлаждения до КТ. Отфильтрованное твердое вещество промывают смесью EtOH/Н₂O (6:1, 10 мл). Собранное твердое вещество преобразовывают в свободное основание с использованием смеси водного раствора NaOH и ДХМ с получением продукта (4,7 г, выход: 32,6%, эи 93%) в виде белой пены.

Суспензию полученного свободного основания (70,0 г, эи 90,5%) в CH₃CN/Н₂O (1:1, 700 мл) подогревают до 60°C с получением прозрачного раствора. Затем к описанному выше раствору добавляют L-DBTA (33 г, 0,55 экв.). После перемешивания при 60°C в течение около 2 ч смесь медленно охлаждают до КТ и перемешивают в течение ночи. Отфильтрованное твердое вещество промывают смесью CH₃CN/Н₂O=1:1 (50 мл), высушивают при пониженном давлении с получением продукта в виде почти белой пены (80 г, выход: 80%, значение эи более 98%).

Пример 11. Тесты на эффективность

В настоящем документе тестирование (S)-7-(1-акрилоилпиперидин-4-ил)-2-(4-феноксифенил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамида выполняют, используя кристаллическую форму А.

Тест 1: Ингибирование и селективность киназ

Способы:

Ферментативные анализы ВТК киназы

Тестирование кристаллической формы А соединения 1 на ингибирование киназы ВТК (aa2-659, Cerna Biosciences) в анализах, основанных на методологии флуоресцентного индуктивно-резонансного переноса энергии с временным разрешением (TR-FRET; от англ. time-resolved fluorescence-resonance energy transfer). Анализы проводят в 384-луночных черных планшетах малого объема в реакционной смеси, содержащей ВТК киназу 5 мкмоль/л АТФ, 2 мкмоль/л пептидного субстрата и 0-10 мкмоль/л соединения в буфере, содержащем 50 ммоль/л Трис pH 7,4, 10 ммоль/л MgCl₂, 2 ммоль/л MnCl₂, 0,1 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л дитиотрейтола (ДТТ), 0,005% Твин-20, 20 нмоль/л SEB и 0,01% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Киназу инкубируют с соединением в течение 60 мин при комнатной температуре и реакцию инициируют добавлением АТФ и пептидного субстрата. После взаимодействия при комнатной температуре в течение 60 мин добавляют равный объем останавливающего/детектирующего раствора в соответствии с инструкцией производителя (CisBio Bioassays).

Останавливающий/детектирующий раствор содержал мышинное моноклональное антитело к фосфо-

тироzinу, конъюгированное с криплатом Eu^{3+} (PT66), и стрептавидин, конъюгированный с XL665, в буфере, содержащем 50 ммоль/л N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислоты (ГЭПЭС), pH 7,0, 800 ммоль/л KF, 20 ммоль/л ЭДТА и 0,1% БСА. Планшеты запечатывают и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем регистрируют сигналы TR-FRET (отношение испускания флуоресценции при длине волны 665 и 620 нм при длине волны возбуждения 337 нм) на ридере для планшетов PHERAstar FS (BMG Labtech). Фосфорилирование пептидного субстрата приводило к связыванию антитела к фосфотиросину с биотинилированным пептидным субстратом, в результате чего флуоресцентный донор (криплат Eu^{3+}) оказывается в положении, тесно приближенном к положению акцептора (стрептавидин-XL665), что приводит в результате к высокой степени резонансного переноса энергии флуоресценции с флуорофора-донора (при 620 нм) на флуорофор-акцептор (при 665 нм). Ингибирование активности ВТК киназы приводило в результате к снижению сигнала TR-FRET. Половинную ингибирующую концентрацию (IC_{50}) для соединения 1 рассчитывают путем подбора данных с помощью логистического уравнения с четырьмя параметрами в программном обеспечении Graphpad Prism.

(2) Биохимическая селективность киназы

Профиль селективности кристаллической формы А устанавливают в сравнении с панелью 342 киназ в концентрации 1 мкмоль/л в Reaction Biology Corp. Кристаллическая форма А характеризовалась ингибированием менее 70% по сравнению с 329 киназами и более 70% ингибированием по сравнению с 13 киназами, включая ВТК. IC_{50} кристаллической формы А (см. табл. 13), включая анализы ИТК, ТЕС, JAK3 и EGFR, проведенные в лаборатории компании BeiGene с помощью анализа TR-FRET и соответствующих пептидов в качестве субстрата.

Определение IC_{50} ИТК:

Протокол анализа ИТК аналогичен анализу ВТК за исключением следующей модификации: в киназной реакции используют 3 мкмоль АТФ и 2 мкмоль субстрата ТК.

Определение IC_{50} ТЕС:

Протокол анализа ТЕС аналогичен анализу ВТК за исключением следующей модификации: 1) в киназной реакции используют 280 мкмоль АТФ и 2 нмоль субстрата поли-GT; 2) реакционный буфер не содержит SEB.

Определение IC_{50} JAK3:

Протокол анализа JAK3 аналогичен анализу ВТК за исключением следующей модификации: 1) в киназной реакции используют 3,4 мкмоль АТФ и 3 мкмоль пептидного субстрата (B-EE-15, биотин-EQEDPEGDYFEWLE); 2) реакционный буфер содержит 50 ммоль/л Трис pH 7,8, 10 ммоль/л MgCl_2 , 5 ммоль/л ДТТ, 0,01% Тритон X-100 и 0,01% БСА.

Определение IC_{50} EGFR: Протокол анализа EGFR аналогичен анализу ВТК за исключением следующей модификации: 1) в киназной реакции используют 20 мкмоль АТФ и 1,44 мкмоль субстрата ТК-биотин (один универсальный субстрат для тирозинкиназ) и 0-1000 нмоль соединения (конечная концентрация 1% ДМСО); 2) реакционный буфер содержит 50 ммоль/л ГЭПЭС pH 7,5, 10 ммоль/л MgCl_2 , 1 ммоль/л этиленгликольтетрауксусной кислоты (ЭГТК), 0,01% красителя Бридж-35, 2,5 ммоль/л ДТТ и 0,1% БСА; 3) останавливающий/детектирующий буферный раствор содержит 25 ммоль/л ГЭПЭС pH 7,5, 400 ммоль/л KF, 50 ммоль/л ЭДТА, 0,01% Тритон-X100 и 0,1% БСА.

Результаты:

IC_{50} кристаллической формы А для ВТК киназы составляла 0,27 нмоль/л. Было показано, что кристаллическая форма А является активным, специфичным и необратимым ингибитором ВТК киназы. Что касается ее селективности, при профилировании в сравнении с панелью из 342 киназ человека в концентрации 1 мкмоль/л кристаллическая форма А ингибировала только 13 других киназ более чем на 70%.

Таблица 16. Ингибирование активности ферментов кристаллической формой А

Фермент	IC ₅₀ (нмоль/л)
ВТК	0,27
ІТК	53
ТЕС	1,9
JAK3	600
EGFR	3,6
BLK	1,13
BMX/ETK	0,62
BRK	33
ERBB4/HER4	1,58
FGR	155
FRK/PTK5	379
LCK	187
ТХК	2,95

Примечание: Анализы ВТК, EGFR, ІТК, ТЕС и JAK3 проводят с помощью анализа TR-FRET и с использованием соответствующих пептидов в качестве субстрата. IC₅₀ кристаллической формы А определяют при K_M АТФ для пяти киназ с предварительной инкубацией в течение 1 ч. Анализы HER4, BMX, ТХК, BLK FGR, LCK, FRK/PTK5 были проведены в Reaction Biology Corp. с использованием ³³P-АТФ и анализа связывания на фильтре. IC₅₀ кристаллической формы А определяют при концентрации АТФ 1 мкмоль/л с предварительной инкубацией в течение 1 ч.

Тест 2: Клеточный анализ ВТКpY223 для кристаллической формы А

Способы:

Клеточный анализ ВТКpY223 представляет собой анализ, основанный на гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF), предназначенный для количественного определения эндогенных уровней фосфорилирования при Tyr223 ВТК. Фосфорилированный Tyr223 необходим для полной активации ВТК. Этот анализ проводят на клетках Ramos (CRL-1596, ATCC) с помощью набора реактивов для анализа ВТКpY223 (63IDC000, Cisbio).

Кратко, клетки Ramos инкубируют в течение 2 ч в условиях истощения сыворотки в среде RPMI1640, содержащей 0,5% фетальную бычью сыворотку (ФБС). После истощения клетки инкубируют в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч с кристаллической формой А для обнаружения при различных концентрациях. После инкубации клетки стимулируют 1 ммоль/л перваната (PV) или Na₃VO₄ (OV) в течение 20 мин. Затем клетки осаждают и подвергают лизису в 1-кратном лизирующем буфере при КТ в течение 10 мин (в наборе поставляется 4-кратный лизирующий буфер). Во время инкубации готовят 1-кратную смесь для антитела путем разведения антитела к ВТК-d2 и антитела к pВТК-K в детектирующем буфере (поставляется в наборе). По 2 мкл/лунка 1-кратной смеси антитела распределяют в аналитическом планшете OptiPlate-384 (6005620, Perkin Elmer). После этого в аналитический планшет, в лунки которого был предварительно внесен раствор антитела, переносят по 18 мкл лизата клеток. После мягкого перемешивания и кратковременного встряхивания планшет запечатывают и выдерживают в темноте при КТ в течение 18 ч. Испускание флуоресценции измеряют при двух различных значениях длины волны (665 нм и 620 нм) на совместимом ридере для HTRF (PHERAstar FS, BMG). Активность соединения 1 рассчитывают на основании ингибирования отношения значений интенсивности сигнала при 665 и 620 нм. Значения IC₅₀ рассчитывают с помощью программного обеспечения GraphPad Prism, используя сигмоидную функцию доза-ответ.

Результаты:

Кристаллическая форма А ингибировала фосфорилирование ВТК в линии клеток В-клеточной лимфомы Ramos уже при концентрации $1,8 \pm 0,2$ нмоль/л (n = 3).

Тест 3: Действия кристаллической формы А на пролиферацию опухолевых клеток в линиях клеток гематологических злокачественных новообразований (Rec-1, Mino, JEKO-1 и TMD-8)

Способы:

В данном исследовании используют 3 линии клеток МКЛ (Rec-1, Mino и JEKO-1) и линию клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы ABC-типа (TMD8). Линии клеток поддерживают в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки/ФБС (Thermo Scientific); 100 единиц/мл пенициллина (Gibco) и 0,1 мг/мл стрептомицина (Gibco) и выдерживают при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Линии клеток восстанавливают из банков замороженных клеток, которые были помещены на хранение после 30 пассажей из исходных приобретенных линий клеток.

Активность ингибирования соединениями роста клеток Rec-1, Mino, JEKO-1 и TMD-8 определяют, используя анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega). Количество клеток, засеваемых в одну лунку 96-луночного планшета, оптимизируют для каждой линии клеток, чтобы обеспечить их логарифмический рост в течение 6-дневного периода обработки. Клетки обрабатывают в трех повторностях 10-точечными серийными разведениями. После 6-дневного воздействия соединения добавляют объем реактива CellTiter-Glo, равный объему питательной среды для культивирования клеток, находящемуся в каждой лунке. Смесь перемешивают на круговой качалке в течение 2 мин, чтобы дать возможность для лизиса клеток, после чего инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре, чтобы дать возможность для проявления и стабилизации люминесцентного сигнала, который соответствовал количеству АТФ и, следовательно, количеству клеток с активным метаболизмом. Люминесцентный сигнал измеряют с помощью ридера PHERAstar FS (BMG Labtech). Значения IC_{50} жизнеспособности клеток были определены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и представляют собой среднее арифметическое 3 независимых анализов.

Результаты:

Кристаллическая форма А соединения 1 проявляет специфическое и активное ингибирующее действие на пролиферацию клеток в 3 линиях клеток МКЛ и линии клеток диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы ABC-типа (TMD8) (табл. 17).

Таблица 17. Ингибирование пролиферации гематологических опухолевых клеток кристаллической формой А

Линия клеток	Тип клеток	Активность IC_{50} (нмоль/л)	Стандартное отклонение (нмоль/л)
Rec-1	МКЛ	0,36	0,03
Mino	МКЛ	3,8	1,8
JEKO-1	МКЛ	20,0	Н/П
TMD-8	DLBCL(ABC)	0,54	0,3

Тест 4: Исследование фармакокинетики кристаллической формы А у мышей

Способы:

Для изучения кинетики мышей случайным образом распределяют в 7 групп, по 4 мыши на группу. Мышам вводят однократную дозу кристаллической формы А соединения 1 и в различные моменты времени (30 мин, 1, 2, 4, 12, 24 ч) подвергают эвтаназии, используя диоксид углерода. Для исследования зависимости от дозы мышей случайным образом распределяют в 9 групп, по 4 мыши на группу. Мышам вводят различные уровни дозы кристаллической формы А соединения 1 и через 4 ч после введения дозы подвергают эвтаназии, используя диоксид углерода. Препараты вводят с помощью желудочного зонда (п/о) в объеме 10 мл/кг массы тела. Оценку массы тела проводят непосредственно перед введением дозы препарата, и дозируемый объем корректируют соответствующим образом.

Подготовка образца на ФК: Образцы крови (50 мкл на одну мышь) для исследования кинетики через 15 мин после введения исследуемого препарата берут из ретроорбитального синуса под анестезией изофлураном/кислородом (эту группу мышей также используют для момента времени 24 ч) или для других моментов времени путем пункции сердца после эвтаназии. Для исследования зависимости от дозы через 30 мин после введения исследуемого препарата берут из ретроорбитального синуса под анестезией изофлураном/кислородом. Плазму крови собирают центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин и хранят в замороженном виде при -80°C до анализа.

Анализ ФК: значения максимальной концентрации в плазме крови (C_{max}) и времени до достижения C_{max} (T_{max}) были получены непосредственно из графиков концентрации против времени.

Результаты:

У мышей линии с контрольным участком импринтинга (ICR) кристаллическая форма А быстро всасывалась и выводилась.

Тест 5: Исследование эффективности кристаллической формы А в модели ксенотрансплантата TMD-8

Способы имплантации опухоли:

Животным предварительно вводят циклофосфамид (приготовленный в растворе хлорида натрия, 150 мг/кг интраперитонеально (и/п)) и дисульфид (приготовленный в растворе 0,8% Твин 80 в растворе хлорида натрия, 125 мг/кг п/о, через час после каждой дозы циклофосфамида) раз в сутки в течение двух суток. Затем животным инокулируют клетки TMD-8 через 24 ч после второй дозы циклофосфамида. В день имплантации питательную среду для культивирования клеток заменяют свежей средой. Спустя четыре часа питательную среду удаляют, и клетки собирают, как описано выше. Клетки ресуспендируют в холодном (4°C) фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) и добавляют такой же объем реактива Матригель (BD, № по каталогу 356237) до получения конечной концентрации $2,5 \times 10^7$ клеток/мл. Ресуспендированные клетки перед инокуляцией помещают на лед. Перед инокуляцией правую подмышечную область каждой мыши очищают 75% этанолом. Каждому животному подкожно вводят путем инъекции

5×10^6 клеток в 200 мкл клеточной суспензии в правый бок спереди с помощью иглы 26-го калибра.

Для исследований эффективности *in vivo* начиная с 3-го дня после инокуляции клеток животных случайным образом распределяют в необходимое количество групп по 10 мышей на группу. Мышам вводят два раза в сутки (2 р/сут) раствор-носитель (0,5% карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ)+0,2% Твин 80) и различные уровни дозы кристаллической формы А соединения 1 в течение 39 дней. Препараты вводят с помощью желудочного зонда (п/о) в объеме 10 мл/кг массы тела. Оценку массы тела проводят непосредственно перед введением дозы препарата, и дозируемый объем корректируют соответствующим образом. Объем опухоли измеряют два раза в неделю по двум измерениям с помощью штангенциркуля (в данном исследовании измерение стало возможным с 11-го дня после инокуляции). Объем опухоли рассчитывают с помощью формулы: $V = 0,5 \times (a \times b^2)$, где а и b представляют собой самый длинный и самый короткий диаметры опухоли соответственно. Статистический анализ проводят с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимой считают величину Р менее 0,05. На протяжении всего исследования за измерение опухолей отвечал один сотрудник, занятый в исследовании. Массу тела также регистрируют два раза в неделю. За мышами также проводят ежедневные наблюдения для выявления клинических признаков токсичности в ходе исследования.

Результаты:

Эффективность кристаллической формы А *in vivo* изучают в модели ксенотрансплантатов клеток TMD-8 DLBCL, выращиваемых подкожно у мышей линии с диабетом без ожирения (NOD; от англ. non-obese diabetic)/тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID, от англ. severe combined immunodeficiency). После ежедневного перорального введения в различных хорошо переносимых уровнях дозы два раза в сутки (2 р/сут) кристаллическая форма А соединения 1 индуцировала дозозависимые противоопухолевые эффекты. Уже при самой низкой из исследованных доз кристаллическая форма А соединения 1 обладала сильной противоопухолевой активностью. На протяжении всего исследования существенного влияния на массу тела животных не отмечено ни в одной экспериментальной группе.

Тест 6: Исследование эффективности кристаллической формы А в системной модели ксенотрансплантата REC-1

Способы имплантации опухоли:

Животным предварительно вводят циклофосфамид (приготовленный в растворе хлорида натрия, 150 мг/кг и/п) и дисульфид (приготовленный в растворе 0,8% ТВ-80 в растворе хлорида натрия, 125 мг/кг п/о, через час после каждой дозы циклофосфамида) раз в сутки в течение двух суток. Затем животным инокулируют клетки REC-1 через 24 ч после второй дозы циклофосфамида. В день имплантации питательную среду для культивирования клеток заменяют свежей средой. Спустя четыре часа питательную среду удаляют, и клетки собирают, как описано выше. Клетки ресуспендируют в холодном (4°C) фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) до получения конечной концентрации 1×10^8 клеток/мл. Перед имплантацией ресуспендированные клетки помещают на лед. Каждому животному вводят 1×10^7 клеток в 100 мкл суспензии клеток путем внутривенной инъекции в хвостовую вену.

Для исследований эффективности *in vivo*, начиная с 8-го дня после инокуляции клеток, животных случайным образом распределяют в необходимое количество групп по 10 мышей на группу. Мышам вводят два раза в сутки (2 р/сут) раствор-носитель (0,5% карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ)+0,2% Твин 80) и различные уровни дозы кристаллической формы А соединения 1 в течение 71 дня. На 78-й день после инокуляции введение всех препаратов прекращают. Препараты вводят с помощью желудочного зонда (п/о) в объеме 10 мл/кг массы тела. Оценку массы тела проводят непосредственно перед введением дозы препарата, и дозируемый объем корректируют соответствующим образом. Массу тела регистрируют два раза в неделю (с 33-го дня этот режим был изменен на три раза в неделю). На протяжении всего исследования мышей также ежедневно осматривают для выявления клинических признаков заболевания. Конечной точкой исследования является общая выживаемость. В случае тяжелого токсического эффекта, такого как обездвиживание, мышей подвергают эвтаназии и оценивают как летальный исход.

Для анализа данных: Анализ выживаемости проводят методом Каплана-Майера. Время выживания определяют как время со дня инокуляции опухоли до даты гибели или эвтаназии животного. Для каждой группы рассчитывают медиану времени выживания (MST, от англ. median survival time), размах вариации времени выживания (RST, от англ. range of survival time) с 95% доверительным интервалом и увеличение продолжительности жизни (ILS; от англ. increase in life-span). Медиану выживаемости определяют как время гибели 50% мышей. ILS рассчитывают по следующей формуле:

$$\% \text{ ILS} = (\text{MST} - \text{MST} (\text{раствор-носитель})) / \text{MST} (\text{раствор-носитель}) \times 100$$

Статистический анализ проводят между каждыми двумя группами с использованием критерия Гехана-Бреслоу-Вилкоксона. Статистически значимой считают величину Р менее 0,05.

Результаты:

Была показана дозозависимая противоопухолевая активность кристаллической формы А соединения 1 против системных имплантатов клеток МКЛ REC-1 у мышей NOD/SCID. В данной модели ксенотрансплантата кристаллическая форма А соединения 1 обладала статистически значимой эффективностью.

Тест 7: Токсикологическое исследование кристаллической формы А

Для доклинической оценки безопасности А кристаллической формы А соединения 1 в различных дозах была выполнена всесторонняя программа доклинических исследований токсичности, включая 28-дневные исследования у крыс и собак, соответствующие принципам надлежащей лабораторной практики (GLP; от англ. Good laboratory practice), и несколько экспериментальных исследований. В этих исследованиях было учтено доступное нормативно-правовое руководство по разработке доклинических исследований противоопухолевых лекарственных препаратов. В этих исследованиях показан благоприятный токсикологический профиль и профиль фармакологической безопасности соединения 1. На протяжении всего исследования ни при одном уровне дозы не возникло летальных исходов, связанных с исследуемым препаратом. На протяжении всего исследования токсикологически значимых изменений в показателях биохимического анализа крови или коагулограммы не отмечено. После фазы восстановления ни одно из таких изменений не отмечено.

Тест 8: Фармакокинетика кристаллической формы А

Для исследований фармакокинетики (ФК) кристаллической формы А соединения 1 был успешно использован валидированный метод жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) у крыс линии Спрег-Дуули и собак породы бигль после введения однократной и многократных доз препарата.

Кристаллическая форма А соединения 1 обладает хорошей пероральной биодоступностью у крыс. Она быстро всасывалась и характеризовалась высоким клиренсом (CL) у крыс. У самок крыс кинетика была линейной на протяжении всего диапазона доз. Линейность у самцов крыс была не настолько высокой. Как у самцов, так и у самок крыс после многократного перорального введения статистически значимое накопление соединения 1 отсутствовало. Кристаллическая форма А соединения 1 характеризовалась умеренным клиренсом (CL), рационально высокой биодоступностью (F%), линейной ФК на протяжении всего диапазона дозы и отсутствием накопления соединения 1 после многократного перорального введения собакам.

Тест 9: Всасывание, распределение, метаболизм и выведение (ADME; от англ. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) кристаллической формы А

Соединение 1 широко распределялось в различных тканях, но было незначительным в ткани головного мозга, что указывает на то, что лекарственное средство с трудом пересекает гематоэнцефалический барьер.

Значения IC_{50} кристаллической формы А соединения 1 для семи основных метаболизирующих изоферментов цитохрома P450 (CYP) (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A) определяют в микросомах печени человека, а также определяют зависимый от времени потенциал ингибирования основных изоферментов CYP соединением 1. Оно оказывает слабое ингибирующее действие на CYP2C8 ($IC_{50} = 4,03$ мкмоль/л), CYP2C9 ($IC_{50} = 5,69$ мкмоль/л) и CYP2C19 ($IC_{50} = 7,58$ мкмоль/л), но еще более низкое ингибирование изоферментов CYP. Зависимое от времени ингибирование соединением 1 цитохрома P450 в отношении этих 7 основных изоферментов CYP маловероятно. CYP3A является основной изоформой CYP, ответственной за метаболизм в микросомах печени человека.

Пример 12. Клиническое исследование

Результат продолжающегося клинического исследования 1 фазы соединения 1 у пациентов с распространенными В-клеточными злокачественными новообразованиями

Многоцентровое открытое исследование 1 фазы соединения 1, впервые проводимое с участием человека, проводится в Австралии и Новой Зеландии и состоит из двух частей - фазы увеличения дозы, в которой принимают участие 25 пациентов, и фазы применения ранее установленной максимально переносимой дозы в расширенной популяции, в которую планируют включить 100 пациентов. В общей сложности в исследование было включено 39 пациентов, в том числе все 25 пациентов из первоначального компонента увеличения дозы и 14 пациентов из продолжающегося компонента применения ранее установленной максимально переносимой дозы в расширенной популяции. На основании фармакокинетики, фармакодинамики, безопасности и эффективности соединения 1, установленных в фазе увеличения дозы, в продолжающемся исследовании применения ранее установленной максимально переносимой дозы в расширенной популяции далее исследуются дозы 320 мг один раз в сутки (1 р/сут) и 160 мг два раза в сутки (2 р/сут).

На дату завершения внесения данных для анализа 19 октября 2015 г. наблюдают 29 объективных ответов, включающих 3 полных ответа (ПО), 1 очень высокий частичный ответ (ОВЧО) и 25 частичных ответов (ЧО). Сводные данные ответов на основании гистологического исследования приведены в табл. 18. 31 из 39 пациентов продолжают получать исследуемое лечение, свободны от прогрессирования заболевания, в том числе все пациенты, к настоящему времени достигшие объективного ответа.

Таблица 18. Ответы у пациентов на основании гистологического исследования

	Медиана (диапазон) дней последующего наблюдения	Наилучший ответ				ЧОО (ПО = ЧО)
		ПО	ЧО	СЗ	ПЗ	
Хронический лимфоцитарный лейкоз	220 (83–329)	0/14 (0 %)	13/14 ¹ (93 %)	1/14 (7 %)	0 (0 %)	13/14 (93 %)
Мантийноклеточная лимфома	148 (84–392)	2/10 (20 %)	6/10 (60 %)	1/10 (10 %)	1/10 (10 %)	8/10 (80 %)
Макроглобулинемия Вальденстрема	271 (11–398)	0/7 (0 %)	6/7 ² (86 %)	0/7 (0 %)	1/7 (14 %)	6/7 (86 %)
DLBCL	29 (20–236)	1/4 (25 %)	0/4 (0 %)	0/4 (0 %)	3/4 (75 %)	1/4 (25 %)
Медленно растущая НХЛ	233 (215–250)	0/2 (0 %)	0/2 (0 %)	2/2 (100 %)	0/2 (0 %)	0/2 (0 %)
Волосатоклеточный лейкоз	362	0/1 (0 %)	1/1 (100 %)	0/1 (0 %)	0/1 (0 %)	1/1 (100 %)
Лимфома типа Беркитта	84	0/1 (0 %)	0/1 (0 %)	0/1 (0 %)	1/1 (100 %)	0/1 (0 %)

¹При последней оценке включено пять пациентов с лимфоцитозом;

²Включен один пациент с ОВЧО

Примечание: ПО = полный ответ; ЧО = частичный ответ; СЗ = стабильное заболевание; ПЗ = прогрессирующее заболевание; ЧОО = частота объективного ответа

Восемь пациентов прекратили прием соединения 1, включая 6 в связи с прогрессированием заболевания и 2 в связи с нежелательными явлениями, связанными с основным злокачественным новообразованием. 3 пациента умерли в ходе исследования в результате прогрессирования заболевания или осложнений прогрессирования заболевания. Серьезные нежелательные явления (СНЯ), связанные с применением исследуемого препарата, отсутствовали. Подавляющее большинство нежелательных явлений независимо от взаимосвязи с исследуемым лечением характеризовались 1-ой или 2-ой степенью тяжести и не ограничивались исследуемым лечением. Из 19 НЯ выше 3-ей степени тяжести 4 были расценены исследователями как возможно связанные с исследуемым препаратом - все они представляют собой самостоятельно разрешившуюся нейтропению, не требующую прекращения исследуемого лечения. Был отмечен один случай обширного кровоизлияния, определяемого как явление кровотечения 3-ей или более высокой степени или явление интракраниального кровотечения любой степени: желудочно-кишечное (ЖК) кровотечение у пациента с мантийноклеточной лимфомой с лимфоматозным вовлечением ЖК тракта; это явление кровотечения возникло во время воздержания от приема препарата и быстро разрешилось при возобновлении применения соединения 1, поэтому его не считают связанным с применением исследуемого препарата. У 6 пациентов в анамнезе была отмечена фибрилляция/трепетание предсердий (AF; от англ. atrial fibrillation), и об обострениях или новых случаях AF не сообщалось.

(2) Результат продолжающегося клинического исследования 1 фазы соединения 1 у пациентов с макроглобулинемией Вальденстрема (BM)

Многоцентровое открытое исследование 1 фазы соединения 1 при В-клеточных злокачественных новообразованиях проводится в Австралии, Новой Зеландии, Южной Корее и Соединенных Штатах Америки и состоит из фазы увеличения дозы и фазы применения ранее установленной максимально переносимой дозы в расширенной популяции в когортах с конкретным заболеванием, включающих ранее не получавших лечение пациентов и пациентов с рецидивирующей/рефрактерной макроглобулинемией Вальденстрема (P/P BM). В компоненте исследования с увеличением дозы исследованы суммарные суточные дозы в диапазоне от 40 до 320 мг, а в продолжающейся фазе применения ранее установленной максимально переносимой дозы исследуют дозы 160 мг два раза в сутки (2 р/сут) или 320 мг один раз в сутки (1 р/сут). По данным на 31 марта 2017 г. в исследование было включено 48 пациентов с BM. Ответы определяют в соответствии с модифицированными критериями Шестого международного семинара по BM (IWWM; от англ. International Workshop on WM).

Было показано, что соединение 1 хорошо переносится, и к настоящему времени случаев прекращения применения соединения 1, связанного с токсичностью, не было. Нежелательные явления (НЯ) в целом характеризовались легкой степенью и разрешались самостоятельно. Наиболее часто встречающимися НЯ (более 10%) любого характера среди 48 пациентов, подлежащих оценке безопасности, были петешии/пурпура/ушибы (35%), инфекция верхних дыхательных путей (31%), запор (25%), диарея (19%), кровотечение из носа (19%), тошнота (17%), кашель (15%), анемия (15%), головная боль (15%), нейтропения (13%) и сыпь (13%), все из которых характеризовались 1-ой или 2-ой степенью тяжести за исключением анемии и нейтропении 3-ей или 4-ой степени тяжести (каждое явление 8%), а также диареи и головной боли 3 или 4 степени тяжести (каждое явление 2%). Пять серьезных НЯ были расценены как возможно связанные с соединением 1; они включают по одному случаю гемоторакса, фибрилляции предсердий, колита, фебрильной нейтропении и головной боли. Среди НЯ, представляющих особый интерес, в общей сложности отмечено три случая фибрилляции предсердий (все степени 1 или 2) и один случай серьезного кровотечения (гемоторакса), определенный как кровотечение 3-ей или более высокой степени

или кровоизлияние центральной нервной системы любой степени. Три явления приводят к прекращению лечения: по одному случаю бронхоэктаза, аденокарциномы предстательной железы и аденокарциномы привратника желудка.

На дату завершения внесения данных оценке ответа подлежали 42 пациента. Пациенты, не подлежащие оценке эффективности, включают двух пациентов с периодом последующего наблюдения менее 12 недель, трех пациентов с IgM более 500 мг/дл на исходном уровне и одного пациента с неправильным определением IgM в связи с криоглобулином. При медиане периода последующего наблюдения 12,3 месяца (4,4-30,5 месяцев) ЧОО составляла 90% (38/42 пациента), а частота значительного ответа составляла 76% (32/42 пациентов), при этом ОВЧО был отмечен у 43% (18/42) пациентов, а частичные ответы - у 33% (14/42) пациентов.

(3) Результат продолжающегося клинического исследования 1 фазы соединения 1 у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой (ХЛЛ/МКЛ)

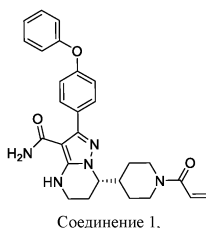
Многоцентровое открытое исследование 1 фазы соединения 1 у пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями проводится в Австралии, Новой Зеландии, Южной Корее и Соединенных Штатах Америки и состоит из фазы увеличения дозы и фазы применения ранее установленной максимально переносимой дозы в расширенной популяции в когортах с конкретным заболеванием, включающих ранее не получавших лечение пациентов и пациентов с рецидивирующими/рефрактерными (Р/Р) ХЛЛ/МКЛ. В компоненте исследования с увеличением дозы исследованы суммарные суточные дозы в диапазоне от 40 мг до 320 мг, а в продолжающейся фазе применения ранее установленной максимально переносимой дозы исследуют дозы 160 мг два раза в сутки (2 р/сут) или 320 мг один раз в сутки (1 р/сут). По данным на 31 марта 2017 г. в исследование было включено 69 пациентов с ХЛЛ или МКЛ (18 TN (от англ. Treatment-naïve), 51 Р/Р).

Было показано, что соединение 1 хорошо переносится при ХЛЛ/МКЛ. Наиболее частыми нежелательными явлениями (НЯ) (не менее 10%) любого характера были петехии/пурпура/ушибы (46%), утомляемость (29%), инфекция верхних дыхательных путей (28%), кашель (23%), диарея (22%), головная боль (19%), гематурия (15%), тошнота (13%), сыпь (13%), артралгия (12%), мышечные спазмы (12%) и инфекция мочевыводящих путей (12%); все эти явления характеризовались 1-ой или 2-ой степенью тяжести за исключением одного случая пурпуры 3-ей степени (подкожное кровоизлияние), который был единственным случаем значительного кровотечения. Дополнительные представляющие интерес нежелательные явления включают по одному случаю диареи 2-ой степени и фибрилляции предсердий 2-ой степени. У 13 пациентов в общей сложности возникло 18 серьезных НЯ (СНЯ), при этом ни одно СНЯ не возникло более чем у одного пациента. Только один пациент прекратил исследуемое лечение в связи с НЯ плеврального выпота 2-ой степени.

На момент прекращения внесения данных у 66 пациентов (16 TN и 50 Р/Р) прошло более 12 недель последующего наблюдения, и они подлежат оценке эффективности, а у остальных трех пациентов период последующего наблюдения составлял менее 12 недель. После медианы периода последующего наблюдения 10,5 месяцев (2,2-26,8 месяцев) общая частота ответа (ОЧО) составляла 94% (62/66) с полными ответами (ПО) у 3% (2/66), частичными ответами (ЧО) у 82% (54/66) и ЧО с лимфоцитозом (ЧО-Лц) у 9% (6/66) пациентов. Стабильное заболевание (СЗ) наблюдалось у 5% (3/66) пациентов. Пациент с плевральным выпотом прекратил лечение до наступления 12 недель и не подлежал оценке ответа. Был отмечен один случай трансформации в лимфому Ходжкина. У пациентов TN с ХЛЛ/МКЛ на момент медианы периода последующего наблюдения 7,6 месяцев (3,7-11,6 месяцев) ОЧО составляла 100% (16/16) с ПО у 6% (1/16), ЧО у 81% (13/16) и ЧО-Лц у 13% (2/16) пациентов. У пациентов с Р/Р ХЛЛ/МКЛ на момент медианы периода последующего наблюдения 14,0 месяцев (2,2-26,8 месяцев) ОЧО составляла 92% (46/50) с ПО у 2% (1/50), ЧО у 82% (41/50) и ЧО-Лц у 8% (4/50) пациентов. Стабильное заболевание наблюдалось у 6% (3/50) пациентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая форма соединения 1



представляющая собой ангидрат,

где кристаллическая форма характеризуется порошковой рентгеновской дифрактограммой, включающей пики дифракции, имеющие углы 2θ , представляющие собой $14,8 \pm 0,2^\circ$, $16,4 \pm 0,2^\circ$ и $21,4 \pm 0,2^\circ$.

2. Кристаллическая форма по п.1, характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой, включающей пики дифракции, имеющие углы 2θ , представляющие собой $14,8 \pm 0,2^\circ$, $15,6 \pm 0,2^\circ$,

16,4±0,2° и 21,4±0,2°.

3. Кристаллическая форма по п.1, характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой, включающей пики дифракции, имеющие углы 2θ, представляющие собой 12,2±0,2°, 12,9±0,2°, 14,8±0,2°, 15,6±0,2°, 16,4±0,2° и 21,4±0,2°.

4. Кристаллическая форма по п.1, характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой, включающей пики дифракции, имеющие углы 2θ, представляющие собой 12,2±0,2°, 12,9±0,2°, 14,8±0,2°, 15,6±0,2°, 16,4±0,2°, 17,7±0,2°, 18,5±0,2°, 20,7±0,2° и 21,4±0,2°.

5. Кристаллическая форма по п.1, характеризующаяся порошковой рентгеновской дифрактограммой, включающей пики дифракции, имеющие углы 2θ, представляющие собой 5,4±0,2°, 10,8±0,2°, 12,2±0,2°, 13,0±0,2°, 14,8±0,2°, 15,6±0,2°, 16,4±0,2°, 17,7±0,2°, 18,5±0,2°, 18,7±0,2°, 20,7±0,2°, 21,4±0,2°, 22,0±0,2°, 22,9±0,2°, 23,7±0,2°, 25,1±0,2°, 26,5±0,2°, 26,9±0,2°, 27,1±0,2°, 29,6±0,2°, 30,8±0,2° и 36,4±0,2°.

6. Кристаллическая форма по любому из пп.1-5, характеризующаяся температурой плавления 139±2°C (температура начала плавления).

7. Способ получения кристаллической формы по любому из пп.1-6, включающий следующую стадию:

(а) стадии растворения соединения 1 в ДХМ (дихлорметан), замены растворителя на ЭА (этилацетат), перекристаллизации из ЭА/МТБЭ (этилацетат/метил-трет-бутиловый эфир) с получением требуемой кристаллической формы.

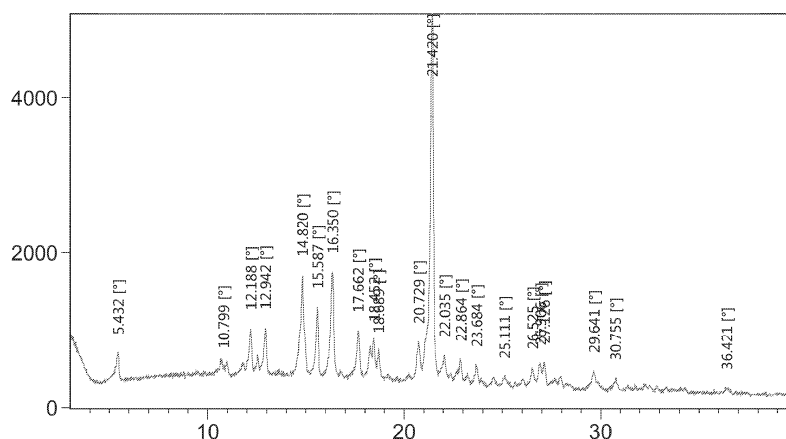
8. Способ лечения заболевания, обусловленного нежелательной активностью Btk (тирозинкиназа Брутона) у субъекта путем введения субъекту кристаллической формы по любому из пп.1-6.

9. Способ по п.8, где заболевание, обусловленное нежелательной активностью Btk, выбрано из аллергического заболевания, аутоиммунного заболевания, воспалительного заболевания, рака или В-клеточного пролиферативного заболевания, выбранного из В-клеточных злокачественных новообразований, или комбинации двух или более из них.

10. Способ по п.9, где В-клеточное пролиферативное заболевание представляет собой В-клеточные злокачественные новообразования, выбранные из лимфомы, неходжкинской лимфомы (НХЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), мантийноклеточной лимфомы (МКЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (ВМ), лимфомы из клеток маргинальной зоны (МЗЛ), волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), лейкоза по типу лимфомы Беркитта (БЛ) или комбинации двух или более из них.

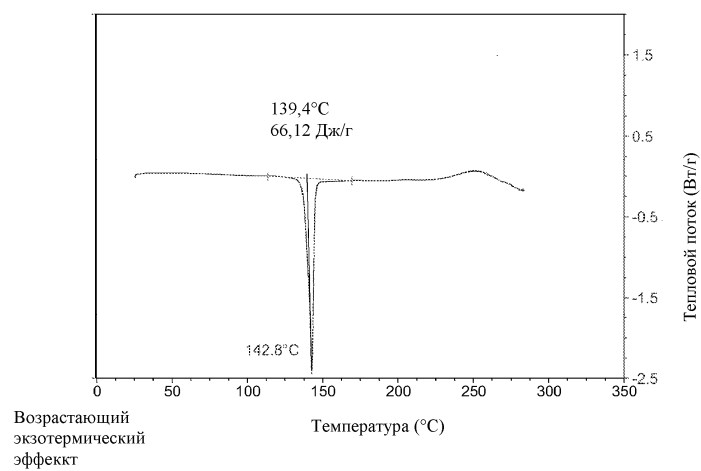
11. Способ по п.9, где В-клеточное пролиферативное заболевание представляет собой рецидивирующие/рефрактерные В-клеточные злокачественные новообразования, выбранные из рецидивирующей/рефрактерной мантийноклеточной лимфомы (Р/Р МКЛ), рецидивирующего/рефрактерного хронического лимфоцитарного лейкоза (Р/Р ХЛЛ), рецидивирующей/рефрактерной мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (Р/Р МКЛ), рецидивирующей/рефрактерной макроглобулинемии Вальденстрема (Р/Р ВМ) или комбинации двух или более из них.

12. Способ по п.9, где кристаллическую форму по любому из пп.1-6 вводят в дозе 160 мг два раза в сутки (2 р/сут) или 320 мг один раз в сутки (1 р/сут).

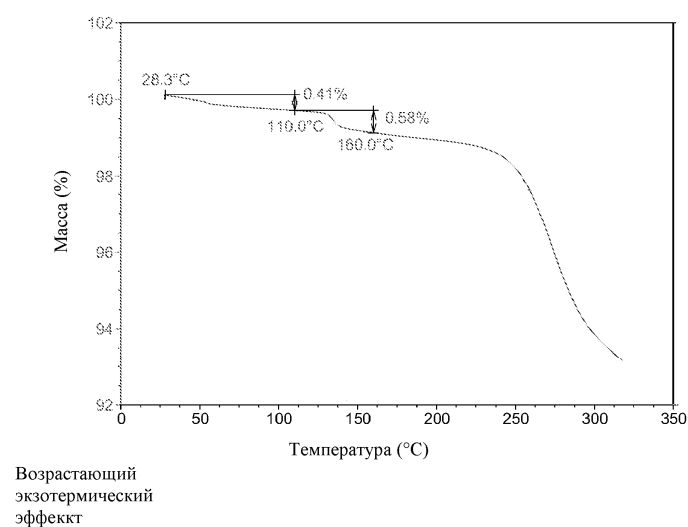


Фиг. 1

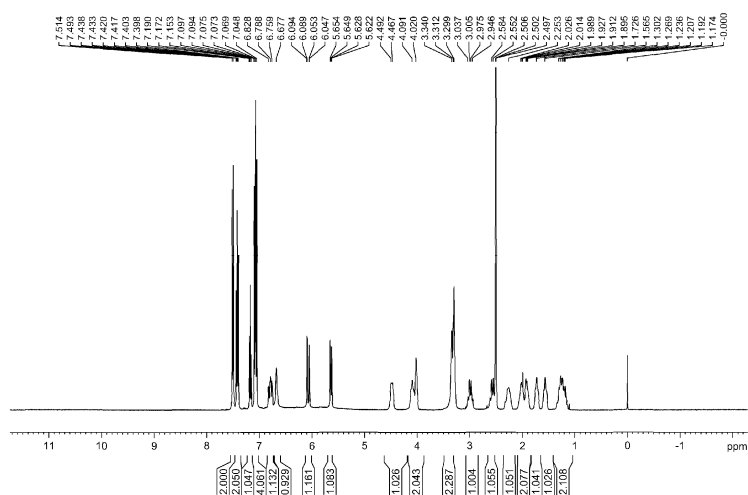
041344



Фиг. 2

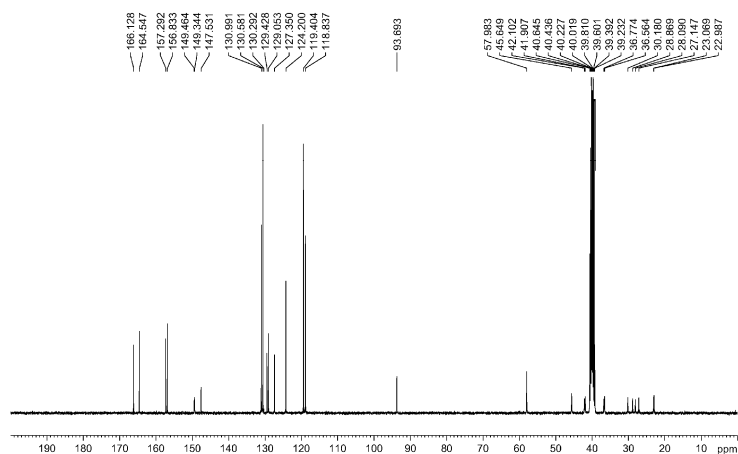


Фиг. 3

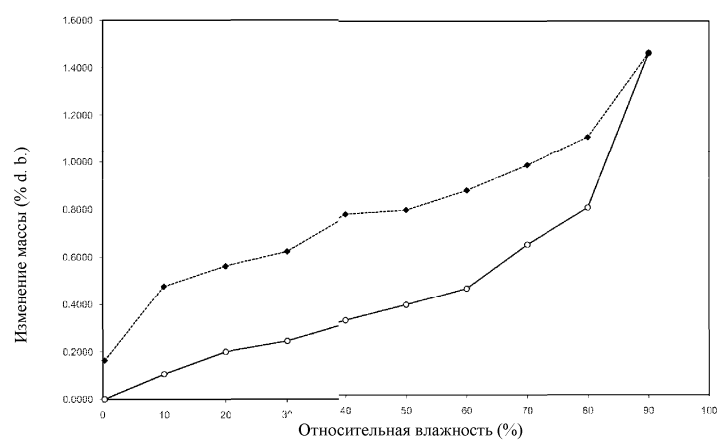


Фиг. 4

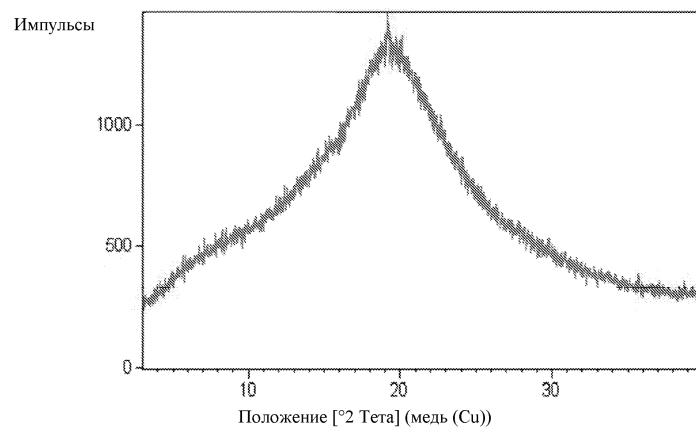
041344



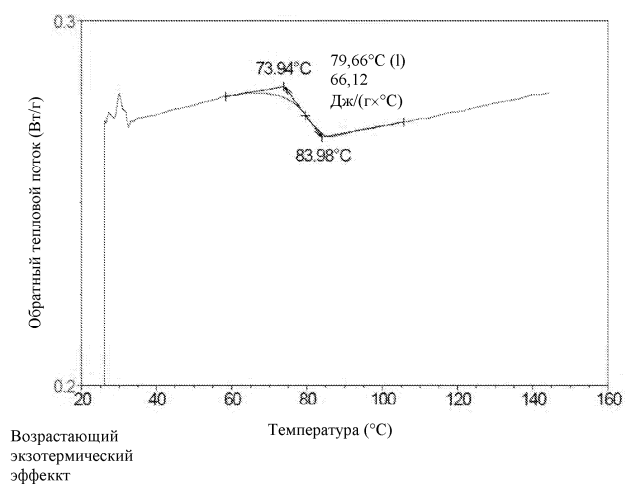
Фиг. 5



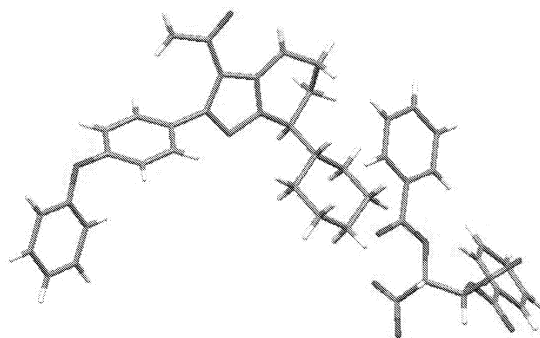
Фиг. 6



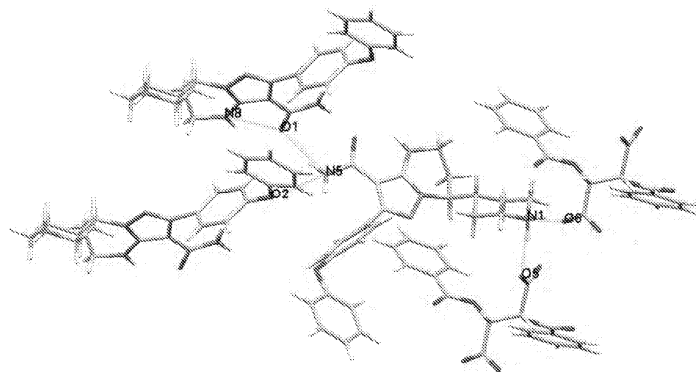
Фиг. 7А



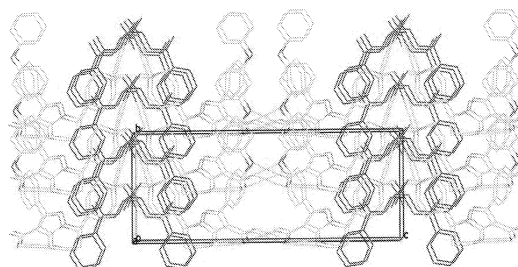
Фиг. 7В



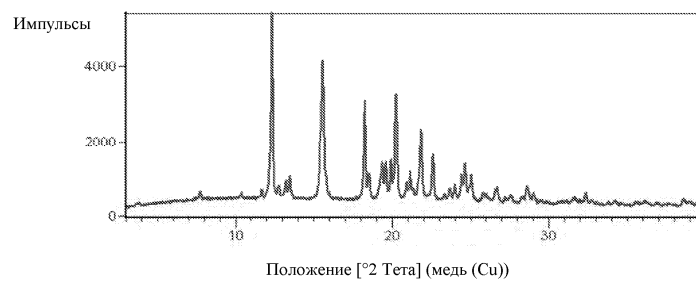
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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