

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292206 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.02(22) Дата подачи заявки
2021.03.23(51) Int. Cl. C07D 413/12 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)
A61P 3/12 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ФЕРРОПОРТИНА

(31) 20165358.1

(32) 2020.03.24

(33) EP

(86) PCT/EP2021/057424

(87) WO 2021/191202 2021.09.30

(71) Заявитель:

ВИФОР (ИНТЕРНЭШНЛ) АГ (CH)

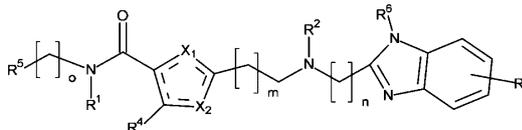
(72) Изобретатель:

Рейм Штефан, Филипп Эрик,
Вильгельм Мария, Блаттер Сирилл
(CH)

(74) Представитель:

Салинник Е.А., Ляджин А.В. (KZ)

(57) Изобретение относится к новому способу получения соединений формулы (I)



и их фармацевтически приемлемых солей, которые выступают в роли ингибиторов ферропортина, пригодных для применения в качестве лекарственных препаратов при профилактике и/или лечении заболеваний, вызываемых отсутствием гепсидина, или нарушений метаболизма железа, приводящих к повышенным уровням железа или повышенной абсорбции железа, таких как перегрузка железом, талассемия, серповидноклеточная анемия и гемохроматоз.

A1

202292206

202292206

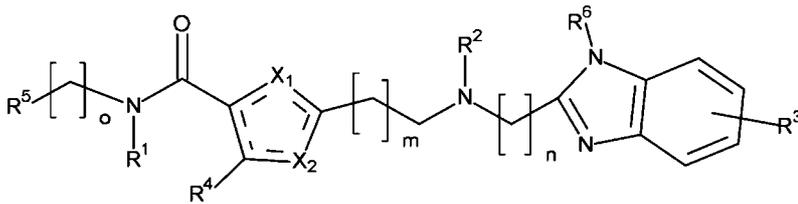
A1

5

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ФЕРРОПОРТИНА

ВВЕДЕНИЕ

10 Изобретение относится к новому способу получения соединений формулы (I)



(I)

и их фармацевтически

приемлемых солей. Соединения общей формулы (I) по настоящему изобретению действуют в роли ингибиторов ферропортина и, следовательно, являются особенно предпочтительными для применения в качестве лекарственных препаратов при профилактике и/или лечении заболеваний, вызываемых отсутствием гепсидина, или нарушений метаболизма железа, приводящих к повышенным уровням железа или повышенной абсорбции железа. Кроме того, соединения общей формулы (I) по настоящему изобретению особенно пригодны для применения при профилактике и/или лечении перегрузки железом, в том числе талассемии, серповидноклеточной анемии и гемохроматоза, а также для применения при профилактике и/или лечении заболеваний, связанных с или вызываемых повышенными уровнями железа, повышенной абсорбцией железа или перегрузкой железом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

25 Железо является важным микроэлементом практически для всех организмов и, в частности, играет роль в росте и образовании крови. Баланс метаболизма железа в этом случае в основном регулируется на уровне восстановления железа из гемоглобина стареющих эритроцитов и абсорбции железа, содержащегося в пище, двенадцатиперстной кишкой. Высвобожденное железо всасывается через кишку, в частности, через специфические системы переноса (DMT-1, ферропортин), переносится в кровотоке и, таким образом, передается в соответствующие ткани и органы (трансферрин, рецепторы трансферрина).

35 Организмы-млекопитающие не могут активно сбрасывать железо. Метаболизм железа, по существу, контролируется гепсидином, пептидным гормоном, вырабатываемым в печени, посредством клеточного высвобождения железа из

макрофагов, гепатоцитов и энтероцитов. Гепсидин воздействует на абсорбцию железа через кишку и через плаценту, а также на высвобождение железа из ретикулоэндотелиальной системы. В организме гепсидин синтезируется в печени и известен, как прогепсидин, при этом прогепсидин кодируется геном, известным как ген

5 НАМР. Образование гепсидина регулируется в прямой связи с уровнем железа у организмов, т. е., если организм получает достаточное количество железа и кислорода, то образуется больше гепсидина, а если уровни железа и кислорода низкие или если имеет место повышенный эритропоэз, то образуется меньше гепсидина. В клетках слизистой оболочки тонкой кишки и в макрофагах гепсидин связывается с

10 транспортным белком ферропортином, который обычно переносит фагоцитозно рециклированного железа из внутреннего пространства клетки в кровь.

Транспортный белок ферропортин представляет собой трансмембранный белок, состоящий из 571 аминокислоты и формирующийся в печени, селезенке, почках, сердце, кишке и плаценте. В частности, ферропортин локализуется в

15 базолатеральной мембране эпителиальных клеток кишки. Следовательно, ферропортин, связанный таким образом, действует для экспорта железа в кровь. В данном случае, наиболее вероятным является то, что ферропортин транспортирует железо в виде Fe^{2+} . Если гепсидин связывается с ферропортином, то ферропортин транспортируется во внутреннее пространство клетки, где происходит его распад, так что высвобождение фагоцитозно рециклированного железа из клеток впоследствии почти полностью блокируется. Если ферропортин деактивирован, например, гепсидином, ввиду чего он не может экспортировать железо, которое находится в клетках слизистой оболочки, то имеющееся железо теряется при естественном сбросе клеток через стул. Таким образом, снижается абсорбция железа в кишке, когда ферропортин деактивируется или

25 ингибируется, например, гепсидином. Кроме того, ферропортин заметно локализуется в ретикулоэндотелиальной системе (РЭС), к которой также принадлежат макрофаги. С другой стороны, если уровень сывороточного железа снижается, то выработка гепсидина в гепатоцитах печени ослабевает, поэтому высвобождается меньшее количество гепсидина и, следовательно, деактивируется меньшее количество ферропортина, позволяя большему количеству имеющегося

30 железа транспортироваться в сыворотку.

Из этого становится очевидно то, что система гепсидин-ферропортин непосредственно регулирует метаболизм железа и что нарушение механизма регулирования гепсидина, таким образом, оказывает прямое воздействие на

35 метаболизм железа в организме. В принципе, механизм регулирования гепсидина-ферропортина функционирует в соответствии с двумя следующими противоположными принципами.

С одной стороны, повышение гепсидина приводит к деактивации ферропортина, тем самым блокируя высвобождение имеющегося железа из клеток в сыворотку, таким

40 образом, снижая уровень сывороточного железа. В случаях патологии, пониженный

уровень сывороточного железа приводит к пониженному уровню гемоглобина, пониженной выработке эритроцитов и, следовательно, к железодефицитной анемии.

С другой стороны, снижение гепсидина приводит к повышению активного ферропортина, тем самым делая возможным усиленное высвобождение имеющегося железа и усиленное всасывание железа, например, из пищи, повышая, таким образом, уровень сывороточного железа. В случаях патологии, повышенный уровень железа приводит к перегрузке железом.

Состояния и заболевания с перегрузкой железом характеризуются избыточными уровнями железа. В этом случае, ввиду избыточных уровней железа возникают проблемы, которые приводят к несвязанному с трансферрином железу (NTBI). NTBI быстро всасывается органами неспецифичным образом, что приводит к накоплению железа в тканях и органах. Перегрузка железом является причиной многих заболеваний и нежелательных медицинских состояний, в том числе к повреждениям сердца, печени и эндокринным повреждениям. Кроме того, накопление железа в головном мозгу наблюдалось у пациентов, страдающих от нейродегенеративных заболеваний, таких как, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. В качестве конкретного пагубно воздействующего аспекта, представляющего собой избыток свободного железа, следует упомянуть образование радикалов. В частности, ионы железа(II) катализируют образование (в частности, за счет реакции Фентона) активных форм кислорода (ROS). Эти ROS приводят к повреждению ДНК, липидов, белков и углеводов, что имеет масштабные последствия в клетках, тканях и органах, а также хорошо известно и описано в литературе, как причина так называемого окислительного стресса.

Помимо традиционных способов лечения перегрузки железом путем удаления иона из организма, например, с помощью хелатирующих агентов, таких как дефероксамин (который также известен, как десферриоксамин В, N¹-{5-[ацетил(гидрокси)амино]пентил}-N-[5-({4-[(5-аминопентил)(гидрокси)амино]-4-оксобутаноил}амино)пентил]-N-гидроксисукцинамид или Десферал®), деферазирокс (Exjade®, 4-(3,5-бис(2-гидроксифенил)-1H-1,2,4-триазол-1-ил)бензойная кислота) и деферипрон (Феррипрокс®, 3-гидрокси-1,2-диметилпиридин-4(1H)-он), были описаны соединения, действующие в роли агонистов гепсидина или оказывающие ингибирующее или поддерживающее воздействие на биохимические регуляторные пути в метаболизме железа, такие как пептидные миметики гепсидина. Упомянутые терапевтические подходы основаны на прямом вовлечении в нарушенный путь метаболизма железа посредством прямого воздействия через первичный регулятор гепсидин за счет обеспечения миметика гепсидина или агониста гепсидина, т. е. действующего в роли заместителя или добавки гепсидина. Этот подход основан на терапевтическом обосновании лечения перегрузки железом, т. е. избыточного уровня сывороточного железа, путем ингибирования ферропортина через механизм деактивации гепсидина, тем самым блокируя абсорбцию избыточного железа.

Ингибиторы ферропортина, согласно формуле (I) настоящего изобретения, и способы их получения были описаны в WO2017/068089 и в WO2017/068090. Способы получения, описанные в данных документах, включают 12 этапов способа, включающие в себя несколько этапов хроматографического процесса, что дает
5 низкоэффективный способ получения, который является затратным в части времени, издержек и усилий. Способ, описанный в данных документах, также характеризуется сравнительно низкими выходами, а некоторые этапы способа создают проблемы с безопасностью и технические проблемы ввиду образования критических побочных
10 продуктов.

Кроме того, в международной заявке WO2018/192973 описано получение и кристаллизация различных специфических солей выбранных ингибиторов ферропортина, описанных в ней, а также описанных в WO2017/068089 и в
15 WO2017/068090.

WO2011/029832 касается тиазольных и оксазольных соединений, которые
15 действуют в роли антагонистов гепсидина и описаны, как подходящие для применения в лечении заболеваний с дефицитом железа, а также в нем описан способ получения указанных соединений, согласно пути синтеза 3). Способ, описанный в нем, также включает множество этапов способа, включающих в себя этапы хроматографической сепарации и очистки, и, следовательно, он также является неблагоприятным с точки
20 зрения эффективности.

В источнике *A. C. Veronese et al. "One-Pot Synthesis of 2-Vinylimidazole Derivatives by Reaction of α -Hydroxyimino- β -dicarbonyl Compounds with Allylamine; 1985)* описана одностадийная реакция синтеза для получения производных 2-винилимидазола, однако в нем не описаны соединения формулы (I), (II) или (II'), а
25 также выбранные промежуточные соединения настоящего изобретения или способ их получения.

ЗАДАЧА

Задача настоящего изобретения заключалась в представлении нового способа получения выбранных ингибиторов ферропортина, определенных общей формулой (I)
30 настоящего изобретения, и их фармацевтически приемлемых солей. Новый способ должен быть усовершенствован в части по меньшей мере одного из аспектов, в которые входит повышенный выход, эффективность способа, уменьшение количества этапов способа, усовершенствование ресурсов, например, путем использования доступных в продаже или более дешевых начальных соединений или путем использования
35 начальных и промежуточных соединений, которые могут быть получены способом, эффективным в части времени, издержек и усилий, путем исключения максимально возможного количества этапов хроматографического процесса, путем повышения рабочей безопасности, исключения критических или вредных побочных продуктов, исключения критических компонентов реакции, таких как Sn реагенты, и путем
40 максимально возможного уменьшения количества этапов промежуточного выделения. Еще одна задача изобретения заключалась в представлении нового способа

R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из

- водорода и
- C_1 - C_4 -алкила, который может быть замещен 1 или 2 заместителями;

5 R^3 представляет собой 0, 1, 2 или 3 заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена,
- циано,
- C_1 - C_4 -алкила,

10 - C_1 - C_3 -галогеналкила;
 - C_1 - C_4 -алкокси и
 - карбоксильной группы;

R^4 выбран из группы, состоящей из

15 - водорода,
 - галогена,
 - C_1 - C_3 -алкила и
 - C_1 - C_3 -галогеналкила;

20 R^5 выбран из группы, состоящей из

- арила, который может иметь от 1 до 3 заместителей, и
- моно- или бициклического гетероарила, который может иметь от 1 до 3 заместителей; и

25 R^6 выбран из группы, состоящей из

- водорода,
- галогена,
- C_1 - C_4 -алкила, который может быть замещен 1 или 2 заместителями;
- C_1 - C_3 -галогеналкила.

30

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

35 Термин «замещенный» означает, что один или более атомов водорода на указанном атоме или группе заменен вариантом выбора из указанной группы при условии, что нормальная валентность указанного атома в имеющихся обстоятельствах не увеличивается. Допускаются комбинации заместителей и/или переменных.

40 Термин «необязательно замещенный» или «необязательный(е) заместитель(и)» означает, что количество заместителей может равняться или не равняться нулю. Если не указано иное, возможно, что необязательно замещенные группы замещены настолько большим количеством необязательных заместителей, насколько может быть включено, путем замены атома водорода на заместитель, не являющийся водородом, на любом

доступном атоме углерода или азота. В целом, количество необязательных заместителей, когда они присутствуют, может составлять 1, 2, 3, 4 или 5, в частности, 1, 2 или 3.

Термин «один или более», используемый в настоящем документе, например, при определении заместителей соединений общей Формулы (I) по настоящему изобретению, означает «1, 2, 3, 4 или 5», в частности, 1, 2, 3 или 4, более конкретно, 1, 2 или 3, еще более конкретно, 1 или 2».

Термин «содержащий» при использовании в формуле изобретения или описании включает в себя «состоящий из».

Если в настоящем описании любой элемент сопровождается выражением «указанный в настоящем документе» или «определенный (в любом месте) в настоящем документе», то это означает, что он может быть упомянут в любом месте настоящего описания или может иметь значение, определенное в любом месте настоящего описания.

Термины, упомянутые в настоящем описании, имеют следующие значения.

Термин «галоген» или «атом галогена» означает атом фтора, хлора, брома или йода, в частности, атом фтора, хлора или брома, при этом предпочтительным выбором является хлор или фтор, еще одним предпочтительным выбором является бром или фтор, наиболее предпочтительным является фтор.

Термин «C₁-C₄-алкил» означает линейную или разветвленную, насыщенную, моновалентную углеводородную группу, имеющую 1, 2, 3 или 4 атома углерода, например, метильную, этильную, *n*-пропильную, изопропильную, *n*-бутильную, *втор*-бутильную, изобутильную или *трет*-бутильную группу и т. д., или ее изомер. Термин «C₁-C₃-алкил» означает линейную или разветвленную, насыщенную, моновалентную углеводородную группу, имеющую 1, 2 или 3 атома углерода, например, метильную, этильную, *n*-пропильную или изопропильную группу.

C₁-C₄-алкильная или C₁-C₃-алкильная группа необязательно может быть замещена 1 или 2 заместителями, предпочтительно, 1 заместителем. Предпочтительно, такие необязательные заместители выбраны из группы, состоящей из: галогена (образуя галоген-замещенную C₁-C₄-алкильную или C₁-C₃-алкильную группу, определенную ниже), C₃-C₆-циклоалкила, содержащего, предпочтительно, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, например, предпочтительно, циклопропила, моно- или бициклического гетероарила, определенного ниже, например, предпочтительно, бензимидазолильной группы, аминокруппы, определенной ниже, карбоксильной группы, аминокарбонильной группы, определенной ниже.

Термин «C₁-C₃-галогеналкил» означает линейную или разветвленную, насыщенную, моновалентную углеводородную группу, в которой термин «C₁-C₃-алкил» имеет значение, определенное выше, и в которой один или более атомов водорода замещены атомом галогена идентично или по-разному. В частности, указанный атом галогена представляет собой атом фтора. Более конкретно, все указанные атомы галогена представляют собой атомы фтора («C₁-C₃-фторалкил»). Указанная C₁-C₃-галогеналкильная группа представляет собой, например, фторметил, дифторметил, трифторметил, 2-фторэтил, 2,2-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил, пентафторэтил, 3,3,3-

трифторпропил или 1,3-дифторпропан-2-ил, причем особенно предпочтительной является трифторметил-группа.

5 Термин «C₁-C₄-алкокси» означает линейную или разветвленную, насыщенную, моновалентную группу формулы (C₁-C₄-алкил)O-, в которой термин «C₁-C₄-алкил» определен выше, например, метокси, этокси, *n*-пропокси, изопропокси, *n*-бутокси, *втор-*бутокси, *изобутокси* или *трет-*бутокси группу, или ее изомер, при этом особенно предпочтительной является метокси-группа.

Термин «карбоксильная группа» означает группу [-(C=O)-OH].

Термин «аминокарбонильная группа» означает группу [NH₂-(C=O)-].

10 Термин «аминогруппа» включает в себя (-NH₂), моно- или диалкиламино (алкил-NH-, (алкил)₂N-), причем в отношении «алкила» может быть сделана ссылка на определение C₁-C₄-алкила и C₁-C₃-алкила выше. Предпочтительной является аминогруппа (-NH₂) и моно- или диметиламино. Наиболее предпочтительной является аминогруппа (-NH₂).

15 Термин «арил» включает в себя ароматические углеводородные остатки, содержащие от 6 до 14 атомов углерода (за исключением атомов углерода в возможных заместителях), которые могут быть моноциклическими или бициклическими, в том числе, например: фенил, нафтил, фенантренил и антраценил, которые могут быть
20 необязательно замещены 1, 2 или 3 одинаковыми или разными заместителями, выбранными из гидрокси, галогена, определенного выше, такого как, предпочтительно, F, Br и Cl, циано, карбоксильной группы, определенной выше, amino, определенного выше, C₁-C₄-алкила или C₁-C₃-алкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, метил, C₁-C₃-галогеналкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, трифторметил, и C₁-C₄-алкокси, определенного выше, такого как,
25 предпочтительно, метокси.

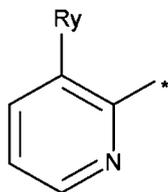
Предпочтительным является необязательно замещенный фенил, такой как незамещенный фенил и фенил, который замещен от 1 до 3, более предпочтительно, 1 или 2 заместителями, которые могут быть одинаковыми или разными. В частности, указанные от 1 до 3 заместителей выбраны из группы, определенной выше.

30 Термин «моно- или бициклический гетероарил» включает в себя гетероароматические углеводородные остатки, содержащие от 4-9-кольцевые атомы углерода, которые, предпочтительно, дополнительно содержат от 1 до 3 одинаковых или разных гетероатомов из ряда S, O, N в кольце и, следовательно, предпочтительно, образуют 5-12-членные гетероароматические остатки, которые, предпочтительно, могут
35 быть моноциклическими, но также и бициклическими. Предпочтительные ароматические гетероциклические остатки включают в себя: пиридил (пиридинил), пиридил-N-оксид, пиридазинил, пиримидил, пиразинил, тиенил (тиофенил), фурил, пирролил, пиразолил, имидазолил, триазолил, тиазолил, оксазолил или изоксазолил, индолизинил, индолил, бензо[b]тиенил, бензо[b]фурил, индазолил, хинолил,
40 изохинолил, нафтиридинил, хиназолинил, хиноксалинил. Предпочтительными являются 5- или 6-членные ароматические гетероциклы, такие как из группы 5-членного

гетероарила, например, тиазолил, такой как тиазол-2-ил, 2-тиазол-2-ил, 2-тиазол-4-ил, тиенил (тиофенил), такой как тиен-3-ил, пиразолил, такой как 1-пиразол-4-ил, 3-пиразол-5-ил, имидазолил, такой как имидазол-2-ил, 2-имидазол-4-ил, 1-имидазол-4-ил, триазол, такой как 1-триазол-3-ил, 1-триазол-4-ил, такой как 1,2,4-триазол-3-ил или
 5 1,2,3-триазол-4-ил, оксазолил, такой как 2-оксазол-4-ил, 2-оксазол-5-ил, оксадиазолил, такой как 1,2,4-оксадиазол-3-ил, и из группы 6-членного гетероарил, например, пиридил (пиридинил), такой как пирид-1-ил, пирид-2-ил, пирид-3-ил, пирид-4-ил, 2-пирид-4-ил, 2-пирид-6-ил, 3-пирид-5-ил (пиридин-1-ил, пиридин-2-ил, пиридин-3-ил, пиридин-4-ил, 2-пиридин-4-ил, 2-пиридин-6-ил, 3-пиридин-5-ил, пиримидин-2-ил, пиримидин-4-ил,
 10 пиримидин-5-ил, и из группы бициклических гетероароматических остатков, в частности, бензимидазолил, такой как бензимидазол-2-ил, бензимидазол-4-ил, бензимидазол-5-ил.

Указанные выше гетероарил-группы могут иметь одну или более, предпочтительно, 1, 2 или 3, более предпочтительно, 1 или 2 одинаковых или разных
 15 заместителя, которые, в частности, выбраны из гидроксидной, галогенной, определенной выше, такого как, предпочтительно, F, Br и Cl, циано, карбоксильной группы, определенной выше, амина, определенного выше, C₁-C₄-алкила или C₁-C₃-алкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, метил, C₁-C₃-галогеналкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, трифторметил, и C₁-C₄-алкокси, определенного выше,
 20 такого как, предпочтительно, метокси.

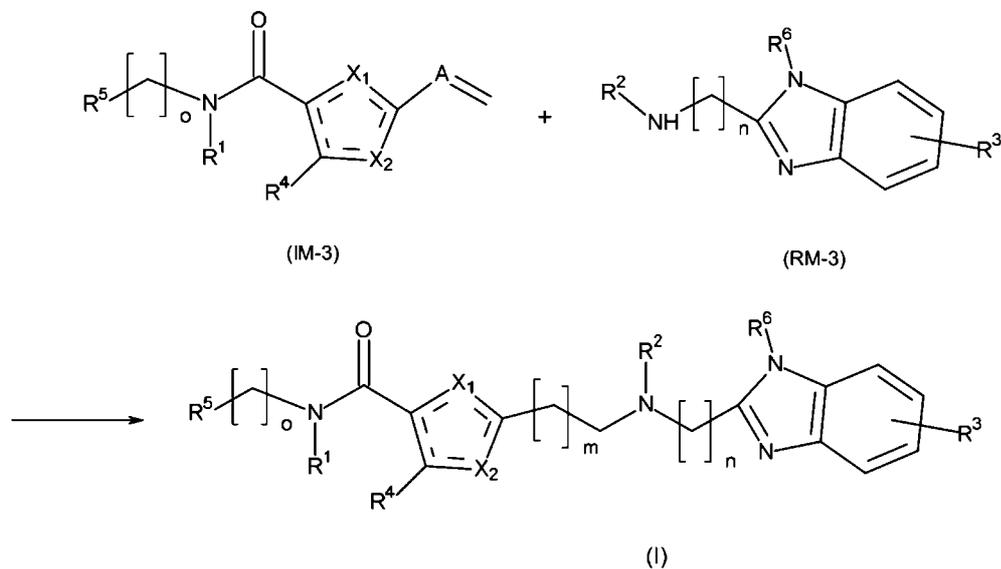
Особенно предпочтительной моно- или бициклической гетероарил-группой является пиридинил-группа, которая имеет 1, 2 или 3 заместителя, выбранные из группы, определенной выше. Предпочтительно, пиридинильная группа имеет 1 или 2
 25 заместителя, более предпочтительно, один заместитель. Предпочтительно, указанные 1, 2 или 3 необязательных пиридинильных заместителя выбраны из C₁-C₃-алкила, определенного выше, такого как, в частности, фтор и бром (при этом наиболее предпочтительным является фтор), и C₁-C₃-галогеналкила, определенного выше, такого как, в частности, трифторметил. Наиболее предпочтительным является один заместитель (обозначенный, как R_y), образующий группу, представленную формулой



30 где * обозначает положение связывания, а R_y обозначает заместитель, который выбран из C₁-C₃-алкила, такого как, предпочтительно, метил, галогена, такого как, предпочтительно, фтор или бром, и C₁-C₃-галогеналкила, такого как, предпочтительно, трифторметил, причем более предпочтительным является фтор или бром, наиболее
 35 предпочтительным является фтор.

АСПЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящего изобретения представлен новый способ получения соединений общей формулы (I), определенных в настоящем документе, в котором промежуточное соединение формулы (IM-3) вводят в реакцию с соединением формулы (RM-3) для получения соединения формулы (I):

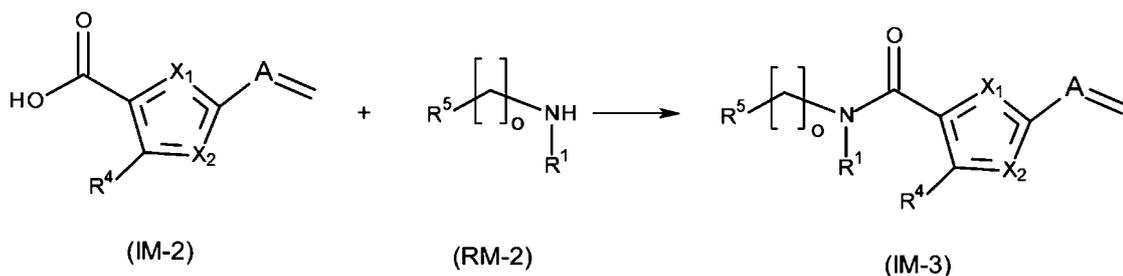


5

Здесь «А» представляет собой СН-группу, СН₂-СН-группу или СН₂-СН₂-СН-группу в зависимости от желаемой в результате длины алкиленовой цепи, определяемой []_m. Использование группы «А», являющейся СН-группой, дает длину цепи с m = 1. Использование группы «А», являющейся СН₂-СН-группой, дает длину цепи с m = 2. Использование группы «А», являющейся СН₂-СН₂-СН-группой, дает длину цепи с m = 3.

Предпочтительно, указанный этап способа осуществляют в щелочных условиях при повышенных температурах от 30°C до 90 °С. Щелочные условия могут быть достигнуты путем добавления подходящего основания, в том числе неорганических и органических оснований, таких как упомянутые ниже. Предпочтительными основаниями являются гидроксид лития и гидроксид натрия.

Во втором аспекте изобретения новый способ может дополнительно включать дополнительный этап, на котором получают промежуточное соединение формулы (IM-3) путем введения промежуточного соединения формулы (IM-2) в реакцию с соединением формулы (RM-2)



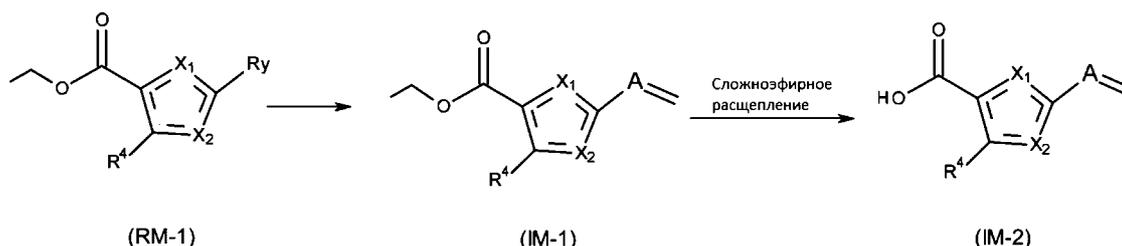
где X¹, X², o, A, R¹, R⁴ и R⁵ имеют значение, определенное выше.

Указанный этап способа, на котором получают промежуточное соединение (IM-3), могут выполнять перед этапом способа, на котором получают соединение (I), как показано выше. Предпочтительно, указанный этап способа выполняют с использованием метилморфолина и этилхлорформата в DCM (дихлорметане). Предпочтительно, реакцию проводят в условиях охлаждения, предпочтительно, при температурах ниже 10 °С.

Предпочтительно, соединение (RM-2), используемое на указанном этапе способа, находится в форме соли, например, в частности, в форме HCl соли.

Получаемое в результате промежуточное соединение (IM-3) может быть извлечено путем водной экстракции HCl при pH 1 и кристаллизовано из воды с проведением последующих обычных этапов фильтрации и сушки для выделения промежуточного соединения (IM-3).

В третьем аспекте изобретения новый способ может дополнительно включать дополнительный этап, на котором получают промежуточное соединение формулы (IM-2) путем преобразования соединения (RM-1) в соединение (IM-1) с последующим сложноэфирным расщеплением

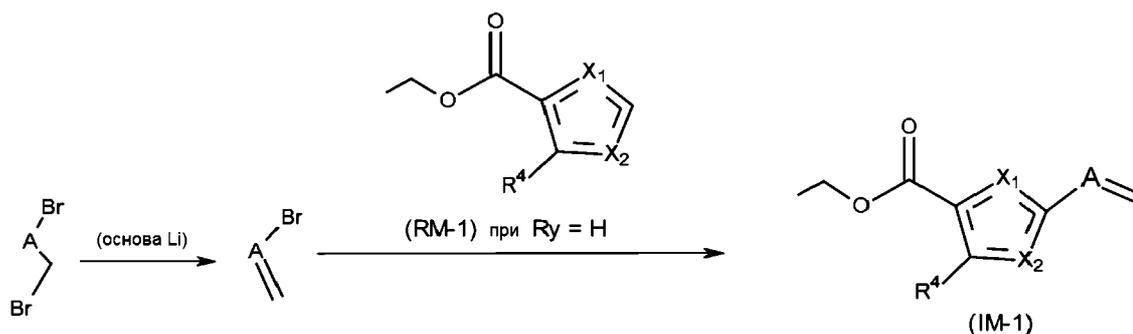


где R_y представляет собой водород или галоген, такой как, предпочтительно, хлор, а X^1 , X^2 , A и R^4 имеют значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

При этом сложноэфирное расщепление может проводиться путем сложноэфирного гидролиза с использованием традиционных способов. Предпочтительно, сложноэфирное расщепление соединения (IM-1) проводят с использованием подходящего основания, в том числе неорганических и органических оснований, таких как упомянутые ниже. Предпочтительными основаниями являются гидроксид лития и гидроксид натрия.

Реакция может проводиться в любом подходящем растворителе, в том числе тех, которые перечислены ниже. Предпочтительно, используют THF (тетрагидрофуран) и воду, и реакцию, предпочтительно, проводят при комнатной температуре ($23\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$).

В четвертом аспекте изобретения новый способ может включать этап, на котором получают промежуточное соединение формулы (IM-1), согласно следующей схеме реакции а):



где X^1 , X^2 , A и R^4 имеют значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

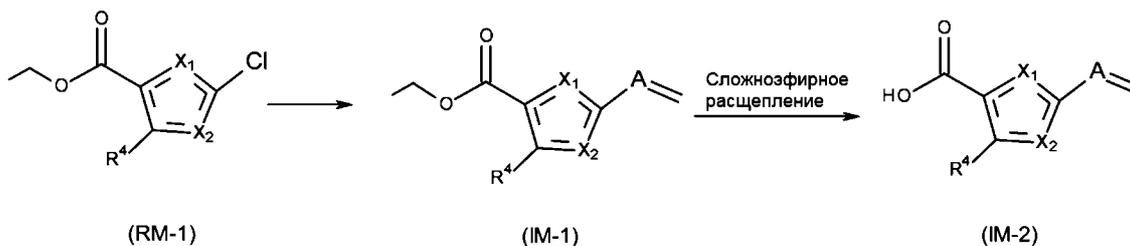
Указанный этап способа, на котором получают соединение (IM-1), предпочтительно, осуществляют при повышенных температурах > 40 °C. Может быть использован любой подходящий растворитель, в том числе те, которые перечислены ниже. Предпочтительно, реакцию проводят в THF.

Далее, реакцию проводят с использованием подходящего катализатора, в том числе, например, $Pd(PPh_3)_4$, $Pd_2(dba)_3$, $Pd(OAc)_2/PPh_3$, $Pd(dppf)Cl_2 \times DCM$, Pd/C .
 10 Особенно предпочтительным является использование $Pd(PPh_3)_4$ (тетраakis(трифенилфосфин)палладий(0)) в качестве катализатора в указанной реакции.

В качестве альтернативы, получение (IM-1) могут осуществлять путем прямого использования бром-алкена в газообразной форме или в форме доступного в продаже раствора в неорганическом растворителе.

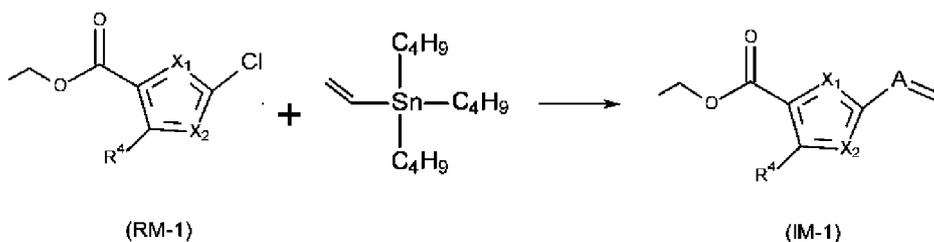
15

В альтернативном аспекте, промежуточное соединение формулы (IM-2) получают путем преобразования соединения (RM-1), где R_y имеет значение Cl, в соединение (IM-1) с последующим сложноэфирным расщеплением, как описано выше:

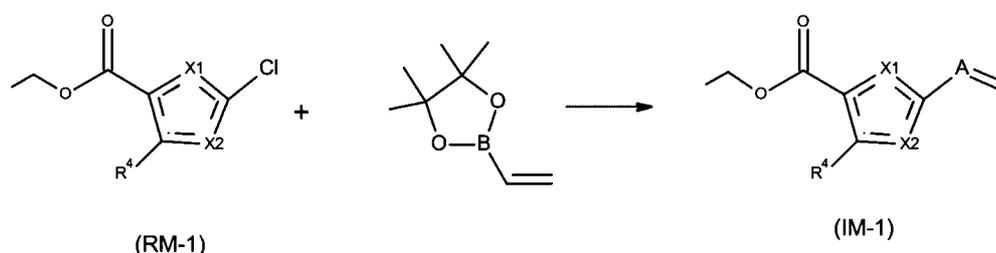


20 где X^1 , X^2 , A и R^4 имеют значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

При этом, этап способа, на котором получают (IM-1), может осуществляться с использованием трибутил(винил)олова, как описано ниже в Этапе 1-а', согласно схеме реакции б):



Еще в одном альтернативном аспекте изобретения, этап, на котором получают промежуточное соединение формулы (IM-1), осуществляют путем введения соединения (RM-1), где R_y имеет значение Cl, в реакцию с пинаколовым сложным эфиром винилбороновой кислоты с образованием соединения (IM-1), согласно схеме реакции в):



где X^1 , X^2 , A и R^4 имеют значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

Данный этап способа предпочтителен, поскольку реагент олова (Sn) не требуется, что снижает вред, наносимый окружающей среде, снижает издержки и риски для здоровья людей, реализующих способ.

В пятом аспекте изобретения, соединение IM-1 получают из соединения RM-1, где R_y представляет собой водород, как описано выше, с последующим преобразованием соединения IM-1 в промежуточное соединение IM-2 путем сложноэфирного расщепления, при этом указанные реакции проводят за один комбинированный этап одностадийной реакции. Такая сокращенная схема реакции обладает преимуществом, заключающимся в повышенной эффективности, благодаря меньшему количеству этапов промежуточного выделения и очистки. Время реакции и усилия могут быть заметно уменьшены и несколько этапов хроматографии могут быть исключены.

В шестом аспекте изобретения, соединение IM-3 получают из соединения IM-1 посредством образования *in situ* промежуточного соединения IM-2 и добавления соединения RM-2, при этом указанную реакцию проводят в виде комбинированной (сокращенной) одностадийной реакции. Такая сокращенная схема реакции обладает преимуществом, заключающимся в повышенной эффективности, благодаря меньшему количеству этапов промежуточного выделения и очистки. Время реакции и усилия

могут быть заметно уменьшены и несколько этапов хроматографии могут быть исключены.

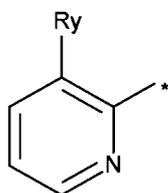
В седьмом аспекте изобретения, соединение IM-3 получают посредством еще одной сокращенной реакции, в которой соединение RM-1 преобразуют в промежуточное соединение IM-1 подобно тому, как описано выше, которое затем переносят в промежуточное соединение IM-2 посредством сложноэфирного расщепления с последующим преобразованием в промежуточное соединение IM-3 путем добавления соединения RM-2. Такая сокращенная схема реакции обладает преимуществом, заключающимся в дополнительном повышении эффективности, благодаря дополнительному уменьшению количества этапов промежуточного выделения и очистки. Время реакции и усилия могут быть дополнительно уменьшены и этапы хроматографии могут быть исключены.

В восьмом аспекте изобретения, соединение (I) получают посредством двух этапов сокращенной реакции, где первый этап сокращенной реакции соответствует получению промежуточного соединения IM-3, как описано в седьмом аспекте выше, а второй этап промежуточной реакции включает преобразование промежуточного соединения IM-3 в соединение (I) *in situ* с последующим образованием его соли для получения предпочтительных солей соединений (I) по настоящему изобретению.

В предпочтительном аспекте изобретения, способ получения соединения (I) осуществляют так, как это описано в любом месте в настоящем документе, и получаемое в результате свободное основание соединения формулы (I) выделяют путем фазовой сепарации (экстракции растворителем) или прямой сепарации получаемой в результате масляной фазы продукта (сепарации масла).

В предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения соединений общей формулы (I), описанных в настоящем документе, где заместитель R⁵ представляет собой моноциклическую гетероарильную группу, которая может иметь от 1 до 3 заместителей, определенных выше. При этом указанные 1, 2 или 3 необязательных заместителя могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из C₁-C₃-алкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, метил, галогена, определенного выше, такого как, предпочтительно, фтор или бром (из которых наиболее предпочтительным является фтор), и C₁-C₃-галогеналкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, трифторметил.

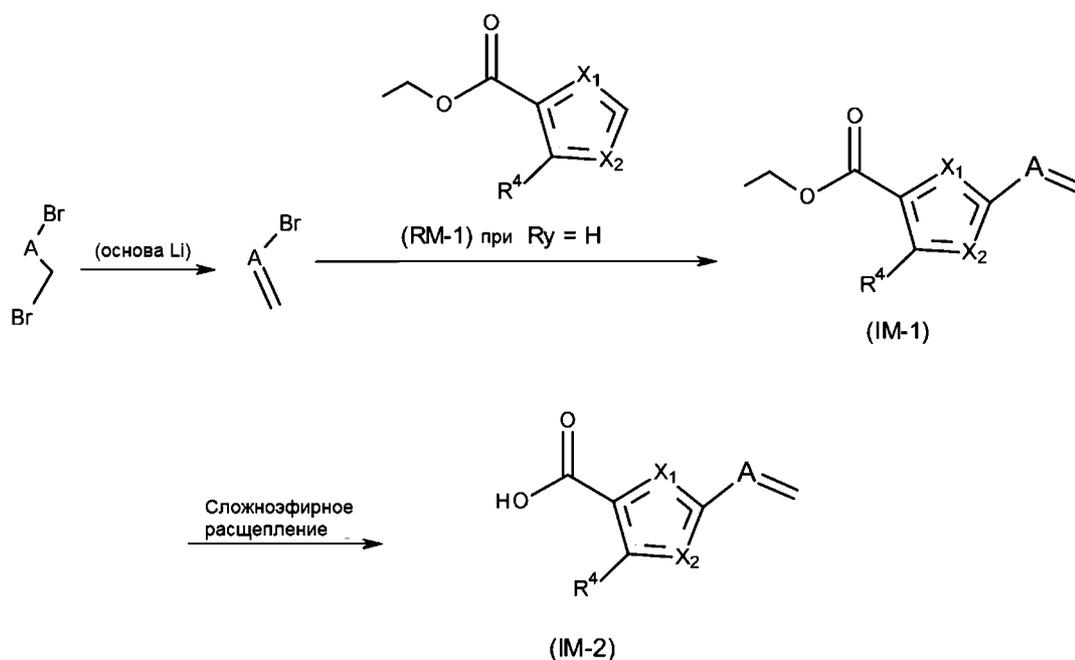
В особенно предпочтительном аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения соединений общей формулы (I), описанных в настоящем документе, где заместитель R⁵ представляет собой группу, представленную



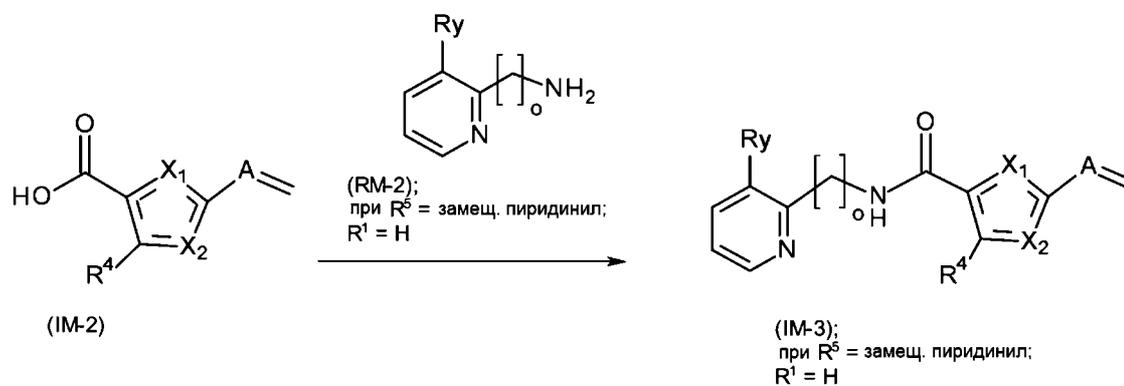
где * обозначает положение связывания, а R_y выбран из группы, состоящей из C_1 - C_3 -алкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, метил, галогена, определенного выше, такого как, предпочтительно, фтор или бром (из которых наиболее предпочтительным является фтор), и C_1 - C_3 -галогеналкила, определенного выше, такого как, предпочтительно, трифторметил. При этом особенно предпочтительно, чтобы R_y представлял собой фтор или бром (из которых наиболее предпочтительным является фтор).

Еще в одном конкретном аспекте настоящего изобретения представлен новый способ получения соединений общей формулы (I), определенных в настоящем документе, включающий следующие этапы реакции:

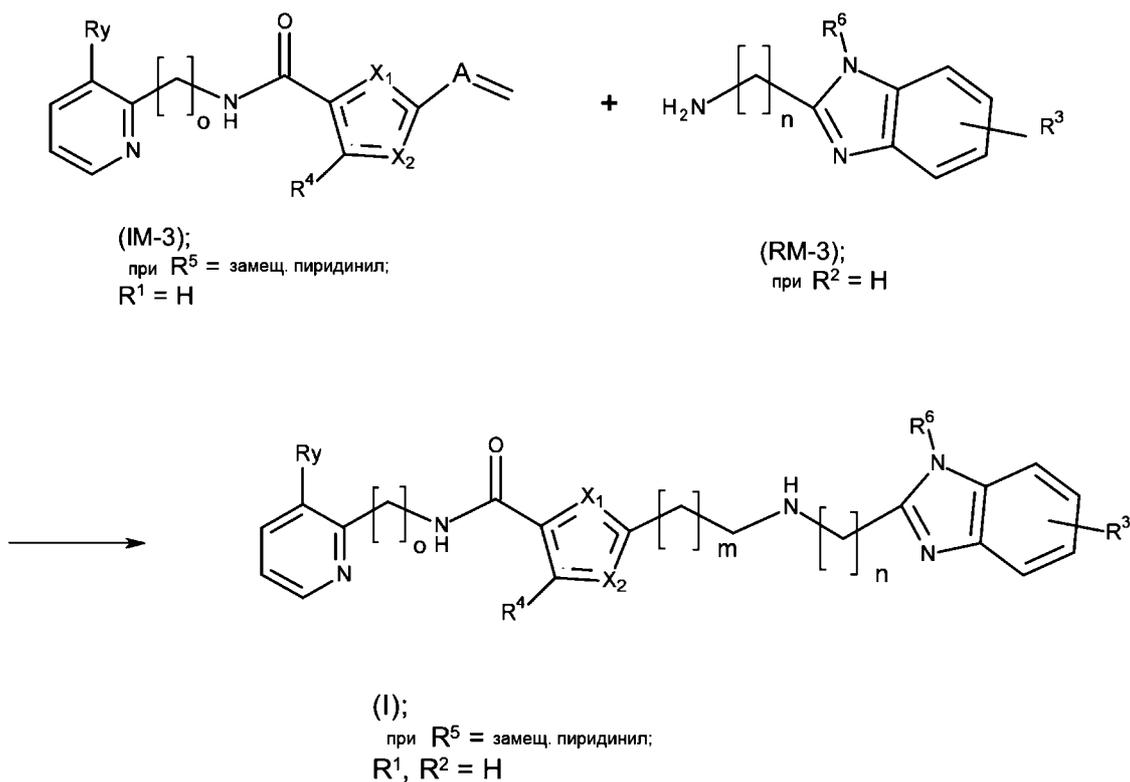
Этап 1:



15 Этап 2:



Этап 3:



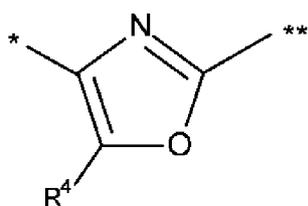
где $X^1, X^2, R^3, R^4, R^6, R_y, A, m, n$ и o имеют значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

Предпочтительно, указанные этапы 1, 2 и 3 способа осуществляют в условиях
5 способа, описанных выше.

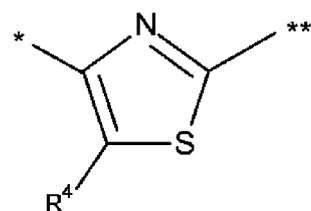
Предпочтительно, этапы 1 и 2 реакции осуществляют за один этап сокращенной
одностадийной реакции.

Дополнительные предпочтительные аспекты настоящего изобретения относятся
к новому способу получения соединений формулы (I), в котором удовлетворено одно
10 или более из следующих условий:

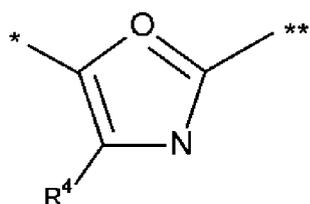
- заместитель «A» представляет собой СН-группу, а m равняется 1; и/или
- o равняется 1; и/или
- каждый из R^1 и R^2 представляет собой водород; и/или
- 15 - R^4 представляет собой водород; и/или
- R^6 представляет собой водород; и/или
- R^3 представляет собой водород; и/или
- X^1 представляет собой N, а X^2 представляет собой O или S, образуя группу,



или



или X^1 представляет собой O, или S и X^2 представляет собой N, образуя группу,

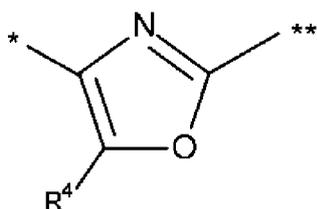


или

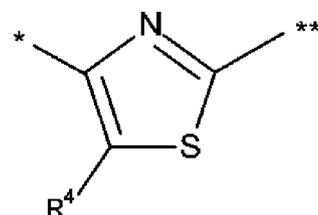


5 где в каждом случае * обозначает положение связывания с карбонил-группой, а ** обозначает второе положение связывания, и R^4 независимо имеет значение, определенное в любом месте в настоящем документе;

10 предпочтительно, X^1 представляет собой N, а X^3 представляет собой O или S, образуя группу,

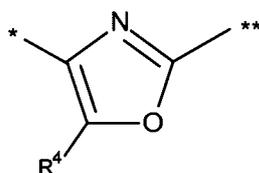


или



15 где в каждом случае * обозначает положение связывания с карбонил-группой, а ** обозначает второе положение связывания, и R^4 независимо имеет значение, определенное в любом месте в настоящем документе;

более предпочтительно, X^1 представляет собой N, а X^3 представляет собой O, образуя группу



где * обозначает положение связывания с карбонил-группой, а ** обозначает второе положение связывания, и R^4 имеет значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

5 В особенно предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новому способу получения соединений общей формулы (I), описанных в настоящем документе, включающему этапы 1, 2 и 3 реакции, определенные выше, где

X^1 представляет собой N;

X^2 представляет собой O;

10 A представляет собой СН-группу;

m равняется 1;

n равняется 2; и

o равняется 1.

15 При этом также предпочтительно, что

R_y представляет собой атом галогена; и

R^4 выбран из группы, состоящей из

- водорода,

- галогена, определенного выше, предпочтительно, хлора,

20 - C_1 - C_3 -алкила, определенного выше, предпочтительно, метила, и

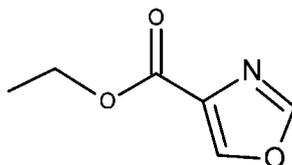
- C_1 - C_3 -галогеналкила, определенного выше, предпочтительно, трифторметила.

Еще более предпочтительно, что при этом

25 R_y представляет собой фтор или бром (из которых наиболее предпочтительным является фтор); и

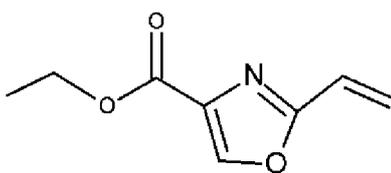
каждый из R^3 , R^4 и R^6 представляет собой водород.

30 Следовательно, в предпочтительном аспекте, изобретение относится к способу, описанному в настоящем документе, в котором соединение (RM-1) представлено формулой (RM-1-a):



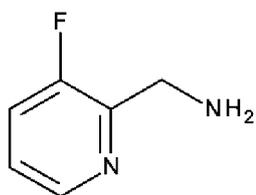
(RM-1-a)

и/или в котором соединение (IM-1) представлено формулой (IM-1-a):



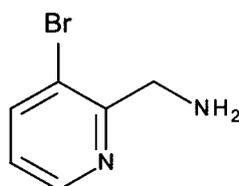
(IM-1-a)

и/или в котором соединение (RM-2) представлено формулой (RM-2-a) или (RM-2-a'):



(RM-2-a)

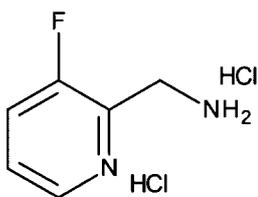
или



(RM-2-a')

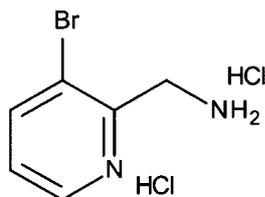
5

предпочтительно, в форме HCl соли:



(RM-2-a)

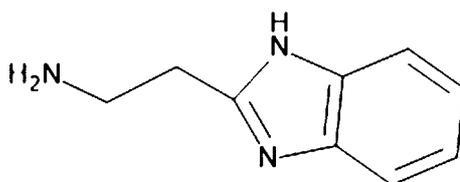
или



(RM-2-a')

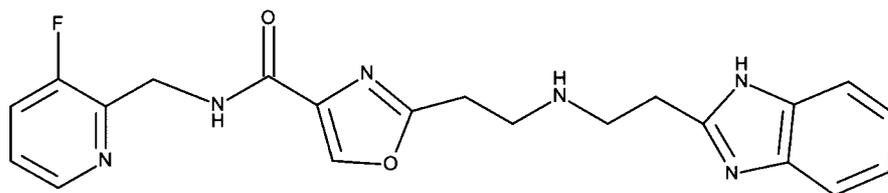
10

и/или в котором соединение (RM-3) представлено формулой (RM-3-a):



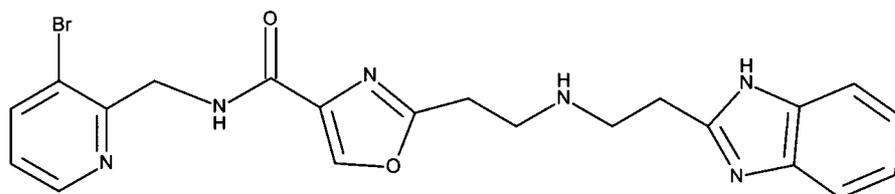
(RM-3-a)

15 Способ по настоящему изобретению особенно предпочтителен для получения соединений формулы (II):



(II)

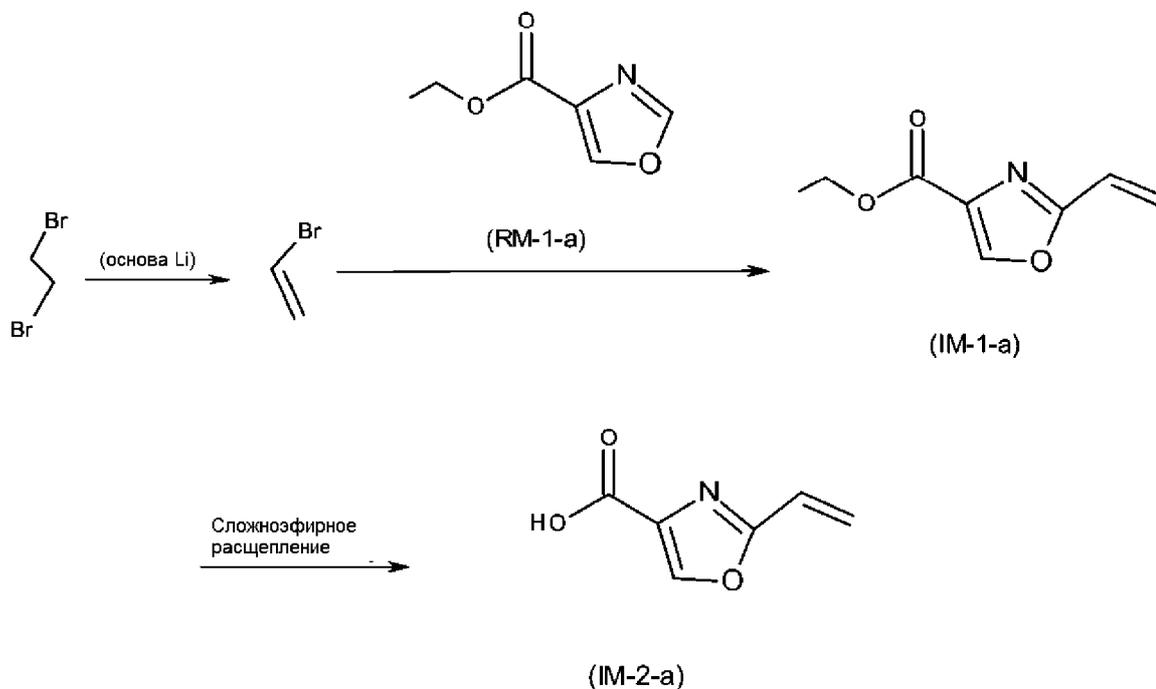
или формулы (II'):



и их фармацевтически приемлемых солей, в частности, солей, описанных в настоящем документе.

- 5 Таким образом, в конкретном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения соединений формулы (II) или (II') и их фармацевтически приемлемых солей, включающему следующие этапы способа:

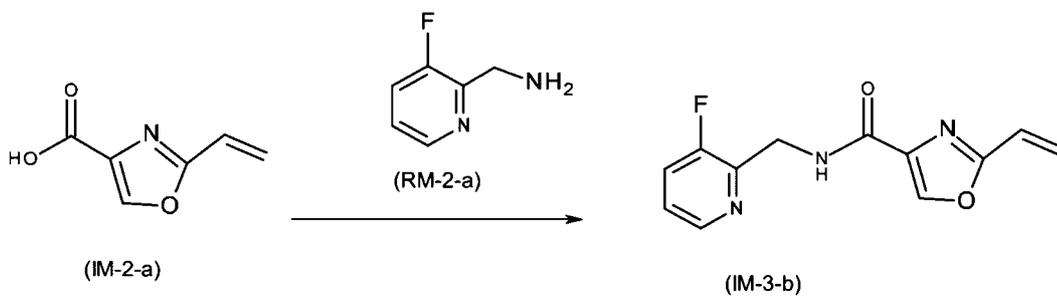
Этап 1-а:



10

Этап 2-а или 2-а', соответственно:

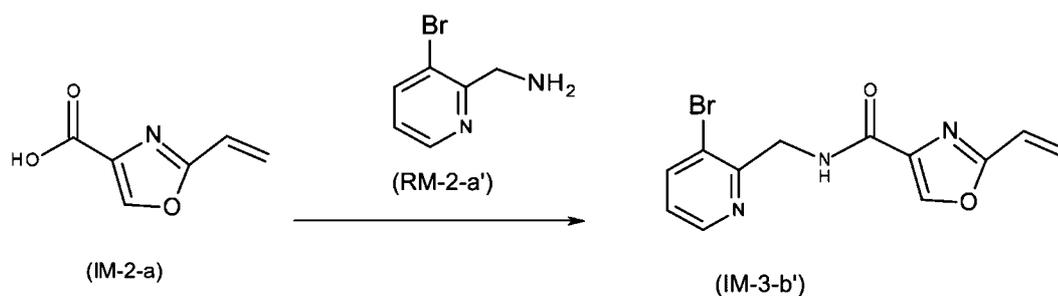
(Этап 2-а):



15

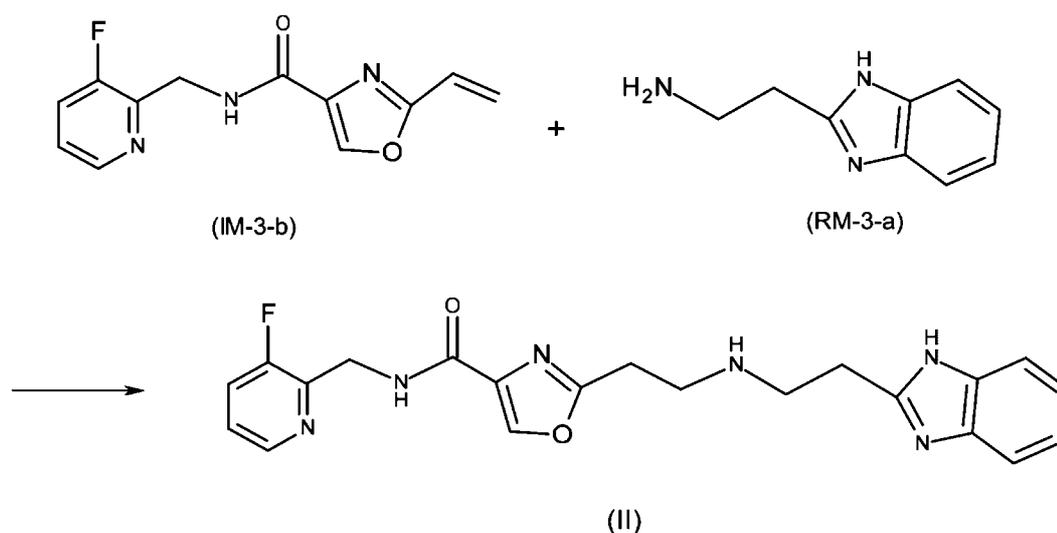
ИЛИ

(Этап 2-а'):



Этап 3-а или 2-а', соответственно:

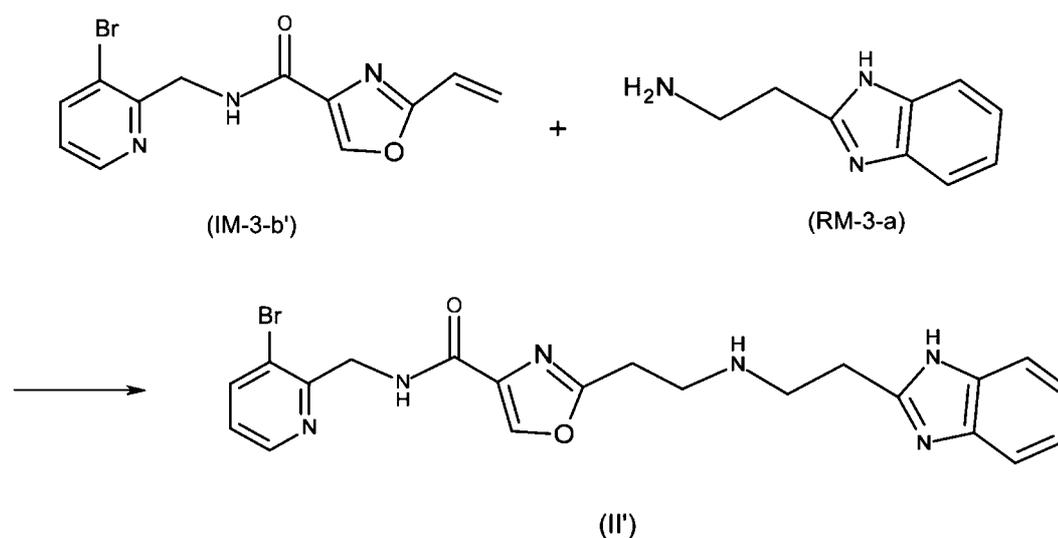
(Этап 3-а):



5

ИЛИ

(Этап 3-а'):

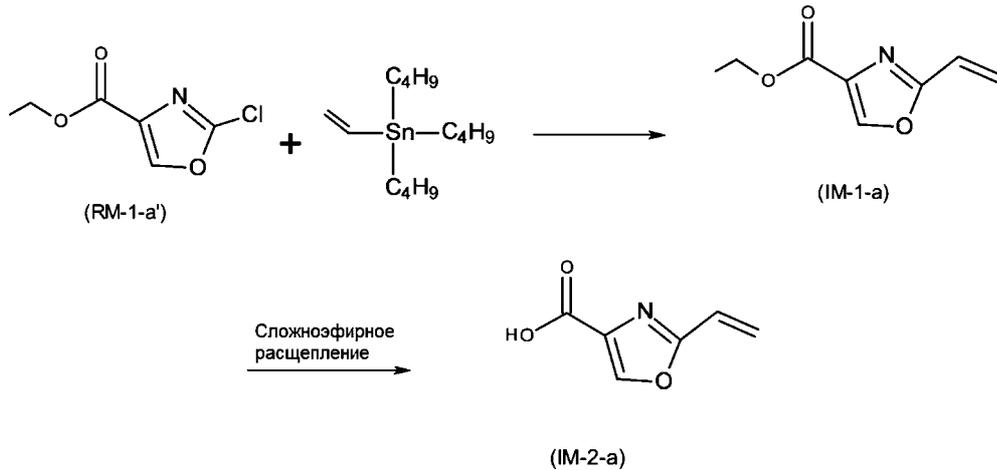


10 Предпочтительно, этапы 1-а и 2-а реакции осуществляют за один этап сокращенной одностадийной реакции.

Предпочтительные условия способа, основания, растворители и катализаторы, описанные выше, предпочтительно, используют в способе, описанном в настоящем документе.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения, указанный конкретный способ включает следующий альтернативный (но менее предпочтительный) этап 1-а' способа, начинающийся с соединения RM-1, где R_y представляет собой хлор, а R^4 представляет собой водород, которое обозначено в данном документе, как RM-1-а', с последующим выполнением этапов 2-а и 3-а способа, как описано выше, для получения соединений формулы (II) или (II') и их фармацевтически приемлемых солей:

Этап 1-а':

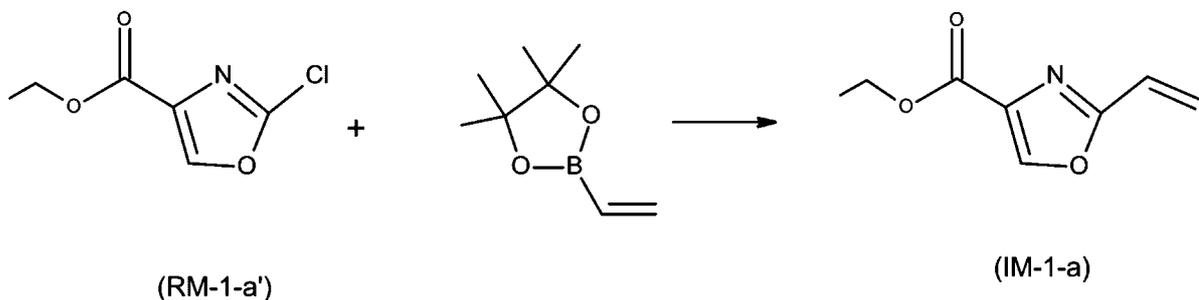


10

Еще в одном аспекте настоящего изобретения особенно предпочтительным является получение промежуточного соединения (IM-1-a) посредством следующего альтернативного (предпочтительного) этапа способа 1-а'', начиная с соединения RM-1, где R_y представляет собой хлор, а R^4 представляет собой водород, которое обозначено в данном документе, как RM-1-а':

15

Этап 1-а'':



20

Как было описано выше, получаемое в результате промежуточное соединение (IM-1-a) может быть использовано на последующих этапах способа, описанных в настоящем документе, для получения соединений формулы (II) или (II') и их фармацевтически приемлемых солей, например, в частности, путем сложноэфирного расщепления соединения (IM-1-a) с образованием соединения (IM-2-a) с последующим выполнением этапов 2-а и 3-а способа, как описано выше.

25

В целом, в способе по изобретению, описанном в любом месте в настоящем документе, может использоваться широкий ряд неорганических и органических оснований, в том числе гидроксид лития, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, карбонат лития, карбонат натрия, карбонат калия, карбонат кальция, фторид натрия и фторид калия. Предпочтительными являются гидроксид натрия, гидроксид лития, гидроксид калия, карбонат натрия и карбонат калия. Наиболее предпочтительными являются гидроксид лития и гидроксид натрия.

Кроме того, в способе по изобретению, описанном в любом месте в настоящем документе, в целом может использоваться широкий ряд растворителей, в том числе, например, метанол, этанол, пропанол, бутанол, этилацетат (EtOAc), пропилацетат, изопропилацетат, ацетонитрил, бутиронитрил, гептан, циклогексан, метилциклогексан, дихлорметан (DCM) толуол, ксилены, хлорбензол, дихлорбензолы, 1,4-диоксан, тетрагидрофуран (THF), 2-метил-тетрагидрофуран, 2,5-диметил-тетрагидрофуран, метил-третбутил-эфир, циклопентил-метил-эфир, N,N-диметилформамид, вода и их смеси. Предпочтительными являются этанол, этилацетат, изопропилацетат, дихлорметан (DCM), тетрагидрофуран (THF), вода и их смеси. Особенно предпочтительными являются растворители, использованные в примерах, описанных ниже.

Еще в одном аспекте настоящего изобретения, способ получения соединений общей формулы (I) или (II), или (II'), описанных в любом месте в настоящем документе, включает дополнительный этап, на котором преобразуют соединение формулы (I) или (II), или (II'), в его фармацевтически приемлемую соль или сольват с использованием соответствующих оснований или кислот и/или растворителей.

Предпочтительно, соединения формулы (I) или (II), или (II'), преобразуют в фармацевтически приемлемую соль с помощью кислот, выбранных из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислоты, метансульфоновой кислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и толуолсульфоновой кислоты. Особенно предпочтительными являются кислоты, выбранные из группы, состоящей из хлористоводородной кислоты, серной кислоты и фосфорной кислоты, из которых наиболее предпочтительной является хлористоводородная кислота.

Более предпочтительно, соединения формулы (I) или (II), или (II'), преобразуют в фармацевтически приемлемую соль, имеющую соотношение соединения (I) или (II), или (II'): кислота, составляющее от 1 до 2 : 1 до 3.

В принципе, возможна кристаллизация в тройную соль (3HCl) или в моносоль (1HCl). Однако из их числа кристаллизация в моносоль является менее предпочтительной, поскольку требуются дальнейшие этапы обработки соединений формулы (I) или (II), или (II'), в том числе, например, замена растворителя или несколько этапов экстракции растворителем. Это менее предпочтительно ввиду

экономичности способа. Таким образом, наиболее предпочтительным является преобразование в тройную HCl соль (3HCl соль).

5 В альтернативном аспекте настоящего изобретения, способ, описанный в любом месте в настоящем документе, включает этап, на котором преобразуют соединения формулы (I) или (II), или (II'), в соль серной кислоты путем добавления серной кислоты и кристаллизации соли серной кислоты.

10 Преобразование соединений формулы (I) или (II), или (II'), в хлористоводородные соли обеспечивает простой и эффективный процесс кристаллизации, что обеспечивает возможность прямой кристаллизации фазы декантированного продукта без необходимости в отделениях фазы. Хлорированные растворители могут быть неблагоприятными ввиду угрозы безопасности человека и окружающей среде. Однако предпочтительный этап способа, на котором преобразуют соединения формулы (I) или (II), или (II'), в соли хлористоводородной кислоты, обладает потенциалом непрерывной обработки, что также является преимуществом с точки зрения эффективности способа.

15 В целом, преобразование соединений формулы (I) или (II), или (II'), в соли может осуществляться традиционными способами кристаллизации. Предпочтительно, кристаллизацию осуществляют путем охлаждения реакционной смеси, содержащей продукты реакции с соединениями формулы (I) или (II), или (II'), до комнатной температуры, добавления смешивающегося с водой растворителя, такого как, предпочтительно, этанол, и добавления выбранной кислоты для образования соответствующей соли кислоты. Предпочтительно, кристаллизацию осуществляют при повышенной температуре, предпочтительно, ниже точки кипения органического растворителя и воды. Получаемые в результате кристаллизованные соли охлаждают до температуры ниже комнатной и выделяют обычными способами, включающими, например, фильтрацию, промыванию и сушку.

25 В частности, образование этих солей соединений по настоящему изобретению может осуществляться способами, описанными в международной заявке WO2018/192973.

30 Как описано в настоящем документе, растворители, используемые для кристаллизации, включают в себя ацетонитрил, дихлорметан (DCM), спирты, такие как, в частности, метанол, этанол, 2-пропанол (изопропанол), альдегиды, кетоны, в частности, ацетон, эфиры, например, тетрагидрофуран (THF) или диоксан, сложные эфиры, например, этилацетат, или алканы, такие как, в частности, пентан, гексан, гептан или циклогексан, и воду, а также их смеси. Предпочтительные растворители, используемые для кристаллизации, выбирают из группы, состоящей из ацетонитрила, дихлорметана, метанола, этанола, 2-пропанола, этилацетата, THF, воды и их смесей.

40 Особенно предпочтительные растворители, используемые для кристаллизации, выбирают из группы, состоящей из ацетонитрила, метанола, этанола, 2-пропанола, этилацетата, THF, воды и их смесей. Предпочтительные смеси вода/растворитель включают в себя смеси воды и ацетона, смеси воды и этанола, а также смеси воды и

метанола, при этом предпочтительными являются смеси воды и этанола, и смеси воды и метанола.

Особенно предпочтительными являются растворители, используемые для кристаллизации, которые выбраны из группы, состоящей из ацетонитрила, дихлорметана, этанола, 2-пропанола (изопропанола), ацетона и этилацетата, а также их смесей с водой, таких как, в частности, смеси этанола и воды, и смеси ацетона и воды. В частности, предпочтительным является использование растворителей, описанных в примерах ниже.

Особенно предпочтительными смесями являются следующие смеси растворителя и воды (соотношения смесей растворителя, указанные в любом месте в настоящем документе, всегда взяты из расчета об:об):

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

Особенно предпочтительным является осуществление преобразования соединений (I) или (II), или (II'), в соли в рамках сокращенной одностадийной реакции с этапом реакции, на котором промежуточное соединение IM-3 вводят в реакцию с соединением RM-3 для образования соединения (I) или (II), или (II').

Соли соединений формулы (I) или (II), или (II'), могут присутствовать в аморфной, полиморфной, кристаллической и/или полукристаллической (частично кристаллической) форме, а также в форме сольвата (или гидрата) соли. Предпочтительно, соли по настоящему изобретению присутствуют в кристаллической и/или полукристаллической (частично кристаллической) форме, и/или в форме ее сольватов (или гидратов).

Предпочтительная кристалличность солей или сольватов соли по настоящему изобретению может быть определена с помощью традиционных аналитических способов, таких как, в частности, использование различных рентгенологических способов, которые обеспечивают возможность выполнения четкого и простого анализа соединений соли. В частности, степень кристалличности может быть определена или подтверждена с помощью способов порошковой рентгеновской дифракции (с отражением), как описано, например, в примерах ниже, или с помощью способов порошковой рентгеновской дифракции (с передачей), как описано, например, в примерах ниже (в отношении обоих из которых также далее используется сокращений PXRD). В случае кристаллических твердых веществ, имеющих одинаковый химический состав, различные получаемые в результате кристаллические решетки обобщены термином полиморфизм.

Предпочтительно, соли по настоящему изобретению проявляют степень кристалличности, составляющую более, чем 30%, более предпочтительно, более, чем

40%, еще более предпочтительно, более, чем 50%, например, по меньшей мере 55-60%, которая измеряется способом PXRD, как описано в настоящем документе.

Соли по настоящему изобретению могут присутствовать в виде сольватов и/или гидратов, которые могут быть образованы путем привлечения, ассоциации, адсорбции, адгезии, внедрения или комплексообразования молекул растворителя в кристаллической решетке солей по настоящему изобретению. Молекулы растворителя, которые могут быть внедрены в кристаллическую решетку, могут быть получены из растворителей, используемых для кристаллизации, а также из воды, исходящей от относительной влажности.

Степень, которую дает выбранный растворитель или вода, обеспечивая сольват или гидрат, на этапах способа или в течение этапа кристаллизации, зависит от сочетания условий способа и различных взаимодействий между выбранными соединениями (I) или (II), или (II'), противоиона из выбранной кислоты, а также выбранного растворителя и условий влажности. Сольваты или гидраты соли могут быть предпочтительны, поскольку молекулы растворителя или воды в структуре кристалла связываются высокими межмолекулярными силами и, таким образом, могут представлять собой элемент структурного образования этих кристаллов, что частично может улучшать стабильность соли. Однако молекулы растворителя и/или воды также имеются в некоторых кристаллических решетках, которые связываются достаточно низкими межмолекулярными силами. Такие молекулы более или менее интегрированы в образование структуры кристалла, однако в части более низкого энергетического эффекта. Содержание растворителя и/или воды в сольватах также зависит от условий сушки и условий окружающей среды (т. е. относительной влажности). В случае стабильных сольватов или гидратов, между активным соединением (т. е. солью) и растворителем или водой, как правило, имеются явные стехиометрические отношения. Во многих случаях эти отношения не полностью удовлетворяют стехиометрическому значению, обычно оно близко к более низким значениям в отличие от теории вследствие некоторых дефектов кристалла. Отношение органических молекул к молекулам растворителя или воды в случае воды с более слабыми связями может варьироваться в значительной степени, например, простираясь до ди-, три- или тетрагидратов. С другой стороны, в аморфных твердых веществах, классификация структуры молекулы растворителя и/или воды не является стехиометрической; однако классификация также может быть стехиометрической лишь случайно. В некоторых случаях невозможно классифицировать точную стехиометрию молекул растворителя или воды, поскольку структуры слоев образуются таким образом, что внедренные молекулы растворителя или воды не могут быть определены в заданной форме.

Содержание растворителя и/или воды в аморфных твердых веществах, а также в кристаллических сольватах или гидратах, в целом может быть определено традиционными способами, такими как, например, использование общеизвестного метода титрования по Карлу-Фишеру, путем выполнения измерений динамической сорбции пара (DVS), путем выполнения термогравиметрических измерений (TG-FTIR),

как описано, например, в примерах ниже. Кроме того, элементный анализ или методы структурного анализа, такие как спектроскопия ^1H ЯМР или рамановская спектроскопия (FT-рамановская спектроскопия), могут дать информацию о степени образования сольвата или гидрата и/или могут быть использованы для подтверждения или валидации результатов измерений по Карлу-Фишеру (KF), DVS или TG-FTIR.

5

Примеры сольватов и/или гидратов, согласно настоящему изобретению, включают в себя, например, геми- (0,5), моно-, сескви- (1,5), ди-, три-, тетра-, пента-, гекса-, гепта-, окта-, нона-, дека- и т. д. сольваты или гидраты, соответственно. Кроме того, также возможны степени промежуточной сольватации, например, сольватация с помощью 2,5, 3,5, 4,5 и т. д. молекул растворителя и/или воды.

10

Предпочтительные примеры сольватов и/или гидратов включают в себя сольваты/гидраты приблизительно с 0,5, 1, 1,5, 2,5, 3, 4 и 7 молекулами сольвата/воды. Еще одни предпочтительные примеры сольватов и/или гидратов включают в себя сольваты/гидраты приблизительно с 0,5, 1, 1,5, 2,5, 3, 4, 6 и 7 молекулами сольвата/воды. Более предпочтительными являются геми- и моносольваты/гидраты приблизительно с 0,5 или 1 молекулой сольвата/воды, при этом особенно предпочтительными являются геми- и моногидраты. Также предпочтительными являются безводные соли. Кроме того, возможно то, что остатки растворителя и/или воды остаются в соли в нестехиометрических количествах.

15

20

Кроме того, возможно то, что смеси воды и растворителя остаются в соли, образуя так называемые смешанные формы гидрата/сольвата. Примеры таких смешанных форм гидрата/сольвата включают в себя, в частности, ацетон/воду, предпочтительно, в соотношении от 1 до 4 : 1; например, в частности, 4 : 1; метанол/воду, предпочтительно, в соотношении от 3 до 9 : 1; например, в частности, 3 : 1, 4 : 1 и 9 : 1; этанол/воду, предпочтительно, в соотношении от 1 до 4 : 1; например, в частности, 3 : 1 и 4 : 1.

25

Любую ссылку на соли соединений формулы (I) или (II), или (II'), указанную в настоящем документе выше или ниже, следует трактовать, как ссылку также на соответствующие сольваты, например, гидраты, сольваты и смешанные формы гидрата/сольвата, и полиморфные модификации, а также аморфные формы, в меру необходимости и целесообразности.

30

Кроме того, новый способ по настоящему изобретению неожиданно дает повышенные выходы по сравнению со способами, известными из уровня техники.

35

Теперь стали возможны выходы в размере $\geq 30\%$, предпочтительно, $\geq 35\%$, более предпочтительно, $\geq 40\%$, еще более предпочтительно, $\geq 45\%$.

В отличие от этого, способы из уровня техники дают выходы не более 22%. Например, получение ZHCl соли соединения (II) или (II'), согласно способу по настоящему изобретению, может дать выходы $> 60\%$, как показано в Примере 4 ниже.

40

В отличие от этого, получение указанной ZHCl с помощью способа, описанного в

WO2017/068089 и в WO2017/068090, дает выход всего 22%, как показано в примерах получения Примера соединения № 127.

В частности, этапы нового сокращенного способа по настоящему изобретению также обеспечивают более подходящий, экономный в отношении издержек и усилий способ. Можно избежать образования полимеров на промежуточных этапах образования, что оказывает положительное воздействие на контроль способа и выходы.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к соединениям формулы (I) или (II), или (II'), описанным в любом месте в настоящем документе, в том числе к солям, гидратам, сольватам и смешанным формам гидрата/сольвата, полиморфным модификациям, а также аморфным формам, которые могут быть получены способом, описанным в настоящем документе. Соединения, которые могут быть получены новым способом, описанным в настоящем документе, характеризуются улучшенной и/или высокой (повышенной) степенью чистоты, определяемой общим содержанием в них примесей, которое меньше, чем 2,00% отн. площади, предпочтительно, меньше, чем 1,50 отн. площади, более предпочтительно, менее, чем 1,00% отн. площади, причем содержание примесей определяют посредством ВЭЖХ, как описано в примерах ниже, а «% отн. площади» указывает на сумму относительной площади всех примесей в спектре ВЭЖХ.

Таким образом, еще один аспект изобретения относится к соединениям формулы (I) и (II) или (II'), описанным в любом месте в настоящем документе, в том числе солям, гидратам, сольватам и смешанным формам гидрата/сольвата, полиморфным модификациям и аморфным формам, имеющих общую степень чистоты, составляющую по меньшей мере 97,80 % отн. площади, предпочтительно, по меньшей мере 97,90 % отн. площади, по меньшей мере 98,00 % отн. площади, по меньшей мере 98,10 % отн. площади, по меньшей мере 98,20 % отн. площади, по меньшей мере 98,30 % отн. площади, по меньшей мере 98,40 % отн. площади, по меньшей мере 98,50 % отн. площади, по меньшей мере 98,60 % отн. площади, по меньшей мере 98,70 % отн. площади, по меньшей мере 98,80 % отн. площади, по меньшей мере 98,90 % отн. площади, по меньшей мере 99,00 % отн. площади, по меньшей мере 99,10 % отн. площади, по меньшей мере 99,20 % отн. площади, по меньшей мере 99,30 % отн. площади, по меньшей мере 99,40 % отн. площади, по меньшей мере 99,50 % отн. площади, по меньшей мере 99,60 % отн. площади, по меньшей мере 99,70 % отн. площади, по меньшей мере 99,80 % отн. площади, по меньшей мере 99,90 % отн. площади, по меньшей мере 99,95 % отн. площади, по меньшей мере 99,96 % отн. площади, по меньшей мере 99,97 % отн. площади, по меньшей мере 99,98 % отн. площади, по меньшей мере 99,99 % отн. площади, причем чистоту определяют посредством ВЭЖХ, как описано в примерах ниже, а «% отн. площади» указывает на относительную площадь соединения по изобретению в спектре ВЭЖХ.

В частности, соединения формулы (I) и (II) или (II'), описанные в любом месте в настоящем документе, в том числе соли, гидраты, сольваты и смешанные формы гидрата/сольвата, полиморфные модификации и аморфные формы, характеризуются

содержанием одной или более примесей при значениях относительного времени удерживания RRT 0,59, 0,65, 0,83 и 1,37 в количестве не более, чем 0,20% отн. площади, предпочтительно, не более, чем 0,15% отн. площади, более предпочтительно, не более, чем 0,10% отн. площади, предпочтительно, при нижнем пределе 0,05% отн. площади.

5

Более предпочтительно, соединения формулы (I) и (II) или (II'), описанные в любом месте в настоящем документе, в том числе соли, гидраты, сольваты и смешанные формы гидрата/сольвата, полиморфные модификации и аморфные формы, характеризуются отсутствием дальнейших примесей при значениях относительного времени удерживания RRT: 0,59, 0,65, 0,83 и 1,37.

10

Более конкретно, соединения формулы (I) и (II) или (II'), описанные в любом месте в настоящем документе, в том числе соли, гидраты, сольваты и смешанные формы гидрата/сольвата, полиморфные модификации и аморфные формы, характеризуются отсутствием дальнейших примесей при значениях относительного времени удерживания: RRT 0,27, 0,52, 0,59, 0,65, 0,83, 0,94, 1,19, 1,37, при этом, предпочтительно, нижний предел составляет 0,05% отн. площади.

15

Более конкретно, соединения формулы (I) и (II) или (II'), описанные в любом месте в настоящем документе, в том числе соли, гидраты, сольваты и смешанные формы гидрата/сольвата, полиморфные модификации и аморфные формы, характеризуются профилем примесей, содержащим одну или более примесей при значениях относительного времени удерживания: RRT 0,48, 0,70, 1,27 и 1,48.

20

При этом примеси и их значения относительного времени удерживания RRT определяют посредством ВЭЖХ, как описано в примерах ниже.

В отличие от этого, в случае способа получения соединения (II) в форме ZnCl соли, как описано в WO2017/068089 и в WO2017/068090 (получение Примера соединения №127) достижение такой высокой степени чистоты и улучшенного профиля примесей не представляется возможным, как это можно увидеть на Фигурах 6, 7 и 8.

25

Особенно предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения относится к полиморфу (PM1) тройной HCl соли соединения (II), который характеризуется паттерном порошковой рентгеновской дифракции (паттерном PXRD), содержащим характеристические кристаллические пики (главные пики), выражаемые в градусах 2-тета, приблизительно при 3,9 и $16,5 \pm 0,25$ градуса или $\pm 0,20$ градуса, или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

30

Предпочтительно, в таком варианте реализации полиморфа (PM1) тройной HCl соли соединения (II), паттерн PXRD содержит один или более дополнительных характеристических (главных) пиков, выражаемых в градусах 2-тета, приблизительно при 7,9, 24,1, 19,1, 12,1 и/или $10,0 \pm 0,25$ градуса или $\pm 0,20$ градуса, или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

35

Более предпочтительно, в таком варианте реализации полиморфа, паттерн PXRD содержит характеристические кристаллические (главные) пики, выражаемые в градусах

40

2-тета, при 3,9, 16,5, 7,9, 24,1, 19,1, 12,1 и $10,0 \pm 0,20$ градуса или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

Предпочтительно, указанные полиморфы (PM1) тройной HCl соли соединения (II) присутствуют в форме гемигидрата. Предпочтительно, указанные полиморфы (PM1) тройной HCl соли соединения (II) характеризуются значениями активности воды $\leq 0,5$ %, предпочтительно, $\leq 0,4$ %, более предпочтительно, $\leq 0,3$ %.

Точка плавления указанных полиморфов (PM1) тройной HCl соли соединения (II), определяемая посредством DSC, как описано в примерах ниже, предпочтительно, находится в диапазоне от ≥ 180 °C до ≤ 220 °C, предпочтительно, в диапазоне от ≥ 185 °C до ≤ 215 °C, более предпочтительно, в диапазоне от ≥ 190 до ≤ 210 °C.

Более предпочтительно, указанные полиморфы (PM1) тройной HCl соли соединения (II) проявляют микроскопическую кристалличность, определяемую посредством световой микроскопии с использованием поляризованного света, которая характеризуется сферическими поликристаллическими частицами с низкой кристалличностью. Средний размер частиц, определяемый посредством световой микроскопии с использованием поляризованного света, составляет приблизительно от 10 до 50 мкм.

Полиморфы (PM1) тройной HCl соли соединения (II) также характеризуются высокими реологическими свойствами благодаря присутствию в форме сыпучего порошка с низкой электростатикой.

Указанные полиморфы (PM1) тройной HCl соли соединения (II) также представляют собой термодинамически стабильные полиморфы при комнатной температуре (23 °C \pm 5 °C).

Еще один предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения относится к полиморфу (PM2) тройной HCl соли соединения (II), который характеризуется паттерном порошковой рентгеновской дифракции (паттерном PXRD), содержащим характеристические кристаллические (главные) пики, выражаемые в градусах 2-тета, приблизительно при 16,9 и $25,3 \pm 0,25$ градуса или $\pm 0,20$ градуса, или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

Предпочтительно, в таком варианте реализации полиморфа (PM2) тройной HCl соли соединения (II), паттерн PXRD содержит один или более дополнительных характеристических (главных) пиков, выражаемых в градусах 2-тета, приблизительно при 11,7, 28,3, 25,5, 20,1 и/или $26,2 \pm 0,25$ градуса или $\pm 0,20$ градуса, или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

Более предпочтительно, в таком варианте реализации полиморфа (PM2) тройной HCl соли соединения (II), паттерн PXRD содержит характеристические кристаллические (главные) пики, выражаемые в градусах 2-тета, при 16,9, 25,3, 11,7, 28,3, 25,5, 20,1 и $26,2 \pm 0,20$ градуса или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

Предпочтительно, указанные полиморфы (PM2) тройной HCl соли соединения (II) присутствуют в безводной форме. Предпочтительно, указанные полиморфы (PM2)

тройной HCl соли соединения (II) характеризуются значениями активности воды $\leq 0,8$ %, предпочтительно, $\leq 0,7$ %, более предпочтительно, $\leq 0,6$ %.

Точка плавления указанных полиморфов (PM2) тройной HCl соли соединения (II), определяемая посредством DSC, как описано в примерах ниже, предпочтительно, находится в диапазоне от ≥ 210 °C до ≤ 240 °C, предпочтительно, в диапазоне от ≥ 215 °C до ≤ 235 °C, более предпочтительно, в диапазоне от ≥ 220 °C до ≤ 230 °C.

Более предпочтительно, указанные полиморфы (PM2) тройной HCl соли соединения (II) проявляют микроскопическую кристалличность, определяемую посредством световой микроскопии с использованием поляризованного света, которая характеризуется тонкими агрегированными иглами с высокой кристалличностью.

Полиморфы (PM2) тройной HCl соли соединения (II) также характеризуются наличием свойств твердого состояния наподобие ваты.

Указанные полиморфы (PM2) тройной HCl соли соединения (II) термодинамически являются менее стабильными по сравнению с полиморфами PM1 или PM3 при комнатной температуре (23 °C \pm 5 °C).

Еще один предпочтительный вариант реализации настоящего изобретения относится к полиморфу (PM3) тройной HCl соли соединения (II), который характеризуется паттерном порошковой рентгеновской дифракции (паттерном PXRD), содержащим характеристические кристаллические (главные) пики, выражаемые в градусах 2-тета, приблизительно при $14,7$ и $10,3 \pm 0,25$ градуса или $\pm 0,20$ градуса, или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

Предпочтительно, в таком варианте реализации полиморфа (PM3) тройной HCl соли соединения (II), паттерн PXRD содержит один или более дополнительных характеристических (главных) пиков, выражаемых в градусах 2-тета, приблизительно при $17,0$, $26,5$, $18,1$, $22,1$ и/или $27,1 \pm 0,25$ градуса или $\pm 0,20$ градуса, или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

Более предпочтительно, в таком варианте реализации полиморфа (PM3) тройной HCl соли соединения (II), паттерн PXRD содержит характеристические кристаллические (главные) пики, выражаемые в градусах 2-тета, при $14,7$, $10,3$, $17,0$, $26,5$, $18,1$, $22,1$ и $27,1 \pm 0,20$ градуса или $\pm 0,10$ градуса, или $\pm 0,05$ градуса.

Предпочтительно, указанные полиморфы (PM3) тройной HCl соли соединения (II) присутствуют в форме моногидрата. Предпочтительно, указанные полиморфы (PM3) тройной HCl соли соединения (II) характеризуются значениями активности воды $> 0,3$ %.

Точка плавления указанных полиморфов (PM3) тройной HCl соли соединения (II), определяемая посредством DSC, как описано в примерах ниже, предпочтительно, находится в диапазоне от ≥ 150 °C до ≤ 190 °C, предпочтительно, в диапазоне от ≥ 155 °C до ≤ 180 °C, более предпочтительно, в диапазоне от ≥ 160 до ≤ 175 °C.

Более предпочтительно, указанные полиморфы (PM3) тройной HCl соли соединения (II) проявляют микроскопическую кристалличность, определяемую

посредством световой микроскопии с использованием поляризованного света, которая характеризуется тонкими стержнями с высокой кристалличностью.

Полиморфы (PM3) тройной HCl соли соединения (II) также характеризуются наличием свойств объемного несыпучего порошка.

5 Указанные полиморфы (PM3) тройной HCl соли соединения (II) являются термодинамически стабильными при комнатной температуре ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

10 Из описанных выше полиморфов тройной соли соединения (II) наиболее предпочтительным является PM1, в частности, благодаря своей термодинамической стабильности при комнатной температуре, сферической форме частиц и хорошим свойствам текучести с низкой электростатикой, что является преимуществом при применении указанных полиморфов в качестве фармацевтически активного ингредиента.

15 Термин «характеристический(е) пик(и)» или «главный(е) пик(и)» в описанных выше вариантах реализации представляет собой пик(и) в паттерне PXRD с наивысшей интенсивностью. Интенсивность пиков в паттернах PXRD снижается согласно порядку пиков, перечисленных выше, и полиморфы (PM1, PM2 и PM3), предпочтительно, характеризуются наличием двух или более характеристических (главных) пиков, имеющих наивысшую интенсивность.

20 Соединения (II'), описанные выше, не были раскрыты в уровне техники, например, в WO2017/068089, в WO2017/068090, в WO2018/192973 или в WO2011/029832, и сами по себе обладают новизной.

25 Соединения формулы (I) и (II), и (II'), описанные в настоящем документе, особенно пригодны для применения в качестве лекарственного препарата, действуя в качестве ингибиторов ферропортина. При этом ингибирование ферропортина может определяться так, как описано в любой из международных заявок на выдачу патента WO2018/192973, WO2017/068089 и WO2017/068090.

30 Соединения формулы (I) и (II), и (II'), описанные в настоящем документе, в том числе их предпочтительные соли и полиморфы, являются особенно подходящими для применения в профилактике и/или лечении нарушений метаболизма железа, приводящих к повышенным уровням железа или повышенной абсорбции железа, например, для применения в профилактике и/или лечении перегрузки железом и/или для применения в профилактике и/или лечении заболеваний, связанных с повышенными уровнями железа, повышенной абсорбцией железа или перегрузкой железом, или вызываемых ими. При этом заболевания, которые связаны с
35 повышенными уровнями железа, повышенной абсорбцией железа или перегрузкой железом, или вызываемые ими, включают в себя, например, талассемию, гемоглобинопатию, болезнь гемоглобина E, болезнь гемоглобина H, гемохроматоз, гемолитическую анемию, талассемию, в том числе альфа-талассемию, бета-талассемию
40 и дельта-талассемию, серповидноклеточную анемию (заболевание серповидных клеток) и врожденную дизэритропоэтическую анемию.

Соединения формулы (I) и (II), и (II'), описанные в настоящем документе, в том числе их предпочтительные соли и полиморфы, также пригодны для применения в профилактике и/или лечении заболеваний, связанных с неэффективным эритропоэзом, таких как миелодиспластические синдромы (MDS, миелодисплазия), истинная полицитемия и врожденная дизэритропоэтическая анемия, или для применения в дополнительной терапии путем ограничения количества железа, доступного для патогенных микроорганизмов, таких как бактерия *Vibrio vulnificus*, тем самым обеспечивая лечение инфекций, вызываемых указанными патогенными микроорганизмами, или для применения в профилактике и/или лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, путем ограничения отложений или увеличения количества железа в тканях или клетках, или для применения в профилактике и/или лечении образования радикалов, активных форм кислорода (ROS) и окислительного стресса, или для применения в профилактике и/или лечении повреждений сердца, печени и эндокринных повреждений, вызываемых перегрузкой железом, или для применения в профилактике и/или лечении воспаления, вызываемого избытком железа.

Следовательно, изобретение также относится к лекарственному препарату, содержащему одно или более соединений (I) или (II), или (II'), в том числе его соли, гидраты, сольваты и смешанные формы гидратов/сольватов, полиморфные модификации и аморфные формы, определенные в настоящем документе, такому как лекарственный препарат для применения в профилактике или лечении любого из заболеваний, состояний или симптомов, описанных выше. Такой лекарственный препарат необязательно может содержать один или более фармацевтических носителей и/или вспомогательных веществ, и/или растворителей, и/или по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное соединение, такое как активное соединение для профилактики и лечения перегрузки железом, талассемии, гемохроматоза или заболевания серповидных клеток, нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона, а также сопутствующих симптомов, или хелатирующее железо соединение.

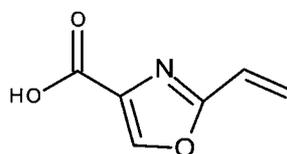
Лекарственный препарат, описанный выше, может находиться в форме состава для перорального приема или парентерального введения.

Соединения (I) или (II), или (II'), в том числе их соли, гидраты, сольваты и смешанные формы гидратов/сольватов, полиморфные модификации и аморфные формы, определенные в настоящем документе, также пригодны для применения в комбинированной терапии, включающей совместное введение соединений по изобретению вместе с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтически активным соединением, причем совместное введение комбинированной терапии может проводиться в виде комбинированной терапии с фиксированной дозой путем совместного введения соединений по изобретению с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтически активным соединением в составе фиксированной дозы или причем совместное введение комбинационной терапии может проводиться в

виде комбинационной терапии со свободной дозой путем совместного введения соединений по изобретению и по меньшей мере одного дополнительного фармацевтически активного соединения в свободных дозах соответствующих компонентов либо путем одновременного введения компонентов по отдельности, либо 5 путем последовательного применения компонентов по отдельности с распределением в течение некоторого периода времени, и причем комбинационная терапия, предпочтительно, включает совместное введение соединений по изобретению с одним или более другими фармацевтически активными соединениями для уменьшения перегрузки железом, которые выбраны из Tmprss6-ASO, хелаторов железа, куркумина, SSP-004184, деферитрина, деферазирокса, дефероксамина и/или деферипрона, и/или с 10 одним или более другими фармацевтически активными соединениями, которые выбраны из антиоксидантов, таких как н-ацетилцистеин; противодиабетических средств, таких как агонисты рецептора GLP-1; антибиотиков, таких как ванкомицин (Van) или тобрамицин; лекарственных средств для лечения малярии; противораковых 15 агентов; противогрибковых лекарственных средств; лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, содержащих агонисты допамина, такие как леводопа; противовирусных лекарственных средств, таких как интерферон- α или рибавирин; иммуносупрессантов, таких как циклоспорин А или производные циклоспорина А; железосодержащих 20 добавок; витаминных добавок; стимуляторов выработки эритроцитов (например, эритропоэтина, Epo); противовоспалительных биологических средств; противотромботических средств; статинов; вазопрессоров; и инотропных соединений.

Еще один аспект изобретения относится к новым промежуточным соединениям, которые могут быть получены благодаря этапам нового способа по настоящему 25 изобретению, а также к соответствующему способу их получения. Этапы способа получения промежуточных соединений могут дополнительно включать этап кристаллизации, выделения и/или очистки для выделения промежуточных соединений.

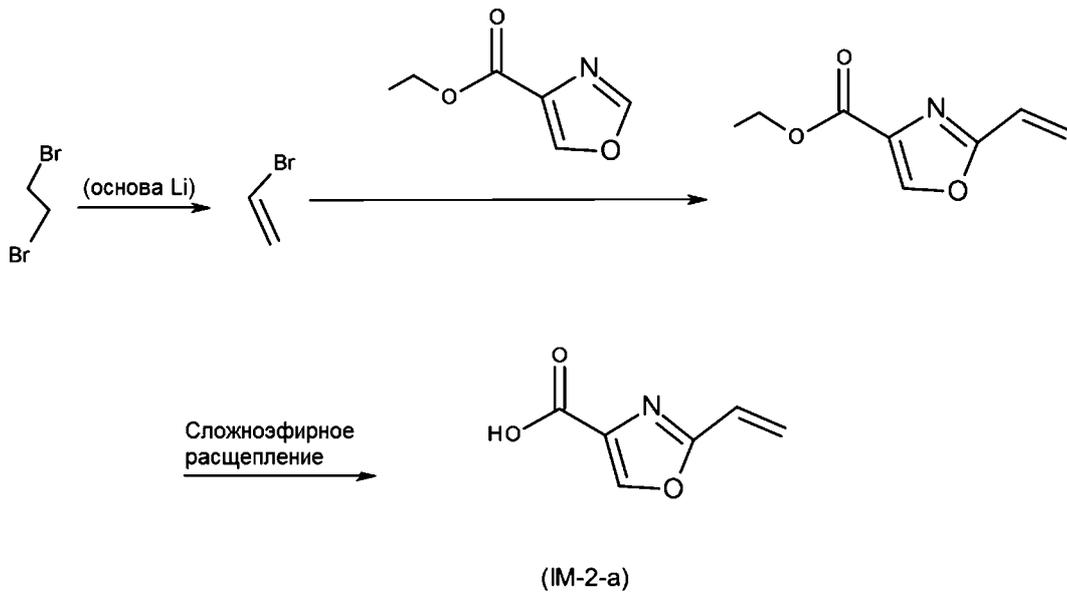
В частности, настоящее изобретение относится к промежуточным соединениям общей формулы (IM-2-a)



(IM-2-a)

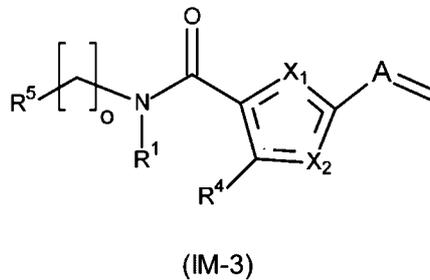
30

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения указанного промежуточного соединения (IM-2-a), включающему этапы реакции, определенные в любом месте выше в контексте описания получения соединений формулы (I), например, в частности, следующим способом:



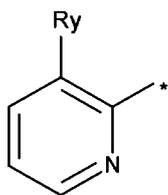
5 который может дополнительно включать этап кристаллизации, выделения и/или очистки для выделения промежуточного соединения (IM-1). При этом, предпочтительные условия способа, основания, растворители и катализаторы, описанные выше, предпочтительно, используют для получения, а также для кристаллизации и выделения.

Еще в одном аспекте, настоящее изобретение относится к промежуточным соединениям общей формулы (IM-3)



10 где X^1 , X^2 , R^1 , R^4 , R^5 , A и o имеют значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

15 Предпочтительно, указанные промежуточные соединения (IM-3) характеризуются наличием группы R^5 , которая представлена формулой

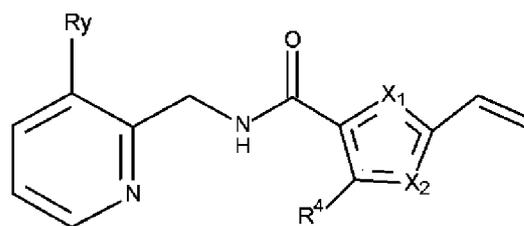


и где также

o равняется 1;

R^1 представляет собой водород;

А представляет собой СН-группу;
и которое представлено следующей формулой (IM-3-a)



(IM-3-a)

5 где X¹, X², R⁴ и R_y имеют значение, определенное в любом месте в настоящем документе.

Более предпочтительно, указанные промежуточные соединения (IM-3) характеризуются тем, что

10 X¹ представляет собой N;

X² представляет собой O;

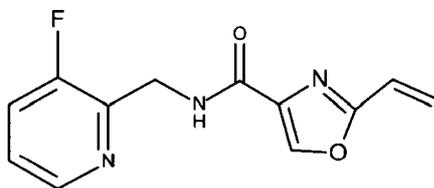
А представляет собой СН-группу;

о равняется 1;

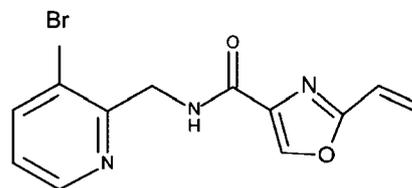
R⁴ представляет собой водород; и

R_y представляет собой фтор или бром (предпочтительным является фтор);

15 и которое представлено следующей формулой (IM-3-b) или (IM-3-b'):



(IM-3-b)



(IM-3-b')

20 Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения промежуточных соединений (IM-3), (IM-3-a) или (IM-3-b), или (IM-3-b'), определенных выше, включающему этапы реакции, определенные в любом месте выше в контексте описания получения соединений формулы (I). При этом, предпочтительные условия способа, основания, растворители и катализаторы, описанные выше, предпочтительно, используют для получения, а также для кристаллизации и выделения.

25 Еще один аспект настоящего изобретения относится к новому способу получения промежуточного соединения (IM-1) или (IM-1-a), определенного в любом месте выше, при этом указанный способ включает этап реакции, описанный выше в четвертом аспекте настоящего изобретения или в способе, согласно этапу способа 1-a' и, более предпочтительно, этапу способа 1-a'', оба из которых были описаны выше.

30 При этом, предпочтительные условия способа, основания, растворители и катализаторы, описанные выше, предпочтительно, используют для получения, а также для кристаллизации и выделения.

Настоящее изобретение более подробно проиллюстрировано в примерах, представленных далее. Примеры являются лишь иллюстративными, и специалист в данной области техники сможет расширить конкретные примеры до дополнительных
5 подходящих вариантов, охватываемых ими.

Описание фигур

- Фиг. 1: PXRD-паттерн соединения (II) в форме ZnCl соли (полиморф РМ1).
 Фиг. 2: PXRD-паттерн соединения (II) в форме ZnCl соли (полиморф РМ2).
 10 Фиг. 3: PXRD-паттерн соединения (II) в форме ZnCl соли (полиморф РМ3).
 Фиг. 4 PXRD-паттерн соединения (II) в форме соли H_2SO_4 .
 Фиг. 5: PXRD-паттерн соединения (II) в форме соли H_3SO_4 .
 Фиг. 6: Хроматограмма ВЭЖХ, на которой показан профиль примесей соединения (II) в форме ZnCl соли (полиморф РМ1), полученной способом, согласно
 15 Примеру 4, с последующей экстракцией растворителем (вариант способа 1).
 Фиг. 7: Хроматограмма ВЭЖХ, на которой показан профиль примесей соединения (II) в форме ZnCl соли (полиморф РМ1), полученной способом, согласно Примеру 4, с последующей сепарацией масла (вариант способа 2).
 Фиг. 8: Хроматограмма ВЭЖХ, на которой показан профиль примесей
 20 соединения (II) в форме ZnCl соли (полиморф РМ1), которое может быть получено способом, описанным в WO2017068090A1 (получение примера соединения № 127).

ПРИМЕРЫ

Сокращения

DCM	дихлорметан
DSC	дифференцирующая сканирующая калориметрия
IPC	
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
PXRD	Порошковая рентгеновская дифракция
THF	Тetraгидрофуран
Mw	Молекулярная масса

25

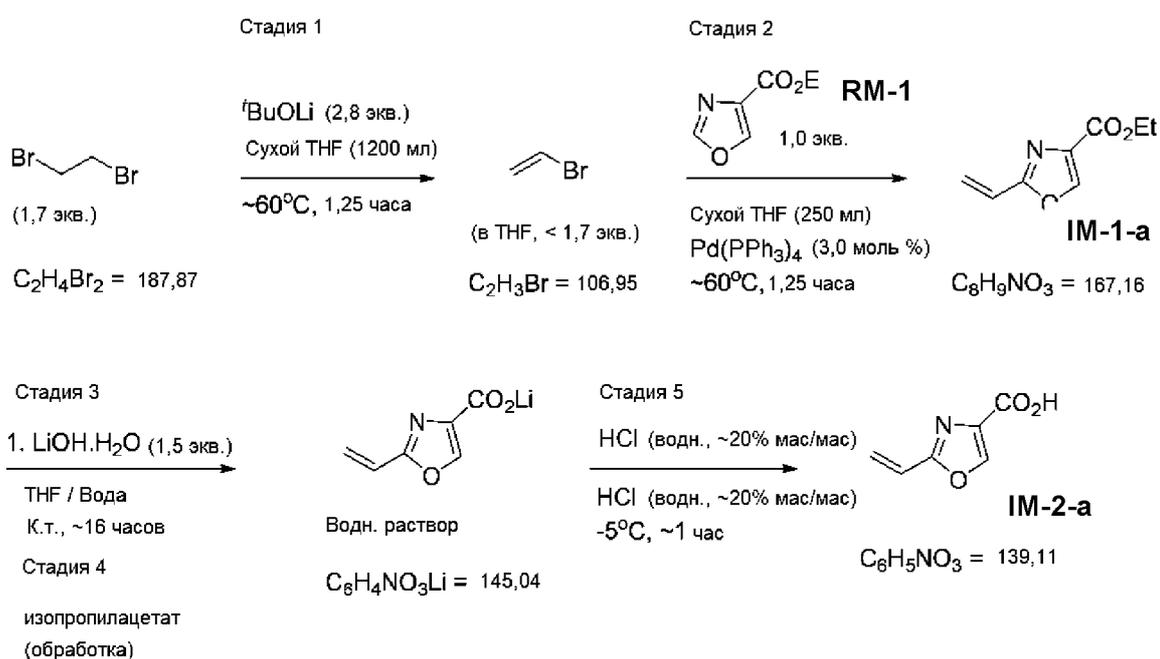
1а. Способ получения промежуточного соединения (IM-2-а) с кристаллизацией из HCl

Химические вещества:

30

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)	Количество (факт.)
	г/моль	ммоль			
1,2-дибромэтан	187,86	120,5	1,7	22,63 г	
Литий-трет-бутоксид	80,06	198,4	2,8	15,88 г	
THF	-	-	-	70 мл 15 мл 15 мл	
этил 4-оксазолкарбоксилат	141,12	70,9	1,0	10,00 г	
$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	-	-	-	2,24 г	
Гидроксид лития	23,95	106,3	1,5	2,55 г	
вода	-	-	-	35 мл	
изопропилацетат	-	-	-	2х 70 мл	
хлористоводородная кислота 20 %	-	-	-	х мл	х мл

Реакция:



5 Процедура:

Сосуд очищают с помощью N_2 в течение ≥ 15 мин.

Загружают LiO^tBu , дозируют 70 мл THF и перемешивают в течение ≥ 10 мин при $20 - 25^\circ\text{C}$.

Смесь нагревают до $55 - 60^\circ\text{C}$ и перемешивают в течение ≥ 5 мин.

10 Раствор 1,2-дибромэтана в 15 мл THF дозируют при $55 - 60^\circ\text{C}$.

Смесь перемешивают в течение ≥ 30 мин при этой температуре.

Смесь охлаждают до 45 - 50°C.

Добавляют Pd(PPh₃)₄, очищают несколькими мл THF и перемешивают при этой температуре в течение ≥ 5 мин.

5

Смесь нагревают до 60 – 65 °С и раствор этил 4-оксазолкарбоксилата в 15 мл THF дозируют при 60 – 65 °С (экзотермически).

Смесь перемешивают при этой температуре в течение ≥ 30 мин.

10 Смесь охлаждают до 20 – 25 °С.

Раствор LiOH в 35 мл воды дозируют при 20 – 25 °С и перемешивают в течение ночи (экзотермически).

ИРС посредством ВЭЖХ: ≥ 95 % преобразования

15 Смесь экстрагируют трижды с помощью изопропилацетата. Органические фазы отбрасывают.

Водную фазу охлаждают до 0 – 5°C и измеряют значение pH.

Значение pH регулируют с помощью HCl 20 % до 0,9 – 1,1 путем поддержания температуры на значении ≤ 10°C.

Суспензию перемешивают при температуре от – 5 до 0 °С в течение ≥ 45 мин.

20 Суспензию фильтруют, промывают 50 мл охлажденного (≤ 5 °С) HCl со значением pH 0, 20 мл охлажденной (≤ 5 °С) воды и сушат в вакууме при 45 °С до сухого состояния.

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход продукта (твердое вещество бледно-коричневого цвета)	9,9 г	6,5 г	66% некоррект.

ВЭЖХ = 98 % площади

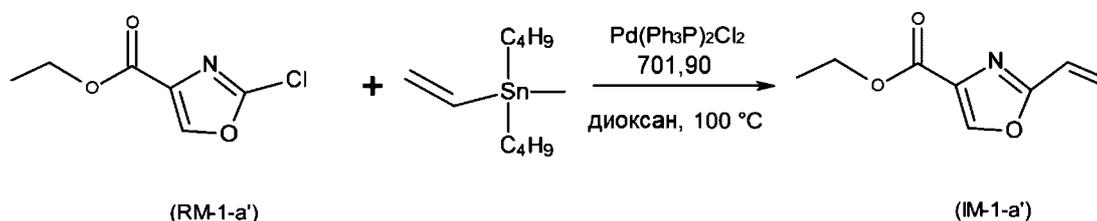
25 q-ЯМР = 98 % м/м

1b. Альтернативный этап способа получения промежуточного соединения (IM-1-a)

30 В альтернативном (но менее предпочтительном) способе, согласно Примеру 1a выше, этапы способа на стадии 1 и стадии 2, описанные в настоящем документе, могут осуществляться, начиная с соединения RM-1, где R_y представляет собой хлор, а R⁴ представляет собой водород, и которое обозначено в настоящем документе RM-1-a', с получением промежуточного соединения IM-1-a.

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество
	г/моль	ммоль		
этил 2-хлороксазол-4-карбоксилат	175,57	885,69	1,0	155,50 г
трибутил(винил)олово	317,1,1	877,96	1,0	278,40 г
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$	701,9	43,60	-	30,60 г
диоксан	-	-	-	1500 мл

Реакция:

5

Процедура:

Этил 2-хлороксазол-4-карбоксилат, трибутил(винил)олово и $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Cl}_2$ загружают в диоксан в условиях азота. Смесь нагревают до точки кипения ОТ 100 – 110 °С в течение ≥ 4 ч. Смесь охлаждают до ПТ 20 – 25 °С, фильтруют на целите и
 10 фильтрационную корку промывают 200 мл диоксана. Фильтрат выпаривают в вакууме до сухого состояния и неочищенный продукт очищают хроматографией.

Колонка: Кр-Sil 1500 г

Элюент: EtOAc/Гептан 20:80

15 Способ: Длительность 7 CV, без градиента, пороговое значение 20 миллиединиц поглощения;

Неочищенный продукт, растворенный в EtOAc/гептане 20:80, при данном масштабе использовали две колонки

20 Выход:

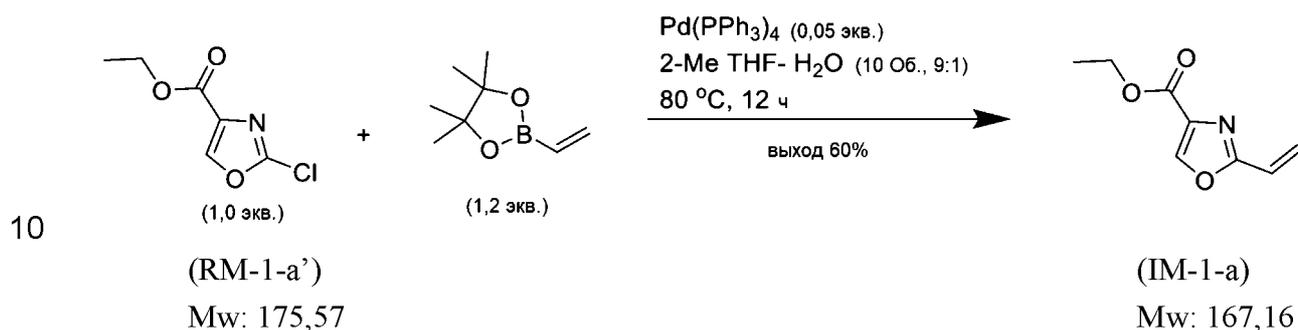
	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-	453,40 г	
Конечный выход продукта	146,02 г	112,34 г	76,93 %

ЯМР: соответствие структуре

1с. Альтернативный этап способа получения промежуточного соединения (IM-1-а)

Еще в одном альтернативном (предпочтительном) способе, согласно Примеру 1а выше, этапы способа на стадии 1 и стадии 2, описанные в настоящем документе, могут осуществляться, начиная с соединения RM-1, где R_y представляет собой хлор, а R⁴ представляет собой водород, и которое обозначено в настоящем документе RM-1-а', с получением промежуточного соединения IM-1-а.

Реакция:



Процедура:

15 В RBF загружали этил 2-хлороксазол-4-карбоксилат (RM-1-а' / 1,0 экв.), 2-Ме THF (9 Об.) и воду (1 Об.) добавляли в атмосфере азота при 25-30 °С. В эту смесь добавляли пинаколовый сложный эфир винилбороновой кислоты (1,2 экв.) и карбонат калия (2,5 экв.) при 25-30 °С и полученную в результате смесь дегазировали азотом в течение 15 минут. Pd(PPh₃)₄ (0,05 экв.) добавляли в атмосфере азота и реакционную смесь

20 подогревали до 80 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение 8-12 ч при 80-85 °С и за завершением реакции следили посредством ТСХ/ВЭЖХ. После завершения реакции, реакционную смесь охлаждали до 25-30 °С и разбавляли водой (5 Об.). Фазы отделяли и водную фазу экстрагировали с помощью 2-Ме THF (5 Об.). Объединенные органические фазы промывали водой (5 Об.) и потом солевым раствором (5 Об.), а

25 затем сушили над сульфатом натрия. Органическую фазу фильтровали и концентрировали при температуре ниже 50 °С в условиях вакуума с получением неочищенного продукта в виде коричневой жидкости. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60-120 меш), элюировали этилацетатом и н-гептаном с получением очищенного продукта.

30 ЯМР: соответствие структуре.

Выход:

55-60%

35 Чистота:

Чистота полученного материала была в диапазоне 96-99%.

Благодаря дальнейшей очистке с использованием кристаллизации н-гептаном при более низкой температуре ниже 0 °С, получали чистоту >98%. При испытании этого материала с высокой степенью чистоты на содержание палладия с помощью ИСП-МС было обнаружено количество в диапазоне 10-250 частиц на миллион, которое было дополнительно уменьшено путем обработки поглотителем Siliabond thiol (обработка гетерогенным Pd-поглотителем) до содержания ниже 25 частиц на миллион.

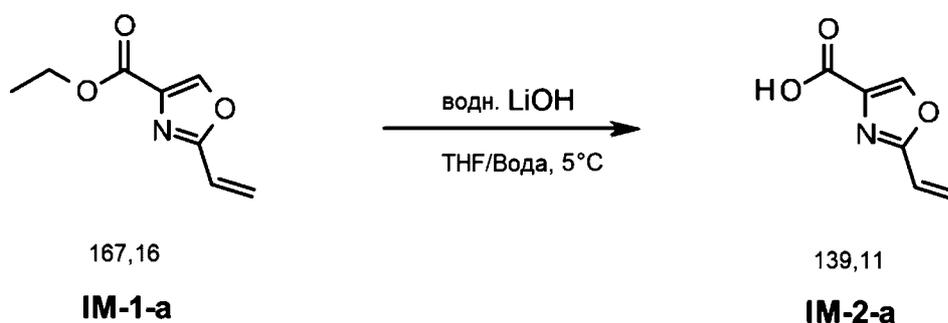
10 2. Способ получения промежуточного соединения (IM-2-а) с кристаллизацией из воды

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Масса теор.	Масса факт.
	г/моль	ммоль			
IM-1-а	167,16	598,2	1,0	100,00 г	100,14 г
THF	-	-	-	500 мл	500 мл
вода	-	-	-	500 мл	500 мл
гидроксид лития	23,95	658,1	1,1	15,76 г	15,76 г
HCl 20 %	-	-	-	х мл	х мл
DCM	-	-	-	2 х 500 мл	2 х 500 мл
сульфат магния	-	-	-	х г	х г

Реакция:

- 15 Начальное соединение IM-1-а может быть получено в соответствии с этапами способа «стадией 1» и «стадией 2» из Примера 1а или как описано в Примере 1b (менее предпочтительно).



20 Процедура:

IM-1-а загружают в реактор и растворяют в THF.

Раствор охлаждают до 3 – 7°C.

Раствор LiOH (15,76 г в 500 мл воды) добавляют в течение \geq 15 мин (слабо экзотермически) при 3 – 7°C.

Смесь перемешивают в течение ≥ 3 ч при 3 - 7°C.

ПС посредством ЖХ/МС $\geq 97\%$ преобразования.

Смесь экстрагируют дважды с помощью DCM. Экстракции и сепарации фазы DCM осуществляли с помощью водн. фазы при 5°C, но без активного охлаждения, используя

5 DCM при комнатной температуре.

Фазы оставляют на ≥ 30 мин.

Органические слои отбрасывают.

Сосуд очищают с помощью HCl 20% и этанола.

10 HCl 20% дозируют в водн. фазу при 3 - 7°C, пока значение pH составляет 0,5 – 1,0 (немного экзотермически, HCl не должен смываться со стенок сосуда). Вплоть до конца дозирования HCl во время кристаллизации, скорость мешалки увеличивали с 80 до 300 об/мин для обеспечения надлежащего перемешивания суспензии.

Суспензию перемешивают в течение ≥ 30 мин при 3 - 7°C.

Суспензию фильтруют и реактор промывают один раз маточным раствором.

15 Влажную корку промывают водой температуры 5 – 10°C и сушили при 45°C/в вакууме < 50 мбар до сухого состояния. Перенос мелкодисперсной суспензии на фильтр оставляет за собой некоторые остатки в сосуде, однако они легко могут быть удалены одним промыванием маточным раствором.

20

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход	83 г	77 г	93% некоррект.

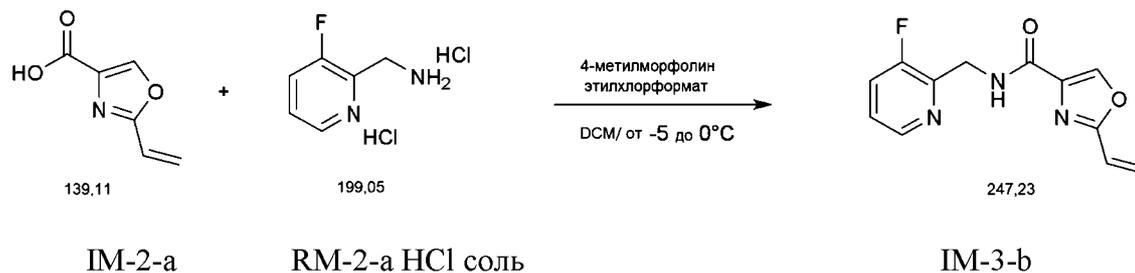
ЯМР анализ: 97% м/м

Корр. Выход: 90%

25 **За. Способ получения промежуточного соединения (IM-3-b) с кристаллизацией из воды**

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	количество теор.	количество факт.
	г/моль	ммоль			
IM-2-a	139,11	718,9	1,00	100,00 г	
DCM	-	-	-	900 мл	
4-метилморфолин	101,15	2731,7	3,80	276,31 г	
этилхлорформат	108,52	898,6	1,25	97,51 г	
RM-2-a	199,05	898,6	1,25	178,86 г	
NaCl-раств. 10 %	-	-	-	2 х 900 мл	
HCl 10 %				3х 450 мл	

Реакция:

5

Процедура:

Начальное соединение IM-2-a может быть получено так, как описано в Примере 1 или 2.

10 В инертной атмосфере соединение IM-2-a суспендируют в DCM и добавляют 4-метилморфолин при температуре от -5 до 0°C.

Затем добавляют этилхлорформат, поддерживая температуру $\leq 0^\circ\text{C}$ (экзотермическое добавление). Соединение RM-2-a (измельченное) добавляют частями, поддерживая температуру $\leq 0^\circ\text{C}$.

15 Суспензию перемешивают в течение ≥ 2 ч при температуре от -5 до 0°C.

Контроль ИРС посредством ЖХ/МС преобразования $\geq 93\%$ площади.

Смесь нагревают до 15 – 25 °С и экстрагируют дважды с помощью раствора NaCl 10%.

Органическую фазу экстрагируют трижды с помощью 450 мл HCl 10% об/об.

20 Значение pH объединенных водных фаз регулировали до 2 с помощью 30% NaOH, а затем - до pH 7 – 8 с помощью 5% NaOH, поддерживая температуру на значении $\leq 10^\circ\text{C}$.

Суспензию фильтруют, промывают дважды 400 мл воды и сушат в вакууме при 45°C до сухого состояния.

25 Выход:

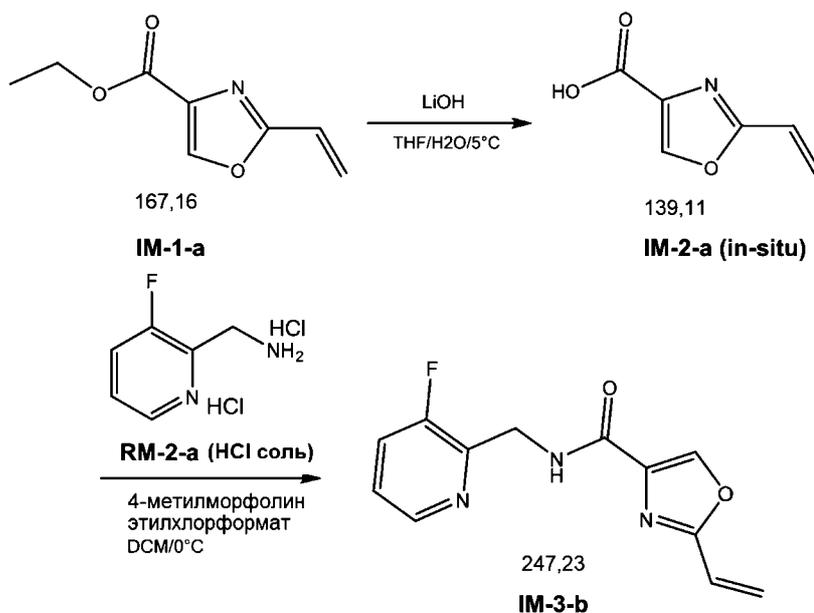
	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход	178 г	162 г	91% некоррект.

ЯМР анализ: 99 %

Корр. Выход: 90 %

30 **3b. Способ получения промежуточного соединения (IM-3-b) – Сокращенный синтез с помощью IM-2-a**

Реакция:

**Вариант способа 1:**

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)	Количество (факт.)
	г/моль	ммоль			
IM-1-a	167,16	59,8	1,0	10,00 г	
THF	-	-	-	50 мл	
Вода	-	-	-	50 мл	
LiOH	23,95	71,8	1,2	1,72 г	
DCM	-	-	-	3 x 50 мл	3 x
HCl 20%	-	-	-	x мл	x мл
DCM	-	-	-	x мл	
4-метилморфолин	101,15	227,3	3,80	22,99 г	
этилхлорформат	108,52	74,8	1,25	8,11 г	
RM-2-a	199,05	74,8	1,25	14,88 г	
NaCl 10 %	-	-	-	2 x 150 мл	
HCl 10%				3 x 75 мл	

5 Процедура:

Начальное соединение IM-1-a может быть получено так, как описано в Примере 1 или 2.

- 10 Начальное соединение IM-1-a растворяют в THF. Раствор 1,72 г LiOH в 20 мл воды добавляют при IT 0 – 5 °C. Смесь перемешивают при 3 – 7 °C в течение ≥ 3 ч. ИРС посредством ВЭЖХ-МС ≥ 97 % преобразования.

Смесь регулируют до IT 15 – 20 °С и значение рН регулируют до 0,8 – 1,2 путем добавления HCl 20 % в этом диапазоне температур. Смесь экстрагируют трижды с помощью DCM. Объединенные органические фазы сушат с помощью удаления азеотропного растворителя путем отгонки 50 мл объема при OT 30 °С / 600 мбар и последующего добавления 50 мл DCM.

Эту процедуру повторяют до тех пор, пока содержание воды не составит 0,13%, что определяется методом по Карлу-Фишеру.

10 Заполнение раствором осуществляют до объема 160 мл с DCM и охлаждают до IT -5 – 0 °С. В этом диапазоне температур добавляют 4-метилморфолин. В этом диапазоне температур добавляют этилхлорформат (экзотермически). RM-2-a (измельченное) добавляют частями при IT ≤ 0 °С. Смесь перемешивают при -5 – 0 °С в течение ≥ 3 ч. ИРС посредством ВЭЖХ-МС ≥ 93% преобразования.

15 Смесь экстрагируют дважды с помощью раствора NaCl 10 %. Водные фазы отбрасывают. Органическую фазу экстрагируют трижды с помощью 75 мл HCl 10%. Органическую фазу отбрасывают. Значение рН объединенных водных фаз регулируют при IT ≤ 10 °С до 2 сначала с помощью NaOH 30 %, а затем с помощью NaOH 5 % до значения рН 7 – 8. После перемешивания в течение ≥ 15 мин при ≤ 10 °С суспензию
20 фильтруют и промывают дважды 60 мл воды. Фильтрационную корку сушат при OT 45 °С / < 100 мбар до сухого состояния.

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход порошок грязно-белого цвета	14,78 г	10,35 г	70,03 %

Чистота ВЭЖХ = 99,8%

25 Вода = 0,04%

В экспериментах с содержанием воды в DCM 0,04% путем азеотропирования, выход составлял вплоть до 85%.

30

35

Вариант способа 2:Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)
	г/моль	ммоль		
IM-1-a	167,16	2392,9	1,00	400,00 г
THF	-	-	5,00	2000,0 мл
водн. LiOH 34,4 г/л	23,95	2871,5	1,2	1999,8 мл
HCl 20 %	-	-	-	x мл
DCM	-	-	3x	3x
			5,0	2000,0 мл
			2,0	800,0 мл
			2,0	800,0 мл
DMF	-	-	3x	3x
			10,0	4000,0 мл
4-метилморфолин	101,15	9332,4	7,0	2800,0 мл
			1,5	600,0 мл
этилхлорформат	108,52	3230,4	1,35	350,57 г
RM-2-a	199,05	2991,1	1,25	595,39 г
Вода	-	-	11,0	4400,0 мл
			2,5	1000,0 мл
			2,5	1000,0 мл

Процедура:

- 5 Начальное соединение IM-1-a может быть получено так, как описано в Примере 1 или 2.

Начальное соединение IM-1-a загружают в реактор и наполняют THF. Раствор охлаждают до 0 – 5°C и дозируют раствор LiOH при IT ≤ 5°C. Раствор перемешивают при IT 0 - 5°C в течение ≥ 60 мин.

10

IPC посредством ВЭЖХ:

Если IPC IM-1-a составляет < 0,2% а/а, то значение pH регулируют до pH 0,5 – 1,0 при 15 – 20°C с помощью HCl 20%.

15

Смесь экстрагируют 3 x с помощью DCM. Объединенные органические фазы сушат над MgSO₄, фильтруют и фильтрационную корку промывают DCM. DCM выпаривают при OT 32 – 37°C / 400 мбар. Добавляют 8,5 экв. DMF. THF выпаривают при 32 – 37°C / до 35 мбар. (Конечные точки дистилляции, когда конденсация растворителя более не происходит).

20

IPC посредством KF ≤ 0,2% воды:

Если ИРС вне характеристик, до добавляют 10 экв. DCM и отгоняют при 32 – 37°C повторно с последующей ИРС KF.

4-метилморфолин добавляют в раствор DMF при ИТ от -5 до 0°C. Этилхлорформат добавляют при ИТ = от -5°C до 0°C. RM-2-a (измельченное) добавляют при ИТ -5°C до 0°C. Смесь перемешивают в течение ≥ 5 h при ИТ от -5 до 0°C.

ИРС посредством ВЭЖХ:

Если ИРС ИМ-3-a > 85% а/а, то медленно добавляют воду при ИТ < 10°C. Значение pH реакционной смеси регулируют до pH 6 – 8 с помощью NaOH 30%, если это необходимо. Суспензию продукта перемешивают в течение ≥ 60 мин при ИТ 0 – 5°C, фильтруют, промывают дважды водой и сушат при 45°C в вакууме.

Выход:

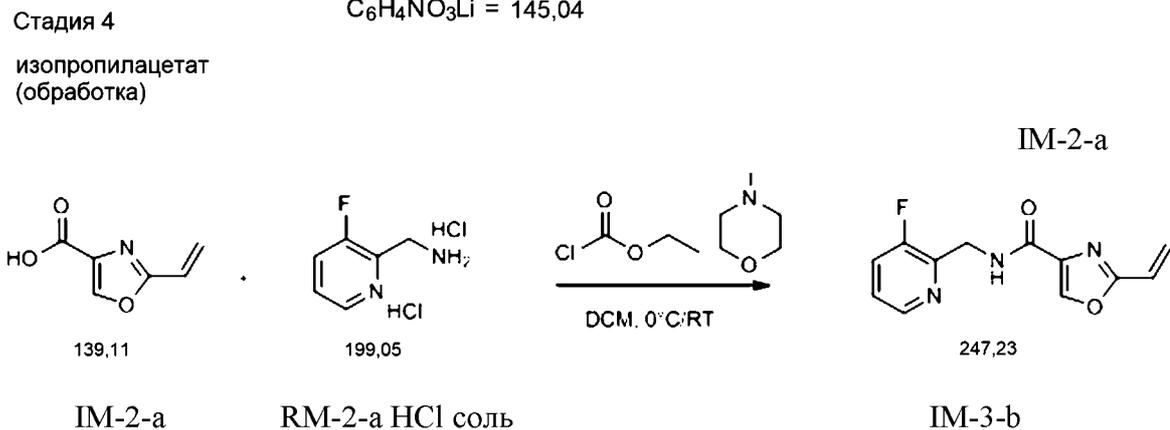
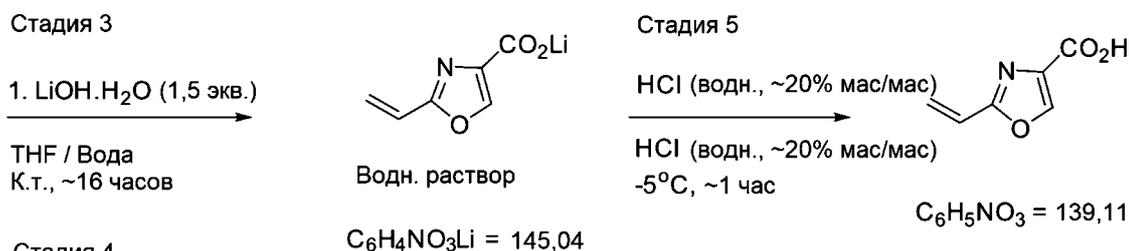
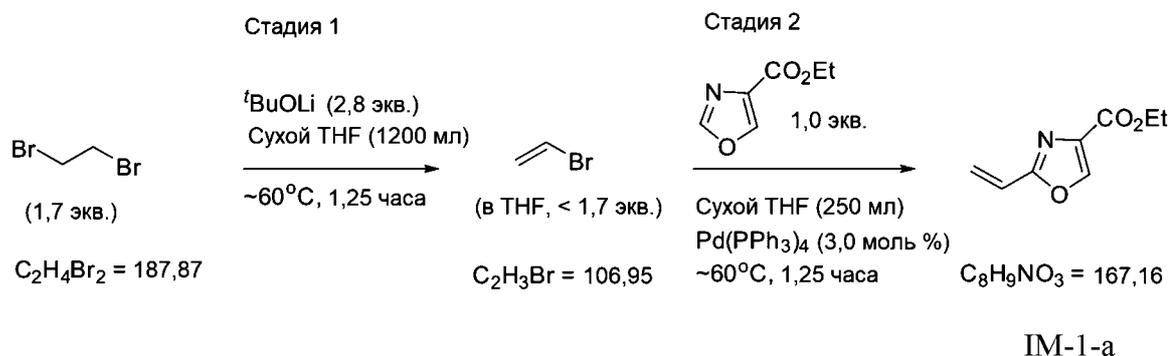
Выход = 448,42 г = 75,6%

Анализ ВЭЖХ = 98,2%

Чистота ВЭЖХ = 99,7%

3с. Способ получения промежуточного соединения (ИМ-3-b) – Сокращенный синтез с помощью ИМ-2-a

Реакция:



Вариант способа 1:Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)	Количество (факт.)
	г/моль	ммоль			
1,2-дибромэтан	187,86	120,5	1,70	22,63 г	
литий-трет-бутоксид	80,06	198,4	2,80	15,88 г	
THF	-	-	-	70 мл 15 мл 15 мл	
этил 4-оксазолкарбоксилат	141,12	70,9	1,00	10,00 г	
Pd(PPh ₃) ₄	-	-	2,7 %	2,24 г	
LiOH	23,95	106,3	1,50	2,55 г	
вода	-	-	-	2 x35 мл	
MTBE	-	-	-	2x 70 мл	
HCl 20%	-	-	-	x мл	x мл
THF	-	-	-	50 мл	
дихлорметан	-	-	-	3 x 50 мл	3 x
4-метилморфолин	101,15	269,3	3,80	27,24 г	
этилхлорформат	108,52	88,6	1,25	9,61 г	
RM-2-a	199,05	88,6	1,25	17,63 г	
раствор NaCl 10 %	-	-	-	2 x 100 мл	2 x

5 Процедура:

Сосуд очищают в течение ≥ 15 мин с помощью N₂. LiOБу загружают в сосуд, добавляют 70 мл THF и смесь перемешивают при IT 20 – 25 °С в течение ≥ 10 мин.

Смесь нагревают до IT 53 – 57 °С и перемешивают в течение ≥ 5 мин.

10 Раствор 1,2-дибромэтана в 15 мл THF добавляют при IT 55 – 60 °С (экзотермически), смесь перемешивают в течение ≥ 30 мин при IT 58 – 62 °С.

Смесь охлаждают до IT 43 – 47 °С.

Добавляют Pd(PPh₃)₄ и перемешивают в течение ≥ 5 мин.

Смесь нагревают до IT 58 – 62 °С, добавляют раствор этил 4-оксазолкарбоксилата в 15 мл THF при IT 60 – 65 °С.

15 Смесь перемешивают в течение ≥ 30 мин при IT 58 – 62 °С.

ИРС посредством ВЭЖХ для сведения:

- этил 4-оксазолкарбоксилат отсутствует

- этилэфирный продукт 72 %
- трет-бутилэфирный продукт 23 %
- промежуточный продукт IM-1-a 5 %

Смесь охлаждают до IT 20 – 25 °С.

- 5 Раствор LiOH в 35 мл воды добавляют при IT 20 – 27 °С и смесь перемешивают при IT 23–27 °С в течение ≥ 16 ч.

IPС посредством ВЭЖХ ≥ 93 %.

Добавляют 35 мл воды и смесь экстрагируют дважды с помощью 70 мл ТВМЕ.

- 10 Добавляют 50 мл THF и значение pH регулируют при IT 15 – 20 °С до 0,5 – 1,0 с помощью HCl 20 %.

Смесь экстрагируют трижды с помощью 50 мл DCM

Объединенные органические фазы сушат над Na₂SO₄ (15 – 20 г), фильтруют и фильтрационную корку промывают 10 мл DCM.

Фаза DCM = 0,51% воды методом Карла-Фишера.

- 15 OT настраивают на значение -20 °С.

Добавляют 4-метилморфолин при IT от -5 до 0 °С.

Добавляют этилхлорформат при IT от -5 до 0 °С

RM-2-a (измельченное) добавляют частями при IT ≤ 0 °С и смесь перемешивают при IT от -5 до 0 °С в течение ≥ 3 ч.

- 20 IPС посредством ВЭЖХ ≥ 90 %.

Смесь экстрагируют дважды с помощью 100 мл NaCl 10 %.

Промежуточный слой поддерживают с органической фазой.

Органическую фазу экстрагируют трижды с помощью 80 мл HCl 10%.

- 25 Водн. раствор фильтруют и значение pH регулируют сначала до 2 – 5 с помощью NaOH 30%, а затем с помощью NaOH 5% до pH 7 – 8. IT поддерживают на значении ≤ 10 °С во время добавления pH.

Суспензию фильтруют и промывают дважды 60 мл воды.

Продукт сушат при 45 °С / < 100 мбар до сухого состояния.

Внешний вид:

- 30 Чистота ВЭЖХ: 99,0 %

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход порошок бежевого цвета	17,52 г	12,36 г	70,60 %

Чистота ВЭЖХ = 99,8%

Вода = 0,04%

5

В экспериментах с содержанием воды в DCM 0,04% путем азеотропирования, выход составлял вплоть до 85%.

Вариант способа 2:

10 Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Теоретически
	г/моль	ммоль		
литий- <i>m</i> -бутоксид (tBuOLi)	80,06	99,2	2,80	7,94 г
THF	-	-	7,00	35,0 мл
1,2-дибромметан (DBE)	187,86	60,2	1,70	11,32 г
THF	-	-	1,50	7,5 мл
Pd(PPh ₃) ₄ (катализатор)	1155,56	1,0	0,027	1,11 г
этил оксазолкарбоксилат ⁴⁻	141,12	35,4	1,00	5,00 г
THF	-	-	1,50	7,5 мл
LiOH	23,95	42,5	1,20	1,02 г
вода	-	-	3,5 17,5	17,5 мл 87,5 мл
MTBE	-	-	2х 7,00	2х 35,0 мл
THF			10,00	50,0 мл
HCl 20 %	-	-	-	х мл
дихлорметан (DCM)	-	-	14,0	70,0 мл
			7,0	35,0 мл
			7,0	35,0 мл
			3,0	15,0 мл
			3,0	15,0 мл
DMF	-	-	х 10,0	х 50,0 мл
			8,5 1,5	42,5 мл 7,5 мл

4-метилморфолин	101,15	138,2	3,90	13,98 г
этилхлорформат (ECF)	108,52	47,8	1,35	5,19 г
RM-2-a	199,05	44,3	1,25	8,82 г
THF	-	-	1,95	9,8 мл
вода	-	-	13,0	65,0 мл
			3,0	15,0 мл
			3,0	15,0 мл

Процедура:

Реактор очищают азотом в течение 15 мин, конденсатор охлаждают до -30°C .

- 5 tBuOLi загружают в реактор и добавляют THF. Смесь нагревают до $T_I = 55^{\circ}\text{C}$ ($T_M = 58^{\circ}\text{C}$) и перемешивают в течение 5 мин. Раствор 1,2-дибромметана в THF добавляют при $T_I \leq 60^{\circ}\text{C}$. Смесь перемешивают при $T_I = 60^{\circ}\text{C}$ ($T_M = 63^{\circ}\text{C}$) в течение 60 мин. Смесь охлаждают до $T_I = 45^{\circ}\text{C}$.

- 10 Добавляют $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Смесь нагревают до $T_I = 60^{\circ}\text{C}$ ($T_M = 63^{\circ}\text{C}$).

Раствор этил 4-оксазолкарбоксилата в THF добавляют при $T_I \leq 65^{\circ}\text{C}$. Смесь перемешивают в течение 30 мин при $T_I = 60^{\circ}\text{C}$ ($T_M = 63^{\circ}\text{C}$). Смесь охлаждают до $T_I = 20 - 25^{\circ}\text{C}$ ($T_M = 20^{\circ}\text{C}$).

15

ИРС посредством ВЭЖХ-МС.

Раствор LiOH в воде добавляют при $T_I \leq 25^{\circ}\text{C}$. Смесь перемешивают при $T_I = 25^{\circ}\text{C}$ в течение ≥ 16 ч.

- 20 ИРС посредством ВЭЖХ-МС

Воду добавляют и смесь экстрагируют 2х с помощью MTBE. Фазы MTBE отбрасывают. Добавляют THF и значение pH регулируют до 0,5 – 1,0 при 15°C - 20°C с помощью

- 25 HCl 20 %. Смесь экстрагируют 3х с помощью DCM. Объединенные органические экстракты сушат над MgSO_4 , фильтруют и фильтрационную корку промывают DCM. DCM выпаривают при 35°C / 400 мбар. Добавляют 8,5 экв. DMF и THF выпаривают при 35°C / жл 35 мбар. Конечные точки дистилляции имеют место тогда, когда конденсация растворителя более не происходит.

- 30 ИРС посредством KF $\leq 0,2\%$ воды, в противном случае проводят дополнительное азеотропирование.

Для дальнейшего азеотропирования добавляют 10 экв. DCM и выпаривали при 35°C/400 мбар. Повторяли ИРС посредством KF.

- 5 Эту процедуру повторяли до тех пор, пока ИРС посредством KF было в пределах характеристик. 4-метилморфолин добавляют в раствор DMF при TI = от -5 до 0°C. Этилхлорформат добавляют при TI = от -5°C до 0°C. RM-2-а (измельченное) добавляют при TI = -5°C - 0°C. Смесь перемешивают в течение ≥ 5 ч при IT = -3°C.

ИРС посредством ВЭЖХ-МС

- 10 Если ИРС IM2 > 85% а/а, то добавляют воду при IT < 10°C
Значение рН реакционной смеси регулируют до рН 6 – 8 с помощью NaOH 30%, если это необходимо. Суспензию продукта перемешивают в течение ≥ 60 мин при IT 0 – 5°C, фильтруют, промывают дважды водой и сушат при 45°C в вакууме.

- 15 Выход:

Выход = 5,5 г = 62,4%

Анализ ВЭЖХ = 99,6% м/м

Чистота ВЭЖХ = 99,7% а/а

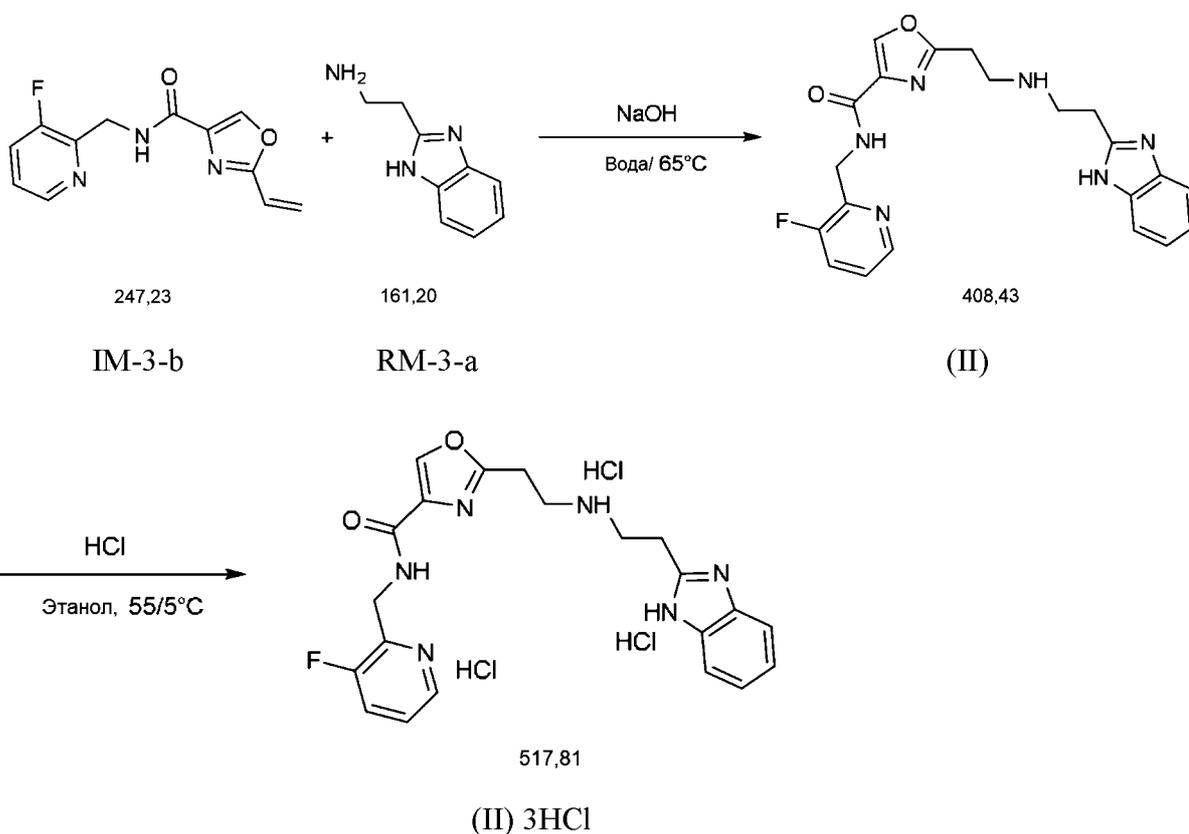
- 20 4. **Способ получения соединения (II) в форме ЗНСІ соли – Сокращенный синтез с заменой растворителя**

Вариант способа 1 (экстракция растворителем):

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Масса теор.	Масса факт.
	г/моль	ммоль			
RM-3-а	161,20	486,4	1,2	78,4 г	78,4 г
вода	-	-	-	6500 мл	6500 мл
NaOH 30%	39,99	40,5	0,1	5,4 г	5,4 г
IM-3-b	247,23	404,5	1,0	100,00 г	100 г
DCM				4х 3200 мл	4х 3200 мл
EtOAc				3х 3200 мл	3х 3200 мл
этанол				1х 3200 мл 1х5600 мл	2х 3200 мл 1х4600 мл
HCl 32 %	36,46	100,4	(2,5)	114,4 г	114,4 г

- 25 Реакция:



5

Процедура:

Промежуточное соединение IM-3-b может быть получено так, как описано в Примере 3.

10 Соединение RM-3-a (измельченное) загружают в реактор и суспендируют в воде при 20 – 25°C.

NaOH 30% дозируют и суспензию перемешивают при 20 – 25°C до образования раствора (прибл. 15 мин).

Добавляют промежуточное соединение IM-3-b (измельченное) и смесь нагревают до 60 – 65°C в течение 72 ч.

15 ИРС посредством ЖХ/МС преобразования $\geq 93\%$ площади.

Смесь охлаждают до 20 – 25°C и добавляют DCM.

Значение pH регулируют до 3,9 – 4,1 с помощью HCl 10%.

Смесь перемешивают в течение 5 мин и фазы оставляют на 1 ч. Нижнюю фазу отбрасывают. Экстракцию DCM повторяют трижды.

20 Значение pH водн. фазы регулируют до 9.9 – 10.1 с помощью NaOH 15% и добавляют EtOAc.

Смесь перемешивают в течение 5 мин и фазы оставляют на 1 ч. Нижнюю фазу отбрасывают. Экстракцию EtOAc повторяют дважды.

25 Органические фазы объединяют (объем = 8,5 л) и концентрируют в вакууме / ОТ 40°C до объема 1,7 л (1/5 объема).

Добавляют 3,2 л EtOH и раствор концентрируют в вакууме / ОТ 40°C до объема 1,7 л (1/2 объема).

Добавляют 3,2 л EtOH и раствор концентрируют в вакууме / ОТ 40°C до объема 1,05 л (1/3 объема).

Добавляют 4,55 л EtOH (5,6 л – 1,05 л) и раствор фильтруют и нагревают до 55 – 60°C. HCl 32% дозируют в течение ≥ 20 мин при 55 – 60°C и суспензию медленно охлаждают

5 до 0 – 5°C в течение ≥ 3 ч.

Суспензию перемешивают при 0 – 5°C ≥ 1 ч и фильтруют.

Отфильтрованную корку промывают 0,8 л EtOH и сушат при 45°C / в вакууме < 50 мбар до сухого состояния.

10 Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход продукта (порошок от белого до грязно-белого цвета)	209,4 г	142,3 г	68% некорр. / 65 % некорр.

Анализ ВЭЖХ: 75,8% м/м свободного основания, 96,2% м/м соль

Чистота ВЭЖХ: 99,2% площади

Профиль чистоты ВЭЖХ показан на Фигуре 6

15 Содержание воды: 1,2%

Содержание хлорида (элементный анализ): среднее значение 19,8 % (м/м), которое близко к ожидаемому значению 20,5% для соотношения 3:1 HCl:соль свободного основания

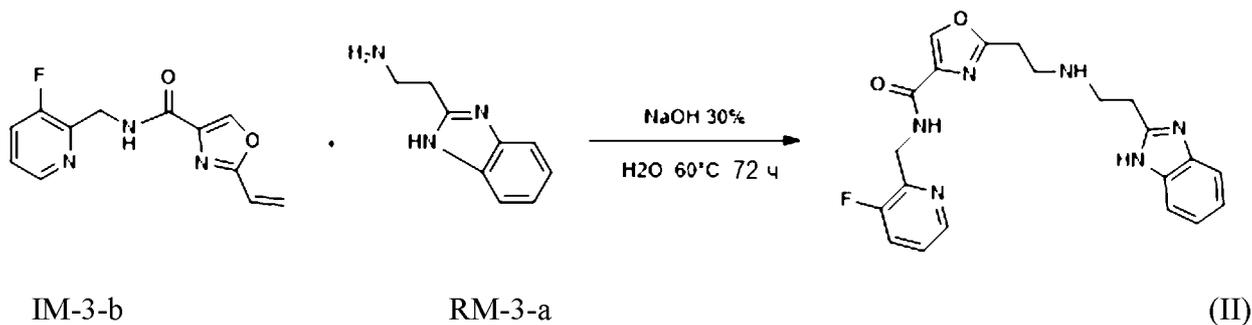
DSC: 192°C

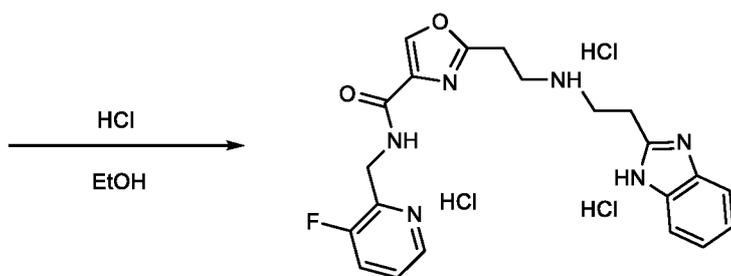
20 Анализ PXRD: полиморфная форма PM1 (PXRD-паттерн, согласно Фигуре 1)

Вариант способа 2 (сепарация масла):

Реакция:

25





(II) 3HCl

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Масса теор.
	г/моль	ммоль		
RM-3-a	161,20	40,4	1,0	6,52 г
вода	-	-	-	100 мл
NaOH 30%	39,99	0,4	0,01	54 мг
IM-3-b	247,23	40,4	1,0	10,00 г
EtOH 99%		-	-	560 мл
HCl 32 %	36,46	100,0	(2,5)	11,51 г

5

Процедура:

RM-3-a загружают в реактор и суспендируют в воде. Добавляют NaOH 30%. Добавляют IM-3-b и смесь нагревают до IT 58 - 62°C в течение ≥ 72 ч. Продукт ИРС посредством ЖХ/МС $\geq 75\%$ площади (все соединения комплексные).

10

Смесь охлаждают до 5 – 25°C и позволяют ей устояться в течение ≥ 16 ч. Масляную фазу на дне сепарируют путем отгонки реактора, декантирования или отсасывания водной фазы под действием вакуума. Сепарированную масляную фазу растворяют в 560 мл EtOH. Раствор фильтруют и нагревают до IT 60 – 65°C. Добавляют 0,7 мг затравочных кристаллов. HCl 32% дозируют в течение 20 мин при IT 60 – 65°C со скоростью мешалки 100 об/мин. После добавления HCl скорость мешалки снижали до 60 об/мин и суспензию медленно охлаждали до IT 0 – 5°C в течение ≥ 4 ч. Суспензию перемешивают при 0 – 5°C ≥ 1 ч и фильтруют. Фильтрационную корку промывают 105 мл EtOH и сушат при 45°C / в вакууме < 50 мбар до сухого состояния.

15

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход продукта	20,93 г	13,7 г	65,40 %

Анализ ВЭЖХ: 77,4% м/м свободного основания, 98,3% м/м соли

Корр. Выход = 64,3%

Чистота ВЭЖХ: 99,7% площади

Профиль чистоты ВЭЖХ показан на Фигуре 7

5

Получение полиморфа РМ2 соединения (II) в форме 3HCl соли

Полиморфную форму РМ2 получают путем горячей рекристаллизации раствора соединения (II) в виде 3HCl соли в форме полиморфа РМ1, как было получено в Примере 4, описанном выше.

10

Горячую рекристаллизацию проводили в смеси растворителя толуол : метанол в соотношении 1:1.

Спектр ^1H ЯМР полиморфа РМ2 по существу остается неизменным по сравнению с таковым у полиморфа РМ1, однако демонстрирует острый синглет при $\sim\delta 3,16$ частиц на миллион, которое относится к метанолу, что предполагает, что содержание метанола составляет ~ 2 мольных процента.

15

Элементный анализ полиморфа РМ2 для определения количества хлорида дал среднее значение 20,0% (м/м), которое вполне соответствует ожидаемому значению 20,5% для 3:1 HCl: соль свободного основания.

20

DSC: 226 °C

Анализ PXRD: полиморфная форма РМ2 (PXRD-паттерн, согласно Фигуре 2)

Получение полиморфа РМ3 соединения (II) в форме 3HCl соли

Полиморфную форму РМ3 получают путем получения насыщенного раствора соединения (II) в виде 3HCl соли в форме полиморфа РМ1, как было получено в Примере 4, описанном выше, в смеси раствора ацетон : вода в соотношении 9:1 (об/об) при 50 °C, охлаждения до 5 °C и затем осаждения белого твердого вещества путем добавления ацетона.

25

Спектр ^1H ЯМР полиморфа РМ3 имеет лишь незначительные отличия по сравнению с таковым полиморфа РМ1, имея незначительный сдвиг широких резонансов.

Элементный анализ полиморфа РМ3 для определения количества хлорида дал среднее значение 19,3% (м/м), которое вполне соответствует ожидаемому значению 20,5% для 3:1 HCl: соль свободного основания.

35

DSC: 169 °C

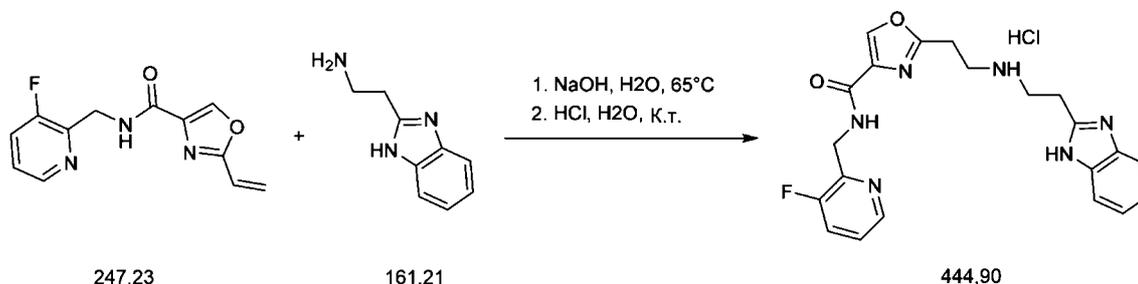
Анализ PXRD: полиморфная форма РМ3 (PXRD-паттерн, согласно Фигуре 3)

5. Способ получения соединения (II) в форме HCl соли (моносоли) – Сокращенный синтез

40

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	количество теор.	количество факт.
	г/моль	ммоль			
RM-3-a	161,20	97,3	1,2	15,68 г	
вода	-	-	-	1300 мл	
NaOH 30%	39,99	8,2	0,1	1,08 г	
IM-3-b	247,23	81,0	1,0	20,00 г	
HCl 20 %				х мл	
DCM		-	-	650 мл	
этанол				160 мл	

Реакция:

5 IM-3-b RM-3-a (II) HCl

Процедура:

Промежуточное соединение IM-3-b может быть получено так, как описано в Примере 3.

10 Соединение RM-3-a (измельченное) суспендируют в воде при 20 – 25°C и добавляют NaOH 30%.

Суспензию перемешивают в течение ≥ 15 мин при 20 – 25°C с образованием раствора. Добавляют промежуточное соединение IM-3-b (измельченное) и суспензию нагревают до 60 – 65°C в течение ≥ 72 ч.

Контроль ИРС посредством ВЭЖХ $\geq 93\%$ преобразования.

15 Эмульсию охлаждают до 20 – 25°C и добавляют 650 мл DCM.

Смесь перемешивают в течение ≥ 10 мин и фазы оставляют на ≥ 1 ч. Водную фазу отбрасывают.

К фазе DCM добавляют 650 мл воды и значение pH регулируют до 5,4 – 5,6 с помощью HCl 20%.

20 Смесь тщательно перемешивают в течение ≥ 10 мин и фазы оставляют на ≥ 1 ч. Фазу DCM отбрасывают.

Водную фазу перемешивают в течение ≥ 16 ч и полученную в результате суспензию фильтруют.

Влажную корку промывают 80 мл EtOH.

25 Отфильтрованную корку сушат при 50°C / < 100 мбар до сухого состояния.

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Выход неочищенного продукта	-		
Конечный выход продукта	36,0 г	21,0 г	59,00%

5 Анализ ВЭЖХ: 88,7% м/м свободного основания, 96,6% м/м

Корр. Выход = 57%

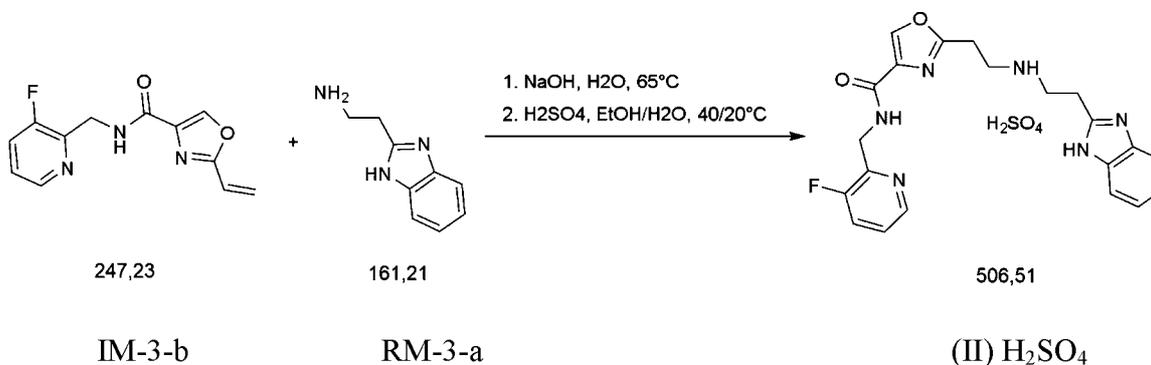
Чистота ВЭЖХ = 98,4% площади

DSC = 173°C

10 Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	количество теор.	количество факт.
	г/моль	ммоль			
RM-3-a	161,20	97,3	1,2	15,68 г	
вода	-	-	-	1300 мл	
NaOH 30%	39,99	8,2	0,1	1,08 г	
IM-3-b	247,23	81,0	1,0	20,00 г	
H ₂ SO ₄ 20 %				х мл	
DCM		-	-	640 мл	
этанол				160 мл	

Реакция:



15

Процедура:

Промежуточное соединение IM-3-b может быть получено так, как описано в Примере 3.

Соединение RM-3-a (измельченное) суспендируют в воде при 20 – 25°C. Добавляют 30% NaOH и смесь перемешивают в течение ≥ 15 мин при 20 – 25°C.

Добавляют промежуточное соединение IM-3-b (измельченное) и смесь нагревают до 60 – 65°C в течение ≥ 72 ч.

5 Преобразование IPC посредством ВЭЖХ $\geq 93\%$.

Смесь охлаждают до 20 – 25°C.

Добавляют 640 мл DCM, перемешивают и фазы оставляют на ≥ 1 ч. Водную фазу отбрасывают.

10 К фазе DCM добавляют 640 мл воды и значение pH регулируют до 3,4 – 3,6 с помощью 20% H₂SO₄. Фазы оставляют на ≥ 1 ч и фазу DCM отбрасывают.

Водную фазу перемешивают и охлаждают до 0 – 5°C в течение ≥ 2 ч.

Суспензию нагревают до 40°C и перемешивают в течение ≥ 16 ч при этой температуре.

Суспензию охлаждают до 0 – 5°C в течение ≥ 4 ч и перемешивают при 0 – 5°C в течение ≥ 1 ч.

15 Суспензию фильтруют и отфильтрованную корку промывают 160 мл этанола.

Отфильтрованную корку сушат при 50°C / < 100 мбар в вакууме до сухого состояния.

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход продукта (порошок от белого до грязно-белого цвета)		24,6 г	60 % некоррект.

20 Анализ ВЭЖХ: 76,4% м/м свободного основания, 94,8% м/м 1:1 соли

Корр. Выход = 57%

Чистота ВЭЖХ: 98,3% площади

H₂O/KF = 2.3%

DSC: 176°C

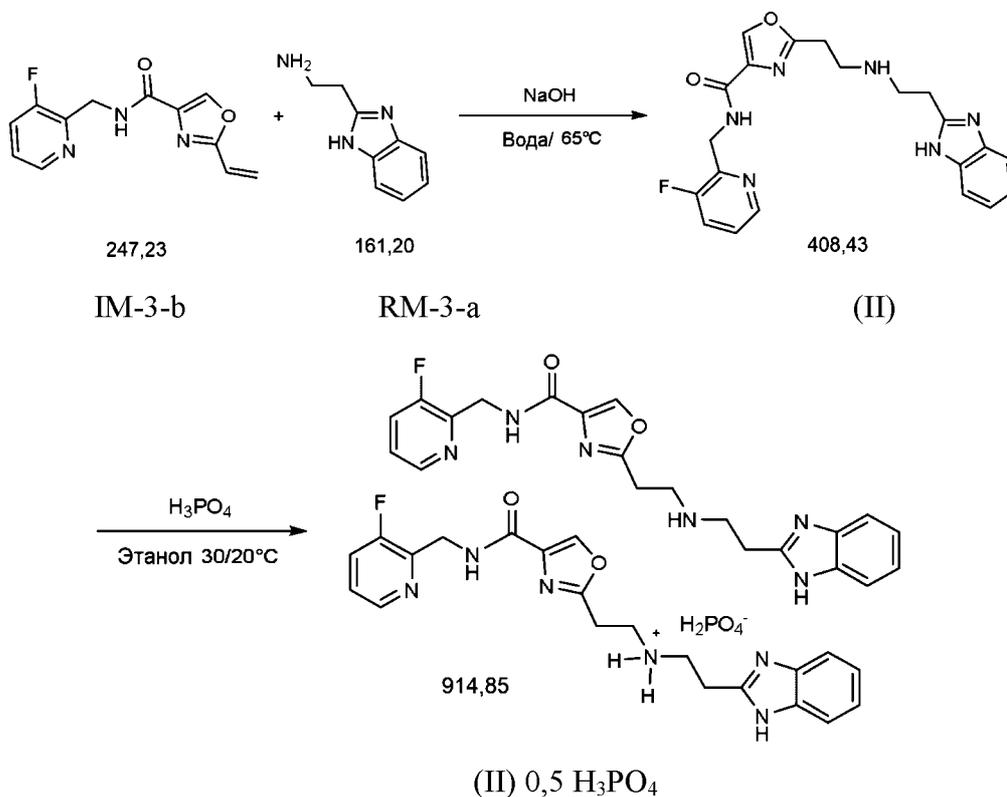
25

7. Способ получения соединения (II) в форме соли 0,5 H₃PO₄ – Сокращенный синтез

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)	Количество (факт.)
	г/моль	ммоль			
RM-3-a	161,2	48,64	1,2	7,84 г	
вода	-	-	-	650 мл	
NaOH 30 %	39,99	4,1	0,1	0,54 г	
IM-3-b	247,23	40,5	1,0	10,00 г	

DCM				4x320 мл	
этилацетат				3x320 мл	
этанол				320, 110, 40 мл	
H ₃ PO ₄ 30%				5 x 6,5 мл	

Реакция:

5

Процедура:

Промежуточное соединение IM-3-b может быть получено так, как описано в Примере 3.

10

Соединение RM-3-a (измельченное) суспендируют в воде при 20 – 25°C и добавляют NaOH 30%.

Суспензию перемешивают в течение ≥ 15 мин при 20 – 25°C с образованием раствора. Добавляют промежуточное соединение IM-3-b (измельченное) и суспензию нагревают до 60 – 65°C в течение ≥ 72 ч.

15

Контроль ИРС посредством ВЭЖХ $\geq 93\%$ преобразования.

Эмульсию охлаждают до 20 – 25°C и добавляют 320 мл DCM.

Значение pH регулируют до 3,9 – 4,1 с помощью HCl 20%.

Смесь тщательно перемешивают в течение ≥ 10 мин и фазы оставляют на ≥ 1 ч.

20

Органическую фазу отбрасывают.

Экстракцию DCM дополнительно повторяют 3 раза.

Значение pH водной фазы регулируют до 9,9 – 10,1 с помощью NaOH 30%.

Добавляют 320 мл EtOAc и смесь тщательно перемешивают в течение ≥ 10 мин. Фазы оставляют на ≥ 1 ч. Водную фазу отбрасывают.

Экстракцию EtOAc дополнительно повторяют 2 раза.

Объединенные органические фазы концентрируют в вакууме при 40°C до 13 мл.

5 Добавляют 320 мл этанола и раствор концентрируют до объема 18 мл.

Добавляют 110 мл этанола и добавляют 5 x 6,5 мл H₃PO₄ 30% при 20 – 25°C. Смесь перемешивают в течение ≥ 24 ч при 28 – 32°C. Суспензию охлаждают до 20 – 25°C в течение ≥ 1 ч и фильтруют. Отфильтрованную корку промывают 40 мл EtOH.

Отфильтрованную корку сушат при 45°C / < 100 мбар до сухого состояния.

10

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Неочищенный выход	-		
Конечный выход продукта	18,5 г	8,8 г	48,00 %

Анализ ВЭЖХ: 85,2% м/м свободного основания, 95,4% м/м 2:1 соли

Корр. Выход = 45,8%

15 Чистота ВЭЖХ = 99,5% площади

R = 3,3%

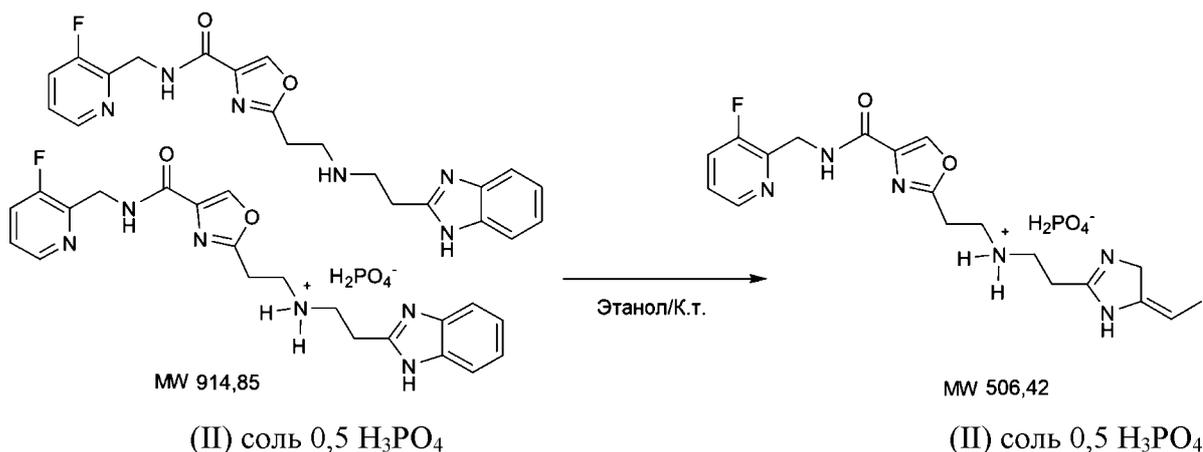
DSC = 253°C

20 **8. Способ получения соединения (II) в форме соли H₃SO₄ – Превращение в соль 1:1**

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)	Количество (факт.)
	г/моль	ммоль			
Соединение (II) Соль 0,5 H ₃ PO ₄	914,85	13,1		12 г	
этанол	-	-	-	180 мл	

Реакция:



Процедура:

- 5 Соль 0,5 H₃PO₄ соединения (II) может быть получена так, как описано в Примере 7.

Соль 0,5 H₃PO₄ соединения (II) суспендируют в этаноле при 20 – 25°C и перемешивают в течение 4 дней при этой температуре.

- 10 Суспензию фильтруют и влажную корку сушат при 45°C / < 100 мбар до сухого состояния.

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Выход неочищенного продукта	-		
Конечный выход продукта	13,3 г	6,6 г	50,00 %

Выход: 6,6 г = 50% относительно свободного основания

- 15 Анализ ВЭЖХ: 78,3% м/м свободного основания, 97% м/м 1:1 соли

Корр. Выход = 48,5%

Чистота ВЭЖХ: 98,7% площади

P = 5,7%

DSC: 182°C

- 20

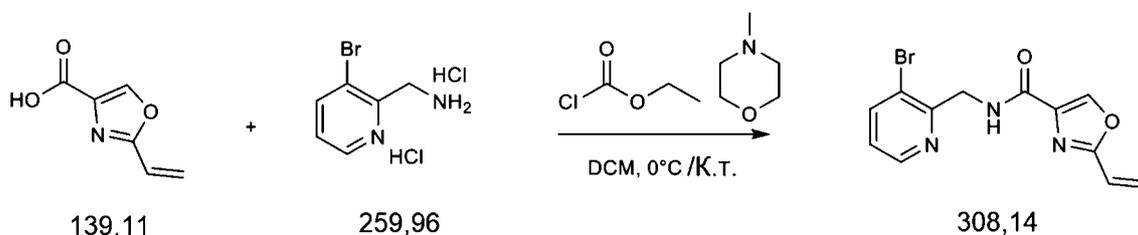
9а. Способ получения промежуточного соединения (IM-3-b')

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)	Количество (факт.)
	г/моль	ммоль			
IM-2-a (2-	139,11	15,4	1,00	2,14 г	2,15 г

винилоксазол-4-карбоновая кислота)					
Дихлорметан	-	-	-	40 мл	40 мл
4-метилморфолин	101,15	58,5	3,80	5,91 г	5,89 г
Этилхлорформат	108,52	19,2	1,25	2,09 г	2,08 г
RM-2-a' (2-(аминометил)-3-бромпиридин)	259,96	19,2	1,25	5,00 г	5,03 г
Жидкий NaCl 10 %	-	-	-	3 x 40 мл	3 x 40 мл

Реакция:



5

IM-2-a

RM-2-a' HCl соль

IM-3-b'

Процедура:

Реакцию проводят в условиях потока N₂.

10 2-винилоксазол-4-карбоксилат (IM-2-a) суспендируют в дихлорметане и охлаждают до -5°C

4-метилморфолин добавляют по каплям таким образом, чтобы температура не превышала 0°C (экзотермически).

15 Этилхлорформат добавляют по каплям таким образом, чтобы температура не превышала 0°C (экзотермически).

Через 20 мин перемешивания добавляют 2-(аминометил)-3-бромпиридин (RM-2-a') таким образом, чтобы температура не превышала 0°C.

Смесь перемешивают в течение ночи при 0°C - 5°C.

Смесь промывают трижды с помощью 10% раствора NaCl.

20 Органические фазы концентрируют при 45°C на роторном испарителе.

К неочищенному продукту добавляют EtOAc / гептан 20:80 (1,7 мл / г), перемешивают при к.т. в течение 4 ч, отфильтровывают, промывают дважды EtOAc/гептаном и сушат при 50°C до получения постоянного веса.

25

Значение рН задают на 4 с помощью HCl 20%.

Водную фазу экстрагируют 4 раза с помощью 110 мл DCM и оставляют на 1 час для отделения фазы, при этом фазы DCM отбрасывают.

5 Значение рН водной фазы регулируют на 10 с помощью NaOH 30%, экстрагируют 3 раза с помощью EtOAc и оставляют на 1 час для отделения фазы, при этом водные фазы отбрасывают.

Фазы EtOAc сушат с помощью сульфата магния, фильтруют и концентрируют на роторном испарителе до сухого состояния.

10 Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Выход	6,56 г	4,18 г	63,72 %

Наблюдается 4,18 г масла коричневого цвета = выход 63,7% теор.

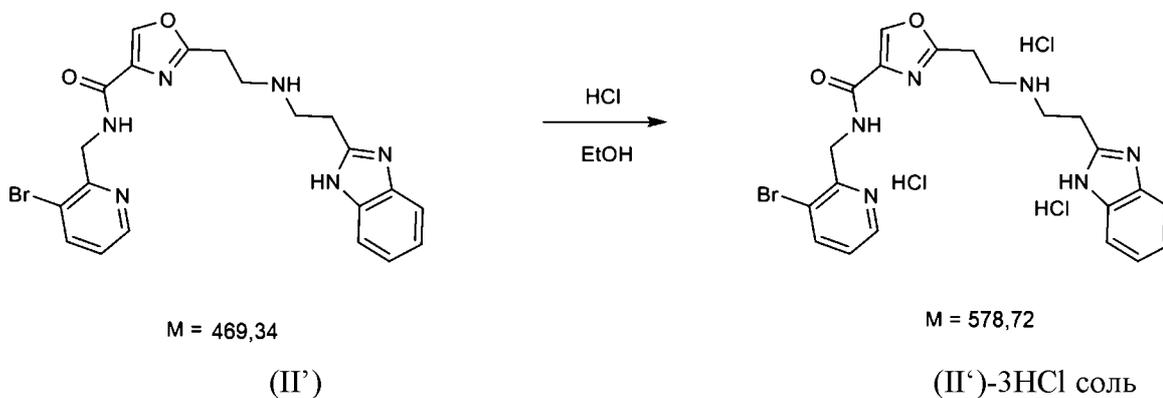
¹H-ЯМР соответствует структуре

15 **9с. Способ получения 3HCl соли соединения (II')**

Химические вещества:

Химическое вещество	Молярная масса		Экв.	Количество (теор.)	Количество (факт.)
	г/моль	ммоль			
Соединение (II')	469,34	8,9	1,0	4,16 г	4,16 г
Этанол	-	-	-	168 мл	170 мл
HCl 32%	36,46	27,9	3,15	3,18 г	3,23 г
Этанол	-	-	-	40 мл	40 мл

Реакция:



Процедура:

Соединение (II') растворяют в этаноле и нагревают до внутренней температуры 40°C.

По каплям добавляют HCl 32%.

Суспензию медленно охлаждают до 0°C.

5 Суспензию перемешивают при 0°C в течение 1 ч.

Суспензию фильтруют, влажную корку промывают этанолом и сушат при 40°C до сухого состояния.

Выход:

	Теоретически	Фактически	Комментарии
Выход	5,13 г	4,02 г	78,36 %

10

Наблюдается 4,02 г твердого вещества белого цвета = выход 78,4% теор.

¹H-ЯМР соответствует структуре

10. ¹H-ЯМР-, PXRD- и DSC-анализ промежуточных соединений и соединений из примеров

15

10.1 ЯМР-анализ

Был проведен ЯМР-анализ промежуточных соединений IM-1-a, IM-2-a и IM-3-b, которые были получены способом, описанным в Примерах 1b, 1a и 3a, соответственно, который дал следующие данные ЯМР.

20

IM-1-a согласно Примеру 1b	¹ H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ- <i>d</i>) δ частей на миллион 8,24 (s, 1 H) 6,64 (dd, <i>J</i> =17,6, 11,3 Гц, 1 H) 6,29 (dd, <i>J</i> =17,7, 0,8 Гц, 1 H) 5,76 (dd, <i>J</i> =11,4, 0,8 Гц, 1 H) 4,40 (q, <i>J</i> =7,3 Гц, 2 H) 1,39 (t, <i>J</i> =7,2 Гц, 3 H)
IM-1-a согласно Примеру 1c	¹ H ЯМР (400 МГц, CDCl ₃): δ 8,14 (s, 1H), 6,63 – 6,56 (m, 1H), 6,27 – 6,22 (m, 1H), 5,71 – 5,68 (m, 1H), 4,36 (q, <i>J</i> = 6,8 Гц, 2H), 1,35 (t, <i>J</i> = 7,20 Гц, 3H)
IM-2-a	¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ частей на миллион 8,73 (s, 2 H) 8,46 (s, 1 H, внутренний стандарт=1,2,4,5-тетрахлор-3-нитробензол) 6,71 (dd, <i>J</i> =17,5, 11,2 Гц, 1 H) 6,22 (dd, <i>J</i> =17,7, 1,0 Гц, 2 H) 5,82 (dd, <i>J</i> =11,2, 0,8 Гц, 2 H)
IM-3-b	¹ H ЯМР (400 МГц, ДМСО- <i>d</i> ₆) δ частей на миллион 8,57 - 8,67 (m, 2 H) 8,45 (s, 1 H) 8,41 (dt, <i>J</i> =4,7, 1,3 Гц, 1 H) 7,71 (ddd, <i>J</i> =10,2, 8,6, 1,3 Гц, 1 H) 7,42 (dt, <i>J</i> =8,5, 4,4 Гц, 1 H) 6,72 (dd, <i>J</i> =17,6, 11,3 Гц, 1 H) 6,24 (dd, <i>J</i> =17,7, 0,8 Гц, 1 H) 5,83 (dd, <i>J</i> =11,4, 0,8 Гц, 1 H) 4,67 (dd, <i>J</i> =5,6, 1,5 Гц, 2 H)

Был проведен ЯМР-анализ соединений (II) из примеров в форме 3HCl соли (полиморфная форма PM1, PM2 и PM2), 1HCl соли, соли H₂SO₄, соли 0,5H₃PO₄ и соли

H_3PO_4 , которые были получены способом, описанным в Примерах 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно, который дал следующие данные ЯМР.

Пример 4 PM1	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ частей на миллион 8,86 (t, $J=5,7$ Гц, 1 H) 8,61 (s, 1 H) 8,45 (d, $J=4,8$ Гц, 1 H) 7,86 (ddd, $J=9,8, 8,6, 1,1$ Гц, 1 H) 7,75 - 7,82 (m, 2 H) 7,44 - 7,61 (m, 3 H) 4,66 (br d, $J=5,1$ Гц, 2 H) 3,77 (s, 4 H) 3,49 (br t, $J=6,7$ Гц, 2 H) 3,38 (br t, $J=7,1$ Гц, 2 H) 3,01 (s, 35 H; внутренний стандарт=диметилсульфон)
Пример 5	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ частей на миллион 8,66 (t, $J=5,7$ Гц, 1 H) 8,63 (s, 1 H) 8,37 (dt, $J=4,7, 1,3$ Гц, 1 H) 7,70 (ddd, $J=10,2, 8,6, 1,3$ Гц, 1 H) 7,46 - 7,62 (m, 2 H) 7,40 (dt, $J=8,6, 4,3$ Гц, 1 H) 7,01 - 7,28 (m, 2 H) 4,62 (dd, $J=5,8, 1,3$ Гц, 2 H) 3,08 - 3,67 (m, 12 H) 1,06 (t, $J=7,1$ Гц, 1 H)
Пример 6	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ частей на миллион 10,00 (br s, 1 H) 8,64 (s, 1 H) 8,58 (t, $J=5,7$ Гц, 1 H) 8,36 (dt, $J=4,6, 1,5$ Гц, 1 H) 7,70 (ddd, $J=10,2, 8,6, 1,3$ Гц, 1 H) 7,46 - 7,62 (m, 2 H) 7,41 (dt, $J=8,5, 4,4$ Гц, 1 H) 7,06 - 7,24 (m, 2 H) 4,62 (dd, $J=5,7, 1,4$ Гц, 2 H) 3,39 - 3,70 (m, 4 H) 3,27 (dt, $J=10,3, 7,0$ Гц, 4 H)
Пример 7	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ частей на миллион 8,58 (t, $J=5,7$ Гц, 1 H) 8,53 (s, 1 H) 8,37 (dt, $J=4,8, 1,4$ Гц, 1 H) 7,70 (ddd, $J=10,0, 8,5, 1,3$ Гц, 1 H) 7,43 - 7,56 (m, 2 H) 7,33 - 7,43 (m, 1 H) 7,05 - 7,18 (m, 2 H) 4,61 (dd, $J=5,6, 1,3$ Гц, 2 H) 2,98 - 3,25 (m, 8 H)
Пример 8	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ частей на миллион 8,59 (br t, $J=5,7$ Гц, 1 H) 8,55 (s, 1 H) 8,37 (dt, $J=4,7, 1,3$ Гц, 1 H) 7,69 (ddd, $J=10,0, 8,5, 1,3$ Гц, 1 H) 7,43 - 7,56 (m, 2 H) 7,40 (dt, $J=8,5, 4,4$ Гц, 1 H) 7,00 - 7,20 (m, 2 H) 4,61 (dd, $J=5,6, 1,0$ Гц, 2 H) 3,05 - 3,35 (m, 8 H)

5 Был проведен ЯМР-анализ промежуточного соединения IM-3-b', соединения (II') и ЗНСI соли соединения (II'), которые были получены способом, описанным в Примерах 9a, 9b и 9c, соответственно, который дал следующие данные ЯМР.

IM-3-b' согласно Примеру 9a	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ = 8,66 (s, 1H), 8,63 - 8,48 (m, 2H), 8,11 (dd, $J = 1,5, 8,1$ Гц, 1H), 7,31 (dd, $J = 4,7, 8,0$ Гц, 1H), 6,74 (dd, $J = 11,3, 17,6$ Гц, 1H), 6,24 (dd, $J = 0,8, 17,7$ Гц, 1H), 5,84 (dd, $J = 0,8, 11,2$ Гц, 1H), 4,63 (d, $J = 5,3$ Гц, 2H)
(II') согласно Примеру 9b	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ = 8,56 (dd, $J = 1,4, 4,7$ Гц, 2H), 8,54 (s, 2H), 8,51 (t, $J = 5,5$ Гц, 2H), 8,45 (s, 3H), 8,09 (dd, $J = 1,4, 8,0$ Гц, 2H), 7,50 - 7,41 (m, 4H), 7,30 (dd, $J = 4,7, 8,0$ Гц, 2H), 7,14 - 7,06 (m, 4H), 4,62 (d, $J = 5,3$ Гц, 4H), 3,07 - 2,92 (m, 16H)
(II') ЗНСI согласно Примеру 9c	^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ = 16,16 - 14,70 (m, 1H), 10,56 - 9,46 (m, 2H), 8,71 (t, $J = 5,7$ Гц, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,56 (dd, $J = 1,4, 4,7$ Гц, 1H), 8,12 (dd, $J = 1,3, 8,1$ Гц, 1H), 7,82 - 7,76 (m, 2H), 7,58 - 7,51 (m, 2H), 7,32 (dd, $J = 4,7, 8,0$ Гц, 1H), 4,60 (d, $J = 5,6$ Гц, 2H), 3,54 - 3,44 (m, 2H), 3,44 - 3,35 (m, 2H)

10.2 PXRD-анализ

Далее был проведен PXRD-анализ соединения (II) из примера в форме $ZnCl$ соли (PM1, PM2 и PM3), соли H_2SO_4 и соли H_3PO_4 , которые были получены способом, описанным в Примерах 4, 6 и 8, соответственно, который дал спектры PXRD, показанные на Фигурах 1-5.

Способ

Подготовка образца и измерение:

- 10 - Подготовка образца: От 10 до 20 мг образца помещали между двумя ацетатными пленками в держателе образца Stoe для пропускания; образец вращали в ходе измерения
- Stoe Stadi P (G.52.SYS.S072); Детектор Mythen1K; излучение Cu-K α 1; стандартные условия измерения: пропускание; мощность трубки 40 кВ и 40 мА; изогнутый монохроматор Ge;
- 15 - размер шага $0,02^\circ 2\theta$, время шага 48 с, диапазон сканирования $1,5-50,5^\circ 2\theta$; режим детектора: шаговое сканирование; шаг детектора $1^\circ 2\theta$;

Оценка данных:

- 20 анализ значения d выполняли с помощью программы EVA от Bruker версии 14, 0, 0, 0
 - фон вычитали
 - перечисляли только строчки до $35^\circ 2\theta$
 - вычисление относительной интенсивности с помощью формулы в Excel

25 Условия PXRD – $ZnCl$ соль соединения (II) (PM1, PM2 и PM3 на Фиг. 1, 2 и 3)

Геометрия	Пропускание; диапазон угла, охватываемый детектором; $12,59^\circ 2\theta =$ внутренняя разрешающая способность $0,01^\circ 2\theta$
Модель	STOE Stadi P с детектором MYTHEN1K
Инструмент/Программное обеспечение	G.52.SYS.S072 / WinXPOW версии 3.0.1.13 GMP
Излучение	Cu 40 кВ/40 мА; K α 1 с помощью изогнутого кристаллического монохроматора Ge; фактическая интенсивность (%relPQ): 104
WL1 =	1,540598
WL2 =	1,54443
ОТНОШЕНИЕ WL =	0
Диапазоны	sf1, DS:1.00°, 12 с; 1,5-50,5°_13 м
Привод =	СПАРЕННЫЙ
ВРЕМЯ ШАГА=	12
РАЗМЕР ШАГА=	0,02
ШАГИ	2450
ТЕТА =	0,75

2Тета =	1,5
РАСХОЖДЕНИЕ =	0,09
Вращение (об/с)	1
Шаг детектора (°2Т)	1
Условия окружающей среды, воздух	23 °С; 15% относительной влажности
у-сдвиг =	0
f =	1

Полиморф РМ1:

Угол 2-Тета °	значение d ангстрем	Интенсивность	Относительная интенсивность %
3,89	22,70	s	36,5
7,96	11,10	m	24,4
10,01	8,83	w	12
12,00	7,37	w	12,6
14,32	6,18	w	9,8
16,53	5,36	s	32,5
19,09	4,65	m	15
22,20	4,00	w	12
24,18	3,68	m	20,1
26,10	3,41	m	15,4
27,69	3,22	w	13,6

Полиморф РМ2:

Угол 2-Тета °	значение d ангстрем	Интенсивность	Относительная интенсивность %
16,96	5,23	vs	100
25,28	3,52	vs	96,5
11,73	7,54	vs	83,2
28,32	3,15	s	65,9
25,48	3,49	s	63,6
20,10	4,41	s	62
26,20	3,40	s	57,4
17,63	5,03	s	54
24,07	3,69	s	52,9
17,18	5,16	s	50,8
19,03	4,66	s	50,5
22,52	3,94	s	50,1
19,73	4,50	s	47,6
23,19	3,83	s	45,5
21,25	4,18	s	44,8
23,72	3,75	s	44,3
18,28	4,85	s	44
21,55	4,12	s	37,5

20,74	4,28	s	36,1
28,89	3,09	s	33,2
24,74	3,60	s	31,3
30,32	2,95	m	27,8
29,21	3,05	m	27
26,65	3,34	m	25,5
29,68	3,01	m	25,1
27,39	3,25	m	24,7
35,16	2,55	m	24,4
35,70	2,51	m	22,9
34,82	2,57	m	21,5
36,64	2,45	m	18,5
37,16	2,42	m	18,1
37,68	2,39	m	16,8
39,01	2,31	m	16,6
33,56	2,67	m	15,6
41,22	2,19	w	13,5
39,99	2,25	w	12,8

Полиморф РМЗ:

Угол 2-Тета °	значение d ангстрем	Интенсивность	Относительная интенсивность %
14,75	6,00	vs	100
10,28	8,60	vs	93,9
16,97	5,22	vs	90,1
26,55	3,35	vs	75,2
18,05	4,91	vs	74,5
22,10	4,02	s	69,2
27,13	3,28	s	68,1
26,11	3,41	s	60,2
28,87	3,09	s	60,1
19,71	4,50	s	57,4
20,74	4,28	s	55,2
5,13	17,21	s	53,9
26,28	3,39	s	53,9
21,68	4,10	s	52,9
27,71	3,22	s	51,3
25,14	3,54	s	50,8
17,84	4,97	s	50,2
22,55	3,94	s	50,2
23,01	3,86	s	49,4
19,29	4,60	s	49
28,22	3,16	s	47,3

6,39	13,82	s	44,3
15,49	5,72	s	42,9
24,54	3,62	s	37,9
25,50	3,49	s	37,3
10,96	8,07	s	36,3
18,94	4,68	s	36,2
31,54	2,83	s	34,8
23,24	3,83	s	34,4
12,81	6,91	s	33,3
31,95	2,80	s	32,8
29,75	3,00	s	31,7
24,79	3,59	m	28,5
28,60	3,12	m	25,2
35,62	2,52	m	24,9
25,81	3,45	m	24,5
34,68	2,58	m	20,4
38,94	2,31	m	19,4
36,58	2,45	m	19,2
33,86	2,64	m	18,8
38,71	2,32	m	18,8
30,19	2,96	m	17,7
30,94	2,89	m	16,9
31,24	2,86	m	16,9
33,28	2,69	m	16,8
38,43	2,34	m	15,9
33,47	2,67	m	15,3
40,87	2,21	m	15,2
39,51	2,28	w	14,7
30,52	2,93	w	14,3
35,39	2,53	w	13,9
32,66	2,74	w	12,9
38,07	2,36	w	12,9
40,53	2,22	w	11,5
40,04	2,25	w	10,7

Условия PXRD –Соединение (II) соль H_2SO_4 (Фиг. 4)

Геометрия	Пропускание; диапазон угла, охватываемый детектором: $12,59^\circ 2\theta =$ внутренняя разрешающая способность $0,01^\circ 2\theta$
Модель	STOE Stadi P с детектором MYTHEN1K
Инструмент/Программное обеспечение	G.52.SYS.S072 / WinXPow версии 3.0.1.13 GMP
Излучение	Cu 40 кВ/40 мА; Kalphal с помощью изогнутого кристаллического монохроматора Ge; фактическая интенсивность (%relPQ): 86
WL1 =	1,540598
WL2 =	1,54443
ОТНОШЕНИЕ WL =	0
Диапазоны	sf1, DS:1°, 12 с; 1,500-50,480° _14 м
Привод =	СПАРЕННЫЙ
ВРЕМЯ ШАГА=	12
РАЗМЕР ШАГА=	0,02
ШАГИ	2450
ТЕТА =	0,75
2ТЕТА =	1,5
РАСХОЖДЕНИЕ =	0,09
Вращение (об/с)	1
Шаг детектора ($^\circ 2\theta$)	1
Условия окружающей среды, воздух	

Угол 2-Тета $^\circ$	значение d ангстрем	Интенсивность	Относительная интенсивность %
4,44	19,91	vs	74,6
4,81	18,37	vs	100
5,57	15,86	s	42,9
6,05	14,59	s	41,4
13,17	6,72	s	39,6
13,98	6,33	s	36,2
14,87	5,95	s	38,4
15,58	5,68	s	38,7
16,07	5,51	s	37,1
16,75	5,29	s	55,4
18,12	4,89	s	62
18,45	4,81	s	57,7
19,62	4,52	s	33,9
21,11	4,21	s	38,5
22,82	3,89	s	33,2
25,50	3,49	vs	84,1
26,21	3,40	s	47,9
27,43	3,25	s	33
31,13	2,87	m	22,5

Условия PXRD –Соединение (II) соль H_3PO_4 (Фиг. 5)

Геометрия	Пропускание; диапазон угла, охватываемый детектором: 12,59° 2 θ = внутренняя разрешающая способность 0,01° 2 θ
Модель	STOE Stadi P с детектором MYTHEN1K
Инструмент/Программное обеспечение	G.52.SYS.S072 / WinXPOW версии 3.0.1.13 GMP
Излучение	Cu 40 кВ/40 мА; Kalphal с помощью изогнутого кристаллического монохроматора Ge; фактическая интенсивность (%relPQ): 95
WL1 =	1,540598
WL2 =	1,54443
ОТНОШЕНИЕ WL =	0
Диапазоны	sf1, DS:1°, 12 с; 1,5-50,5° _14 м
Привод =	СПАРЕННЫЙ
ВРЕМЯ ШАГА=	12
РАЗМЕР ШАГА=	0,02
ШАГИ	2450
ТЕТА =	0,75
2ТЕТА =	1,5
РАСХОЖДЕНИЕ =	0,09
Вращение (об/с)	1
Шаг детектора (°2 θ)	1
Условия окружающей среды, воздух	

Угол / 2-Тета °	значение ангстрем	d /	Интенсивность	Относительная интенсивность [%]
4,87	18,14	m		28,1
11,26	7,85	m		21,9
12,01	7,37	s		31
13,16	6,72	s		42,5
14,72	6,01	vs		74,3
15,49	5,72	vs		74,7
16,02	5,53	m		23,4
16,47	5,38	vs		83,7
16,97	5,22	s		43,7
17,44	5,08	s		66,4
18,42	4,81	vs		82,7
19,65	4,51	s		35,2
20,04	4,43	m		18,9
20,45	4,34	s		58,7
21,65	4,10	m		26,7
22,09	4,02	s		35,5
22,62	3,93	m		20,8
23,31	3,81	m		16
24,10	3,69	m		21,7
25,06	3,55	s		37,7
25,41	3,50	s		52,5

26,13	3,41	vs	100
26,89	3,31	s	41,6
27,42	3,25	w	14
27,89	3,20	w	11,1
28,66	3,11	m	25,9
29,09	3,07	m	19,6
29,66	3,01	w	9
30,62	2,92	w	8,1
30,95	2,89	w	9,9
31,28	2,86	w	8,8
31,57	2,83	w	10,7
33,32	2,69	w	11
33,77	2,65	w	8,4
34,35	2,61	w	7,8
35,00	2,56	w	12
35,52	2,53	w	13,5
36,81	2,44	w	9,7
37,32	2,41	w	6
38,79	2,32	w	6,2
39,14	2,30	w	6,4
40,89	2,21	w	7,2

10.3 Измерение DSC

Дифференцирующую сканирующую калориметрию проводят в герметичном промывочном ковше со скоростью нагревания 10 °С/мин.

5

10.4 Определение идентичности, профилей примесей и степени чистоты с помощью ВЭЖХ

Идентичность и анализ основания соединений по настоящему изобретению и его примесей определяют посредством качественного и количественного анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с детектированием диодной матрицей, используя внутрилабораторный метод на основе Ph. Eur. 2.2.29.

10

Идентичность синтезированных соединений подтверждают путем сравнения со значениями времени удержания и спектрами соответствующих эталонных веществ. Анализ вычисляют исходя из внешней калибровочной кривой испытуемого соединения в форме основы для формы соли и ее примесей.

15

Процедура

20 Устройство

ВЭЖХ с обеспечением насоса, автоматического дозатора, колонной печи и детектора на диодной матрице, а также аналитического баланса (Категория 1), пипеток

(например, Gilson, Rainin), мерных колб (10, 25 и 50 мл), мембранного фильтра (0,2 мкм)

Реагенты

- 5 - метанол (ранга ВЭЖХ), Sigma (или эквивалент)
 - трифторуксусная кислота (TFA) для ВЭЖХ 100%, Sigma (или эквивалент)

Подвижная фаза:

- A: вода / метанол (95+5 ОБ/ОБ; 0,1% TFA)
 10 B: метанол / вода (95+5 ОБ/ОБ; 0,1% TFA)

Подвижная фаза А: вода / метанол (95+5 ОБ/ОБ; 0,1% TFA)

- Разводят 100 мл метанола водой R до 2 литров. Затем добавляют 2,0 мл TFA, тщательно перемешивают и дегазируют в ультразвуковой ванне.
 15

Подвижная фаза В: метанол / вода (95+5 ОБ/ОБ; 0,1% TFA)

- Разводят 50 мл воды R метанолом до 1 литра. Затем добавляют 1,0 мл TFA, тщательно перемешивают и дегазируют в ультразвуковой ванне.

- 20 **Исходные растворы А и В (1000 мг/л):** Получают два исходных раствора, каждый из которых содержит 1000 мг/л соединения для испытания, путем разведения 50 мг в 50 мл подвижной фазы А.

- 25 **Стандартные растворы А и В (40 мг/л):** Разводят каждый из исходных растворов 1:25 подвижной фазой А. Фильтруют образцы через фильтра 0,2 мкм в стеклянный сосуд для ВЭЖХ.

Исходный раствор SST

- Отвешивают 10 мг эталонных примесей, например, промежуточных соединений, которые, как ожидается, являются результатом способа, в мерную колбу 10 мл, добавляют 5 мл метанола и разводят водой.
 30

Раствор примесей С (1 мг/л)

- Вводят 100 мкл исходного раствора А с помощью пипетки в мерную колбу 100 мл и разводят подвижной фазой А. Фильтруют образцы через фильтр 0,2 мкм в стеклянный сосуд для ВЭЖХ.
 35

Раствор примесей D/ стандартный раствор SST (10 мг/л)

- Вводят 100 мкл исходного раствора В и 1000 мкл исходного раствора SST с помощью пипетки в мерную колбу 100 мл и разводят подвижной фазой А. Фильтруют образцы через фильтр 0,2 мкм в стеклянный сосуд для ВЭЖХ.
 40

Хроматографическая система

- Жидкостный хроматограф снабжен колоночным отсеком с поддерживаемой контрольной температурой $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, детектором на диодной матрице (200 – 400 нм) и колонкой 4,6 мм x 150 мм C18 (например, Ascentis Express C18, 2,7 мкм). Скорость потока составляет 1,0 мл/мин.

Градиент ЖХ:

время [мин]	А [%]	В [%]
-3,000	100	0
0,000	100	0
1,000	100	0
8,000	65	35
20,000	65	35
20,100	0	100
25,000	0	100

- 10 Время выполнения: 20,0 мин
Длина УФ волны: 254 нм
вводимый объем: 10 мкл для образцов, различные объемы для стандартных растворов

15 Проверка пригодности системы (SST) и проверка контроля качества (QC)

- Разумные введения стандартного раствора SST свидетельствуют от пригодности хроматографической системы, если RSD и значения времени удержания площадей пика испытуемого соединения составляют $\leq 2\%$, соответствующая разрешающая способность испытуемых соединений составляет $\geq 1,5$, а коэффициент асимметрии пика испытуемого соединения находится в диапазоне 0,8 – 1,5.

Вводят стандартный раствор А шесть раз в начале последовательности (SST) и дважды в конце последовательности (QC). Последовательность может использоваться только в том случае, если удовлетворены указанные выше требования.

25

Стандартная кривая

Стандартная кривая для испытуемого соединения (анализ) может быть получена, например, путем введения 5,0 мкл, 7,5 мкл и 10,0 мкл стандартного раствора А, а также 12,5 мкл и 15,0 мкл стандартного раствора В.

- 30 Стандартная кривая для примесей испытуемого соединения может быть получена, например, путем введения 5,0 мкл и 10,0 мкл раствора примесей С, а также 5,0 мкл, 10,0 мкл и 15,0 мкл раствора примесей D.

Коэффициент регрессии для обеих стандартных кривых должен составлять $\geq 0,9990$.

Подготовка образца

5

Процедура - примеси

Аккуратно отвешивают приблизительно 50 мг соединения для испытания в форме его соли в колбу 50 мл и составляют с меткой подвижной фазы А. Дважды готовят раствор образца. Фильтруют раствор через мембранный фильтр 0,2 мкм и вводят 10 мкл.

10

Процедура - анализ

Используют оба раствора, приготовленные в разделе «Примеси» и разводят подвижной фазой А в соотношении 1:25. Фильтруют раствор через мембранный фильтр 0,2 мкм и вводят 10 мкл.

15

Вычисление

Качественное определение

Время удержания испытуемого соединения не должно отклоняться более, чем на 0,3 мин от пика стандартного раствора А. Спектр, полученный для испытуемого соединения в образце, коррелирует с эталонным спектром испытуемого соединения в стандартном растворе А. Определяют коэффициент совпадения с библиотекой. Последний должен составлять ≥ 990 .

20

Время удержания любой примеси испытуемого соединения не должно отклоняться более, чем на 0,1 мин от соответствующего эталонного вещества. Спектр, полученный для примеси в образце, коррелирует с эталонным спектром соответствующей примеси в растворе SST. Определяют коэффициент совпадения с библиотекой. Последний должен составлять ≥ 990 .

25

Количественное определение – анализ

Концентрации стандартных растворов, выражаемые количеством испытуемого соединения в форме его основы (мкг), наносят на график зависимости от площади пика, а также берут отрезок (а) и наклон (b). Полученный коэффициент корреляции не должен составлять менее, чем 0,999. Вычисляют количество основы испытуемого соединения, используя приведенную ниже формулу:

35

$$\text{Основа испытуемого соединения [\% (м/м)]} = \frac{(y-a) \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{b \cdot V_3 \cdot E}$$

- y площадь пика (испытуемого соединения) образца
- a отрезок стандартной кривой
- b наклон стандартной кривой (площадь/мкг)

- V_1 разбавление (например, 50 мл)
 V_2 объем коэффициента разбавления образца (например, 1,0 мл/25 мл = 25)
 V_3 вводимый объем (например, 10 мкл)
 E взвешенное количество образца (мг)
 5 100 коэффициент для вычисления % [м/м]

Количественное определение - примеси

Количественное определение примесей в виде % площади

10

Все пики на хроматограмме образца при 254 нм интегрированы. Пики, относящиеся к пустому месту, не рассматривают. Определяют и фиксируют процент всех примесей и отдельно каждой примеси $s \geq 0,05\%$ площади.

15 Количественное определение примесей в виде % м/м

Концентрации стандартных растворов, выражаемые количеством испытуемого соединения в форме его основы (мкг), наносят на график зависимости от площади пика, а также берут отрезок (a) и наклон (b). Полученный коэффициент корреляции не должен составлять менее, чем 0,999. Количество каждой примеси вычисляют с учетом коэффициента отклика, используя приведенную ниже формулу:

20

$$\text{примесь [\% (м/м)]} = \frac{(y - a) \cdot V_1 \cdot 100}{b \cdot V_2 \cdot E \cdot RF}$$

y площадь пика (испытуемого соединения) образца

a отрезок стандартной кривой

b наклон стандартной кривой (площадь/мкг)

25

V_1 разбавление (например, 50 мл)

V_2 вводимый объем (например, 10 мкл)

E взвешенное количество образца (мг)

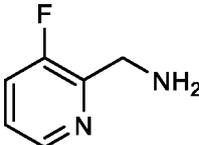
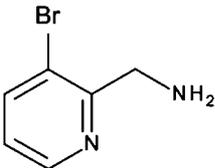
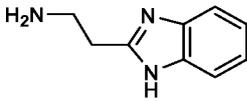
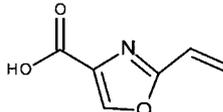
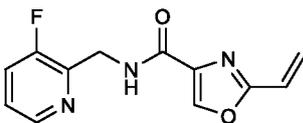
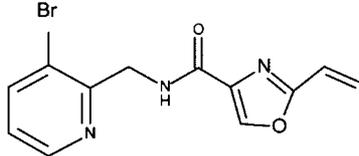
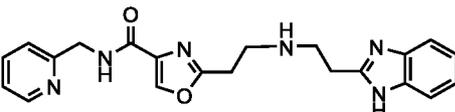
100 коэффициент для вычисления % [м/м]

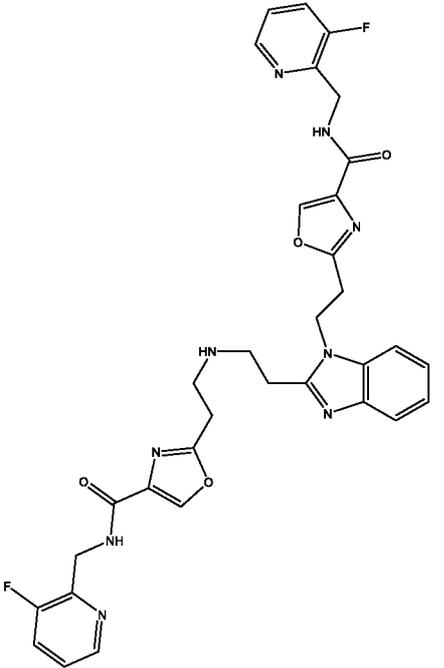
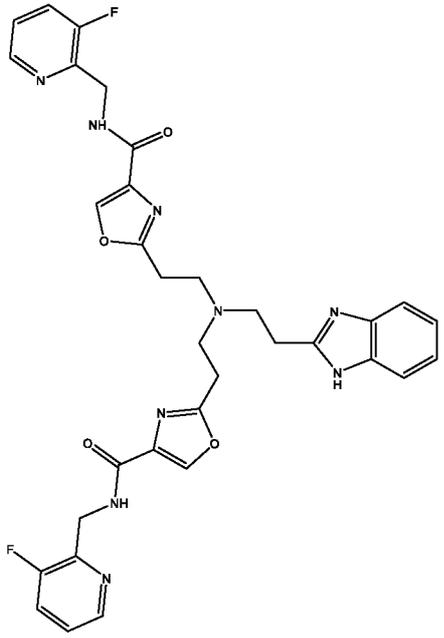
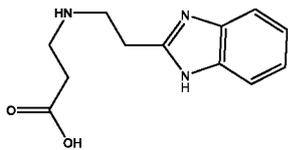
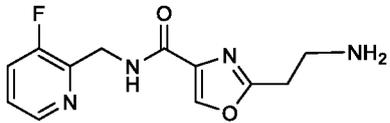
RF Коэффициент отклика в зависимости от испытуемого соединения

30

Приведенный выше способ используют для определения идентичности и анализа соединения (II) в форме $ZnCl$ соли (полиморфа PM1), полученного способом из Примера 4 (вариант способа 1 и 2).

35

Аббревиатура	Наименование	Общая формула/ Молекулярная масса	структура
RM-2-a = RM2 = SP6	(3-фторпиридин-2-ил)метанамин	$C_6H_7FN_2$ Mw: 126,13 г/моль	
RM-2-a'	2-(аминометил)-3-бромпиридин	Mw: 259,96 г/моль	
RM-3-a = RM3	2-(1H-бензо[d]имидазол-2-ил)этан-1-амин	$C_9H_{11}N_3$ Mw: 161,21 г/моль	
IM-2-a	2-винилоксазол-4-карбоновая кислота	Mw: 139,11 г/моль	
IM-3-b =IM2	N-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2-винилоксазол-4-карбоксамид	$C_{12}H_{10}FN_3O_2$ Mw: 247,23 г/моль	
IM-3-b'	N-((3-бромпиридин-2-ил)метил)-2-винилоксазол-4-карбоксамид	$C_{12}H_{10}BrN_3O_2$ Mw: 308,14 г/моль	
SP1	2-(2-((2-(1H-бензо[d]имидазол-2-ил)этил)амино)этил)-N-(пиридин-2-илметил)оксазол-4-карбоксамид	$C_{21}H_{22}N_6O_2$ Mw: 390,45 г/моль	

Аббревиатура	Наименование	Общая формула/ Молекулярная масса	структура
SP3	N-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2-(2-((2-(1-(2-(4-((3-фторпиридин-2-ил)метил)карбамоил)оксазол-2-ил)этил)-1H-бензо[d]имидазол-2-ил)этил)амино)этил)оксазол-4-карбоксамид	C ₃₃ H ₃₁ F ₂ N ₉ O ₄ Mw: 655,67 г/моль	
SP4	2,2'-(((2-(1H-бензо[d]имидазол-2-ил)этил)азанедиил)бис(этан-2,1-диил))бис(N-((3-фторпиридин-2-ил)метил)оксазол-4-карбоксамид)	C ₃₃ H ₃₁ F ₂ N ₉ O ₄ Mw: 655,67 г/моль	
SP5	3-((2-(1H-бензо[d]имидазол-2-ил)этил)амино)пропановая кислота	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ Mw: 233,27 г/моль	
SP7	2-(2-аминоэтил)-N-((3-фторпиридин-2-ил)метил)оксазол-4-карбоксамид	C ₁₂ H ₁₃ FN ₄ O ₂ Mw: 264,26 г/моль	

Эталонные стандарты	Информация	Хранение
3HCl соединения (II) (VIT-2763)	Содержание основано на свободном основании с содержанием 75,3%	к.т.
RM-2-a = RM2 = SP6	см. коэффициент отклика, 6,4	+2 - +8 °C
RM-3-a = RM3	см. коэффициент отклика, 6,4	+2 - +8 °C
IM-3-b = IM2	-	к.т.
SP1	см. коэффициент отклика, 6,4	к.т.
SP3	см. коэффициент отклика, 6,4	к.т.
SP4	см. коэффициент отклика, 6,4	к.т.
SP5	см. коэффициент отклика, 6,4	к.т.
SP7	см. коэффициент отклика, 6,4	к.т.

Примеси	Коэффициент отклика
RM-2-a = RM2 = SP6	1,140
RM-3-a = RM3	1,269
SP1	1,300
SP3	0,916
SP4	0,884
SP5	0,889
SP7	0,748

Результаты:

Вещество	Время удержания [мин]
RM-2-a = RM2 = SP6	2,30
RM-3-a = RM3	3,71
SP5	4,05
SP7	5,34
SP1	5,81
3HCl соединения (II) (VIT-2763)	8,33
IM-3-b = IM2	10,84

SP3	12,08
SP4	13,97

На Фигуре 6 показана хроматограмма ВЭЖХ профиля примесей соединения (II) в форме ЗНCl соли (полиморф РМ1 / VIT-2763), полученной способом из Примера 4, с последующей экстракцией растворителем (вариант способа 1).

5

№	Отн. ВУ [VIT-2763]	Наименование пика	Высота МЭП	Площадь МЭП*мин	Наименование в библиотеке	Совпадение в библиотеке	Отн. площадь %
1	0.48	RM3	0.593	0.05964	SP5	946.91	0.06
2	1.00	VIT-2763	950.122	104.71023	н.п.	н.п.	99.75
3	1.27	неизвестно	0.593	0.08638	VIT-2763	809.42	0.08
4	1.48	SP3	0.640	0.11859	SP3	852.54	0.11

На Фигуре 7 показана хроматограмма ВЭЖХ профиля примесей соединения (II) в форме ЗНCl соли (полиморф РМ1 / VIT-2763), полученной способом из Примера 4, с последующей сепарацией масла (вариант способа 2).

10

№	Отн. ВУ [VIT-2763]	Наименование пика	Высота МЭП	Площадь МЭП*мин	Наименование в библиотеке	Совпадение в библиотеке	Отн. площадь %
1	0.70	SP1	1.287	0.06175	SP1	956.88	0.058
2	1.00	VIT-2763	1101.520	107.10545	н.п.	н.п.	99.861
3	1.27	SP2	1.575	0.08782	VIT-2763	949.55	0.082

Сравнительный пример – пример соединения 127 из WO2017068090A1:

На Фигуре 8 показана хроматограмма ВЭЖХ профиля примесей соединения (II) в форме ЗНCl соли (полиморф РМ1 / VIT-2763), которое может быть получено способом, описанным в WO2017068090A1 (получение примера соединения № 127).

15

№	Отн. ВУ [VIT-2763]	Наименование пика	Высота МЭП	Площадь МЭП*мин	Наименование в библиотеке	Совпадение в библиотеке	Отн. площадь %
1	0.27	RM2	0.649	0.05274	н.п.	н.п.	0.05
2	0.48	RM3	0.714	0.06292	SP5	963.18	0.06
3	0.52	SP5	1.029	0.08730	SP5	984.98	0.08
4	0.59	неизвестно	8.853	0.65997	VIT-2763	948.21	0.63
5	0.65	SP7	3.709	0.29642	SP7	993.82	0.28
6	0.83	OH	7.957	0.59178	VIT-2763	942.23	0.57
7	0.94	неизвестно	1.012	0.07481	VIT-2763	914.21	0.07
8	1.00	VIT-2763	949.837	102.08108	VIT-2763	837.49	97.52
9	1.19	неизвестно	0.375	0.07308	н.п.	н.п.	0.07
10	1.37	SP9	4.466	0.63416	SP9 0.50%	944.14	0.61
11	1.49	SP3	0.376	0.06125	н.п.	н.п.	0.06

20 Преобразование из основания соединения (II) в соединение (II) в форме ЗНCl

VIT-2763-ЗНCl [% (м/м)] = основание VIT-2763 [% (м/м)] x 517,81 [г/моль] / 408,44 [г/моль]

Это соответствует коэффициенту преобразования 1,27.

11. Фармакологические анализы для оценки активности соединений (II) и (II')

В представленной далее таблице подытожены данные относительно активности соединений (II) и (II') в качестве ингибиторов ферропортина по сравнению с гепсидином:

Анализ	(II') IC50 (нМ)	(II) IC50 (нМ)	Гепсидин IC50 (нМ)	n
Интернализация гепсидина (J774)	5,9	7,3	10,7	2
Биофизический тест связывания гепсидина с ферропортином (FP)	28	28	-	2
Вызываемый железом ответ (HEK354 Blazer)	168	156	39	3
Интернализация и разложение Fpn (HEK354 FACS)	161	119	6	2

5

Соединения (II) и (II') испытывали в форме их ZHCl солей.

11.1 Анализ интернализации гепсидина (J774)

Этот клеточный тест позволяет количественно оценить связывание гепсидина с ферропортином (Fpn) с помощью микроскопического детектирования интернализации флуоресцентно меченого гепсидина в клетках J774. J774 является клеточной линией мышиных макрофагов, которая продемонстрировала эндогенную экспрессию Fpn при инкубации с железом (Knutson et al, 2005). Связывание гепсидина с Fpn запускает интернализацию и разложение как гепсидина, так и Fpn. Однако TMR (6-карбокситетраметилродаминовый) флуорофор, присоединенный к гепсидину, остается ассоциированным с клеткой после разложения пептидного остова гепсидина. Таким образом, микроскопическое детектирование флуоресценции от ассоциированного с клеткой TMR служит мерой связывания гепсидина с Fpn и интернализации гепсидина и Fpn. В случае предотвращения связывания комплекса TMR-гепсидин с Fpn, клеточная TMR-флуоресценция остается низкой (Dürrenberger et al, 2013). Эффект соединений-ингибиторов Fpn, имеющих низкую молекулярную массу, у этом анализе оценивали *in vitro*, как описано ниже.

J774 клетки, которые собирали из культур с конfluenceностью приблизительно 80%, высевали в концентрации 8×10^5 клеток/мл в полной среде (DMEM, 10% FBS, 1% пенициллин-стрептомицин), содержащей 200 мкМ Fe(III)NTA (нитрилотриуксусная кислота), 100 мкл на лунку в 96-луночных планшетах MicroClear (Greiner; Cat. 655090), и выращивали при 37°C с 5% CO₂. После инкубирования в течение ночи клетки 3 раза промывали предварительно подогретым DMEM без фенолового красного, 30 мкл/лунку DMEM без фенолового красного добавляли после финального промывания, и добавляли

25

10 мкл/лунку серийных разведений исследуемых соединений в трех повторениях. J774 клетки предварительно инкубировали с исследуемыми соединениями при 37°C с 5% CO₂ в течение 15 минут перед добавлением TMR-гепсидина в финальной концентрации 25 нМ. Клетки инкубировали в общем объеме 50 мкл при 37°C с 5% CO₂ в течение 2 часов, затем добавляли краситель Hoechst 33342 к финальной концентрации 0,5 мкг/мл для окрашивания ядер, и далее инкубировали в течение 10 минут при 37°C с 5% CO₂. Клетки 3 раза промывали PBS и фиксировали в 100 мкл 4% параформальдегида в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре. После удаления раствора параформальдегида, клетки 3 раза промывали PBS, оставляя 100 мкл на лунку, и планшеты закрывали герметизирующей пленкой. Регистрировали картины флуоресценции TMR (530-550 нм возбуждение/575-625 нм испускание/400 мс время экспозиции) и Hoechst 33342 (360-370 нм возбуждение/420-460 нм испускание/10 мс время экспозиции) с помощью спектрофотометра ScanR (Olympus) для считывания планшетов, оснащенного 20 х светосильным объективом. Регистрировали четыре изображения на лунку и канал флуоресценции, покрывающий приблизительно 1500 клеток на лунку. Полученные данные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ScanR для анализа изображений. Анализ изображений включал детектирование ядер (Hoechst 33342 флуоресценция), идентификацию ассоциированных с клеткой участков, применение виртуального канала и определение порога для уменьшения фона по типу катящегося шара, после чего применяли алгоритм средней суммы для измерения TMR флуоресценции, связанной с клетками, в качестве количественного параметра оценки интернализированного TMR-гепсидина. Значения IC₅₀ вычисляли по полученным данным средней суммы с использованием статистической обработки кривых «Ig (ингибитор) vs. ответ» в программе Prism 5 (Graphpad Software Inc., версия 5.02). Для каждого набора данных сравнивали соответствие модели «log (ингибитор) vs. ответ (три параметра)» и соответствие модели «log(ингибитор) vs. ответ – переменный наклон (четыре параметра)», и использовали данные IC₅₀ для предпочтительной модели. Данные IC₅₀ для соединений формулы (II) и (II'), протестированных в анализе интернализации гепсидина, представлены в Таблице 1. Значение IC₅₀ для немеченного гепсидина в этом анализе составляет 0,015 ± 0,011 мкМ.

Таблица 1 Показаны усредненные (AVE) данные IC₅₀ по соединениям (II) и (II'), испытанным в анализе интернализация гепсидина, для множества измерений

Эксп. соед.	J774 IC ₅₀ (мкМ)
Соединение (II')	0,006
Соединение (II)	0,007

35

11.2 Биофизический анализ связывания ферропортина с гепсидином

Этот биофизический анализ был разработан для более прямого подтверждения ингибирования связывания гепсидина с ферропортином (Fpn). Инкубирование TMR-

гепсидина с очищенным человеческим Fpn, выделенным из дрожжевых клеток *Pichia pastoris*, которые экспрессируют человеческий Fpn с С-концевым аффинным маркером FLAG (Bonaccorsi di Patti, 2014), приводит к увеличению флуоресцентной поляризации (FP) TMR-гепсидинового лиганда. Соединения (II) и (II') тестировали на предмет ингибирования связывания TMR-гепсидина с Fpn, детектируя дозозависимое снижение FP сигнала TMR, как подробно описано ниже.

Смесь 1,3 мкМ человеческого Fpn и 30 нМ TMR-гепсидина в буфере для FP анализа, содержащую 50 мМ Tris-HCl pH 7,3, 200 мМ NaCl, 0,02% DDM, 0,1% BSA, распределяли в 384-луночный черный планшет с круглодонными лунками малого объема (Corning, Cat. 3677) по 16 мкл на лунку. Добавляли по 8 мкл серийных разведений исследуемых соединений с дублированиями, с финальными концентрациями Fpn и TMR-гепсидина 1 мкМ и 20 нМ, соответственно. Планшеты инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре и измеряли параллельную (S) и перпендикулярную (P) флуоресценцию с помощью устройства для считывания флуоресценции Synergy FH1 (BioТек). Значения FP вычисляли в mP по приведенной ниже формуле.

$$mP = \frac{F_{\text{параллельное}} - F_{\text{перпендикулярное}}}{F_{\text{параллельное}} + F_{\text{перпендикулярное}}} \times 1000$$

Значения IC₅₀ определяли по вычисленным значениям в mP, как описано для анализа интернализации гепсидина, и они перечислены в Таблице 2. Значение IC₅₀ для немеченного гепсидина в этом анализе составляет 0,37 ± 0,067 мкМ.

Таблица 2 Показаны усредненные (AVE) данные IC₅₀ по соединениям (II) и (II'), испытанным в биофизическом анализе связывания ферропортина с гепсидином, для множества измерений.

Эксп. соед.	FP IC50 (мкМ)
Соединение (II')	0,028
Соединение (II)	0,028

11.3 Ингибирование осуществляемого ферропортином транспорта железа в анализе вызываемого железом ответа

Внутриклеточные концентрации железа в данном анализе косвенно измеряют путем мониторинга активности репортерного гена бета-лактамазы (BLA), сшитого с промотором человеческого ферритина и связанного с ним регулирующего элемента фактора, контролирующего содержание железа (IRE), которое удерживается в 5' нетранслируемой области мРНК ферритина. Экспрессирование ферропортина (Fpn) в такой линии клеток приводит к оттоку железа и пониженным уровням железа, о чем

свидетельствует сниженная активность репортерного гена. С другой стороны, ингибирование Fpn-опосредованного оттока железа приводит к повышению уровней железа в клетке, что детектируется как повышенная активность репортерного гена. Низкомолекулярные соединения, являющиеся ингибиторами Fpn, тестировали на предмет дозозависимых эффектов в таком *in vitro* анализе вызываемого железом ответа, как описано ниже.

НЕК-293 линию клеток #354 генерировали путем устойчивого интегрирования (i) химерной конструкции человеческой Fpn-GFP, вставленной в производное доксициклин-индуцированной pTRE-Tight-BI плазмиды (Clontech, Cat. 631068), и (ii) конструкции промотор человеческого ферритина-BLA репортерный ген в производное НЕК-293 Tet-ON Advanced линии клеток (Clontech). Для создания конструкции ферритин-BLA репортерный ген, 1,4 kb фрагмент промотора человеческого ферритина H амплифицировали методом ПЦР из человеческой геномной ДНК (прямой праймер 5'-CAGGTTTGTGAGCATCCTGAA-3'; обратный праймер 5'-GGCGGCGACTAAGGAGAGG-3') и вводили перед BLA геном, присутствующим в pcDNA™6,2/cGeneBLAzer™-DEST плазмиде (Invitrogen, Cat. 12578-043), тем самым замещая оригинальный CMV промотор, и помещали IRE, регулирующий трансляцию гена ферритина, примерно на 170 пар оснований выше иницирующего кодона репортерного гена. #354 клетки собирали из культур с примерно 80% конфлюентности, высевали в концентрации $1,8 \times 10^5$ клеток/мл в среде DMEM/F12 GlutaMAX™ (Invitrogen, Cat. 31331-028), содержащей 10% FBS (Clontech, Cat. 631106), 1% пенициллин-стрептомицин, 200 мкг/мл гигромицин В (Invitrogen, Cat. 10687-010), бластицидин 5 мкг/мл (Invitrogen, Cat. R-210-01), 4 мкг/мл, доксициклин (Clontech, Cat. 631311), в объеме 50 мкл на лунку в 384-лунковые планшеты, покрытые поли-d-лизинном (PDL), и инкубировали при 37°C с 5% CO₂. После инкубирования в течение ночи, добавляли серийные разбавления исследуемых соединений 10 мкл/лунку в четырех повторениях, и далее планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Клетки промывали 3 раза сбалансированным солевым раствором Хенкса (HBSS), оставляя 25 мкл на лунку. Активность BLA определяли путем добавления к клеткам 5 мкл/лунку GeneBLAzer реагента CCF4-AM (Invitrogen, Cat. K1085). После инкубирования планшетов в темноте при 18°C в течение 60 минут, измеряли сигналы синей и зеленой флуоресценции на сканирующем спектрофотометре для чтения планшетов Safire2 (Tecan) с длиной волны возбуждающего луча 410 нм и испусканием при 458 нм (синий) и 522 нм (зеленый). Вычисляли соотношение интенсивности синей/зеленой флуоресценции в качестве критерия активности BLA, и определяли значения EC₅₀ по вычисленному соотношению синей/зеленой флуоресценции, как описано для анализа интернализации гепсидина. Данные EC₅₀ для протестированных соединений (II) и (II') приведены в Таблице 3. Значение EC₅₀ для гепсидина в этом анализе составляет $0,096 \pm 0,063$ мкМ (n=37).

Таблица 3 Показаны усредненные (AVE) данные EC_{50} по соединениям (II) и (II'), испытанным в анализе вызываемого железом ответа, для множества измерений.

Эксп. соед.	BLAzer EC_{50} (мкМ)
Соединение (II')	0,168
Соединение (II)	0,156

5

11.4 Анализ интернализации и разложения ферропортина

НЕК-293 линию клеток #354 (описана в 11.3) использовали для измерения способности соединений вызывать интернализацию и разложение ферропортина (Fpn) методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Инкубирование НЕК-293 #354 клеток в доксициклиносодержащих средах индуцировало экспрессию химерного белка человеческого Fpn-GFP на поверхности клеток. Данные 10 независимых экспериментов показали, что выращивание НЕК#354 клеток в течение 48 часов в присутствии 4 мкг/мл доксициклина индуцировало в среднем $42,6\% \pm 6,4\%$ Fpn-GFP-положительных клеток. Низкомолекулярные соединения-ингибиторы Fpn тестировали на предмет дозозависимого влияния на Fpn-GFP среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) на линии клеток НЕК-293 #354, как описано ниже.

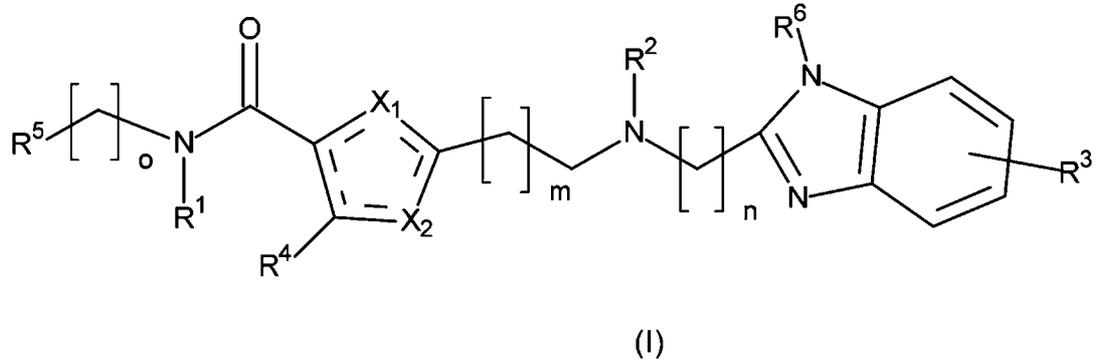
НЕК#354 клетки собирали из культур с конfluenceностью около 80%, высевали в концентрации $0,6 \times 10^6$ клеток/мл в среде DMEM/F12 GlutaMAX™ (Invitrogen, Cat. 31331-028), содержащей 10% FBS (Clontech, Cat. 631106), 1% пеницилин-стрептомицин (Invitrogen, Cat. 15140-122), 200 мкг/мл гигромицин В (Invitrogen, Cat. 10687-010), бластицидин 5 мкг/мл (Invitrogen, Cat. R-210-01), 4 мкг/мл, доксициклин (Clontech, Cat. 631311), 50 мкл на лунку 384-луночных планшетов (Greiner; Cat. 781091), и выращивали при 37°C с 5% CO₂. После инкубирования в течение ночи, добавляли серийные разбавления исследуемых соединений 10 мкл/лунку в четырех повторениях, и далее планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Клетки один раз промывали FACS-буфером (PBS, содержащий 1% FBS, 2 mM EDTA и 0,05% NaN₃), собирали в FACS-буфере с 0,5 мкг/мл йодида пропидия (Sigma, Cat. P4864) и анализировали на проточном цитометре (CANTO™ II, BD Biosciences), оснащенном высокопроизводительным семплером. Живые НЕК#354 клетки отделяли в качестве отрицательной по йодиду пропидия популяции и анализировали на предмет экспрессирования Fpn-GFP. Вычисляли значение MFI Fpn-GFP для >2000 живых клеток для каждого разбавления соединения, используя FlowJo (Tree Star's, Oregon), и вычисляли потенциал Fpn-ингибиторов к индуцированию интернализации и разложению Fpn-GFP, как описано для анализа интернализации гепсидина. Данные EC_{50} для соединений формулы (II) и (II'), протестированных в анализе интернализации и разложения ферропортина методом FACS, приведены в таблице 4. Среднее значение EC_{50} для гепсидина в этом анализе составляет $0,004 \pm 0,002$ мкМ.

Таблица 4 Показаны усредненные (AVE) данные EC₅₀ по соединениям (II) и (II'), испытанным в анализе интернализации и разложения ферропортина, для множества измерений.

Эксп. соед.	EC50 (мкМ)
Соединение (II')	0,161
Соединение (II)	0,119

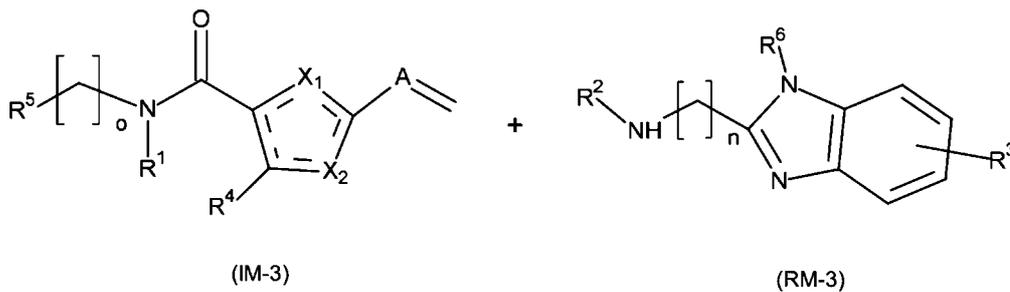
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения соединения общей формулы (I) и его фармацевтически приемлемых солей,



включающий этапы, на которых:

соединение формулы (IM-3) вводят в реакцию с соединением формулы (RM-3)



с получением соединения формулы (I);

где

X^1 представляет собой N, S или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что один из X^1 и X^2 представляет собой N и что X^1 и X^2 отличаются;

m представляет собой целое число 1, 2 или 3;

n представляет собой целое число 1, 2, 3 или 4;

O представляет собой целое число 1, 2, 3 или 4;

A представляет собой CH-группу, CH_2 -CH-группу или CH_2 - CH_2 -CH-группу;

R^1 и R^2 независимо выбраны из группы, состоящей из

- водорода и
- C_1 - C_4 -алкила, который может быть замещен 1 или 2 заместителями;

R^3 представляет собой 1, 2 или 3 необязательных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена,
- циано,
- C_1 - C_4 -алкила,
- C_1 - C_3 -галогеналкила;
- C_1 - C_4 -алкокси и
- карбоксильной группы;

R^4 выбран из группы, состоящей из

- водорода,
- галогена,
- C_1 - C_3 -алкила и
- C_1 - C_3 -галогеналкила;

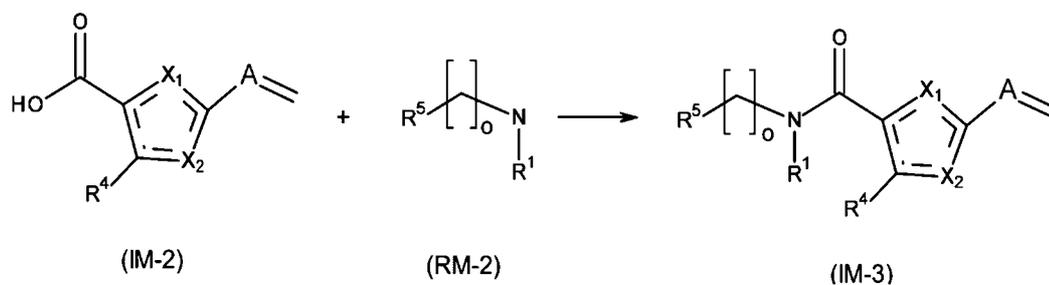
R^5 выбран из группы, состоящей из

- арила, который может иметь от 1 до 3 заместителей, и
- моно- или бициклического гетероарила, который может иметь от 1 до 3 заместителей, и

R^6 выбран из группы, состоящей из

- водорода,
- галогена,
- C_1 - C_4 -алкила, который может быть замещен 1 или 2 заместителями;
- C_1 - C_3 -галогеналкила.

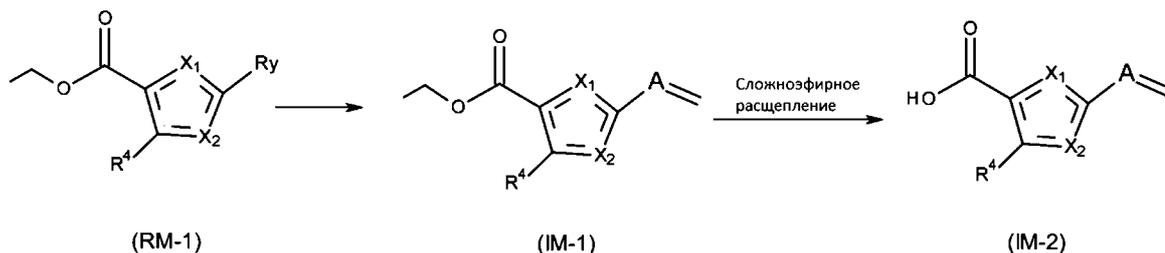
2. Способ получения соединения общей формулы (I) и его фармацевтически приемлемых солей по п. 1, дополнительно включающий этап, на котором соединение формулы (IM-2) вводят в реакцию с соединением формулы (RM-2) с образованием соединения формулы (IM-3)



где

X^1 , X^2 , o, A, R^1 , R^4 и R^5 имеют значение, определенное в п. 1.

3. Способ по п. 2, который дополнительно включает этап, на котором получают соединение формулы (IM-2) путем преобразования соединения (RM-1) в соединение (IM-1) с последующим сложноэфирным расщеплением:



где

R_y представляет собой

- водород или
- галоген; и

X^1 , X^2 , A и R^4 имеют значение, определенное в п. 1 и 2.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что

соединение формулы (IM-1) получают согласно одной из следующих схем реакции: схема реакции а):

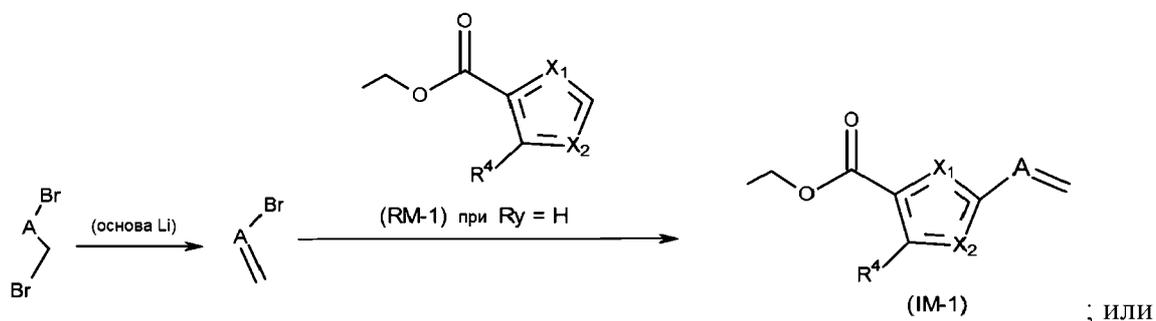


схема реакции б):

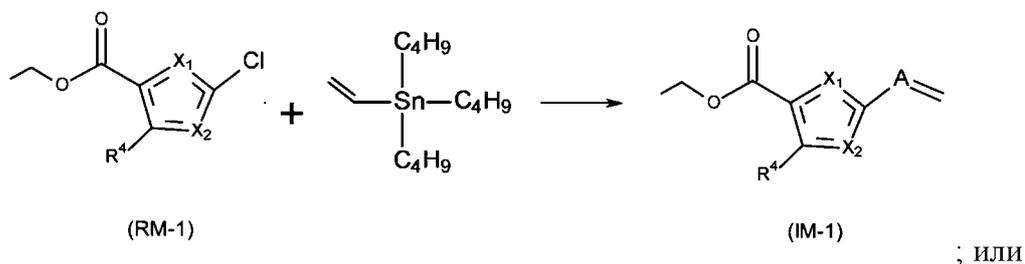
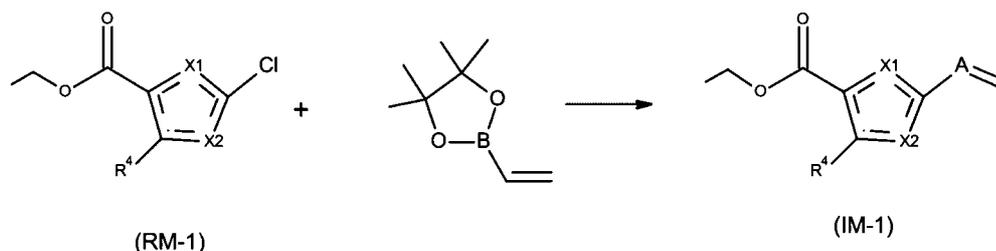


схема реакции в):



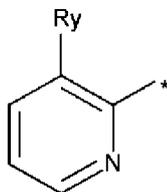
где X^1 , X^2 , A и R^4 имеют значение, определенное в любом из пп. 1-3.

5. Способ по п. 3 и п. 4, отличающийся тем, что получение соединения (IM-2) из соединения (RM-1) через промежуточное соединение (IM-1) осуществляют за один этап способа в одностадийной реакции.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что R^5 представляет собой моноциклическую гетероарильную группу, которая может иметь от 1 до 3 заместителей, которые могут быть независимо выбраны из

- C_1 - C_3 -алкила,
- галогена и
- C_1 - C_3 -галогеналкила,

при этом, предпочтительно, R^5 представляет собой группу, представленную



где

* обозначает положение связывания и

R_y выбран из

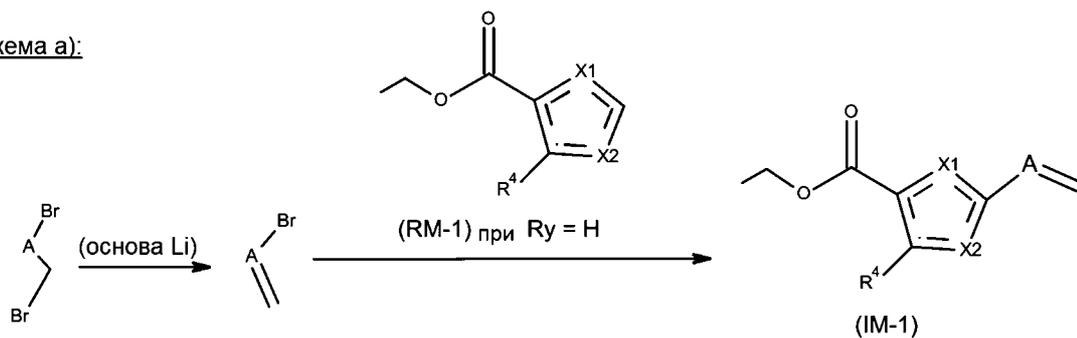
- C_1 - C_3 -алкила,
- галогена и
- C_1 - C_3 -галогеналкила;

при этом, предпочтительно, R_y представляет собой фтор или бром.

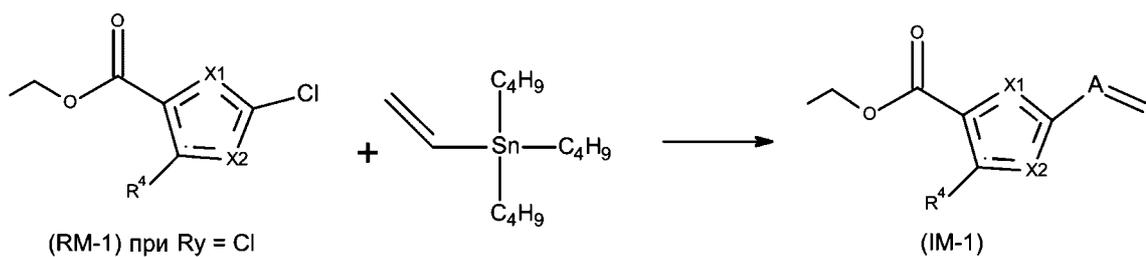
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, включающий следующие этапы реакции:

Этап 1:

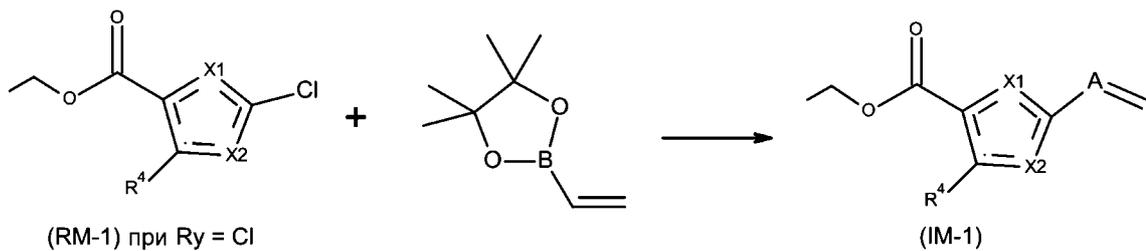
Схема а):



или схема б)



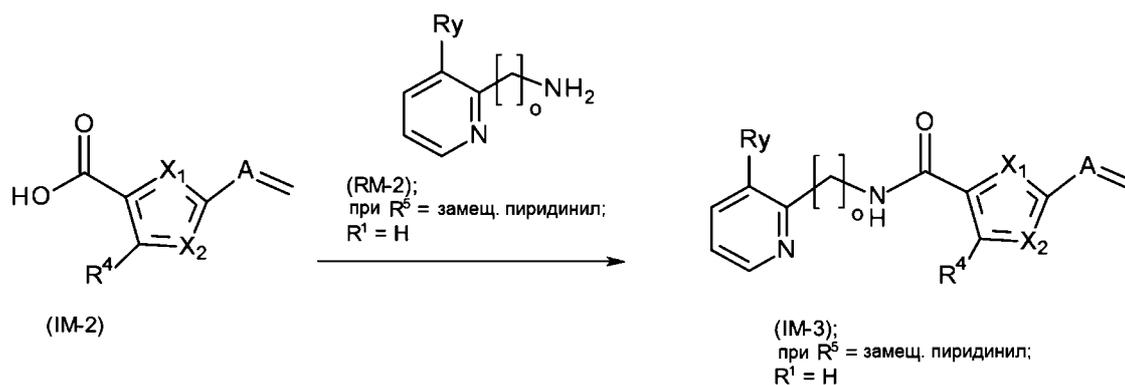
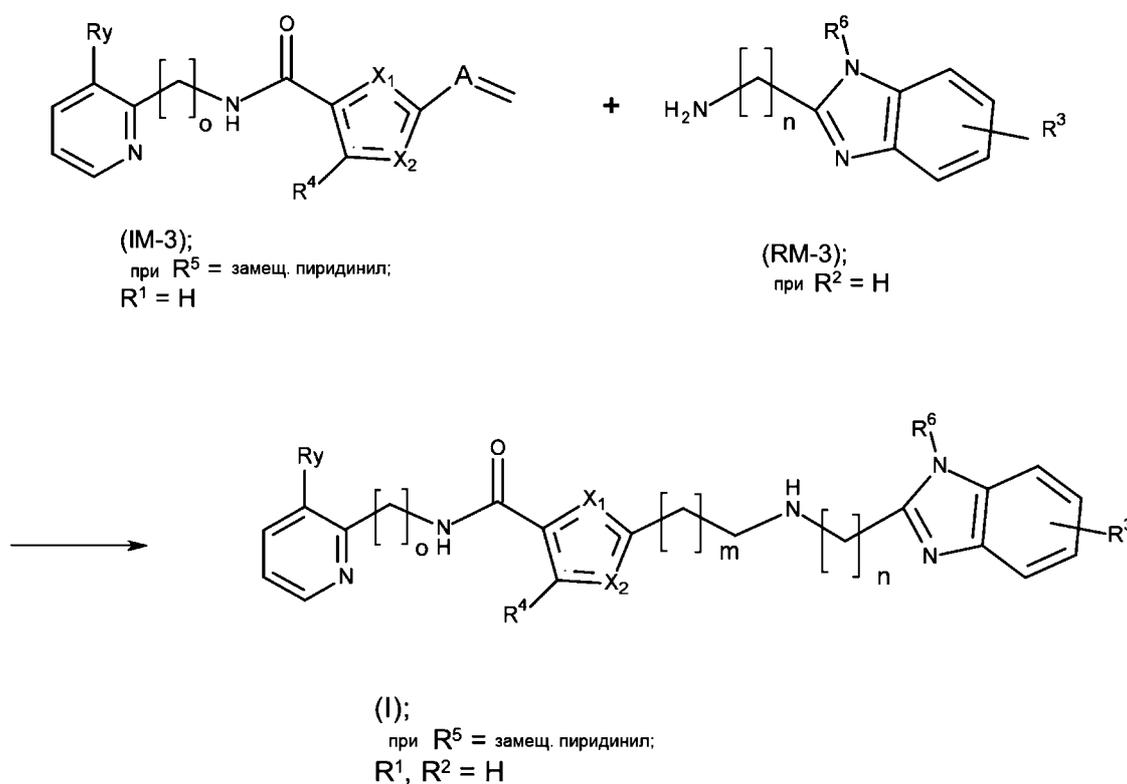
или схема в)



с последующим сложнэфирным расщеплением:



Этап 2:

**Этап 3:**

где X^1 , X^2 , R^3 , R^4 , R^6 , R_y , A, m, n и o имеют значение, определенное в любом из предыдущих пунктов.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что удовлетворено одно или более из следующих условий:

A представляет собой СН-группу; и/или

m равняется 1; и/или

o равняется 1; и/или

каждый из R^1 и R^2 представляет собой водород; и/или

R^4 представляет собой водород; и/или

R^6 представляет собой водород; и/или

R^3 представляет собой водород; и/или

X^1 представляет собой N, а X^3 представляет собой O или S, образуя группу



или

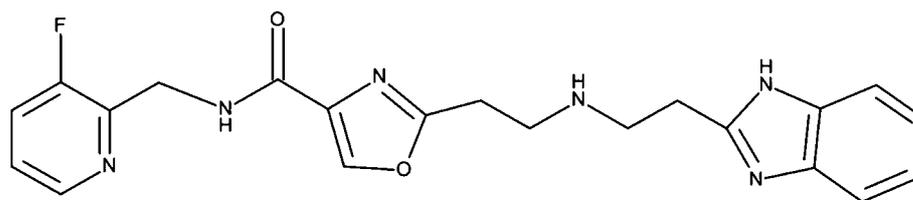
X^1 представляет собой O или S, а X^2 представляет собой N, образуя группу



где в каждом случае * обозначает положение связывания с карбонил-группой, а ** обозначает второе положение связывания; и

R^5 имеет значение, определенное в любом из предыдущих пунктов.

9. Способ получения соединения формулы (II) и его фармацевтически приемлемых солей по любому из предыдущих пунктов



(II),

включающий следующие этапы способа:

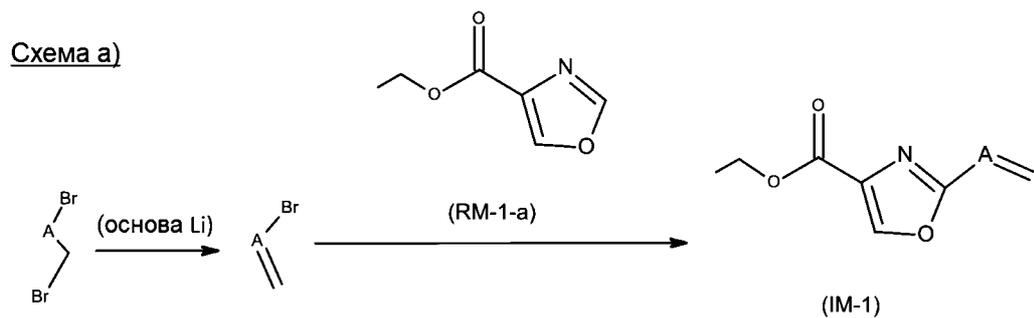
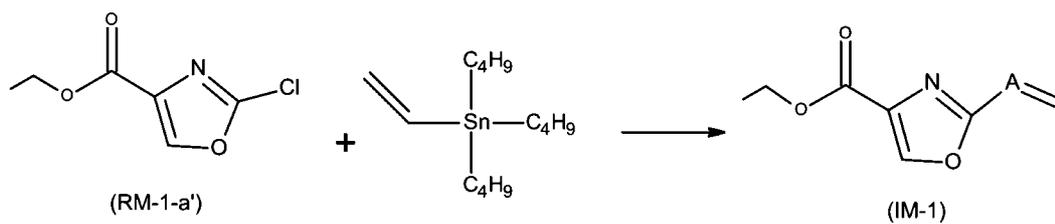
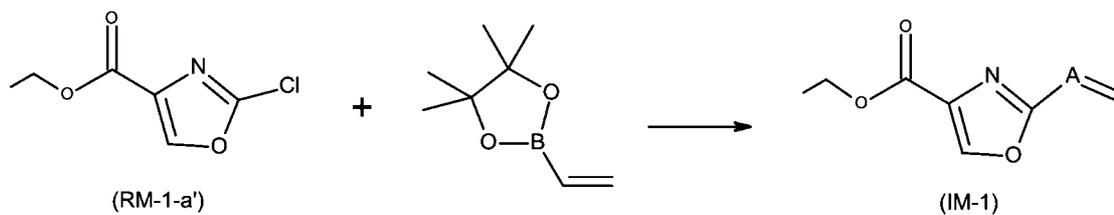
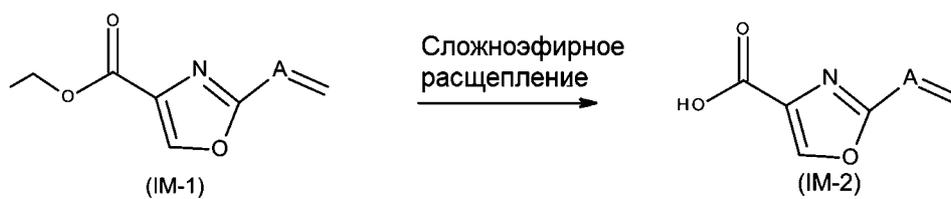
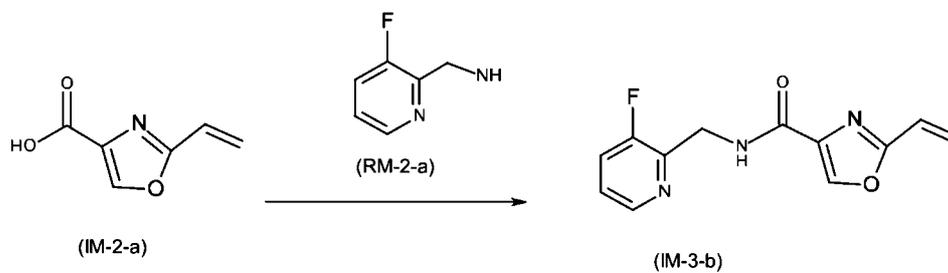
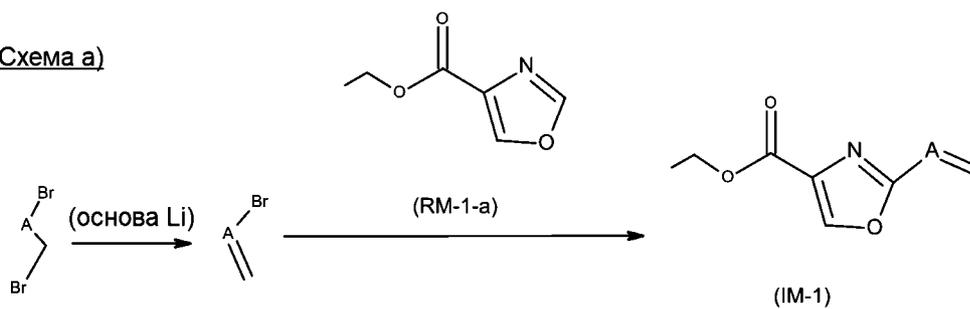
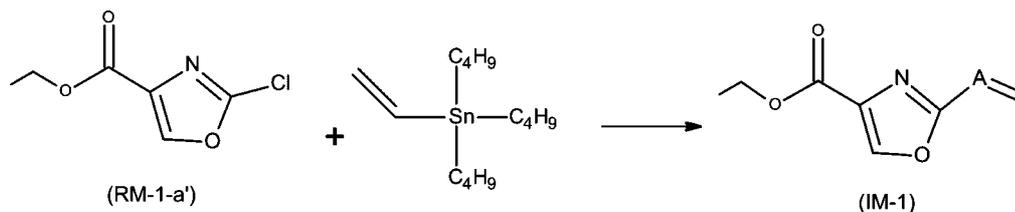
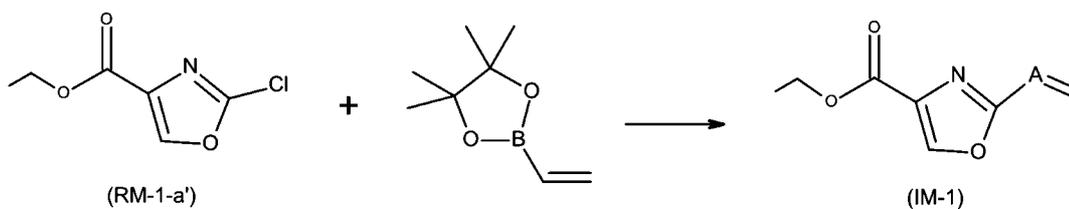
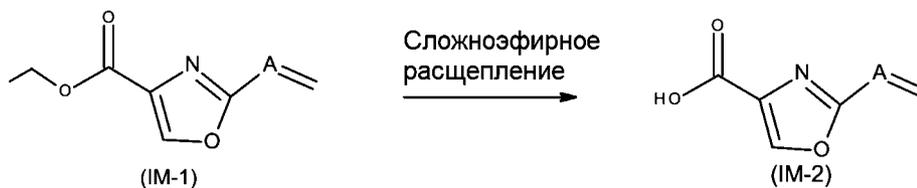
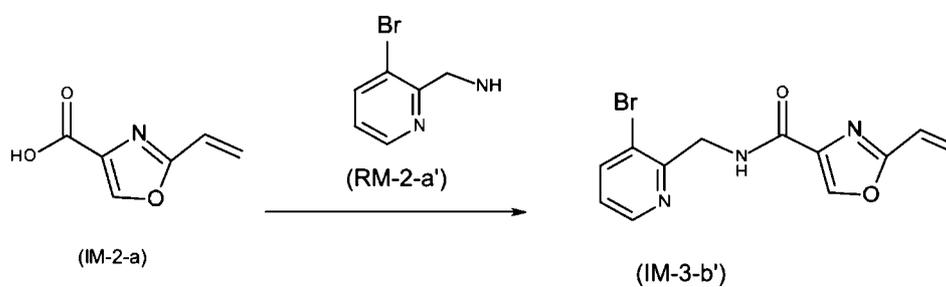
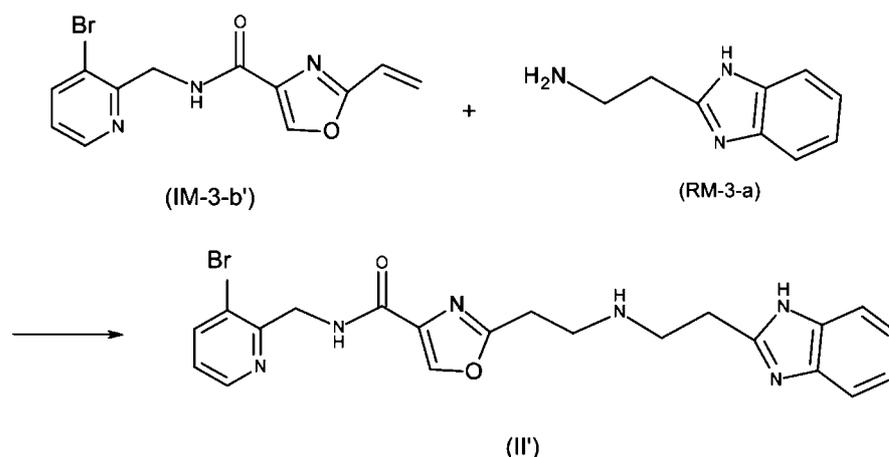
Этап 1-а:**или схема б)****или схема в)****с последующим сложноэфирным расщеплением:****Этап 2-а:****Этап 3-а:**

Схема а)или схема б)или схема в)с последующим сложноэфирным расщеплением:Этап 2-а:Этап 3-а:

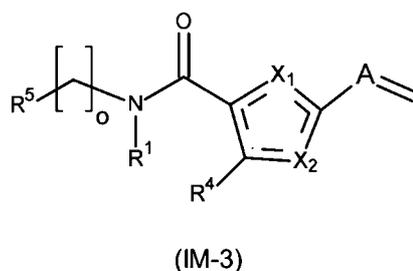


11. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий этап, на котором соединение формулы (I) или (II), или (II'), преобразуют в его фармацевтически приемлемую соль или сольват с использованием соответствующих оснований или кислот и/или растворов, предпочтительно, с использованием кислот, выбранных из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, хлористоводородной кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислоты, метансульфоновой кислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты и толуолсульфоновой кислоты;

предпочтительно, соединение формулы (I) или (II), или (II'), преобразуют в соль, выбранную из следующей группы: HCl моносоли (HCl), тройная HCl соль (3HCl), соль H₂SO₄, соль 0,5 H₃PO₄ и соль 1H₃PO₄.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что этапы 1 и 2 или 1-а и 2-а, соответственно, выполняют в одной сокращенной одностадийной реакции и/или этап преобразования промежуточного соединения IM-3 в соль соединения (I) или (II), или (II'), при он присутствует, выполняют в одной сокращенной одностадийной реакции.

13. Промежуточное соединение общей формулы (IM-3)



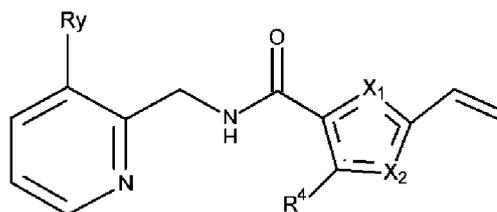
где

X¹ и X² отличаются и независимо представляют собой O или S, и

R¹, R⁴, R⁵, A и o имеют значение, определенное в любом из предыдущих пунктов;

или

общей формулы (IM-3-a)



(IM-3-a)

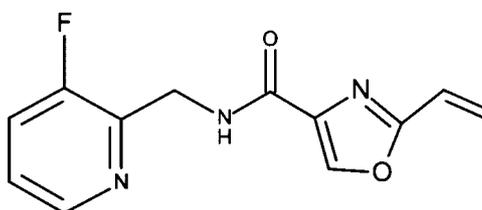
где

X^1 и X^2 отличаются и независимо представляют собой O или S, и

R^4 и R_y имеют значение, определенное в любом из предыдущих пунктов,

или

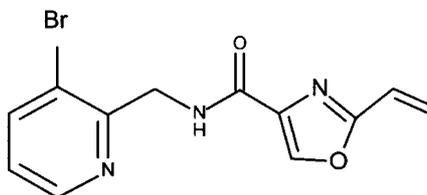
общей формулы (IM-3-b)



(IM-3-b)

или

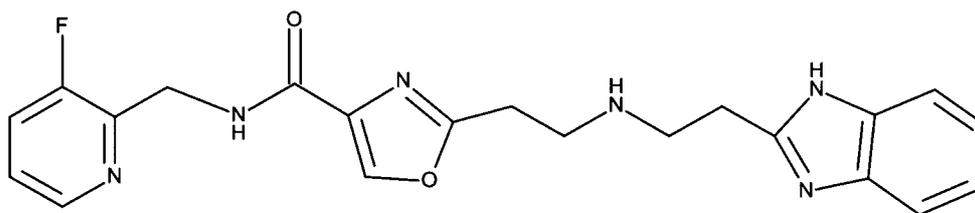
общей формулы (IM-3-b')



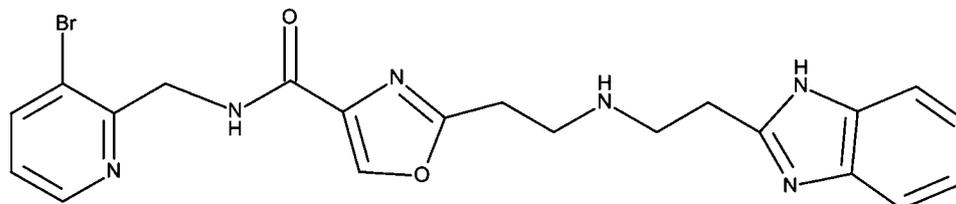
14. Способ получения промежуточного соединения (IM-1) по п. 3 или п. 4, включающий этап реакции по п. 5; или промежуточного соединения (IM-3), (IM-3-a), (IM-3-b) или (IM-3-b') по п. 13, включающий этапы реакции по одному или более предыдущим пунктам 2-10.

15. Соединение формулы (II'), в том числе его соли, гидраты, сольваты и смешанные формы гидрата/сольвата, полиморфные модификации и аморфные формы.

16. $ZnCl$ соль соединения формулы (II) или (II')



(II)



(III)

или его сольват, гидрат или полиморф,

характеризующаяся одним или более из следующих критериев чистоты:

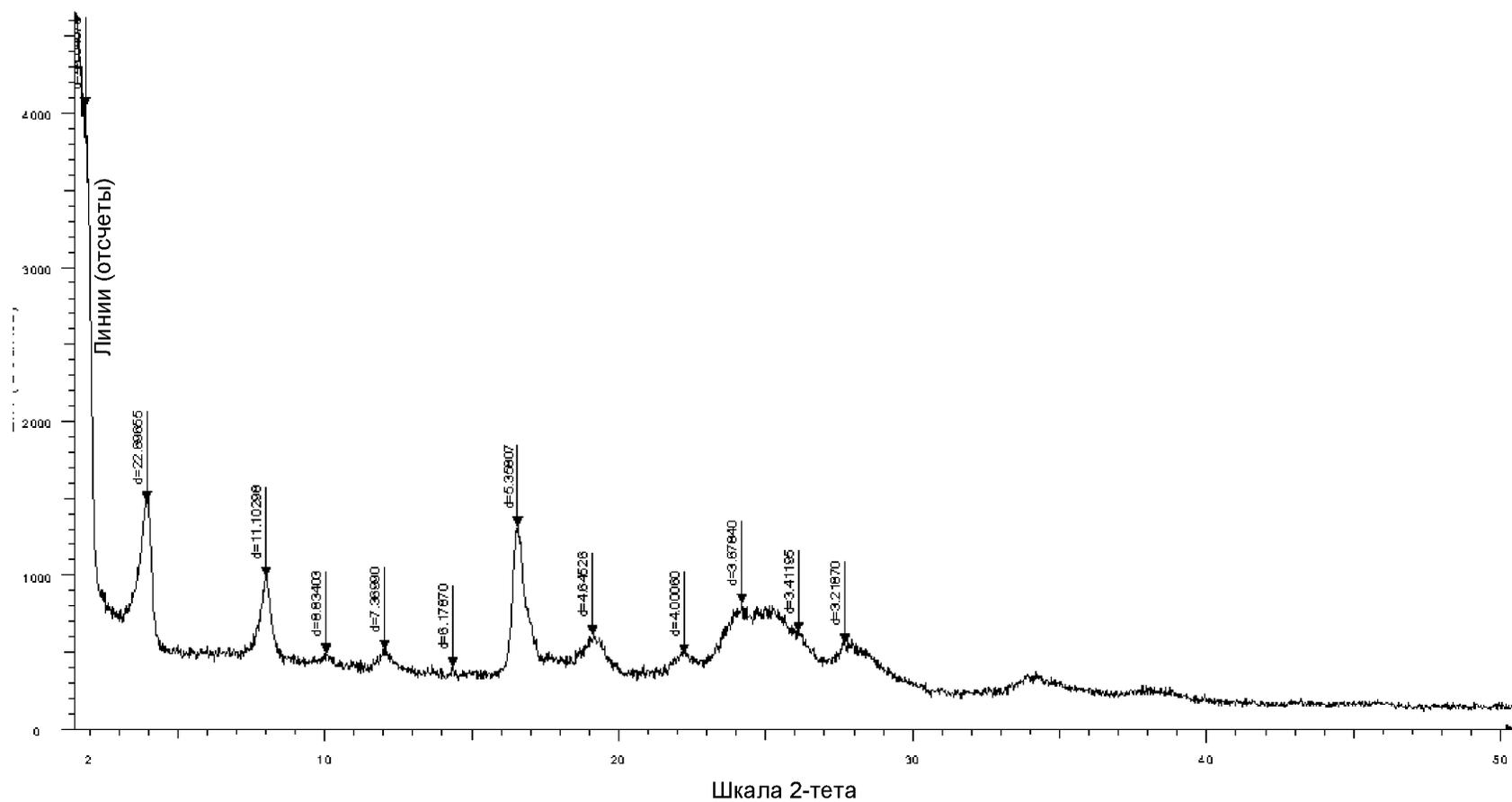
общее содержание примесей составляет менее, чем 2,00 % отн. площади, и/или

чистота составляет $\geq 97,80$ % отн. площади, $\geq 98,00$ % отн. площади, $\geq 98,50$ % отн. площади или $\geq 99,00$ % отн. площади; и/или

содержание одной или более примесей при значениях относительного времени удерживания RRT 0,59, 0,65, 0,83 и 1,37 составляет не более, чем 0,20% отн. площади, и/или

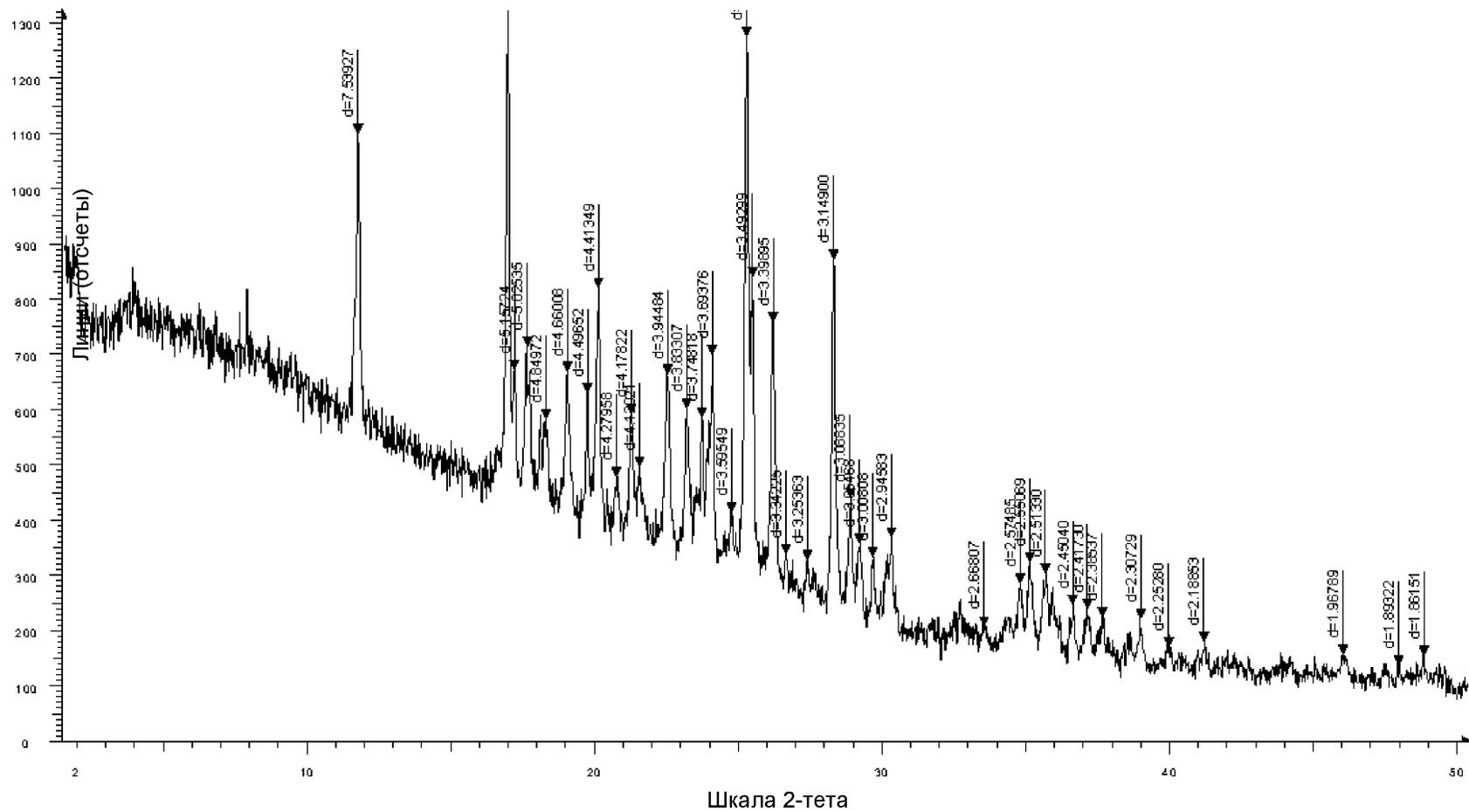
отсутствие дальнейших примесей при значениях относительного времени удерживания RRT: 0,59, 0,65, 0,83 и 1,37;

причем степень чистоты, содержание примесей, значения времени удерживания RRT и значения отн. площади определены посредством ВЭЖХ.



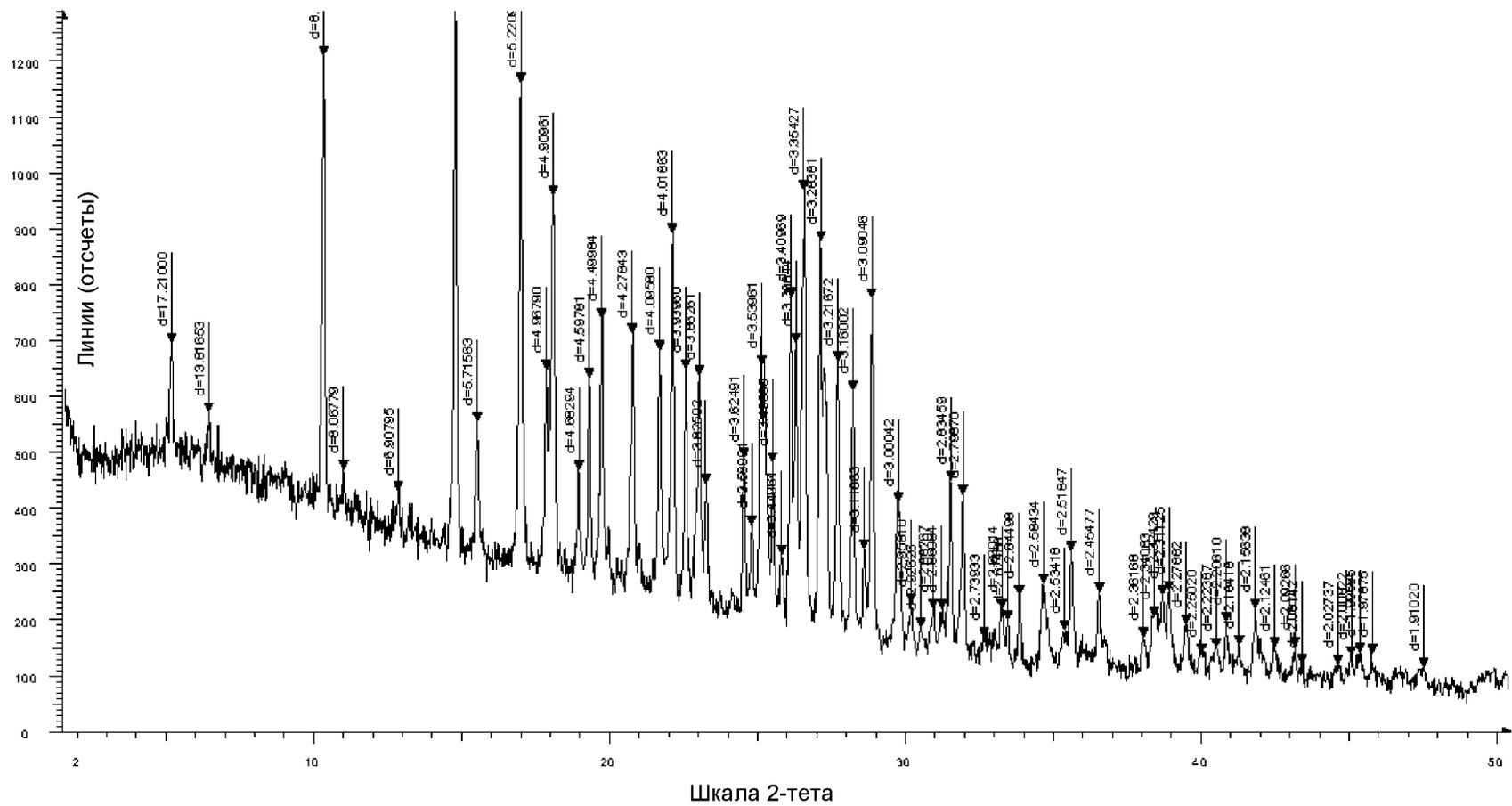
PXRD-паттерн соединения (II) в форме 3HCl соли; полиморфная форма PM1

ФИГ. 1



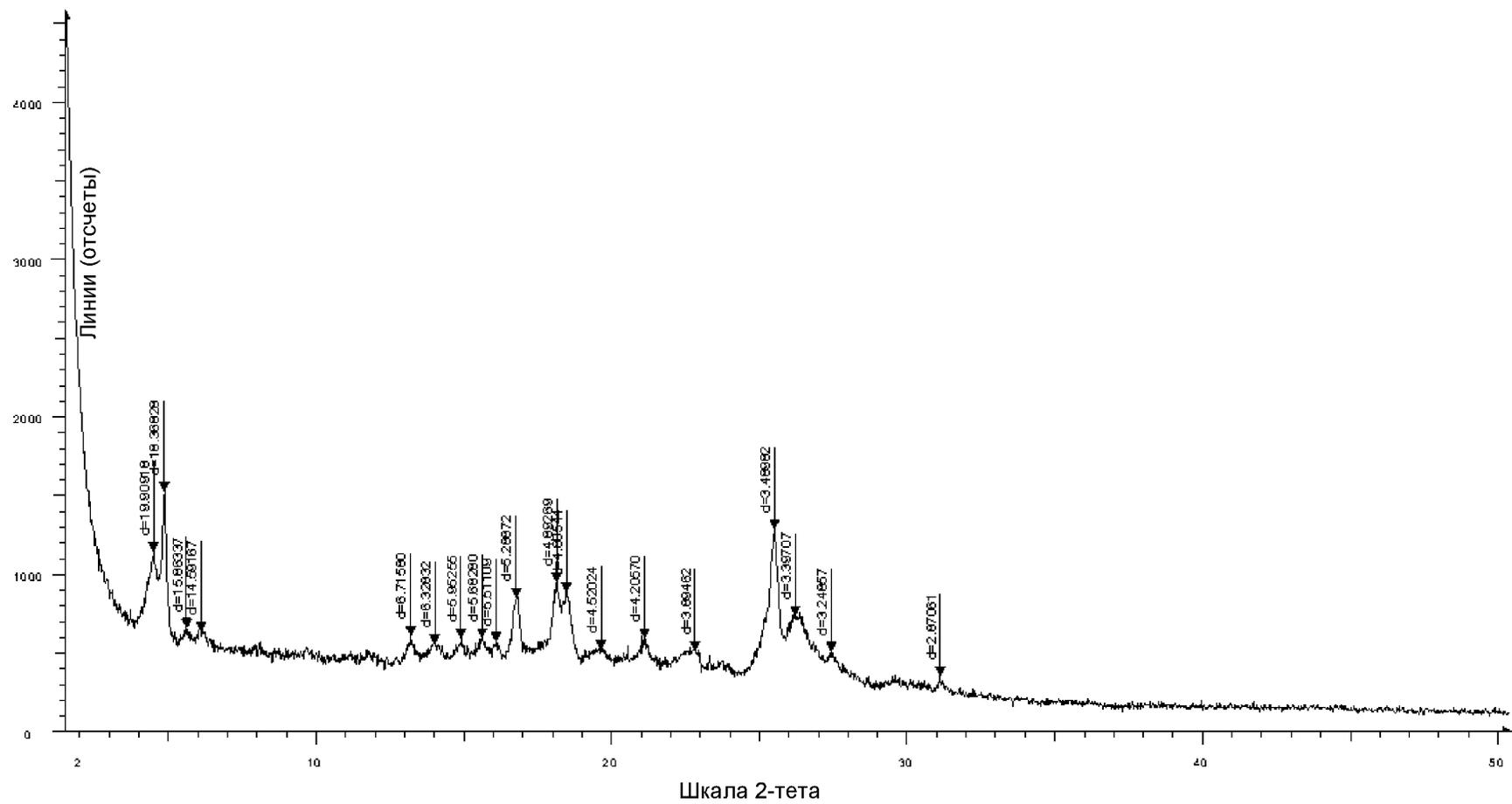
PXRD-паттерн соединения (II) в форме 3HCl соли; полиморфная форма PM2

ФИГ. 2



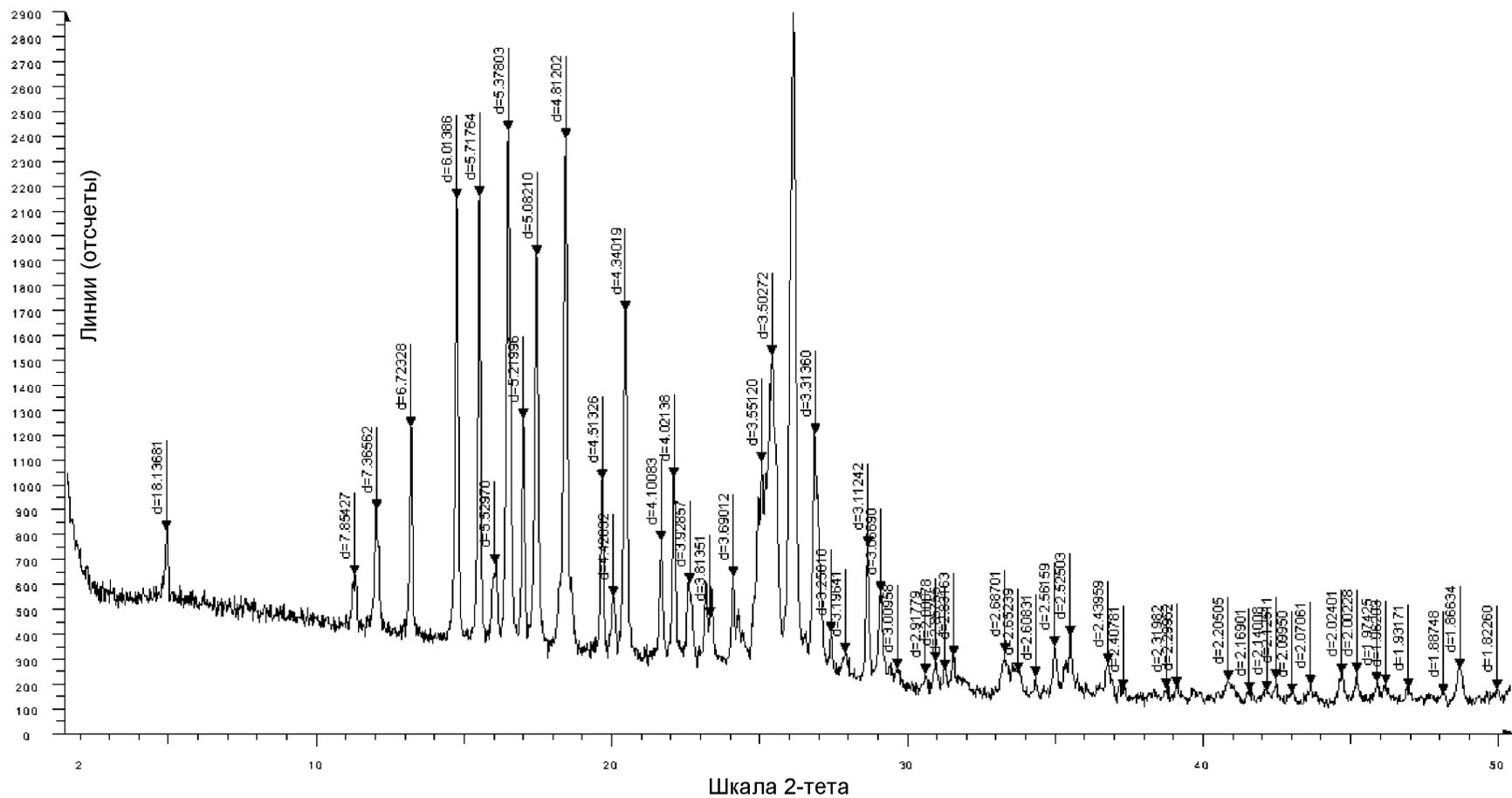
PXRD-паттерн соединения (II) в форме 3HCl соли; полиморфная форма PM3

ФИГ. 3

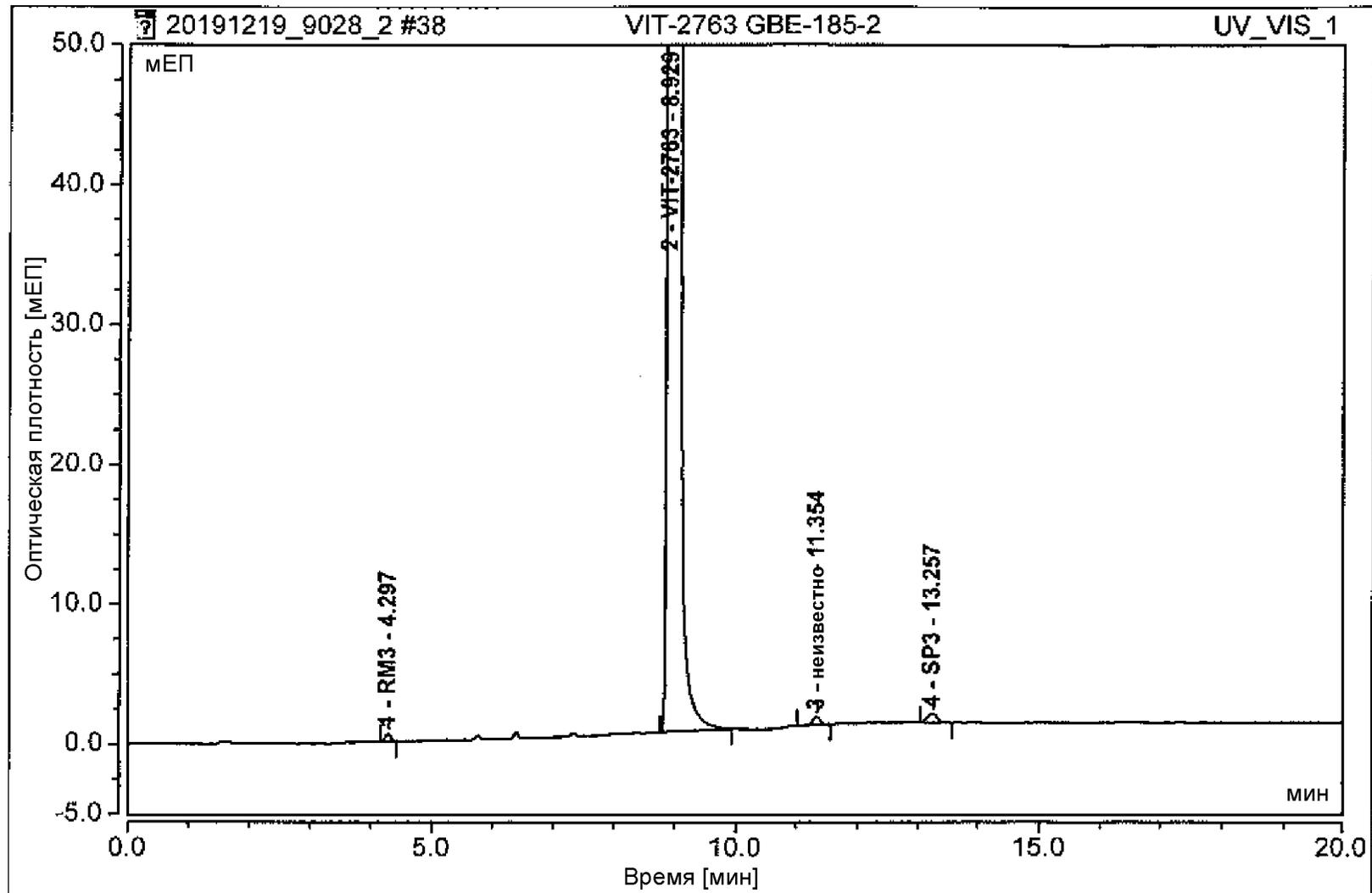


PXRD-паттерн соединения (II) в форме соли H_2SO_4

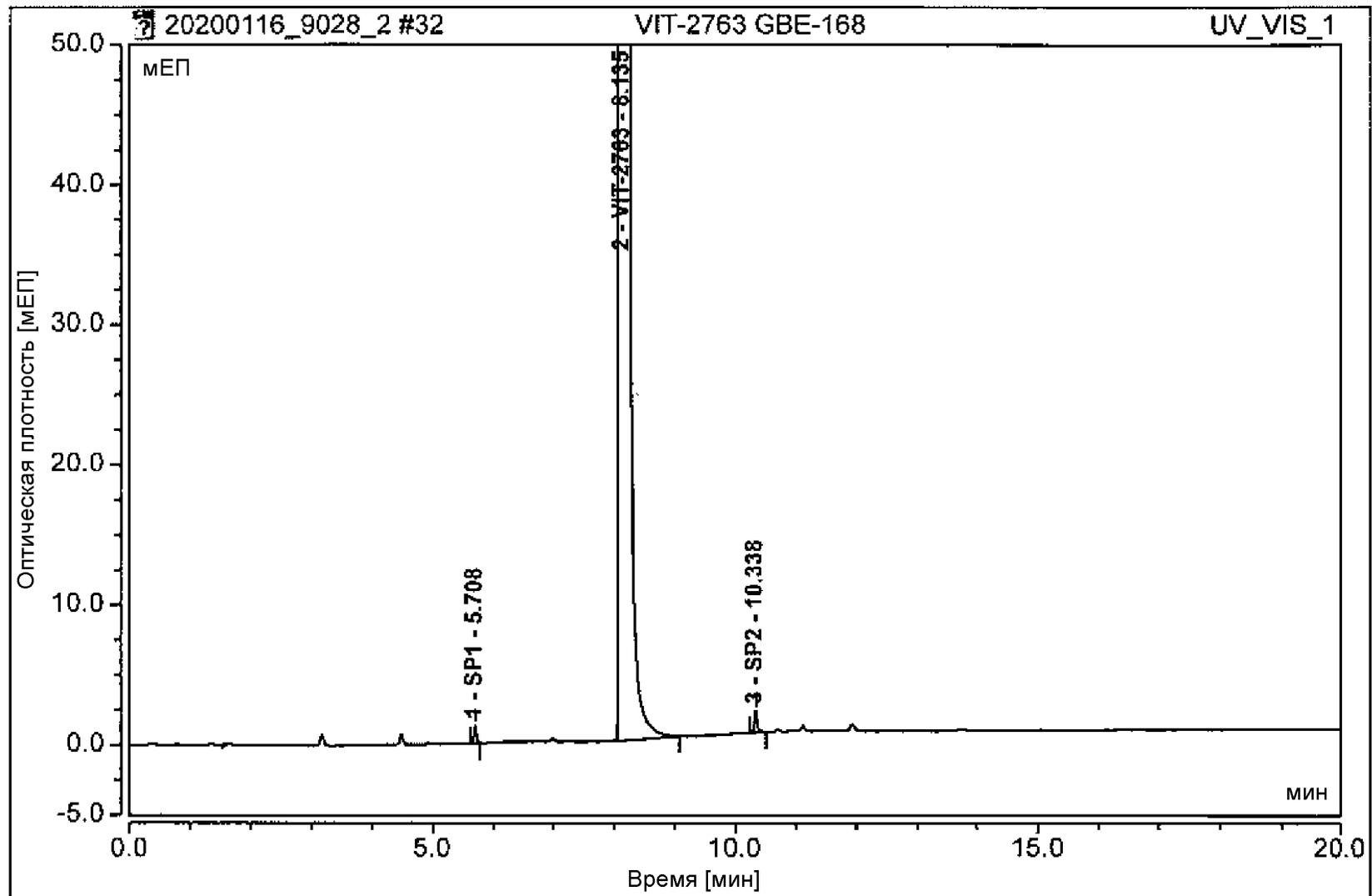
ФИГ. 4

PXRD-паттерн соединения (II) в форме соли $1\text{H}_3\text{SO}_4$

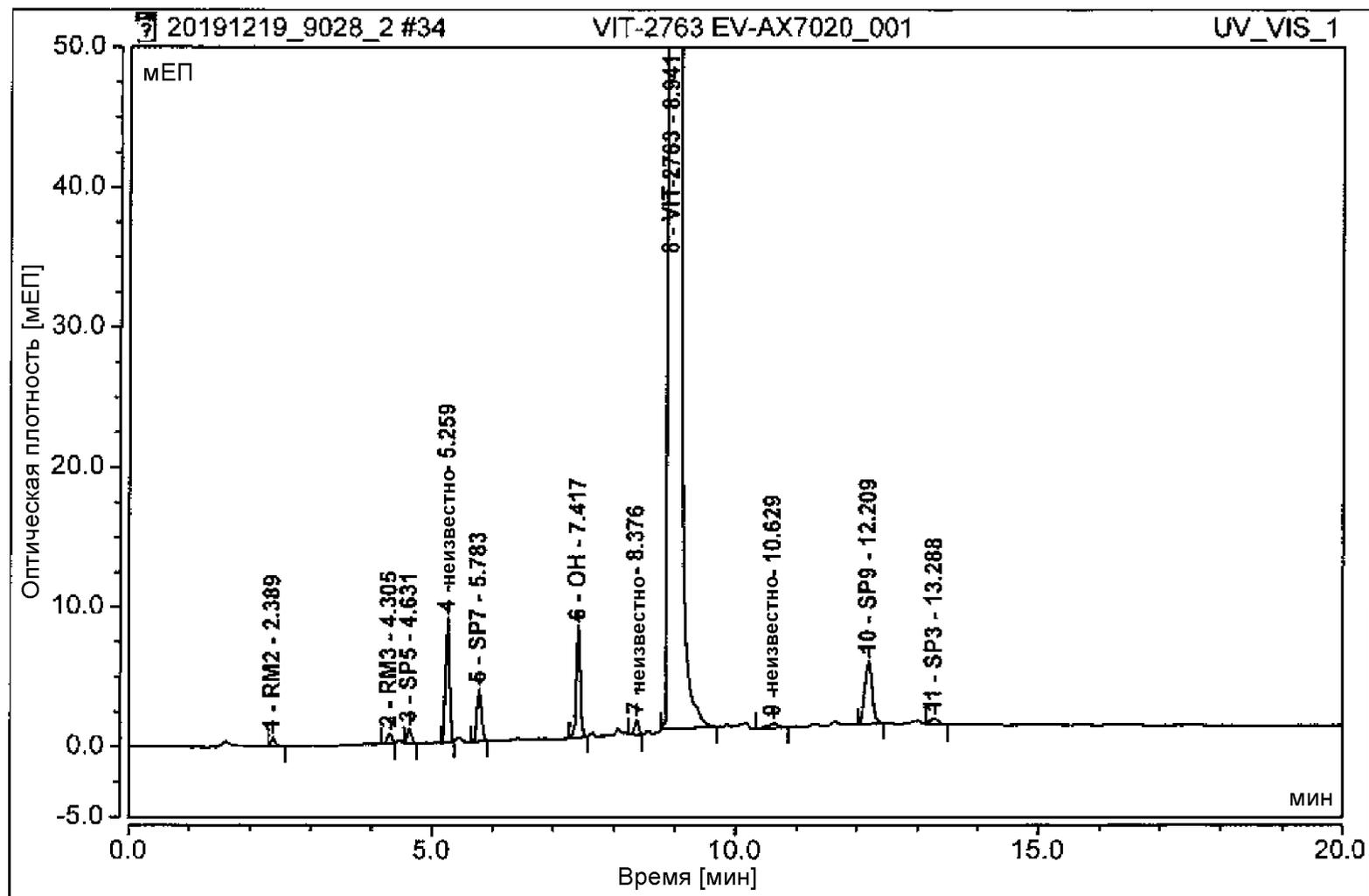
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8