

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042192**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.23

(21) Номер заявки
202091402

(22) Дата подачи заявки
2018.12.07

(51) Int. Cl. **C07D 401/12** (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)

(54) **ФУМАРАТ (R)-3-(1-(2,3-ДИХЛОР-4-(ПИРАЗИН-2-ИЛ)ФЕНИЛ)-2,2,2-ТРИФТОРЭТИЛ)-1-МЕТИЛ-1-(1-МЕТИЛПИПЕРИДИН-4-ИЛ)МОЧЕВИНЫ, СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/597,236**

(32) **2017.12.11**

(33) **US**

(43) **2020.09.01**

(86) **PCT/US2018/064512**

(87) **WO 2019/118298 2019.06.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХЕЛСИНН ХЕЛСКЕА СА (СН)

(56) **WO-A1-2015134839**

(72) Изобретатель:
**Гарсия Рубио Сильвина (US),
Персегини Мауро (СН), Гуайнацци
Анджело (US), Пьетра Клаудио,
Джулиано Клаудио (ИТ)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) В изобретении описаны различные варианты осуществления, относящиеся к фумарату (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины и способам их получения и применения для лечения патологических состояний и нарушений, связанных с увеличенной концентрацией грелина, таких как чрезмерное потребление пищи, алкогольная зависимость, и других нарушений (например, синдрома Прадера-Вилли). В заявке также описаны разные кристаллические формы фумарата НМ04 и способы их получения.

042192
B1

042192
B1

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке US № 62/597236, поданной 11 декабря 2017 г., которая во всей ее полноте включена в настоящее изобретение в качестве ссылки для любых объектов.

Область техники, к которой относится изобретение

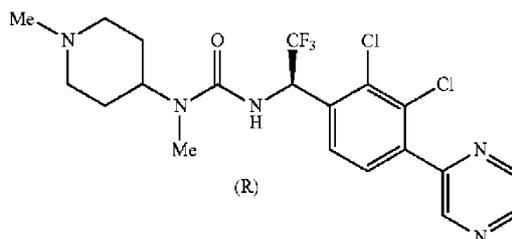
Настоящее изобретение относится к фумарату (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины (также обозначенному, как HM04 или H0900), активному антагонисту рецептора усиления секреции грелина/гормона роста (GHS-R1a), применимому для лечения заболеваний, связанных с нарушением баланса концентраций грелина, таких как компульсивное переедание, алкогольная зависимость, и других нарушений (например, синдрома Прадера-Вилли). Настоящее изобретение также относится к различным кристаллическим формам фумарата HM04 и к способам их получения.

Уровень техники

Грелин, пептид, высвобождающий гормон роста, продуцируемый грелинергическими клетками в желудочно-кишечном тракте, действует, как нейрпептид, который регулирует энергетический метаболизм путем стимулирования аппетита. Модулирование, например, ингибирование передачи сигналов грелина посредством рецептора усиления секреции грелина/гормона роста (GHS-R1a), является привлекательной мишенью для фармакологического способа лечения нарушений, связанный с высокой концентрацией грелина. Возможные нарушения, поддающиеся лечению с использованием модуляторов грелина, включают чрезмерное потребление пищи (такое как компульсивное переедание, ожирение, гиперфагию (или неконтролируемый аппетит), возобновление увеличения массы тела после диеты (возникающую после диеты гиперфагию), алкогольную зависимость и генетические заболевания, связанные с увеличенной концентрацией грелина (например, синдром Прадера-Вилли (СПВ)).

СПВ встречается примерно в 1 случае на 10000 рождений и связан с делецией или недостаточным экспрессированием региона 15q11.2 родительской хромосомы 15. Признаки СПВ включают небольшой рост, низкий мышечный тонус и гиперфагию. Для лечения недостаточного роста и гипотонии часто используют замену гормона роста. Однако отсутствует способ лечения чрезмерного аппетита и страдающие СПВ дети могут стать взрослыми людьми, страдающими ожирением и диабетом типа 2. При СПВ обычно повышены концентрации грелина; однако еще не установлена взаимосвязь между передачей сигналов грелина и потреблением пищи при СПВ. См. публикации Purlall L., et al., In adults with Prader-Willi syndrome, elevated ghrelin levels are more consistent with hyperphagia than high PYY and GLP-1 levels. *Neuropeptides*. 2011; 45(4): 301-7; Cummings D.E., et al., Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nature Medicine*. 2002; 8(7): 643-4; DelParigi A., et al., High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002; 87(12): 5461-4.

Соответственно, необходимо разработать средства лечения, которые эффективно ингибируют GHSR1a, которые хорошо переносятся пациентом и которые не мешают другим функциям гормонов роста. Модуляторы GHSR1a, включая ингибиторы, такие как (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина (HM04, H0900), представленная ниже, описаны в патенте U.S. № 9546157.



Однако в этом патенте не раскрыты ее стабильные соли и кристаллические формы.

Краткое изложение сущности изобретения

Вариант осуществления 1. Фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины.

Вариант осуществления 2. Соль, соответствующая варианту осуществления 1, где солью является (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина:фумарат состава 1:1.

Вариант осуществления 3. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления, где не менее 50% соли находится в кристаллической форме.

Вариант осуществления 4. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления, где не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98%, не менее 99% или 100% соли находится в кристаллической форме.

Вариант осуществления 5. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащая по меньшей мере одну кристаллическую форму, выбранную из числа следующих: форма 1, форма 2, форма 3 и форма 4, определенную с помощью их рентгенограмм ПРРГ, как описано ниже.

Вариант осуществления 6. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществле-

ния, содержащая форму 1, обладающая полученной с помощью ПРРГ (порошковая рентгенография) с использованием излучения Cu K-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 12.

Вариант осуществления 7. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления 1-5, содержащая форму 2, отличающаяся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Cu K-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 3.

Вариант осуществления 8. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления 1-5, содержащая форму 3, отличающаяся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Cu K-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 15.

Вариант осуществления 9. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления 1-5, содержащая форму 4, отличающаяся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Cu K-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 16.

Вариант осуществления 10. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления 1-5, содержащая форму 1, отличающаяся полученной с использованием излучения Cu K-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $7,8 \pm 0,2$, $9,5 \pm 0,2$, $14,3 \pm 0,2$, $16,7 \pm 0,2$, $17,2 \pm 0,2$, $18,5 \pm 0,2$, $18,8 \pm 0,2$, $19,3 \pm 0,2$, $20,0 \pm 0,2$, $20,7 \pm 0,2$, $22,4 \pm 0,2$, $23,2 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$, $27,2 \pm 0,2$, $31,7 \pm 0,2$ и $32,4 \pm 0,2$ градусов 2-тета.

Вариант осуществления 11. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления 1-5, содержащая форму 3, отличающаяся полученной с использованием излучения Cu K-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $7,2 \pm 0,2$, $9,4 \pm 0,2$, $9,7 \pm 0,2$, $10,8 \pm 0,2$, $14,3 \pm 0,2$, $15,1 \pm 0,2$, $16,2 \pm 0,2$, $17,9 \pm 0,2$, $18,7 \pm 0,2$, $18,9 \pm 0,2$, $19,6 \pm 0,2$, $21,5 \pm 0,2$, $22,7 \pm 0,2$, $23,7 \pm 0,2$, $24,3 \pm 0,2$, $25,1 \pm 0,2$, $27,4 \pm 0,2$, $28,7 \pm 0,2$ и $34,9 \pm 0,2$ градусов 2-тета.

Вариант осуществления 12. Соль, соответствующая любому из предыдущих вариантов осуществления 1-5, содержащая форму 4, отличающаяся полученной с использованием излучения Cu K-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $12,2 \pm 0,2$, $13,2 \pm 0,2$, $15,0 \pm 0,2$, $15,4 \pm 0,2$, $17,6 \pm 0,2$, $18,1 \pm 0,2$, $19,5 \pm 0,2$, $20,2 \pm 0,2$, $20,9 \pm 0,2$, $21,4 \pm 0,2$, $23,0 \pm 0,2$, $23,4 \pm 0,2$, $24,4 \pm 0,2$, $24,8 \pm 0,2$, $25,9 \pm 0,2$, $27,9 \pm 0,2$, $28,9 \pm 0,2$, $29,6 \pm 0,2$, $30,7 \pm 0,2$ градусов 2-тета.

Вариант осуществления 13. Лекарственное средство, содержащее соль, соответствующую любому из вариантов осуществления 1-12.

Вариант осуществления 14. Фармацевтическая композиция, содержащая соль, соответствующую любому из вариантов осуществления 1-12 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 15. Способ получения соли, соответствующей любому из вариантов осуществления 1-12, включающий объединение (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины с фумаровой кислотой.

Вариант осуществления 16. Способ, соответствующий варианту осуществления 15, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина находится в твердой форме при ее объединении с фумаровой кислотой.

Вариант осуществления 17. Способ, соответствующий варианту осуществления 15, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина находится в растворе при ее объединении с фумаровой кислотой.

Вариант осуществления 18. Способ, соответствующий любому из вариантов осуществления 15-17, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевину подвергают экстракции с использованием кислоты/основания до ее объединения с фумаровой кислотой.

Вариант осуществления 19. Способ, соответствующий любому из вариантов осуществления 15-17, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевину не подвергают экстракции с использованием кислоты/основания до ее объединения с фумаровой кислотой.

Вариант осуществления 20. Применение соли, соответствующей любому из вариантов осуществления 1-12, лекарственного средства, соответствующего варианту осуществления 13, или фармацевтической композиции, соответствующей варианту осуществления 14 для приготовления лекарственного средства для уменьшения сигнальной активности грелина в клетках.

Вариант осуществления 21. Применение, соответствующее варианту осуществления 20, в котором клетки обрабатывают солью, кристаллическим соединением, лекарственным средством или композицией *in vitro*.

Вариант осуществления 22. Применение, соответствующее варианту осуществления 20 или варианту осуществления 21, в котором сигнальную активность грелина определяют путем измерения концентрации внутриклеточного кальция, определенной путем исследования с использованием флуоресцентного визуализирующего считывающего устройства для планшетов (ФЛВСП).

Вариант осуществления 23. Применение, соответствующее варианту осуществления 22, в котором уменьшается концентрация внутриклеточного кальция.

Вариант осуществления 24. Применение соли, соответствующей любому из вариантов осуществления 1-12, лекарственного средства, соответствующего варианту осуществления 13, или фармацевтической композиции, соответствующей варианту осуществления 14 для приготовления лекарственного средства для уменьшения сигнальной активности грелина у субъекта.

Вариант осуществления 25. Применение соли, соответствующей любому из вариантов осуществления 1-12, лекарственного средства, соответствующего варианту осуществления 13, или фармацевтической композиции, соответствующей варианту осуществления 14 для приготовления лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего патологическим состоянием или нарушением, связанным с увеличением концентрации грелина.

Вариант осуществления 26. Применение, соответствующее варианту осуществления 25, в котором патологическое состояние или нарушение выбрано из числа следующих: чрезмерное потребление пищи, алкогольная зависимость и синдром Прадера-Вилли.

Вариант осуществления 27. Применение, соответствующее варианту осуществления 25 или варианту осуществления 26, в котором патологическое состояние или нарушение выбрано из числа следующих: компульсивное переедание, ожирение, возобновление увеличения массы тела после диеты и гиперфагия.

Применение, соответствующее вариантам осуществления 25-27, может быть осуществлено путем перорального введения; во время указанного применения можно модулировать концентрацию циркулирующего гормона роста у субъекта; дополнительно во время указанного применения можно уменьшать концентрацию циркулирующего гормона роста у субъекта; дополнительно во время указанного применения можно уменьшать потребление пищи субъектом; дополнительно во время указанного применения можно уменьшать массу тела субъекта; дополнительно во время указанного применения можно стабилизировать массу тела субъекта.

Дополнительные объекты и преимущества отчасти описаны в приведенном ниже описании и они отчасти очевидны из описания или их можно обнаружить при практическом осуществлении настоящего изобретения. Объекты и преимущества можно понять и обеспечить с помощью элементов и комбинаций, специально отмеченных в прилагаемой формуле изобретения.

Следует понимать, что приведенное выше общее описание и приведенное ниже подробное описание являются лишь иллюстративными и разъясняющими, а не ограничивающими формулу изобретения.

На прилагаемых чертежах, которые включены в настоящее описание и являются его частью, представлен один (несколько) вариант (вариантов) осуществления и вместе с настоящим описанием они предназначены для разъяснения принципов, описанных в настоящем изобретении.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А и 1Б (нижняя диаграмма) представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 свободного основания НМ04, полученной так, как описано в примере 1А, не являющаяся объектом настоящего изобретения.

На фиг. 1Б (верхняя диаграмма) представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 свободного основания НМ04, полученной так, как описано в примере 1В, не являющаяся объектом настоящего изобретения.

На фиг. 1В представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 2.

На фиг. 2 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 3.

На фиг. 3 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 2 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 3.

На фиг. 4А представлена рентгенограмма ПРРГ, полученная после перемешивания форм 1 и 2 фумарата НМ04 при соотношении 50:50 в смеси ацетонитрил:вода (95:5) при 60°C в течение 48 ч.

На фиг. 4Б представлена рентгенограмма ПРРГ, полученная после перемешивания форм 1 и 2 фумарата НМ04 при соотношении 50:50 в этаноле при 60°C в течение 48 ч.

На фиг. 5 представлена схема методики синтеза увеличенного количества формы 1 фумарата НМ04 и она более подробно описана в примере 5.

На фиг. 6 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 5 (после сушки при 60°C в течение 6 ч).

На фиг. 7 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 5 (после сушки при 60°C в течение 15 ч).

На фиг. 8 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 5 (после сушки при 60°C в течение 72 ч).

На фиг. 9 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 5 (после сушки при 65°C в течение 18 ч).

На фиг. 10 представлена схема усовершенствованной методики синтеза формы 1 фумарата НМ04 и она более подробно описана в примере 6.

На фиг. 11 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 6, методика 1.

На фиг. 12 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 6, методика 2.

На фиг. 13 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 6, получение увеличенного количества проведено по методике, описанной в методика 2.

На фиг. 14 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 1 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 6, методика 3.

На фиг. 15 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 3 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 7.

На фиг. 16 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ для кристаллической формы 4 фумарата НМ04, полученной так, как описано в примере 8.

На фиг. 17 представлено сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме у крыс от времени при пероральном введении 3 мг/кг свободного основания НМ04 и 3 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания).

На фиг. 18 представлено сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме у собак от времени при пероральном введении 2 мг/кг свободного основания НМ04 и 2 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания).

На фиг. 19 представлено сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме у крыс от времени после перорального введения доз, равных 3, 10 и 30 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания).

На фиг. 20 представлено сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме у собак от времени после перорального введения доз, равных 3, 10 и 30 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания).

На фиг. 21А представлена зависимость концентрация-ответ для НМ04, полученная в исследовании антагонистической активности с использованием флуоресцентного визуализирующего считывающего устройства для планшетов (ФЛВСП) и с использованием клеток НЕК293, экспрессирующих рецептор GHSR1a человека.

На фиг. 21Б представлена зависимость концентрация-ответ для R011, полученная в исследовании антагонистической активности с использованием ФЛВСП и с использованием клеток НЕК293, экспрессирующих рецептор GHSR1a человека.

На фиг. 21В представлена зависимость концентрация-ответ для НМ04, полученная в исследовании агонистической активности с использованием ФЛВСП и с использованием клеток НЕК293, экспрессирующих рецептор GHSR1a человека.

На фиг. 21Г представлена зависимость концентрация-ответ для R011, полученная в исследовании агонистической активности с использованием ФЛВСП и с использованием клеток НЕК293, экспрессирующих рецептор GHSR1a человека.

На фиг. 21Д представлена зависимость концентрация-ответ для НМ04, полученная в исследовании обратной агонистической активности с использованием инозит-1-фосфата (IP-1).

На фиг. 21Е представлена зависимость концентрация-ответ для R011, полученная в исследовании обратной агонистической активности с использованием инозит-1-фосфата (IP-1).

На фиг. 22 представлена средняя концентрация гормона роста в плазме, наблюдающаяся у крыс при времени, равном 0 и 15 мин после инъекции грелина, в 4 группах, которым вводили: 1) 1 мл/кг физиологического раствора+10 мл/кг 0,5% КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза), ПО (перорально) (n=6); 2) 15 мкг/кг грелина, ВВ (внутривенно)+10 мл/кг 0,5% КМЦ, ПО (n=6); 3) 30 мг/кг фумарата НМ04, ПО, за 2 ч до 15 мкг/кг грелина, ВВ (n=6); 4) 10 мг/кг антагониста грелина R011, ВВ (внутрибрюшинно), за 30 мин до 15 мкг/кг грелина, ВВ (n=6).

На фиг. 23А представлено потребление корма мышами Snord116+/- (ГЕТ (гетерозиготные)) в возрасте 7 месяцев и однопометными мышами дикого типа (ДТ) в возрасте 7 месяцев, определенное через 1 ч после однократного внутрибрюшинного введения 1) разбавителя (n=6); 2) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (n=6); 3) 0,5 мг/кг каберголина (n=6) или 4) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) и 0,5 мг/кг каберголина (n=6). В течение 16 ч до инъекции мыши голодали и после инъекции в неограниченном количестве получали корм.

На фиг. 23Б представлено потребление корма мышами Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 7 месяцев и однопометными мышами дикого типа (ДТ) в возрасте 7 месяцев, определенное через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч и 24 ч после однократного внутрибрюшинного введения 1) разбавителя (n=6); 2) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (n=6); 3) 0,5 мг/кг каберголина (n=6) или 4) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) и 0,5 мг/кг каберголина (n=6). В течение 16 ч до инъекции мыши голодали.

На фиг. 24 представлено потребление корма мышами Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 3 месяцев и однопометными мышами дикого типа (ДТ) в возрасте 3 месяцев, определенное через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч и

24 ч после однократного внутривнутрибрюшинного введения 1) разбавителя (n=6) или 2) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (n=6). В течение 16 ч до инъекции мыши голодали и после инъекции в неограниченном количестве получали корм.

На фиг. 25А представлено потребление корма мышами Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 12 месяцев и однопометными мышами дикого типа (ДТ) в возрасте 12 месяцев, определенное через 1 ч после однократного внутривнутрибрюшинного введения 1) разбавителя (ГЕТ: n=4; ДТ: n=6) или 2) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (ГЕТ: n=4; ДТ: n=6). В течение 16 ч до инъекции мыши голодали и после инъекции в неограниченном количестве получали корм.

На фиг. 25Б представлено потребление корма мышами Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 12 месяцев и однопометными мышами дикого типа (ДТ) в возрасте 12 месяцев, определенное через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч и 24 ч после однократного внутривнутрибрюшинного введения 1) разбавителя (ГЕТ: n=4; ДТ: n=6) или 2) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (ГЕТ: n=4; ДТ: n=6). В течение 16 ч до инъекции мыши голодали и после инъекции в неограниченном количестве получали корм.

На фиг. 26 представлено потребление корма мышами Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 7 месяцев и однопометными мышами дикого типа (ДТ) в возрасте 7 месяцев, определенное через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч и 24 ч после однократного внутривнутрибрюшинного введения 1) разбавителя (n=5) или 2) 30 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (n=5). В течение 16 ч до инъекции мыши голодали и после инъекции в неограниченном количестве получали корм.

На фиг. 27А представлено потребление корма и на фиг. 27Б представлена масса для мышей Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 6 месяцев и однопометных мышей дикого типа (ДТ) в возрасте 6 месяцев, определенные ежедневно после проводимого в течение 10 последовательных дней внутривнутрибрюшинного введения в 07:00 ч 1) растворителя (n=10) или 2) 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (n=10).

На фиг. 28А представлено потребление корма и на фиг. 28Б представлена масса для мышей Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 8 месяцев и однопометных мышей дикого типа (ДТ) в возрасте 8 месяцев, определенные ежедневно после проводимого в течение 5 последовательных дней перорального введения в 07:00 ч 1) растворителя (n=5) или 2) 30 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (n=5).

На фиг. 29А представлено потребление корма во время освещения (ОСВ) и на фиг. 29Б представлено потребление корма во время затемнения (ЗАТ) для мышей Snord116+/- (ГЕТ) в возрасте 8 месяцев и однопометных мышей дикого типа (ДТ) в возрасте 8 месяцев, определенные ежедневно после проводимого в течение 5 последовательных дней перорального введения в 18:00 ч 1) растворителя (n=5) или 2) 30 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) (n=5).

Описание вариантов осуществления

Как кратко описано выше и подробно описано ниже, настоящее изобретение относится к фумарату (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина и его кристаллической форме. Настоящее изобретение также относится к способам получения фумарата и его кристаллических форм, и применению их для приготовления лекарственного средства пригодного для ингибирования GHSR1a.

Подробное описание настоящего изобретения приведено в прилагаемом ниже описании. Хотя при практическом осуществлении и проверке настоящего изобретения можно использовать методики и материалы, сходные с описанными в настоящем изобретении или эквивалентные им, иллюстративные методики и материалы описаны ниже. Другие особенности, объекты и преимущества настоящего изобретения станут понятными из описания и из формулы изобретения. В описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа включает формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Если не приведены другие определения, то все технические и научные термины, использованные в настоящем изобретении, обладают такими же значениями, которые обычно известны специалисту с общей подготовкой в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все патенты и публикации, цитированные в настоящем изобретении, во всей их полноте включены в настоящее изобретение в качестве ссылки.

Одним объектом настоящего изобретения является фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина. По меньшей мере в одном варианте осуществления настоящего изобретения солью является (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина:фумарат состава 1:1.

Соль может находиться в самых разных формах, таких как масло или твердое вещество. Твердое вещество может являться аморфным, кристаллическим веществом или представлять собой их смесь. По меньшей мере в одном варианте осуществления настоящего изобретения не менее 50% соли находится в кристаллической форме. В других вариантах осуществления не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98%, не менее 99% или 100% соли может находиться в кристаллической форме.

Если соль является по меньшей мере частично кристаллической, то кристаллическая форма может быть выбрана из числа следующих: форма 1, форма 2, форма 3 и форма 4.

По меньшей мере в одном варианте осуществления соль содержит кристаллическую форму 1, отличающуюся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 12. В других вариантах осуществления не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98%, не менее 99% и 100% соли может находиться в кристаллической форме 1.

В некоторых вариантах осуществления форма 1 может отличаться полученной с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $7,8 \pm 0,2$, $9,5 \pm 0,2$, $14,3 \pm 0,2$, $16,7 \pm 0,2$, $17,2 \pm 0,2$, $18,5 \pm 0,2$, $18,8 \pm 0,2$, $19,3 \pm 0,2$, $20,0 \pm 0,2$, $20,7 \pm 0,2$, $22,4 \pm 0,2$, $23,2 \pm 0,2$, $25,6 \pm 0,2$, $27,2 \pm 0,2$, $31,7 \pm 0,2$ и $32,4 \pm 0,2$ градусов 2-тета.

По меньшей мере в одном варианте осуществления соль содержит кристаллическую форму 2, отличающуюся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 3. В других вариантах осуществления не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98%, не менее 99% и 100% соли может находиться в кристаллической форме 2.

По меньшей мере в одном варианте осуществления соль содержит кристаллическую форму 3, отличающуюся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 15. В других вариантах осуществления не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98%, не менее 99% и 100% соли может находиться в кристаллической форме 3.

В некоторых вариантах осуществления форма 3 может отличаться полученной с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $7,2 \pm 0,2$, $9,4 \pm 0,2$, $9,7 \pm 0,2$, $10,8 \pm 0,2$, $14,3 \pm 0,2$, $15,1 \pm 0,2$, $16,2 \pm 0,2$, $17,9 \pm 0,2$, $18,7 \pm 0,2$, $18,9 \pm 0,2$, $19,6 \pm 0,2$, $21,5 \pm 0,2$, $22,7 \pm 0,2$, $23,7 \pm 0,2$, $24,3 \pm 0,2$, $25,1 \pm 0,2$, $27,4 \pm 0,2$, $28,7 \pm 0,2$ и $34,9 \pm 0,2$ градусов 2-тета. По меньшей мере в одном варианте осуществления соль содержит кристаллическую форму 3, отличающуюся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 16. В других вариантах осуществления не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98%, не менее 99% и 100% соли может находиться в кристаллической форме 4.

В некоторых вариантах осуществления форма 4 может отличаться полученной с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $12,2 \pm 0,2$, $13,2 \pm 0,2$, $15,0 \pm 0,2$, $15,4 \pm 0,2$, $17,6 \pm 0,2$, $18,1 \pm 0,2$, $19,5 \pm 0,2$, $20,2 \pm 0,2$, $20,9 \pm 0,2$, $21,4 \pm 0,2$, $23,0 \pm 0,2$, $23,4 \pm 0,2$, $24,4 \pm 0,2$, $24,8 \pm 0,2$, $25,9 \pm 0,2$, $27,9 \pm 0,2$, $28,9 \pm 0,2$, $29,6 \pm 0,2$, $30,7 \pm 0,2$ градусов 2-тета. Другим объектом настоящего изобретения является фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель и фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиазин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытый в настоящем изобретении. Фармацевтически приемлемый носитель может дополнительно включать инертный наполнитель, разбавитель или поверхностно-активное вещество.

Фармацевтические композиции можно получить по обычным методикам смешивания, гранулирования или нанесения покрытия и фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, могут содержать от примерно 0,1 до примерно 99%, от примерно 5 до примерно 90 или от примерно 1 до примерно 20% раскрытого соединения в пересчете на массу или на объем.

Другой объект настоящего изобретения включает способы получения фумарата (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиазин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины и его кристаллических форм, подробно описанных в приведенных ниже примерах.

Другим объектом настоящего изобретения является применение фумарата (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиазин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытого в настоящем изобретении для приготовления лекарственного средства для уменьшения сигнальной активности грелина в клетках.

Термин "сигнальная активность грелина" означает любое одно действие или комбинацию действий в прямом направлении, которые происходят, когда грелин связывается с его рецептором или комплексом рецептора.

В некоторых вариантах осуществления клетки обрабатывают *in vitro* фумаратом (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиазин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытым в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетки обрабатывают *in vivo* фумаратом (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиазин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытым в настоящем изобретении.

Другим объектом настоящего изобретения является применение фумарата (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиазин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытого в настоящем изобретении для приготовления лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего патологическим состоянием или нарушением, связанным с увеличением концентрации грелина. Неограничивающий пример патологического состояния или нарушения, связанного с увеличенной концентрацией грелина, может включать нарушения, связанные с чрезмерным потреблением пищи, такие как ком-

пульсивное переедание, ожирение, гиперфагия (неконтролируемый аппетит), возобновление увеличения массы тела после диеты (включая возникающую после диеты гиперфагию), алкогольную зависимость и генетические заболевания, такие как синдром Прадера-Вилли и т.п.

Патологические состояния или нарушения, упомянутые здесь могут быть связаны с увеличением концентрации циркулирующего гормона роста.

Термины "уменьшать" или "ингибировать" означает уменьшать, ослаблять или останавливать действие, функцию или количество по сравнению с соответствующими контролю. В некоторых вариантах осуществления "уменьшать" или "ингибировать" означает возможность обеспечивать общее уменьшение, составляющее 20% или более. В некоторых вариантах осуществления "уменьшать" или "ингибировать" означает возможность обеспечивать общее уменьшение, составляющее 50% или более. В некоторых вариантах осуществления "уменьшать" или "ингибировать" означает возможность обеспечивать общее уменьшение, составляющее 75, 85, 90, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления указанное выше количество ингибируется или уменьшается в течение времени по сравнению со случаем введения дозы контроля (такого как плацебо) в течение такого же периода времени. При использовании в настоящем изобретении "контроль" означает любой образец, стандарт или концентрацию, которые используют для сопоставления. "Контроль" можно получить от здорового или не страдающего заболеванием субъекта. В некоторых примерах "контроль" получают от одного или большего количества здоровых субъектов, которых не включают в исследование или не лечат.

Термин "существенно уменьшенное" означает достаточно высокую степень уменьшения численного значения по сравнению с контрольным численным значением, такую, как разность двух значений, которую специалист в данной области техники считает статистически значимой в контексте биологической характеристики, определяющейся указанными значениями. В некоторых вариантах осуществления существенно уменьшенные численные значения уменьшены по сравнению с контрольным значением на любое значение, равное более примерно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 100%.

В некоторых вариантах осуществления обработка клеток фумаратом (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытым в настоящем изобретении, или введение его субъекту приводит к уменьшению сигнальной активности грелина. В некоторых вариантах осуществления сигнальная активность грелина в клетках или у субъекта уменьшается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% по сравнению с сигнальной активностью грелина, наблюдающейся при отсутствии фумарата (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины или кристаллической (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины.

В некоторых вариантах осуществления сигнальную активность грелина определяют путем измерения концентрации внутриклеточного кальция, определенной путем исследования с использованием флуоресцентного визуализирующего считывающего устройства для планшетов (ФЛВСП). В некоторых вариантах осуществления обработка по меньшей мере одним соединением, выбранным из числа следующих: фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины и кристаллическая (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина, раскрытые в настоящем изобретении, приводит к уменьшению концентрации внутриклеточного кальция.

Исследование с использованием ФЛВСП означает методику детектирования активации связанного с белком G рецептора (в частности, например, GHS-R1a) и стимуляции потока кальция в клетки. Концентрацию внутриклеточного кальция можно определить с использованием чувствительных по отношению к кальцию красителей и флуоресцентного считывающего устройства для планшетов. Дополнительные описания см. в публикации Arkin, Michelle R., et al. (2012). FLIPR™ Assays for GPCR and Ion Channel Targets. In Assay Guidance Manual [Internet] Sittampalam G.S., et al. (Eds).

В некоторых вариантах осуществления сигнальную активность грелина определяют путем измерения концентрации циркулирующего гормона роста. В некоторых вариантах осуществления введение субъекту фумарата (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытого в настоящем изобретении, приводит к уменьшению концентрации циркулирующего гормона роста у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления сигнальную активность грелина определяют путем измерения количества потребляемой пищи. В некоторых вариантах осуществления введение субъекту фумарата (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытого в настоящем изобретении, приводит к уменьшению потребления пищи.

В некоторых вариантах осуществления сигнальную активность грелина определяют путем измерения массы тела. В некоторых вариантах осуществления введение субъекту фумарата (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, раскрытого в настоящем изобретении, приводит к уменьшению массы тела или к стабилизации массы тела.

Термины "лечение" или "лечить" означают методику получения благоприятных или необходимых клинических результатов. Термины "лечение" или "лечить" означают любое введение или нанесение терапевтического средства, предназначенного для лечения заболевания у млекопитающих, включая людей. При использовании в настоящем изобретении благоприятные или необходимые клинические результаты могут включать, но не ограничиваются только ими, любое одно или большее количество следующих: облегчение одного или большего количества симптомов, уменьшение степени проявления патологического состояния, предупреждение или задержка рецидива патологического состояния, задержка или замедление прогрессирования патологического состояния, облегчение протекания патологического состояния, подавление патологического состояния или прогрессирования патологического состояния, остановка развития патологического состояния и ремиссия (частичная или полная) патологического состояния. Термины "лечение" или "лечить" также включают уменьшение патологических последствий патологического состояния. Способы, предлагаемые в настоящем изобретении, включают один или большее количество этих аспектов лечения. В соответствии с приведенным выше, термин "лечение" не означает необходимость 100% устранения всех признаков патологического состояния или нарушения.

Настоящее применение может быть осуществлено путем перорального введения фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем изобретении, предназначенной для лечения патологического состояния или нарушения, связанного с увеличенной концентрацией циркулирующего грелина.

Настоящее применение может быть дополнительно осуществлено путем перорального введения композиции, раскрытой в настоящем изобретении, предназначенной для лечения патологического состояния или нарушения, связанного с увеличенной концентрацией циркулирующего гормона роста.

Терапевтически эффективные количества и дозы при пероральном введении с использованием солей, раскрытых в настоящем изобретении, могут меняться в зависимости от различных факторов, включая подвергающееся лечению патологическое состояние или нарушение, а также возраст, массу тела, возможно, пол и другие влияющие на здоровье пациента факторы, и их можно определить во время проведения лечения. Терапевтически эффективные количества могут находиться в диапазоне от 1 до 500 мг. В качестве неограничивающего примера, композиции для перорального введения могут содержать 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 или 500 мг активного ингредиента, раскрытого в настоящем изобретении.

Аббревиатуры названия, используемые в приведенных ниже примерах и в любых других разделах настоящего изобретения, включают:

Таблица 1

Аббревиатура/Химическое название	Название
атм.	атмосфера (атмосферы)
АЦН	ацетонитрил
Вос	трет-бутоксикарбонил
СDCl ₃	дейтерированный хлороформ
КДИ	1,1'-карбонилдимимдазол
D-КСК	D-камфорсульфоновая кислота
ДХМ	дихлорметан

ДМЭ	диметоксизтан
СО (г.)	газообразный монооксид углерода
ДАБЦО	1,4-диазабцикло[2.2.2]октан
ДИБАЛ-Н	диизобутилалюминийгидрид
ДМА	N,N-диметилацетамид
ДМФ	N,N-диметилформаид
ДМСО	диметилсульфоксид
ДСК	дифференциальная скапирующая калориметрия
экв.	эквивалент(ы)
Et ₃ N	триэтиламин
Et ₂ O	диэтиловый эфир
EtOAc	этилацетат
EtOH	этанол
ГСП	гравиметрический анализ сорбции паров
ч	час(ы)
H ₂ O	вода
HCl	хлористоводородная кислота
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ЖХ-МС/МС	жидкостная хроматография (высокого давления) - тандемная масс-спектрометрия
ИПС	изопропанол
КТП	контроль в технологическом процессе
ВВ	внутривенно
K ₂ CO ₃	карбонат калия
MeOH	метанол
МЭК	метилэтилкетон
MgSO ₄	сульфат магния
МИБК	метилизобутилкетон
мин	минута (минуты)
Na ₂ CO ₃	карбонат натрия
Na ₂ SO ₄	сульфат натрия
NaN	гидрид натрия
NaHCO ₃	бикарбонат натрия
NaOH	гидроксид натрия
NH ₄ HCO ₃	бикарбонат аммония
NH ₄ OH	гидроксид аммония
NMP	N-метил-2-пирролидон
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
ПО	перорально
Pd/C	палладий на угле
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпаллади й(II)
КТ	комнатная температура
ОВ	относительная влажность
СТА	синхронный термический анализ
t-BuOH	трет-бутанол
ТБАА	трет-бутилацетоацетат
ТБМЭ	трет-бутилметилловый эфир
ТГФ	тетрагидрофуран
ПРРГ	порошковая рентгенография

Примеры

Пример 1. Получение и характеристика кристаллической формы 1 свободного основания (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины (НМ04).

Пример 1А. Получение затравочных кристаллов кристаллической формы 1 свободного основания НМ04.

Первый обладающий массой 15 мг образец аморфного свободного основания (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пиразин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, также называющегося НМ04 или Н0900, растворяли в ацетонитриле и второй обладающий массой 15 мг образец аморфного свободного основания НМ04 растворяли в ацетоне. Растворам давали медленно выпариваться в эксикаторе в токе азота. Кристалличность подтверждали с помощью порошковой рентгенографии (ПРРГ). Рентгенограммы ПРРГ (форма 1) образцов свободного основания НМ04, кристаллизованных из раствора в ацетонитриле и из раствора в ацетоне, представлены на фиг. 1А и 1Б (нижняя диаграмма) соответственно.

Пример 1В. Получение увеличенного количества кристаллической формы 1 свободного основания НМ04.

Образец аморфного свободного основания НМ04 растворяли в 0,5 мл ацетона и раствору давали

медленно выпариваться в эксикаторе в токе азота. Через 24 ч получали коричневый маслообразный остаток, в который добавляли несколько затравочных кристаллов формы 1 свободного основания, кристаллизованного из раствора в ацетоне (см. пример 1А), и терли шпателем. Масло затвердело и полученный продукт сушили в вакуумном сушильном шкафу при 50°C в течение 24 ч и получали 95 мг кристаллического свободного основания.

Кристалличность подтверждали с помощью порошковой рентгенографии (ПРРГ), см. фиг. 1Б, верхняя диаграмма. С помощью синхронного термического анализа (СТА) показано, что кристаллическое свободное основание не являлось гидратированным или сольватированным. Температура начала плавления кристаллического свободного основания, определенная с помощью ДСК, составляла примерно 155°C. Исследование с помощью ГСП показало, что продукт являлся в незначительной степени гигроскопичным и обладал обратимым увеличением массы, равным примерно 1,5%, при относительной влажности (ОВ), равной вплоть до 70%, и равным примерно 2%, при ОВ, равной вплоть до 80%. Рассчитанная растворимость кристаллического свободного основания в воде составляла менее 2 мг/мл.

Пример 2. Получение небольшого количества формы 1 фумарата НМ04.

Аморфное свободное основание НМ04 (100 мг) суспендировали в ацетонитриле (2 мл). Добавляли фумаровую кислоту (27 мг), смывая остаточные количества кислоты в реакционную смесь дополнительным количеством ацетонитрила (0,2 мл), и тщательно перемешивали. Смесь осторожно нагревали и быстро осаждалось твердое вещество. Полученную суспензию нагревали с циклическим изменением температуры от 40°C до комнатной температуры в течение ночи (18-24 ч). Продукт отфильтровывали, промывали ацетонитрилом (0,2 мл) и сушили в вакуумном сушильном шкафу при 50°C в течение 24 ч и получали 86 мг продукта-фумарата.

Путем анализа с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) установлено, что продукт-фумарат представлял собой соль состава 1:1. Кристалличность подтверждали с помощью ПРРГ и продукт обозначали, как форма 1 (фиг. 1В). С помощью СТА установлено отсутствие потери массы до плавления, это означает, что продукт не являлся гидратированным или сольватированным. С помощью ДСК обнаружена одна эндотерма, соответствующая температуре начала плавления, равной примерно 172°C. Исследование с помощью ГСП показало, что фумарат являлся гигроскопичным и обладал увеличением массы, равным примерно 2,8%, при относительной влажности (ОВ), равной вплоть до 70%, и равным примерно 4,5%, при ОВ, равной вплоть до 80%. Рассчитанная растворимость фумарата в воде составляла более 2 мг/мл.

Пример 3. Кристаллические формы фумарата НМ04 (формы 1 и 2).

Свободное основание НМ04 (1,5 мг) суспендировали в ацетонитриле (6 мл) и добавляли фумаровую кислоту (0,4 г). Смесь осторожно нагревали и быстро осаждалось твердое вещество. Полученную суспензию нагревали с циклическим изменением температуры от 40°C до комнатной температуры в течение 72 ч. Добавляли дополнительное количество ацетонитрила (1 мл) и продукт отфильтровывали, промывали ацетонитрилом (5×0,2 мл) и сушили в вакуумном сушильном шкафу при 50°C в течение не менее 24 ч до постоянной массы и получали 1,6 г фумарата. Этот кристаллический фумарат НМ04 характеризовали с помощью ПРРГ и он представлял собой форму 1 (фиг. 2).

На фиг. 3 представлена типичная рентгенограмма ПРРГ образца формы 2 фумарата НМ04, полученного после растворения фумарата НМ04 в этаноле и выпаривания растворителя при комнатной температуре в атмосфере азота.

Увеличенное количество формы 2 фумарата НМ04 получали путем проводимого при нагревании растворения 150 мг исходного вещества (форма 1 фумарата НМ04) в 0,45 мл смеси этанол/вода состава 90/10. Раствор выпаривали в эксикаторе в токе азота в течение 96 ч и извлекали твердый продукт. Рентгенограмма ПРРГ для полученного в увеличенном количестве продукта-формы 2 в основном соответствовала продукту, полученному в меньшем количестве, однако не исключена возможность получения смеси с небольшим количеством формы 1. Путем анализа с помощью ЯМР установлено, что продукт соответствовал простой соли. С помощью СТА установлена потеря массы, равная примерно 1,9%, при температуре, равной от 70 до 150°C, это указывает на то, что образец, вероятно, является гидратом. С помощью ДСК обнаружена широкая эндотерма, начинающаяся примерно при 164,5°C, которая соответствует плавлению. С помощью ГСП установлено увеличение массы, равное 3,5%, при ОВ, равной вплоть до 70%, и увеличение массы, равное 4,9%, при ОВ, равной вплоть до 80%. Не обнаружено изменения рентгенограммы ПРРГ после ГСП или выдерживания образца в эксикаторе при 40°C/ ОВ=75% в течение 7 дней.

Сравнительные эксперименты с получением суспензий проводили путем смешивания исходного вещества - формы 1 и полученного в увеличенном количестве вещества - формы 2 при соотношении количеств, составляющем примерно 50:50 (10:10 мг). Смеси встряхивали в 100 мкл различных растворителей или смесей растворителей при комнатной температуре в течение 48 ч. Через 48 ч из каждой суспензии отбирали образец твердого вещества, затем растворитель (растворители) выпаривали и продукт анализировали с помощью ПРРГ для исследования того, протекает ли превращение в одну форму. Полученные суспензии повторяли при 60°C и через 48 ч повторно отбирали образцы. Результаты исследований, проводимых при комнатной температуре и при 60°C, представлены в приведенной ниже табл. 2.

Таблица 2

Растворитель (растворители)	48 ч/КТ	48 ч/60°C
Ацетонитрил	форма 1	форма 1
Ацетонитрил:вода (95:5)	форма 1	не установлено
Этанол	формы 1 и 2	не установлено
Этанол:вода (95:5)	форма 2	масло

Получение сравнительных суспензий в ацетонитриле при комнатной температуре приводило к полному превращению в форму 1. Получение суспензий в этаноле приводило к получению смеси форм и получение в смеси этанол/вода при температуре окружающей среды приводило к превращению в форму 2. Получение сравнительных суспензий в ацетонитриле при 60°C приводило к полному превращению в форму 1. В случае суспензий, полученных в смеси ацетонитрил/вода и в этаноле при 60°C получены неинтерпретированные рентгенограммы ПРРГ (фиг. 4А и 4Б соответственно). Дополнительные исследования сравнительных суспензий не проводили.

Пример 4. Методики анализа для соединений примеров 1-3.

Методики анализа, использовавшиеся для характеристики продуктов, описанных в примерах 1-3, приведены ниже.

СТА проводили с помощью анализатора для проведения ТГА (термогравиметрический анализ)/ДТА (дифференциальный термический анализ) Perkin-Elmer STA 600. Образец (5 мг) нагревали от 25 до 300°C при скорости, равной 10°C/мин, в течение этого времени определяли изменение массы. В качестве продувочного газа использовали азот при скорости потока, равной 20 см³/мин.

Для анализа с помощью ДСК 5 мг образца отвешивали в алюминиевую чашку для ДСК и негерметично закрывали алюминиевой крышкой. Затем образец помещали в прибор для ДСК Perkin-Elmer Jade и выдерживали при 25°C до обеспечения стабильного ответа на тепловой поток. Затем образец нагревали до 300°C при скорости, равной 10°C/мин, и измеряли полученный ответ на тепловой поток. Использовали продувку гелием при скорости, равной 20 см³/мин. До проведения анализа температуру и тепловой поток прибора проверяли с использованием стандарта - индия.

Для анализа с помощью ГСП 15-20 мг образца помещали на весы для исследования сорбции паров IgaSorp (Hiden Analytical Instruments). Затем образец сушили путем поддержания среды, обладающей влажностью, равной 0%, до прекращения изменения массы. Затем образец обрабатывали путем увеличения ОВ от 0 до 90% с шагом значения ОВ, равным 10%, при этом образец выдерживали на каждом шаге до установления равновесия (завершение шага: 99%). После установления равновесия выраженную в % ОВ в приборе повышали на один шаг и процедуру установления равновесия повторяли. После завершения цикла сорбции образец сушили по такой же методике. Затем исследовали изменение массы во время проведения циклов сорбция/десорбция, это позволяло определить гигроскопичность образца.

Анализ с помощью ЯМР проводили в ДМСО-d₆ с использованием прибора Bruker Avance III 400.

Анализ с помощью ПРРГ проводили путем осторожного впрыскивания образца (примерно 2 мг) в обладающий нулевым фоном, отдельный, скошенный, изготовленный из диоксида кремния держатель для образца для ПРРГ. Затем образец помещали в дифрактометр Philips X-Pert MPD и использовали приведенные ниже условия проведения эксперимента.

Анод трубки: Cu.

Напряжение источника: 40 кВ.

Ток трубки: 40 мА.

Длина волны альфа-1: 1,5406 Å.

Длина волны альфа-2: 1,5444 Å.

Начальный угол (2-тета): 4.

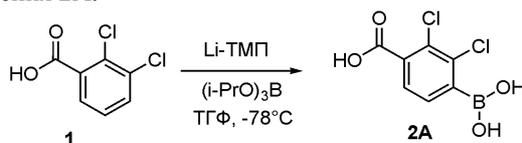
Конечный угол (2-тета): 40.

Непрерывное сканирование.

Пример 5. Синтез увеличенного количества формы 1 фумарата НМ04.

Схема синтеза формы 1 фумарата НМ04, описанного в этом примере, представлена на фиг. 5.

Стадия 1. Синтез соединения 2А.



2,2,6,6-Тетраметилпиперидин (ТМП, 7,20 кг, 51,1 моля, 3,0 экв., содержание воды (КФ (определенной по методике Карла-Фишера))=0,30%) добавляли в реактор объемом 100 л, снабженный датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, и перемешивали при КТ в защитной атмосфере азота. В реактор добавляли ТГФ (50 л) и смесь перемешивали. Сосуд трижды продували азотом и охлаждали до 0°C. К смеси в течение более 1 ч по каплям добавляли n-BuLi (20,4 л, 3,0 экв.; 2,5 М раствор в гексане), поддерживая температуру равной от примерно 0 до примерно 5°C. Раствор становился желтым.

Смесь перемешивали при температуре, равной от примерно 0 до примерно 5°C, в течение 30 мин. Смесь охлаждали до температуры, равной от примерно -78 до примерно -70°C, и получали раствор А.

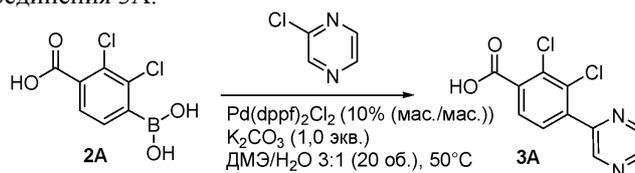
Соединение 1 (3,25 кг, 17,0 моля, 1,0 экв., содержание воды (КФ)=0,03%) растворяли в 15 л ТГФ и получали раствор В.

Раствор В в течение 1 ч по каплям при температуре, равной от примерно -70 до примерно -78°C, добавляли к раствору А и затем перемешивали в течение 30 мин и получали раствор С. К раствору С в течение 10 мин по каплям добавляли триизопропилборат ((i-PrO)₃B) (3,52 кг, 18,7 моля, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при температуре, равной от примерно -70 до примерно -78°C в течение 1 ч. Для остановки реакции в течение 30 мин добавляли HCl (40 л, 3М, 7,0 экв.). Отмечалось повышение температуры на 10°C.

Полученный водный слой отделяли и экстрагировали с помощью EtOAc (40 л). Водный слой отделяли и дважды повторно экстрагировали с помощью EtOAc (35 л, 30 л). Органические слои объединяли и получали примерно 160 л жидкости. Объединенный органический слой дважды промывали с помощью 50 л 1М водного раствора HCl, насыщенного с помощью NaCl. Органический слой концентрировали до объема, равного примерно 5 л, в ротонном испарителе объемом 50 л при температуре, равной примерно 50 до примерно 55°C, при давлении, равном 30-40 мм рт. ст., в течение примерно 8 ч.

Оставшийся EtOAc трижды заменяли на ДМЭ (10 л×3). Органический слой концентрировали в ротонном испарителе объемом 50 л при температуре, равной от примерно 50 до примерно 55°C, при давлении, равном 30-40 мм рт. ст., в течение примерно 6 ч. Каждый раз оставалось примерно 5 л остатка. К остатку добавляли ДМЭ (20 л) и получали темно коричневый 14,2% раствор соединения 2А (3,55 кг в 25 кг раствора; выход 88,8%; чистота 97,4% (ППК (площадь под кривой) определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=1,6 мин); остаточное количество этилацетата: 0,24%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ=8,55 (s, 2H), 7,36 (d, 1H), 7,69 (d, 1H). По такой же методике получали вторую порцию соединения 2А массой 3,29 кг (чистота 95,4%, выход 82,3%, остаточное количество этилацетата: 0,11%).

Стадия 2. Синтез соединения 3А.

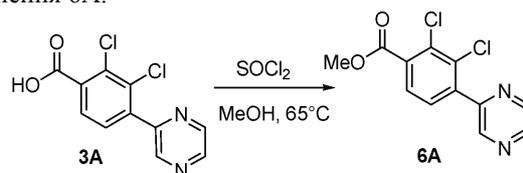


Соединение 2А (2,91 кг в 20,5 кг раствора) при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли в реактор объемом 100 л. Последовательно добавляли ДМЭ (45 мл), 2-хлорпирозин (1,42 кг, 12,4 моля, 1,0 экв.) и Pd(dppf)Cl₂ (10% мас./мас., 291 г) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота. Через смесь в течение 20 мин пропускали азот и сосуд с полученной смесью продували и заполняли азотом (3 раза). Смесь нагревали при 48-52°C в течение 60 мин. В другом реакторе при комнатной температуре K₂CO₃ (2,57 кг, 18,6 моля, 1,5 экв.) добавляли к 22 л воды и затем в течение 10 мин по каплям добавляли к содержащей соединение 2А смеси. Смесь перемешивали при 48-52°C в течение 16 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. Эту процедуру повторяли дважды и все три порции объединяли.

Водный раствор K₂CO₃ (1,0 кг) растворяли в 22 л воды и добавляли к объединенной смеси до установления значения pH, равного 9. К смеси добавляли ТБМЭ (50 л) и ее фильтровали (фильтр из ПЭТФ (полиэтилентерефталат), 3-5 мкм, 205 г/м²) для удаления примерно 50 г липкого коричневого твердого материала (аналог катализатора). Водный слой дважды отделяли и экстрагировали с помощью ТБМЭ (40 л, 40 л).

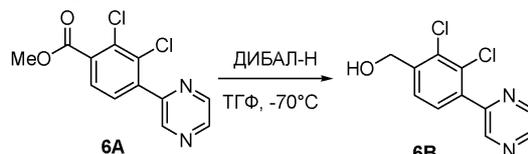
Водный слой объединяли с водным слоем четвертой порции, полученной по описанной выше методике. Значение pH объединенных водных слоев устанавливали равным <3 с помощью HCl (2 н., 48 л). При перемешивании смеси при комнатной температуре в течение 1 ч медленно осаждалось твердое вещество. Смесь фильтровали (фильтр из ПЭТФ, 3-5 мкм, 205 г/м²) в течение 30 мин и получали 20 кг влажного продукта. В реактор объемом 100 л, снабженный верхним перемешивающим устройством, при комнатной температуре добавляли АЦН (40 л). В реактор добавляли 20 кг влажного продукта и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником и перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 4 ч. Реакционную смесь в течение 3 ч (примерно 15°C/ч) охлаждали до комнатной температуры и фильтровали и получали 8,5 кг влажного твердого вещества. Влажное твердое вещество сушили в вакууме (20-30 мм рт. ст.) при 50-55°C в течение 15 ч и получали соединение 3А в виде белесого твердого вещества (6,1 кг; чистота 97,4% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=3,7 мин); выход 83,8%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ = 7,67 (d, 1H), 7,82 (d, 1H), 8,75 (d, 1H), 8,82 (t, 1H), 8,98 (d, 1H), 13,89 (bs, 1H).

Стадия 3. Синтез соединения 6А.



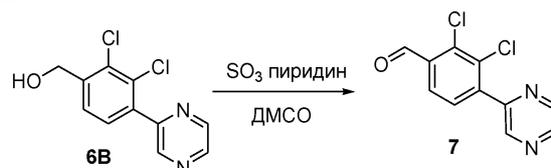
Соединение 3А (6,1 кг, 22,7 моля, 1,0 экв.) добавляли в реактор объемом 100 л, снабженный датчиком температуры, верхним перемешивающим устройством и холодильником. В реактор при комнатной температуре добавляли метанол (92 л). Смесь охлаждали до 0-10°C и при 0-10°C в течение 30 мин по каплям добавляли SOCl_2 (5,4 кг, 45,3 моля, 2,0 экв.). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником (65°C) и перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 15 ч. Получали суспензию. Большую часть растворителя и SOCl_2 удаляли путем отгонки в вакууме до тех пор, пока не осталось примерно 30 л. Смесь концентрировали в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 50-55°C в течение примерно 6 ч. К остатку при температуре, равной от -5 до 15°C, добавляли воду (10 л). При температуре, равной от -5 до 15°C, значение pH устанавливали равным 8-9 водным раствором K_2CO_3 (200 г, растворенный в 2 л воды). Полученный водный слой дважды экстрагировали изопропилацетатом (25 л, 25 л). Объединенные органические слои (примерно 50 кг) промывали с помощью 20 л водного раствора NaHCO_3 . Органический слой отделяли и промывали с помощью 10 л водного раствора NaHCO_3 . Все водные слои объединяли (55,8 кг). Органический слой фильтровали через слой диоксида кремния (30 см) и слой промывали дополнительным количеством изопропилацетата до тех пор, пока соединение 6А не отфильтровывалось через силикагель (примерно 3 ч). Органический слой концентрировали до объема, равного примерно 5 л. К остатку добавляли ТГФ (10 л) и концентрировали в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 50-55°C в течение примерно 3 ч до объема, равного примерно 5 л (3 раза). К концентрированному остатку добавляли 10 л ТГФ и получали концентрированный раствор соединения 6А (15,8 кг; 32,83%, 5,19 кг соединения 6А в растворе; чистота 97,9% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=8,5 мин); выход 80,8%). ^1H -ЯМР (400 МГц, ДМСО): $\delta=3,98$ (s, 3H), 7,54 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 8,63 (d, 1H), 8,72 (t, 1H), 8,94 (d, 1H).

Стадия 4. Синтез соединения 6В.



В атмосфере азота ТГФ (26 л) добавляли в реактор объемом 100 л, снабженный датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством. Добавляли ДИБАЛ-Н (26 кг, 46 молей, 5,0 экв.) и систему трижды продували и заполняли азотом. Смесь охлаждали до температуры, равной от -78 до -70°C, и получали раствор А. При температуре, равной от -78 до -70°C, в атмосфере азота в течение 30 мин по каплям добавляли обладающий комнатной температурой раствор соединения 6А (2,6 кг, 9,2 моля, 1,0 экв.) в 52 л ТГФ. Смесь в течение примерно 5-6 ч нагревали до -30°C. Реакционную смесь перемешивали при температуре, равной от -40 до -30°C, в течение 30 мин. Смесь в течение 1 ч медленно добавляли к 42 л 2 н. раствора HCl при обеспечении максимальной температуры, равной 35°C. Смесь экстрагировали с помощью 26 л изопропилацетата. Органический слой отделяли и промывали с помощью 30 л рассола. Эту процедуру повторяли и обе порции органического слоя объединяли и концентрировали в вакууме от объема, равного примерно 100 л, до равного примерно 5-10 л. В ходе концентрирования медленно образовывалось твердое вещество А. Смесь охлаждали до 5-15°C и перемешивали в течение 1 ч. Смесь фильтровали (30-50 мкм) в течение 30 мин. Твердое вещество сушили в вакууме при 50°C в течение 6 ч и получали соединение 6В в виде коричневого твердого вещества (2,1 кг; чистота 97,5% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=8,6 мин); выход 45,7%). ^1H -ЯМР (400 МГц, ДМСО): $\delta=4,65$ (d, 2H), 5,68 (t, 1H), 7,62 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 8,72 (d, 1H), 8,80 (t, 1H), 8,94 (d, 1H).

Стадия 5. Синтез соединения 7.

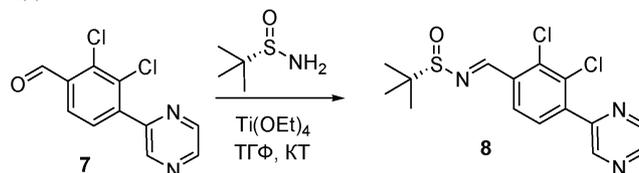


В колбу объемом 50 л, снабженную датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, в атмосфере азота при комнатной температуре добавляли ДМСО (10 л). В атмосфере азота при комнатной температуре добавляли соединение 6В (2,05 кг, 8,04 моля, 1,0 экв.). В атмосфере азота при КТ добавляли Et_3N (8 л) и затем смесь охлаждали до 15-20°C. В отдельной колбе при 5-15°C SO_3 -пиридин (5,1 кг, 32,08 моля, 4,0 экв.) растворяли в 10 л ДМСО и примерно при 20°C в течение 3,5 ч по каплям до-

бавляли к смеси. Реакционную смесь переносили в 70 л смеси лед-вода. Суспензию перемешивали при 0-10°C в течение 1 ч и фильтровали в течение 1,5 ч (фильтр из ПЭТФ, 3-5 мкм, 205 г/м²) с помощью центрифуги и получали соединение 7 в виде коричневого твердого вещества. Твердое вещество при комнатной температуре растворяли в 35 л ДХМ. Полученный содержащий ДХМ слой промывали с помощью 5 л рассола.

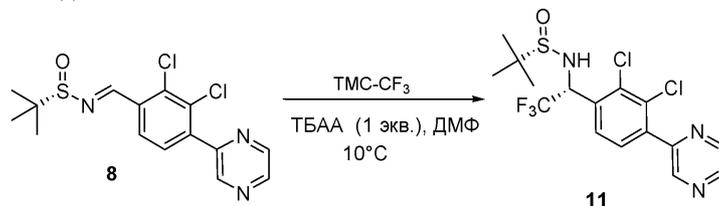
Органический слой отделяли и концентрировали в вакууме при 40-45°C досуха и получали соединение 7 в виде коричневого твердого вещества (2,33 кг; чистота 96,3% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=9,2 мин); выход 93,5%). ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ=7,67 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 8,67 (d, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,99 (d, 1H), 10,56 (s, 1H).

Стадия 6. Синтез соединения 8.



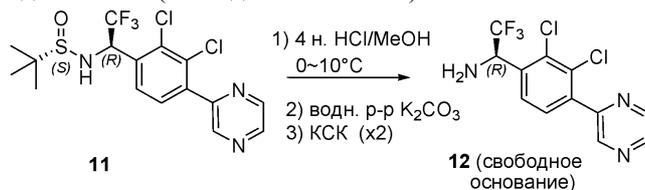
В колбу объемом 50 л, снабженную датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, в атмосфере азота при комнатной температуре добавляли ТГФ (23 л). В колбу в атмосфере азота последовательно добавляли соединение 7 (2,3 кг, 9,1 моля, 1,0 экв.) и (S)-2-метилпропан-2-сульфинамид (1,21 кг, 10 молей, 1,1 экв.). В колбу в атмосфере азота при 30-35°C в течение 1 ч по каплям добавляли Ti(OEt)₄ (6,22 кг, 27,3 моля, 3,0 экв.). Систему трижды продували азотом и затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. К реакционной смеси добавляли изопропилацетат (40 л). Затем всю реакционную смесь при перемешивании при КТ медленно добавляли к 20 л рассола. Образовывалось большое количество твердого вещества и наблюдали выделение тепла. Твердое вещество (примерно 18 кг) отфильтровывали с использованием центрифуги и затем твердое вещество повторно суспендировали в 20 л изопропилацетата в течение 20 мин и повторно отфильтровывали и получали немного меньшее количество твердого вещества (17,3 кг). Затем фильтраты объединяли и промывали с помощью 20 л рассола. Органический слой отделяли и концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 40-50°C в течение примерно 4 ч для удаления растворителей и получали коричневое масло (соединение 8). Масло растворяли в ДМФ и получали черный раствор (7,36 кг; 40,1%; 3,0 кг соединения 8 в растворе; чистота 92,1% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=9,7 мин); выход >100%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ=1,30 (s, 9H), 7,59 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,73 (m, 1H), 8,97 (s, 1H), 9,10 (s, 1H).

Стадия 7. Синтез соединения 11.



В колбу объемом 50 л, снабженную датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, в атмосфере азота при 15°C добавляли ДМФ (26 л, 10 об./мас.). В колбу в атмосфере азота последовательно добавляли соединение 8 (7,3 кг раствора в ДМФ, содержащего 2,9 кг, 8,1 моля, 1,0 экв.) и ТБАА (2,44 кг, 8,1 моля, 1,0 экв.). Смесь охлаждали до 0-10°C. Затем в колбу при 0-10°C в течение 60 мин добавляли ТМС-CF₃ (ТМС=триметилсилан, 2,88 кг, 20,3 моля, 2,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали в защитной атмосфере азота при 0-5°C в течение 3 ч. К смеси добавляли изопропилацетат (60 л), затем при перемешивании при 5-25°C добавляли 45 л NaHCO₃. Органический слой отделяли, трижды промывали с помощью NaHCO₃ (30 л×3), и смесь массой 60 кг концентрировали и получали 2,5 кг коричневого масла. Маслообразный продукт растворяли в 20 л ТБМЭ и фильтровали в течение 2 ч через слой силикагеля (толщина примерно 40 см, диаметр 30 см) и получали 2,14 кг соединения 11 в виде раствора в ТБМЭ. Раствор концентрировали при 45-50°C досуха и получали соединение 11 в виде черного масла (1,85 кг; чистота 85,2% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=9,1 мин, 9,6 мин для диастереоизомера); выход 53,6%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ=1,33 (s, 9H), 3,82-3,85 (d, 1H), 5,61-5,66 (m, 1H), 7,53-7,60 (m, 2H), 8,63-8,64 (d, 1H), 8,71-8,72 (m, 1H), 8,95 (s, 1H).

Стадия 8. Синтез соединения 12 (свободное основание).



В реактор объемом 50 л, снабженный датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, в атмосфере азота при 25°C добавляли соединение 11 (1,8 кг, 4,23 моля, 1,0 экв., неочищенное). Для растворения соединения 11 добавляли безводный MeOH (18 л). Затем при 25-30°C в течение 10 мин по каплям добавляли смесь MeOH/HCl (18 л, 1 н.) и смесь перемешивали при 25-30°C в течение 1 ч. К реакционной смеси добавляли воду (15 л) и смесь концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 45-50°C в течение примерно 4 ч для удаления растворителя. Значение pH смеси устанавливали равным 10 с помощью 5 л раствора K₂CO₃. Затем к смеси добавляли 20 л EtOAc и органический слой отделяли и водный слой дважды экстрагировали с помощью EtOAc (15 л×2). Органические слои объединяли и промывали с помощью 10 л рассола. Объединенные органические слои содержали 996 г соединения 12 в виде раствора в 40 кг EtOAc (чистота 84% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=2,8 мин). Органические слои концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 45-50°C в течение примерно 3 ч и получали 7,5 кг соединения 12 в виде раствора в EtOAc (чистота 83% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=2,7 мин)).

В отдельный реактор объемом 50 л, снабженный датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, добавляли D-КСК (930 г, 4,0 моля, 1,0 экв. в пересчете на 1,26 кг соединения 12) и перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. В реактор последовательно добавляли EtOAc (10 л) и затем раствор соединения 12 в EtOAc (1,26 кг, 3,9 моля, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и медленно образовывалась суспензия. Смесь фильтровали с помощью центрифуги и промывали с помощью EtOAc и получали 2,3 кг соединения 12 в виде почти белого твердого вещества (чистота 96,0%).

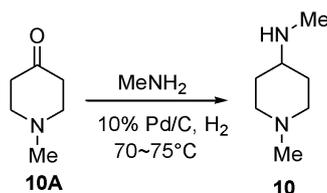
В колбу объемом 50 л последовательно добавляли твердый продукт, 20 л EtOAc и 10 л 10% водного раствора K₂CO₃ и перемешивали при комнатной температуре до исчезновения твердого вещества (pH 9-10). Органический слой отделяли и водный слой дважды экстрагировали с помощью EtOAc (10 л×2). Органические слои объединяли (примерно 32 кг) и промывали с помощью 10 л рассола. Органический слой содержал 716 г соединения 12 в 31,8 кг раствора.

Органический слой концентрировали в вакууме при 45-50°C до объема, равного примерно 8 л. К органическому слою добавляли активированный уголь (200 г) и смесь перемешивали при 60-70°C в течение 1 ч, охлаждали до комнатной температуры и фильтровали в течение 30 мин с использованием воронки Бюхнера и фильтровальной бумаги (размер пор: 30-50 мкм) для удаления активированного угля. Смесь концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 45-50°C в течение примерно 3 ч и получали 710 г соединения 12 в виде желтого твердого вещества (чистота 99,4%).

В реактор объемом 10 л, снабженный датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, последовательно добавляли D-КСК (410 г, 1,77 моля, 1,0 экв. в пересчете на 680 г соединения 12), 3,4 л iPrOH и 68 мл воды и перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. Смесь кипятили с обратным холодильником (84°C) и через 1 ч получали раствор А. Соединение 12 (680 г) растворяли в 3,4 л iPrOH и одной порцией добавляли к раствору А. Образовывался прозрачный раствор и температура понижалась до 65°C. Смесь перемешивали при 65°C в течение примерно 15 мин, затем образовывалось твердое вещество. Смесь в течение 2 ч охлаждали до 10°C, перемешивали при 10°C в течение еще 30 мин и фильтровали в течение 30 мин с использованием воронки Бюхнера и фильтровальной бумаги (размер пор: 30-50 мкм) и получали 1,1 кг белого твердого вещества.

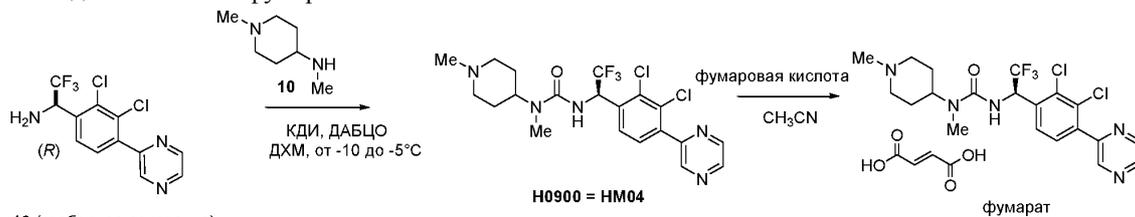
В колбу объемом 20 л последовательно добавляли EtOAc (10 л), 1,1 кг белого твердого продукта и 5 л 10% раствора K₂CO₃ и перемешивали в течение 5 мин. Твердое вещество растворялось (pH 9-10). Слой, содержащий EtOAc, отделяли и водный слой дважды экстрагировали с помощью EtOAc (каждый раз по 5 л). Органические слои объединяли (примерно 20 л), промывали с помощью 5 л рассола и концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 45-55°C в течение примерно 3 ч для удаления большей части растворителя и до тех пор, пока масса остатка не становилась равной 1 кг. К смеси добавляли гептаны (1 л) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь фильтровали в течение 30 мин с использованием воронки Бюхнера и фильтровальной бумаги (размер пор: 30-50 мкм) и получали 419 г соединения 12 (свободное основание) в виде белого твердого вещества (чистота 99,7%). Фильтрат концентрировали и получали 135 г соединения 12 в виде желтого твердого вещества (чистота 98,7%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ=1,85 (bs, 2H), 5,17 (m, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 8,62 (d, 1H), 8,70-8,71 (m, 1H), 8,93 (s, 1H). Продукты объединяли и получали выход соединения 12, равный 40,7%.

Стадия 9. Синтез соединения 10.



В автоклавный реактор объемом 10 л в атмосфере азота при комнатной температуре добавляли Pd/C (40 г, 5% (мас./мас.)). В реактор последовательно добавляли ТГФ (2 л), 2 л метиламина (27-30% спиртовой раствор, 2,1 экв.), и 800 г соединения 10А (7 молей, 1,0 экв.). Систему трижды продували водородом. Смесь перемешивали при давлении водорода (равном 50 фунт-сила/дюйм²) при 70-75°C в течение ночи и затем фильтровали в течение 10 мин с использованием воронки Бюхнера и фильтровальной бумаги (размер пор: 30-50 мкм) для удаления Pd/C. Фильтрат концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 45-50°C в течение примерно 3 ч и получали 933 г желтого масла. Смесь перегоняли без использования колонки при атмосферном давлении и порцию, которая отгонялась при 140-170°C, собирали и получали 763 г соединения 10 в виде бесцветного масла (чистота 98,6% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=4,8 мин); выход 84,2%; количество остаточного этанола: 8000 част./млн). Часть масла (563 г) перегоняли с использованием колонки длиной 3 см при атмосферном давлении и порцию, которая отгонялась при 140-170°C, собирали и получали 510 г соединения 10 (выход 75,8%; количество остаточного этанола: 134 част./млн). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ=0,82 (bs, 1H), 1,10-1,12 (q, 2H), 1,66 (d, 2H), 1,73-1,81 (t, 2H), 2,05 (s, 3H), 2,08-2,19 (m, 1H), 2,22 (s, 3H), 2,60 (d, 2H).

Стадия 10. Синтез фумарата НМ04.



В реактор объемом 3 л, снабженный датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, последовательно добавляли ДХМ (1 л), 200 г КДИ (1,23 моля, 2,0 экв.) и 35 г ДАБЦО (0,31 моля, 0,5 экв.) и перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. Смесь охлаждали до температуры, равной от -10 до -5°C. Соединение 12 (200 г) растворяли в 1 л ДХМ и в течение 1 ч по каплям добавляли к смеси, затем перемешивали при температуре, равной от -10 до -5°C в течение 16 ч. При температуре, равной от -10 до 0°C, в течение 10 мин добавляли соединение 10 (159 г, 1,24 моля, 2,0 экв.). Затем смесь нагревали до 0-5°C и выдерживали в течение 2 ч. Смесь концентрировали в вакууме при 40-45°C до объема, равного примерно 1 л. К остатку добавляли HCl (1 л 1 н. раствора) и концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 45-50°C в течение примерно 2 ч для удаления ДХМ. К остатку добавляли еще 3 л 1 н. раствора HCl и трижды экстрагировали с помощью ТБМЭ (4 л, 2 л, 2 л). Значение pH водного слоя медленно устанавливали равным 9-10 с помощью 20% водного раствора K₂CO₃ (примерно 1,5 л) и экстрагировали с помощью ДХМ (2 лх3). Органические слои объединяли (примерно 4 л) и трижды промывали 0,25 н. раствором KН₂РO₄ (1,2 лх3). Органический слой промывали с помощью 2 л рассола для обеспечения нейтральной среды и концентрировали в роторном испарителе в вакууме (30-40 мм рт. ст.) при 45-50°C в течение примерно 2 ч до массы, равной 450 г (335 мл). К остатку добавляли ТМБЭ (1,5 л) и перегоняли до тех пор, пока не собирали 500 мл жидкости. Эту стадию повторяли четырежды путем добавления 500 мл ТБМЭ и сбора 500 мл дистиллята, за исключением того, что при последней перегонке собирали 330 мл жидкости. Примерно 1-1,2 л остатка оставалось в колбе. Остаток медленно охлаждали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь фильтровали, дважды промывали с помощью ТБМЭ (400 млх2) и сушили и получали 192 г свободного основания НМ04 в виде светло-желтого твердого вещества (чистота 99,3% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=11,0 мин)). Оставшийся на стенках продукт растворяли в ДХМ и концентрировали в вакууме и получали 22 г свободного основания НМ04 в виде коричневого липкого масла (чистота 97,6%). Фильтрат концентрировали в вакууме и получали 22,5 г желтого твердого вещества (чистота 94,0%).

В колбу объемом 3 л, снабженную датчиком температуры и верхним перемешивающим устройством, последовательно добавляли свободное основание НМ04 (187 г, 0,39 моля, 1,0 экв., чистота 99,3%) и 1,9 л АЦН и перемешивали в атмосфере азота при 15°C и получали светло-желтую суспензию. В колбу добавляли фумаровую кислоту (45,6 г, 0,39 моля, 1,0 экв.) и через 1 мин образовывалась белая суспензия. Реакционную суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали (15-20 мкм, зола <0,15), дважды промывали с помощью АЦН (50 млх2) и сушили в вакууме при 50°C в течение

6 ч и получали 207 г фумарата НМ04 в виде светло-желтого твердого вещества (чистота 99,4% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=11,1 мин); выход 57,8%; количество остаточного АЦН: 3100 част./млн). Фильтрат концентрировали в вакууме и получали 20,1 г фумарата НМ04 в виде светло-желтого твердого вещества (чистота 97,3%).

Часть продукта (117 г) дополнительно сушили в вакуумном сушильном шкафу (20-40 мм рт. ст.) для уменьшения содержания остаточного ацетонитрила. После сушки при 60°C в течение 6 ч, 15 ч и 72 ч; и при 65°C в течение 18 ч содержание остаточного ацетонитрила составляло 3100 част./млн, 2570 част./млн, 1300 част./млн и 256 част./млн соответственно. После сушки выделяли 98 г фумарата НМ04 (чистота 99,4% (ППК определяли с помощью ВЭЖХ, время удерживания=11,0 мин)); ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ=1,49-1,58 (m, 2H), 1,81-1,92 (m, 2H), 2,44-2,53 (m, 5H), 2,78 (s, 3H), 3,12 (m, 2H), 4,06-4,13 (m, 1H), 6,36-6,41 (m, 1H), 6,55 (s, 2H), 7,47 (d, 1H), 7,73 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,75 (d, 1H), 8,81-8,82 (m, 1H), 8,99 (d, 1H). Количество фумарата НМ04, выделенного после сушки части порции, равно 98 г, экстраполировали на всю порцию и рассчитано, что приблизительный выход для стадии 10 составлял 48%.

Проводили анализ продуктов - фумаратов НМ04, полученных после сушки при 60°C в течение 6 ч, 15 ч и 72 ч; и при 65°C в течение 18 ч с помощью ПРРГ (см. фиг. 6-9, соответственно). Рентгенограмма ПРРГ указывала на то, что продукт - фумарат НМ04 соответствовал форме 1.

Пример 6. Усовершенствованная методика синтеза формы 1 фумарата НМ04.

Рассчитано, что общий выход фумарата НМ04, полученного на стадии 10 примера 5, составлял примерно 48%. Для увеличения общего выхода исследовали усовершенствованную методику синтеза, в которой отсутствовала стадия выделения свободного основания НМ04. В частности, изменяли стадию 10 методики, описанной в примере 5, представленной на фиг. 5. Схема усовершенствованной методики синтеза, начиная со стадии 9 примера 5, представлена на фиг. 10.

Усовершенствованная методика 1 получения фумарата НМ04: В инертной атмосфере в реактор объемом 1 л последовательно добавляли ДХМ (121,4 г), КДИ (20,0 г, 123 ммоль, 2 экв.) и ДАБЦО (3,5 г, 31 ммоль). Смесь охлаждали до -10°C. В отдельный сосуд помещали раствор, содержащий ДХМ (132,5 г) и соединение 12 (20,0 г, 62,1 ммоль), и перемешивали с получением раствора. Этот раствор в течение 33 мин по каплям добавляли в реактор объемом 1 л, поддерживая внутреннюю температуру, равной от -10 до -5°C. После окончания добавления сосуд промывали с помощью ДХМ (7,0 г), который затем добавляли к реакционной смеси. После перемешивания в течение ночи (19 ч) и обеспечения положительного КТП в течение 15 мин добавляли соединение 10 (1 5,9 г, 124 ммоль, 2 экв.) и сосуд промывали с помощью ДХМ (9,0 г). После нагревания до 0°C, перемешивания в течение 1 ч, обеспечения положительного КТП и перемешивания в течение еще 1,5 ч смесь нагревали до комнатной температуры и добавляли воду (200,1 г). Водный слой отделяли и органический слой дважды экстрагировали 1 н. раствором HCl (201, 200 г). Объединенные водные слои, содержащие продукт, промывали с помощью ТБМЭ (148 г). После удаления органического слоя к водному слою добавляли ДХМ (265,0 г) и 50% раствор K₂CO₃ (примерно 240 мл) до установления значения pH, равного 9,61.

Тем временем получали раствор KN₂PO₄ (8,2 г) в воде (240 г). К органическому слою, содержащему продукт, добавляли раствор KN₂PO₄ до установления значения pH, равного 7,12 (142,2 г). После отделения водного слоя органический слой промывали водой (200 г). После отделения водного слоя органический слой выпаривали при 50°C. Добавляли АЦН (314,4 г) и растворитель повторно отгоняли при 70-75°C в вакууме. Добавляли АЦН (235,8 г) и растворитель повторно отгоняли в вакууме. Добавляли АЦН (141,5 г), полученный раствор фильтровали через тонкий фильтр и фильтр промывали с помощью АЦН (16 г). После нагревания до 60°C к раствору добавляли фумаровую кислоту (7,2 г, 62 ммоль), это приводило к образованию белого осадка. После проводимого в течение 1 ч охлаждения до 20°C суспензию фильтровали и дважды промывали с помощью ТБМЭ (2×30 г). После сушки на фильтре в токе азота получали 70,7 г влажного неочищенного продукта. Его в течение 1 ч суспендировали в ТБМЭ (177,0 г), отфильтровывали и промывали с помощью ТБМЭ (70 г). После сушки на фильтре в токе азота получали 33,0 г влажного продукта. Нагревание при 50°C в вакууме давало сухой продукт - фумарат НМ04 в виде белого порошкообразного вещества (21,1 г; чистота по данным ВЭЖХ: 99,8%; выход 57%). Анализ с помощью ПРРГ подтверждал, что продукт являлся формой 1 (см. фиг. 11).

Анализ с помощью ПРРГ, описанный в примерах 6, 7 и 8, проводили с использованием дифрактометра X'Pert PRO PANalytical и приведенных ниже условий проведения эксперимента.

Анод трубки: Cu.

Напряжение трубки: 40 кВ.

Ток трубки: 40 мА.

Длина волны альфа-1: 1,5406 Å.

Длина волны альфа-2: 1,5444 Å.

Начальный угол (2-тета): 3.

Конечный угол (2-тета): 40.

Время счета: 12700 с.

Режим сканирования: непрерывное сканирование.

Усовершенствованная методика 2 получения фумарата НМ04: Усовершенствованную методику, описанную выше, дополнительно оптимизировали с целью использования хорошей способности к кристаллизации фумарата НМ04. В дополнение к отсутствию выделения свободного основания и выделения продукта - фумарата НМ04 непосредственно после добавления АЦН и фумаровой кислоты, в этой методике также не проводили обработку свободного основания путем экстракции с помощью кислоты/основания. Избыток фумаровой кислоты удаляли из суспензии в ТБМЭ.

В инертной атмосфере в реактор объемом 1 л последовательно добавляли ДХМ (120 г), КДИ (20,1 г, 124 ммоль, 2 экв.) и ДАБЦО (3,5 г, 31 ммоль). Смесь охлаждали до -10°C . В отдельный сосуд помещали раствор, содержащий ДХМ (133,8 г) и соединение 12 (20,1 г, 62,4 ммоль), и перемешивали с получением раствора. Этот раствор в течение 39 мин по каплям добавляли в реактор объемом 1 л, поддерживая внутреннюю температуру, равной от -10 до -5°C . После окончания добавления сосуд промывали с помощью ДХМ (7 г), который затем добавляли к реакционной смеси. После перемешивания в течение ночи (18 ч) и обеспечения положительного КТП в течение 15 мин добавляли соединение 10 (15,9 г, 124 ммоль, 2 экв.) и сосуд промывали с помощью ДХМ (7 г). После нагревания до 0°C , перемешивания в течение 1 ч и обеспечения положительного КТП к смеси добавляли воду (200 г) и нагревали до комнатной температуры.

Тем временем получали раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (13,8 г) в воде (402 г). Водный слой отделяли и к органическому слою, содержащему продукт, добавляли раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ до установления значения pH, равного 7. После отделения водного слоя органический слой промывали водой (200 г). После отделения водного слоя органический слой фильтровали через тонкий фильтр и фильтр промывали с помощью АЦН (64 г). К раствору добавляли фумаровую кислоту (7,2 г, 62 ммоль), это приводило к образованию белого осадка, который отфильтровывали и дважды промывали с помощью АЦН ($2 \times 31,5$ г). После сушки на фильтре в токе азота получали 44,5 г влажного неочищенного продукта. Его в течение 1 ч суспендировали в ТБМЭ (266,8 г), отфильтровывали и дважды промывали с помощью ТБМЭ (2×30 г). После сушки на фильтре в токе азота получали 45,0 г влажного продукта. Сушка при 60°C в вакууме давала сухой продукт - фумарат НМ04 в виде белого порошкообразного вещества (25,2 г; чистота по данным ВЭЖХ: 99,6%; выход 68%). Анализ с помощью ППРГ подтверждал, что продукт являлся формой 1 (см. фиг. 12).

Получение увеличенного количества фумарата НМ04 по методике 2: В инертной атмосфере в реактор объемом 2 л последовательно добавляли ДХМ (418 г), КДИ (70,5 г, 435 ммоль, 2 экв.) и ДАБЦО (12,4 г, 111 ммоль). Смесь охлаждали до -10°C . В отдельный сосуд помещали раствор, содержащий ДХМ (465 г) и соединение 12 (70,0 г, 217 ммоль), и перемешивали с получением раствора. Этот раствор в течение 24 мин по каплям добавляли в реактор объемом 2 л, поддерживая внутреннюю температуру, равной от -10 до -5°C . После окончания добавления сосуд промывали с помощью ДХМ (25 г), который затем добавляли к реакционной смеси. После перемешивания в течение ночи (20 ч) и обеспечения положительного КТП в течение 15 мин добавляли соединение 10 (55,7 г, 434 ммоль, 2 экв.) и сосуд промывали с помощью ДХМ (24 г). После нагревания до 0°C , перемешивания в течение 1,5 ч и обеспечения положительного КТП к смеси добавляли воду (700 г) и нагревали до комнатной температуры.

Тем временем получали раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (13,8 г) в воде (402 г). Водный слой отделяли и к органическому слою, содержащему продукт, добавляли раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ до установления значения pH, равного 7,03. После отделения водного слоя органический слой промывали водой (700 г). После отделения водного слоя органический слой фильтровали через тонкий фильтр и фильтр промывали с помощью АЦН (220,5 г). К раствору добавляли фумаровую кислоту (25,3 г, 218 ммоль), это приводило к образованию белого осадка, который отфильтровывали и промывали с помощью АЦН (111 г). После сушки на фильтре в токе азота продукт суспендировали в ТБМЭ (933 г) в течение 80 мин, отфильтровывали и дважды промывали с помощью ТБМЭ (2×104 г). После сушки на фильтре в токе азота получали 80,8 г влажного продукта. Сушка при 60°C в вакууме давала сухой продукт - фумарат НМ04 в виде белого порошкообразного вещества (78,0 г; чистота по данным ВЭЖХ: 99,5%; выход 61%). Анализ с помощью ППРГ подтверждал, что продукт являлся формой 1 (см. фиг. 13).

Усовершенствованная методика 3 получения фумарата НМ04: В инертной атмосфере в реактор объемом 1 л последовательно добавляли ДХМ (120 г), КДИ (20,2 г, 125 ммоль, 2 экв.) и ДАБЦО (3,5 г, 31 ммоль). Смесь охлаждали до -20°C . В отдельный сосуд помещали раствор, содержащий ДХМ (133 г) и соединение 12 (20,0 г, 62,1 ммоль), и перемешивали с получением раствора. Этот раствор в течение 35 мин по каплям добавляли в реактор объемом 1 л, поддерживая внутреннюю температуру, равной от -20 до -15°C . После окончания добавления сосуд промывали с помощью ДХМ (7,2 г), который затем добавляли к реакционной смеси. После перемешивания в течение ночи (24 ч) и обеспечения положительного КТП в течение 10 мин добавляли соединение 10 (15,9 г, 124 ммоль, 2 экв.) и сосуд промывали с помощью ДХМ (7,0 г). После нагревания до 0°C , перемешивания в течение 1 ч и обеспечения положительного КТП к смеси добавляли воду (200 г) и нагревали до комнатной температуры.

Тем временем получали раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (13,7 г) в воде (402 г). Водный слой отделяли и к органическому слою, содержащему продукт, добавляли раствор $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (311,1 г) до установления значения pH, равного 7. После отделения водного слоя органический слой промывали водой (200 г). После отделения

водного слоя органический слой фильтровали через тонкий фильтр и фильтр промывали с помощью АЦН (63 г). К раствору добавляли фумаровую кислоту (7,2 г, 62 ммоль), это приводило к образованию белого осадка, который отфильтровывали и промывали с помощью АЦН (32 г). После сушки на фильтре в токе азота получали 53,7 г влажного неочищенного продукта. Его суспендировали в ТБМЭ (267,0 г) в течение 40 мин, отфильтровывали и дважды промывали с помощью ТБМЭ (2×30 г). После сушки на фильтре в токе азота получали 41,8 г влажного продукта. Сушка при 60°C в вакууме давала сухой продукт - фумарат НМ04 в виде белого порошкообразного вещества (28,1 г; чистота по данным ВЭЖХ: 99,7%; выход 76%). Анализ с помощью ПРРГ подтверждал, что продукт являлся формой 1 (см. фиг. 14).

Пример 7. Синтез формы 3 фумарата НМ04.

В инертной атмосфере в реакторе объемом 1 л свободное основание НМ04 (16,0 г 33,6 ммоль) растворяли в АЦН (251 г). После нагревания до 60°C к раствору добавляли фумаровую кислоту (3,9 г, 33,6 ммоль) и промывали с помощью АЦН (2,6 г), это приводило к образованию белого осадка. После охлаждения в течение 2 ч до 20°C продукт отфильтровывали. После сушки на фильтре в токе азота получали 6,4 г влажного продукта. Сушка при 60°C в вакууме давала сухой продукт - фумарат НМ04 в виде белого порошкообразного вещества. Путем анализа с помощью ПРРГ идентифицировали другую кристаллическую форму, форму 3 (см. фиг. 15).

Пример 8. Синтез формы 4 фумарата НМ04.

В инертной атмосфере в реактор объемом 1 л последовательно добавляли ДХМ (120 г), КДИ (20,0 г, 123 ммоль, 2 экв.) и ДАБЦО (3,5 г, 31 ммоль). Смесь охлаждали до -10°C. В отдельный сосуд помещали раствор, содержащий ДХМ (133 г) и соединение 12 (20,0 г, 62,1 ммоль), и перемешивали с получением раствора. Этот раствор в течение 35 мин по каплям добавляли в реактор объемом 1 л, поддерживая внутреннюю температуру, равной от -10 до -5°C. После окончания добавления сосуд промывали с помощью ДХМ (7,0 г), который затем добавляли к реакционной смеси. После перемешивания в течение ночи (18,5 ч) и обеспечения положительного КТП в течение 10 мин добавляли соединение 10 (15,8 г, 123 ммоль, 2 экв.) и сосуд промывали с помощью ДХМ (6,8 г). После нагревания до 0°C, перемешивания в течение 1 ч, обеспечения положительного КТП и перемешивания в течение еще 20 мин смесь нагревали до комнатной температуры и к ней добавляли воду (200 г). Водный слой отделяли и органический слой дважды экстрагировали 1 н. раствором HCl (2×200 г). Объединенные водные слои, содержащие продукт, промывали с помощью ТБМЭ (148 г). После отделения органического слоя к водному слою добавляли ДХМ (265,0 г) и 50% раствор K₂CO₃ (примерно 240 мл) до установления значения pH, равного 9,66.

Тем временем получали раствор KN₂PO₄ (8,2 г) в воде (240 г). К органическому слою, содержащему продукт, добавляли раствор KN₂PO₄ (138,2 г) до установления значения pH, равного 7,10. После отделения водного слоя органический слой промывали водой (200 г). После отделения водного слоя органический слой выпаривали при 40°C. Добавляли ТБМЭ (370 г) и повторно перегоняли при 65°C в вакууме до тех пор, пока не отгоняли 10 объемов (собирали 218,5 г растворителя). К раствору добавляли фумаровую кислоту (7,2 г, 62 ммоль), это приводило к образованию белого осадка. После охлаждения в течение 2 ч до 20°C и выдерживания при этой температуре в течение 15 ч суспензию фильтровали, маточные растворы один раз рециркулировали и продукт промывали с помощью ТБМЭ (33 г). После сушки на фильтре в токе азота получали 26,5 г влажного продукта. Сушка при 50-60°C в вакууме давала сухой продукт - фумарат НМ04 в виде белого порошкообразного вещества (22,3 г; чистота по данным ВЭЖХ: 99,9%; выход 61%). Путем анализа с помощью ПРРГ идентифицировали другую кристаллическую форму, форму 4 (см. фиг. 16).

Пример 9. Сопоставление фармакокинетики при пероральном введении свободного основания НМ04 и фумарата НМ04 у крыс и собак.

Сопоставляли фармакокинетику НМ04 в плазме самцов крыс Sprague Dawley, которым вводили перорально одну дозу, равную 3 мг/кг НМ04 (в пересчете на массу свободного основания), приготовленную в растворе, содержащем 10% ДМАА (диметилацетамид), 6% Solutol и 84% 3ФФ (забуференный фосфатом физиологический раствор), с использованием свободного основания НМ04 или фумарата НМ04. Образцы крови отбирали через установленные промежутки времени и с помощью ЖХ-МС/МС определяли концентрацию НМ04 в плазме. Сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме от времени у крыс, которым перорально вводили свободное основание НМ04 и фумарат НМ04, представлено на фиг. 17.

Результаты фармакокинетического анализа представлены в приведенной ниже таблице 3. Биологическую доступность при введении 3 мг/кг свободного основания НМ04 рассчитывали, как отношение среднего значения ППК при пероральном введении к среднему значению ППК, равному 990,3±24,6 нг×ч/мл, определенному после внутривенного введения 3 мг/кг свободного основания НМ04 трем самцам крыс Sprague Dawley. Биологическую доступность при введении 3 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) рассчитывали, как отношение среднего значения ППК при пероральном введении к среднему значению ППК, равному 2103,3±357,7 нг×ч/мл, определенному после внутривенного введения 3 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) трем самцам крыс Sprague Dawley.

Таблица 3. Фармакокинетическое исследование с использованием крыс (3 мг/кг НМ04, перорально)

Параметр (среднее \pm CO*)	Свободное основание НМ04 (n=3)	Фумарат НМ04 (n=3)
Концентрация НМ04 в плазме (нг/мл)		
0,08 ч	не исследовали	не исследовали
0,25 ч	24,2 \pm 6,6	107,8 \pm 27,8
0,50 ч	39,0 \pm 5,2	325,9 \pm 187,8
1 ч	44,4 \pm 6,0	201,0 \pm 38,7
2 ч	35,7 \pm 11,3	173,9 \pm 12,2
4 ч	25,0 \pm 13,0	108,3 \pm 38,3
8 ч	7,9 \pm 5,8	42,3 \pm 2,5
24 ч	2,4*	не исследовали
ППК _(0-t) (нг \times ч/мл)	220,0 \pm 57,2	970,2 \pm 147,0
T _{макс} (ч)	1 \pm 0	0,83 \pm 0,29
C _{макс} (нг/мл)	44,4 \pm 6,0	329,2 \pm 184,6
Биологическая доступность (%)**	22,2 \pm 5,8	46,13 \pm 6,99

* CO - стандартное отклонение,

** N=1; в случае двух из трех животных концентрация составляла меньше, чем предел количественного определения.

Сопоставляли фармакокинетику НМ04 в плазме самцов собак породы Бигль, которым вводили перорально одну дозу, равную 2 мг/кг НМ04, приготовленную в растворе, содержащем 10% ДМФА, 6% Solutol и 84% 3ФФ, с использованием свободного основания НМ04 или фумарата НМ04. Сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме от времени у собак, которым перорально вводили свободное основание НМ04 и фумарат НМ04, представлено на фиг. 18.

Результаты фармакокинетического анализа представлены в приведенной ниже табл. 4. Биологическую доступность рассчитывали, как нормированное на дозу отношение среднего значения ППК при пероральном введении к среднему значению ППК при внутривенном введении (ППК_{по}/ППК_{вв} \times доза_{вв}/доза_{по}). Биологическую доступность при введении 2 мг/кг свободного основания НМ04 рассчитывали, как нормированное на дозу отношение среднего значения ППК при пероральном введении к среднему значению ППК, равному 782,1 \pm 363,5 нг \times ч/мл, определенному после внутривенного введения 1 мг/кг свободного основания НМ04 трем самцам собак породы Бигль. Биологическую доступность при введении 2 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) рассчитывали, как нормированное на дозу отношение среднего значения ППК при пероральном введении к среднему значению ППК, равному 1126,1 \pm 363,6 нг \times ч/мл, определенному после внутривенного введения 1 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) трем самцам собак породы Бигль.

Таблица 4. Фармакокинетическое исследование с использованием собак (2 мг/кг НМ04, перорально)

Параметр (среднее \pm CO)	Свободное основание НМ04 (n=3)	Фумарат НМ04 (n=3)
Концентрация НМ04 в плазме (нг/мл)		
0,08 ч	не исследовали	не исследовали
0,25 ч	8,94 \pm 5,56	86,6 \pm 32,2
0,50 ч	49,40 \pm 7,72	182,4 \pm 24,1
1 ч	66,33 \pm 4,25	227,4 \pm 52,2
2 ч	74,05 \pm 3,77	219,0 \pm 63,6
4 ч	67,34 \pm 6,27	152,9 \pm 56,9
8 ч	49,23 \pm 10,21	70,2 \pm 41,0
24 ч	6,61 \pm 4,38	13,1 \pm 13,2
ППК _(0-t) (нг \times ч/мл)	928,8 \pm 142,5	1854,4 \pm 828,1
T _{макс} (ч)	2 \pm 0	1,33 \pm 0,58
C _{макс} (нг/мл)	74,05 \pm 3,77	230,47 \pm 57,13
Биологическая доступность (%)	59,38 \pm 9,11	82,34 \pm 36,77

Пример 10. Фармакокинетика при пероральном введении одной дозы фумарата НМ04 у крыс и собак.

Исследовали фармакокинетику НМ04 в плазме самцов крыс Sprague Dawley в возрасте 6 недель и самцов собак породы Бигль (в возрасте 1-5 лет) после перорального введения одной дозы фумарата НМ04. Исследуемые композиции, содержащие 0,6 мг/мл, 2 мг/мл и 6 мг/мл фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) получали в 5% растворе глюкозы. Дозы, равные 3, 10 и 30 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) вводили через желудочный зонд при объеме дозы, равном 5 мл/кг для каждой из исследуемых композиций. Каждая соответствующая одной дозе группа включала 4 животных. Композиции вводили собакам натошак и через 3 ч после введения дозы обеспечивали доступ к корму.

Сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме от времени у крыс представлено на фиг. 19 и результаты фармакокинетического исследования представлены в приведенной ниже табл. 5.

Биологическую доступность при введении 3 мг/кг рассчитывали, как отношение среднего значения ППК при пероральном введении к среднему значению ППК, равному 1760 ± 196 нг×ч/мл, определенному после внутривенного введения 3 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) четырем самцам крыс Sprague Dawley. Среднее значение ППК после внутривенного введения (n=4). Биологическую доступность при введении 10 мг/кг рассчитывали, как отношение среднего значения ППК при пероральном введении к среднему значению ППК, равному 6170 ± 1770 нг×ч/мл, определенному после внутривенного введения 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) четырем самцам крыс Sprague Dawley. Стандартное отклонение, соответствующее среднему значению для биологической доступности при пероральном введении, рассчитывали по следующей формуле

$$CO_q = \left[\sqrt{(\mu y^2 \cdot CO_x^2 + \mu x^2 \cdot CO_y^2)} \right] / \mu y^2$$

в которой q=среднее значение для биологической доступности; μx =нормированное на дозу среднее значение ППК при пероральном введении и μy =нормированное на дозу среднее значение ППК при ВВ введении.

Таблица 5. Фармакокинетическое исследование с использованием крыс

Параметр (среднее ± СО)	3 мг/кг (n=4)	10 мг/кг (n=4)	30 мг/кг (n=4)
Концентрация НМ04 в плазме (нг/мл)			
0,25 ч	34,7 ± 5,42	150 ± 28,5	950 ± 465
0,50 ч	64,2 ± 35,0	548 ± 603	1400 ± 961
1 ч	82,4 ± 30,8	456 ± 100	2290 ± 537
2 ч	150 ± 53,5	652 ± 62,1	2560 ± 530
4 ч	116 ± 24,0	387 ± 134	2120 ± 422
8 ч	47,0 ± 10,9	215 ± 97,3	1350 ± 179
24 ч	МПК	8,73 ± 17,5*	14,6 ± 6,8
ППК (0-последнее) (нг×ч/мл)	762 ± 164	3360 ± 685 [§]	26200 ± 3970
T _{макс} (ч)	3,00 ± 1,15	1,38 ± 0,750	1,75 ± 0,500
t _{1/2} (ч)	2,82 ± 0,354 ⁺	4,88 ± 2,07 [§]	2,65 ± 0,193
C _{макс} (нг/мл)	156 ± 47,3	769 ± 458	2590 ± 524
Биологическая доступность (%)	43,3 ± 10,5	54,4 ± 15,2	

последнее=время, при котором определяли последнюю поддающуюся обнаружению концентрацию,

МПК=меньше предела количественного определения,

* N=1; в случае трех из четырех животных концентрация составляла меньше, чем предел количественного определения,

⁺ N=2,

[§] N=3.

Концентрация НМ04 увеличивается с увеличением дозы, причем при дозе, равной 30 мг/кг, происходит более чем пропорциональное дозе увеличение. После перорального введения крысам одной дозы, равной 3, 10 и 30 мг/кг, концентрация НМ04 достигает значения C_{макс} в течение 4 ч. После перорального введения дозы соединение всасывается при биологической доступности, составляющей примерно 40-50%, при дозах, равных 3 и 10 мг/кг.

Сопоставление зависимостей концентрации НМ04 (нг/мл) в плазме от времени у собак представлено на фиг. 20 и результаты фармакокинетического исследования представлены в приведенной ниже табл. 6.

Таблица 6. Фармакокинетическое исследование с использованием собак

Параметр (среднее ± СО)	3 мг/кг (n=4)	10 мг/кг (n=4)	30 мг/кг (n=4)
Концентрация НМ04 в плазме (нг/мл)			
0 ч*	5,34 ± 3,83	2,15 ± 4,30	МПК
0,25 ч	66,0 ± 26,8	307 ± 246	1940 ± 1330
0,50 ч	360 ± 238	862 ± 460	3730 ± 1560
1 ч	300 ± 127	1510 ± 435	5720 ± 1200
2 ч	287 ± 158**	1170 ± 260	5030 ± 710
4 ч	185 ± 115	789 ± 150	3780 ± 577
8 ч	95,6 ± 83,3	468 ± 171	2440 ± 176
24 ч	8,83 ± 14,7	65,1 ± 65,2	560 ± 147
ППК (0-последнее) (нг×ч/мл)	2160 ± 1720	10900 ± 3500	54000 ± 6010
T _{макс} (ч)	0,875 ± 0,250	1 ± 0	1 ± 0
C _{макс} (нг/мл)	425 ± 222	1510 ± 435	5720 ± 1200
t _{1/2} (ч)	4,02 ± 1,21	4,93 ± 1,31	6,97 ± 0,613
Биологическая доступность (%)	55,6 ± 18,8	68,0 ± 10,0	

МПК=меньше предела количественного определения,

* определяли концентрацию до введения дозы. Введение дозы этим же животным проводили не менее, чем через 4 дня,

** N=3; при статистической обработке данных собаку 3 исключили вследствие сильно отличающегося значения.

При дозе, равной 3 мг/кг, три из четырех определенных до введения дозы концентраций НМ04 подавались обнаружению (диапазон: 5,15-8,31 нг/мл). Образцы повторно анализировали дважды и результаты подтверждались. Кроме того, при пероральном введении 10 мг/кг у собаки 2 определяли поддающуюся обнаружению концентрацию до введения дозы (8,60 нг/мл). Маловероятно, что эта концентрация является остаточной концентрацией от введения предыдущей дозы, равной 3 мг/кг, поскольку через 24 ч эта концентрация была меньше предела количественного определения. Эти значения, близкие к нижнему пределу количественного определения в методике анализа (2,5 нг/мл), исключали из расчетов и заменяли на значение, равное 0.

В случае перорального введения одной дозы фумарата НМ04 в течение 1 ч после введения дозы быстро обеспечивались максимальные концентрации НМ04. Поддающиеся обнаружению концентрации соединения определяли в течение времени, составляющего вплоть до 24 ч после введения дозы, у всех, за исключением двух собак. После обеспечения максимальной концентрации НМ04 в плазме уменьшались при кажущемся конечном периоде полувыведения (в диапазоне 4-7 ч), сходном с периодом полувыведения после внутривенного введения (в диапазоне 4-5 ч). При пероральном введении дозы, находящейся в диапазоне от 3 до 30 мг/кг, несмотря на то, что происходит приблизительно пропорциональное дозе увеличение $C_{\text{макс}}$, происходит более чем прямо пропорциональное дозе увеличение ППК. Биологическая доступность НМ04 при пероральном введении являлась высокой, это находится в соответствии с низким клиренсом соединения.

Абсолютную биологическую доступность при пероральном введении 3 мг/кг рассчитывали, как отношение отдельных значений ППК_∞ при пероральном введении к отдельным значениям ППК_∞, определенным после внутривенного введения 3 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) тем же четырем самцам собак породы Бигль. Получены следующие отдельные значения ППК_∞ при пероральном и ВВ введении: собака 1: 4930 и 6190 нг×ч/мл соответственно; собака 2: 1440 и 3100 нг×ч/мл соответственно; собака 3: 1160 и 3210 нг×ч/мл соответственно; и собака 4: 1850 и 3070 нг×ч/мл соответственно.

Абсолютную биологическую доступность при пероральном введении 10 мг/кг рассчитывали, как отношение отдельных значений ППК_∞ при пероральном введении к отдельным значениям ППК_∞, определенным после внутривенного введения 10 мг/кг фумарата НМ04 (в пересчете на массу свободного основания) тем же четырем самцам собак породы Бигль. Получены следующие отдельные значения ППК_∞ при пероральном и ВВ введении: собака 1: 17500 и 22500 нг×ч/мл соответственно; собака 2: 8780 и 13200 нг×ч/мл соответственно; собака 3: 8470 и 15500 нг×ч/мл соответственно; и собака 4: 10900 и 14900 нг×ч/мл соответственно.

Концентрации НМ04 в плазме определяли с помощью ЖХ-МС/МС с последующим осаждением белка в 96-луночном планшете. К моменту проведения анализа образцы размораживали при температуре окружающей среды. К аликвотам объемом 25 мкл плазмы крыс или собак в К₃-ЭДТК (ЭДТК - этилендиаминтетрауксусная кислота) добавляли 300 мкл внутреннего стандарта (25 нг/мл НМ04-d₈ в ацетонитриле). После осторожного перемешивания взбалтыванием в течение 5 мин и центрифугирования при 2010×g и при 4°C в течение 15 мин аликвоту органической фазы объемом 100 мкл переносили в чистый 96-луночный полипропиленовый планшет с использованием роботизированной системы P3-Evolution (Perkin Elmer). После разбавления с помощью 100 мкл 10 нМ раствора формиата аммония, pH 3,5, аликвоту объемом 10 мкл инжескировали в систему для ЖХ-МС/МС. Условия проведения ЖХ-МС/МС представлены в приведенной ниже табл. 7.

Таблица 7

Система для ВЭЖХ:	Hewlett Packard 1100 series					
Подвижная фаза:	Канал А: 10 мМ раствор формиата аммония, рН 3,5 Канал В: ацетонитрил					
Режим элюирования:	градиентный					
Время (мин)	0,0	1,0	1,1	2,5	2,6	4,0
А, %	75	75	10	10	75	75
В, %	25	25	90	90	25	25
Полная продолжительность:	4,0 мин					
Скорость потока:	0,3 мл/мин					
Примерные времена удерживания:	2,18 мин					
Температура печи колонки:	40°C					
Аналитическая колонка:	Zorbax SB-C18 (2,1×50 мм, 3,5 мкм)					
Тип автоматического пробоотборника:	CTC Analytics CTC PAL					
Инжектируемый объем:	10 мкл					
Температура автоматического пробоотборника:	4°C					
Прибор для МС:	Applied Biosystem SCIEX API 3000					
Ионизация:	Ионизация распылением в электрическом поле в режиме положительных ионов					
Переход для ММР*: НМ04	m/z	476,08	>m/z	129,19		
Переход для ММР: НМ04-d8	m/z	484,24	>m/z	137,41		
Разрешение:	единицы Q1					
	единицы Q3					
Нижний предел количественного определения:	5,0 нг/мл (крысы); 2,5 нг/мл (собаки)					
Верхний предел количественного определения:	5000 нг/мл (крысы); 1250 нг/мл (собаки)					
Использующееся программное обеспечение:	Analyst 1.4.1 и Watson 7.4					

* ММР - мониторинг множества реакций.

Пример 11. Антагонистическая активность НМ04 по отношению к рецептору грелина (GHSR1a).

Характеристики связывания НМ04 с рецептором грелина GHSR1a изучали с использованием фумарата НМ04 путем исследования с использованием флуоресцентного визуализирующего считывающего устройства для планшетов (ФЛВСП). НМ04 обладал существенной антагонистической активностью по отношению к GHSR1a при значении IC_{50} , равном 7,308 нМ (фиг. 21А). Также проводили сравнительное исследование с использованием контрольного антагониста GHSR1a, R011 (WO 2005/048916, пример 30). R011 обладал антагонистической активностью по отношению к GHSR1a при значении IC_{50} , равном 343 нМ (фиг. 21Б).

Не обнаружена агонистическая активность НМ04 и R011 при концентрациях, равных вплоть до 10 мкМ (фиг. 21В и 21Г). По данным исследованию обратной агонистической активности с использованием инозит-1-фосфата (IP-1) и НМ04, и R011 не обладали явной обратной агонистической активностью (фиг. 21Д и 21Е). Полученные *in vitro* результаты свидетельствуют о том, что НМ04 является активным антагонистом грелина и не проявляет агонистической или явной обратной агонистической активности.

Соединения разводили с помощью 100% ДМСО и получали исходный 30 мМ раствор. В день проведения исследования готовили серийные разведения, начиная с исходного раствора. Для исследования с использованием ФЛВСП: 1) 8 мкл ДМСО добавляли к 2 мкл исходного раствора соединения (30 мМ) и получали 10 мкл 6 мМ раствора; для получения 10 доз готовили половинные серийные разведения 6 мМ раствора; 2) исследуемые растворы получали путем разведения исходных растворов в соотношении 1/40 в буфере для исследования (концентрация ДМСО=2,5%). Для исследования с использованием IP-1: 1) 29 мкл ДМСО добавляли к 1 мкл исходного раствора соединения (30 мМ) и получали 30 мкл 1 мМ раствора; для получения 10 доз готовили половинные серийные разведения 1 мМ раствора; 2) исследуемые растворы получали путем разведения исходных растворов в соотношении 1/100 в буфере для исследования (конечная концентрация ДМСО=1%).

Для изучения агонистической и антагонистической активности путем исследования с использованием флуоресцентного визуализирующего считывающего устройства для планшетов (ФЛВСП) использовали клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие рецептор GHSR1a человека. За 1 день до проведения исследования клетки высевали в 384-луночный планшет с покрытием из Matrigel® при плотности, равной $1,5 \times 10^4$ клеток/лунка, с добавлением 30 мкл полной среды МДСИ (модифицированная по методике Дульбекко среда Игла) и инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 22-26 ч. В день проведения исследования в каждую лунку добавляли 4×краситель (10 мкл/лунка в случае 384 луночных планшетов). Планшеты для исследования инкубировали в темноте при 37°C в течение 30 мин. Краситель удаляли центрифугированием при скорости, равной 300 об/мин, в течение 30 с. С помощью

PlateMate Matrix (условия при низкой скорости, Thermo Fisher Scientific) добавляли смесь ССРХ (сбалансированный солевой раствор Хэнка)/Neres (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) (30 мкл) с добавлением 1 мМ пробенцида. Затем планшет помещали в устройство FLIPR Tegra (Molecular Devices) и посредством ФЛВСП (режим исследования агониста) добавляли 10 мкл 4×рабочие концентрации НМ04 или R011. Сигнал флуоресценции детектировали с помощью ФЛВСП при комнатной температуре при стандартных условиях за 10 мин до обработки клеток с помощью 10 мкл 5×рабочие концентрации агонистов (соединение, добавленное посредством ФЛВСП). Сигнал флуоресценции детектировали в течение последующих 3 мин (режим исследования агониста).

Для изучения обратной агонистической активности использовали такую же процедуру, как описанная выше, вплоть до дня проведения исследования. В день проведения исследования среду удаляли центрифугированием при скорости, равной 700 об/мин, в течение 30 с и добавляли 20 мкл/лунка буфера для исследования, содержащего НМ04 или R011. Планшеты для исследования инкубировали в темноте при 37°C в течение 1 ч. Во все лунки с помощью Multidrop Combi последовательно добавляли IP1-d2 (5 мкл) и АВ-Сгур (5 мкл). Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и считывали с помощью EnVision при длинах волн, равных 620 и 665 нм.

Результаты представляли в относительных световых единицах (ОСЕ) и анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Software Inc. version 6. Значения половинной максимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀), определенные для НМ04 и R011, рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Пример 12. Влияние фумарата НМ04 на вызванное грелином увеличение концентрации гормона роста у крыс.

Крыс разделяли на 4 группы: 1) 1 мл/кг растворителя+10 мл/кг 0,5% КМЦ, ПО (n=6); 2) 15 мкг/кг грелина, ВВ+10 мл/кг 0,5% КМЦ, ПО (n=6); 3) 30 мг/кг фумарата НМ04, ПО, за 2 ч до 15 мкг/кг грелина, ВВ (n=6); 4) 10 мг/кг антагониста грелина - R011, ВВ, за 30 мин до 15 мкг/кг грелина, ВВ (n=6). Отбирали образцы крови объемом 100 мкл через 0 и через 15 мин после инъекции грелина. Крыс анестезировали с помощью 64,8 мг/кг пентобарбитала натрия. Для отбора крови в левую бедренную артерию вставляли катетер, заполненный гепаринизированным физиологическим раствором, и его снабжали удлинительной трубкой, шприцем для образца объемом 1 мл и трехходовым краном для обеспечения возвращения избытка крови.

Концентрации гормона роста (ГР) в плазме определяли с помощью анализа ГР у крыс ELISA (Millipore, Catalog No. EZRMGH-45K). Эксперименты проводили дважды. ППК для ГР, 0-15 мин, рассчитывали по методике трапеций. Для сопоставления результатов для двух групп использовали односторонний и двусторонний анализ ANOVA. Все значения представляли в виде среднего значения ±СПС (стандартная погрешность среднего). После одностороннего анализа ANOVA проводили последующий тест Тьюки, где статистическая значимость указана с помощью значений $p < 0,05$ или значений $p < 0,01$.

Инъекция физиологического раствора приводила к незначительному увеличению концентрации ГР в плазме. Сам грелин вызывал явное увеличение концентрации ГР через 15 мин после инъекции. Средняя концентрация ГР в плазме после ВВ введения 15 мкг/кг грелина находилась в диапазоне 90-120 нг/мл. И НМ04, и R011 ингибировали вызванное грелином увеличение концентрации ГР на 35 и 78% соответственно. Средняя концентрация гормона роста в плазме, наблюдающаяся в каждой из 4 групп через 0 и 15 мин после инъекции грелина, представлена на фиг. 22 (***) $p < 0,01$ относительно разбавителя; ### $p < 0,05$ относительно только грелина).

Пример 13. Влияние фумарата НМ04 в модели синдрома Прадера-Вилли на мышах.

Влияние фумарата НМ04 на потребление корма и переносимость глюкозы исследовали с использованием генетической модели синдрома Прадера-Вилли на мышах путем сопоставления мышей Snord116+/- (ГЕТ) (мышь ГЕТ) с однопометными мышами дикого типа (ДТ). Поскольку агонисты D2R уменьшают потребление корма, в качестве контроля в эксперименте использовали утвержденный FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) агонист D2R - каберголин. Фенотипические признаки в этой модели СПВ на мышах включают гиперфагию, постнатальную задержку роста, высокую концентрацию грелина и низкую концентрацию гормона роста. Ding F., et al. SnoRNA Snordl 16 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. PloS one. 2008; 3(3): e1709. Эти страдающие СПВ мыши потребляют корм чаще, чем однопометные мыши ДТ, в особенности при освещении, и сильнее мотивированы к борьбе за корм (более высокий уровень требований) (результаты не приведены).

НМ04, вводимый внутривенно (ВВ) при дозе, равной 10 мг/кг, не приводил к уменьшению потребления корма у мышей ДТ в возрасте 3, 7 или 12 месяцев (см. фиг. 25-27). НМ04 (10 мг/кг, ВВ) приводил к уменьшению потребления корма через 12 и 24 ч после введения дозы у мышей ГЕТ в возрасте 3 месяцев (фиг. 26). НМ04 (10 мг/кг, ВВ) приводил к уменьшению потребления корма через 1 ч после введения дозы у мышей ГЕТ в возрасте 12 месяцев (фиг. 25А), однако степень уменьшения не сохранялась (фиг. 25В). НМ04, вводимый ВВ при дозе, равной 30 мг/кг, приводил к уменьшению потребления корма в течение вплоть до 8 ч после введения дозы у мышей ГЕТ в возрасте 7 месяцев, но не у мышей ДТ (фиг.

26). При пероральном введении 30 мг/кг НМ04 мышам ГЕТ возрасте 8 месяцев ежедневно в 07:00 ч в течение 5 дней потребление корма уменьшалось в течение вплоть до 2 дней без оказания влияния на массу тела (фиг. 30А и 30В). При пероральном введении 30 мг/кг НМ04 мышам ГЕТ возрасте 8 месяцев в 18:00 ч во время затемнения потребление корма было меньше во время последующего освещения в дни 2, 3, 4 и 5, и достигало значимого результата в день 5 (фиг. 31А).

В отличие от влияния НМ04 на потребление корма он не приводит к улучшению переносимости глюкозы у мышей ГЕТ, тогда как в случае мышей ДТ такое влияние наблюдалось. Эти результаты показывают, что НМ04 может ослабить гиперфагию, связанную с СПВ, хотя на фармакологический ответ могут влиять такие факторы, как возраст, циркадные ритмы, энергетический статус и метаболизм.

Однократное введение: мыши (в возрасте 3, 7 и 12 месяцев) голодали в течение 16 ч и затем им внутривентриально вводили одну инъекцию разбавителя или разбавителя, содержащего НМ04, каберголин или НМ04 и каберголин, в соответствии с приведенной ниже табл. 8.

Таблица 8

Вид	Возраст (месяцы)	Количество животных	Соединение и доза (мг/кг)
ГЕТ	7	6	НМ04 (10)
ГЕТ	7	6	каберголин (0,5)
ГЕТ	7	6	разбавитель
ГЕТ	7	6	НМ04 (10) + каберголин (0,5)
ДТ	7	6	НМ04 (10)
ДТ	7	6	каберголин (0,5)
ДТ	7	6	разбавитель
ДТ	7	6	НМ04 (10) + каберголин (0,5)
ГЕТ	3	6	НМ04 (10)
ГЕТ	3	6	разбавитель
ДТ	3	6	НМ04 (10)
ДТ	3	6	разбавитель
ГЕТ	12	4	НМ04 (10)
ГЕТ	12	4	разбавитель
ДТ	12	6	НМ04 (10)
ДТ	12	6	разбавитель
ГЕТ	7	5	НМ04 (30)
ГЕТ	7	5	разбавитель
ДТ	7	5	НМ04 (30)
ДТ	7	5	разбавитель

НМ04 растворяли в воде для инъекций и каберголин растворяли в ДМСО и получали раствор для инъекций в смеси 5% ДМСО/вода. Затем мыши в неограниченном количестве получали корм и суммарное потребление корма определяли через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после введения дозы. Поскольку размер мышей ГЕТ существенно меньше, чем размер их однопометных контрольных мышей ДТ, потребление корма выражали, как потребление в пересчете на 1 г массы тела. Значимость результатов анализировали с помощью двустороннего анализа ANOVA с последующей поправкой Бонферрони (Graphpad Prism, Prism 5.0, San Diego, CA).

В группе мышей в возрасте 7 месяцев суммарное потребление корма мышами ГЕТ, которым вводили разбавитель, являлось существенно увеличенным по сравнению с результатом для мышей ДТ, которым вводили разбавитель. Каберголин приводил к уменьшению потребления корма у мышей обоих генотипов. В отличие от этого, НМ04 (10 мг/кг) не приводил к уменьшению потребления корма ни мышами ДТ, ни мышами ГЕТ, и не способствовал усилению подавляющего воздействия каберголина на потребление корма (фиг. 23А и 23Б).

В группе мышей в возрасте 3 месяцев суммарное потребление корма мышами, которым вводили разбавитель, существенно не изменялось в течение первых 8 ч. Через 12 и 24 ч мыши ГЕТ потребляли большее количество корма, чем мыши ДТ. Введение НМ04 (10 мг/кг) существенно уменьшало потребление корма мышами ГЕТ через 12 и 24 ч после введения дозы (см. фиг. 24). НМ04 не приводил к уменьшению потребления корма мышами ДТ.

В группе мышей в возрасте 12 месяцев потребление корма мышами ГЕТ, которым вводили разбавитель, являлось существенно более значительным, чем мышами ДТ. НМ04 (10 мг/кг) приводил к уменьшению потребления корма мышами ГЕТ через 1 ч после введения дозы (фиг. 25А); однако этот уровень уменьшения не сохранялся (фиг. 25Б).

В случае группы мышей в возрасте 7 месяцев также исследовали мышей ГЕТ и ДТ, которым вводили разбавитель или НМ04 при более высокой дозе, равной 30 мг/кг. НМ04 (30 мг/кг) не оказывал явное влияние на потребление корма мышами ДТ, но уменьшал потребление корма мышами ГЕТ в течение вплоть до 8 ч (фиг. 26).

Ежедневное введение: Для исследования возможной более высокой эффективности НМ04 при ежедневном введении мышам в возрасте 6 месяцев один раз в сутки в 07:00 ч в течение 10 дней вводили раз-

бавитель или разбавитель, содержащий НМ04 (10 мг/кг внутрибрюшинно), и мышам в возрасте 8 месяцев ежедневно в 07:00 ч или в 18:00 ч в течение 5 дней через желудочный зонд вводили разбавитель или разбавитель, содержащий НМ04 при более высокой дозе, равной 30 мг/кг. Результаты представлены в приведенной ниже табл. 9. Потребление корма и массу тела определяли ежедневно.

Таблица 9

Вид	Возраст (месяцы)	Количество животных	Время введения	Путь введения	Количество последовательных дней введения	Соединение и доза (мг/кг)
ГЕТ	6	10	07:00	внутрибрюшинно	10	НМ04 (10)
ГЕТ	6	10	07:00	внутрибрюшинно	10	разбавитель
ДТ	6	10	07:00	внутрибрюшинно	10	НМ04 (10)
ДТ	6	10	07:00	внутрибрюшинно	10	разбавитель
ГЕТ	8	5	07:00	перорально	5	НМ04 (30)
ГЕТ	8	5	07:00	перорально	5	разбавитель
ДТ	8	5	07:00	перорально	5	НМ04 (30)
ДТ	8	5	07:00	перорально	5	разбавитель
ГЕТ	8	5	18:00	перорально	5	НМ04 (30)
ГЕТ	8	5	18:00	перорально	5	разбавитель
ДТ	8	5	18:00	перорально	5	НМ04 (30)
ДТ	8	5	18:00	перорально	5	разбавитель

В группе мышей в возрасте 6 месяцев потребление корма мышами ДТ и ГЕТ, которым вводили разбавитель, существенно не отличалось. Ежедневное введение НМ04 (10 мг/кг ВБ) не оказывало явное влияние на потребление корма (фиг. 27А) или массу тела (фиг. 27Б) в случае мышей ДТ и ГЕТ.

В группе мышей в возрасте 8 месяцев, которым проводили введение в 07:00 ч во время освещения, существенное уменьшение потребления корма обнаружено к дню 2, но не в последующие дни (фиг. 28А). Масса тела не изменялась (фиг. 28Б). В случае мышей ДТ, которым вводили НМ04, не обнаружено уменьшение потребления корма или массы тела (фиг. 28А и 28Б).

В группе мышей в возрасте 8 месяцев, которым проводили введение в 18:00 ч во время затемнения, потребление корма определяли и во время освещения, и во время затемнения. Хотя мышам вводили НМ04 в начале затемнения, во время затемнения не обнаружено уменьшение потребления корма ни мышами ДТ, ни мышами ГЕТ (фиг. 29Б). Во время последующего освещения (06:00-18:00) потребление корма мышами ГЕТ, которым вводили НМ04, было меньше в дни 2, 3, 4 и 5 и достигало значимого результата в день 5, однако это не происходило в случае мышей ДТ (фиг. 29А).

Приведенное выше описание считается достаточным для обеспечения специалисту в данной области техники возможности практического выполнения вариантов осуществления. В приведенном выше описании и в примерах подробно описаны некоторые варианты осуществления и описан наилучший вариант осуществления, предполагаемый авторами настоящего изобретения. Однако следует понимать, что независимо от того, насколько подробным является предшествующее описание, варианты осуществления можно выполнять на практике многими путями и они должны находиться в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

При использовании в настоящем изобретении термин "примерно" относится к числовому значению, включая, например, целые числа, дробные числа и выраженные в процентах значения, даже, если это явно не указано. Термин "примерно" обычно означает диапазон числовых значений (например, +/-5-10% от указанного диапазона), который специалист в данной области техники считает эквивалентным указанному значению (например, обеспечивающему такое же действие или результат). Если термины "не менее" и "примерно" указаны до перечня числовых значений или диапазонов, то термины изменяют все значения или диапазоны, указанные в перечне. В некоторых случаях термин "примерно" может включать числовые значения, которые округлены до ближайшего значащего разряда.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина.
2. Соль по п.1, где солью является (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина:фумарат состава 1:1.
3. Соль по любому из предыдущих пунктов, где не менее 50% соли находится в кристаллической форме.
4. Соль по любому из предыдущих пунктов, где не менее 60, не менее 70, не менее 80, не менее 90, не менее 95, не менее 96, не менее 97, не менее 98, не менее 99 или 100% соли находится в кристаллической форме.
5. Фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-

метилпиперидин-4-ил)мочевины, содержащий форму 1, отличающийся полученной с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $7,8\pm 0,2$, $9,5\pm 0,2$, $14,3\pm 0,2$, $16,7\pm 0,2$, $17,2\pm 0,2$, $18,5\pm 0,2$, $18,8\pm 0,2$, $19,3\pm 0,2$, $20,0\pm 0,2$, $20,7\pm 0,2$, $22,4\pm 0,2$, $23,2\pm 0,2$, $25,6\pm 0,2$, $27,2\pm 0,2$, $31,7\pm 0,2$ и $32,4\pm 0,2$ градусов 2-тета.

6. Фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, содержащий форму 2, отличающийся полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 3.

7. Фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, содержащий форму 3, отличающийся полученной с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $7,2\pm 0,2$, $9,4\pm 0,2$, $9,7\pm 0,2$, $10,8\pm 0,2$, $14,3\pm 0,2$, $15,1\pm 0,2$, $16,2\pm 0,2$, $17,9\pm 0,2$, $18,7\pm 0,2$, $18,9\pm 0,2$, $19,6\pm 0,2$, $21,5\pm 0,2$, $22,7\pm 0,2$, $23,7\pm 0,2$, $24,3\pm 0,2$, $25,1\pm 0,2$, $27,4\pm 0,2$, $28,7\pm 0,2$ и $34,9\pm 0,2$ градусов 2-тета.

8. Фумарат (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины, содержащий форму 4, отличающийся полученной с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, включающей пики при $12,2\pm 0,2$, $13,2\pm 0,2$, $15,0\pm 0,2$, $15,4\pm 0,2$, $17,6\pm 0,2$, $18,1\pm 0,2$, $19,5\pm 0,2$, $20,2\pm 0,2$, $20,9\pm 0,2$, $21,4\pm 0,2$, $23,0\pm 0,2$, $23,4\pm 0,2$, $24,4\pm 0,2$, $24,8\pm 0,2$, $25,9\pm 0,2$, $27,9\pm 0,2$, $28,9\pm 0,2$, $29,6\pm 0,2$, $30,7\pm 0,2$ градусов 2-тета.

9. Соль по п.5, где указанная форма 1 отличается полученной с помощью ПРРГ (порошковая рентгенография) с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 12.

10. Соль по п.7, где указанная форма 3 отличается полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 15.

11. Соль по п.8, где указанная форма 4 отличается полученной с помощью ПРРГ с использованием излучения Си К-альфа рентгенограммой ПРРГ, в основном сходной с рентгенограммой ПРРГ, представленной на фиг. 16.

12. Лекарственное средство, содержащее соль по любому из пп.1-11.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая соль по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Способ получения соли по любому из пп.1-11, включающий объединение (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевины с фумаровой кислотой.

15. Способ по п.14, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина находится в твердой форме при ее объединении с фумаровой кислотой.

16. Способ по п.14, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевина находится в растворе при ее объединении с фумаровой кислотой.

17. Способ по любому из пп.14-16, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевину подвергают экстракции с использованием кислоты/основания до ее объединения с фумаровой кислотой.

18. Способ по любому из пп.14-16, в котором (R)-3-(1-(2,3-дихлор-4-(пирозин-2-ил)фенил)-2,2,2-трифторэтил)-1-метил-1-(1-метилпиперидин-4-ил)мочевину не подвергают экстракции с использованием кислоты/основания до ее объединения с фумаровой кислотой.

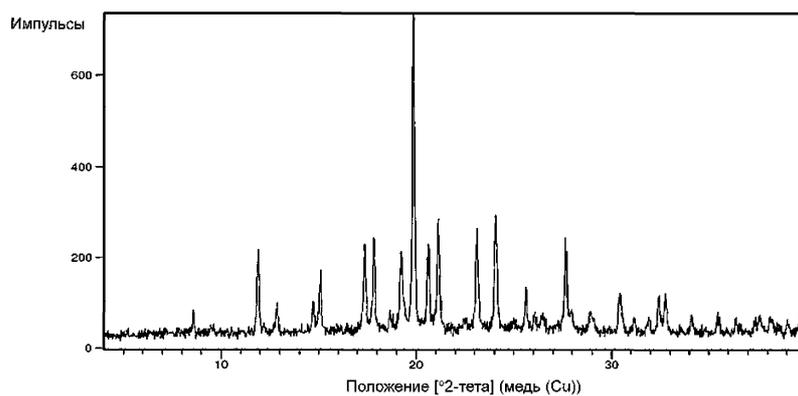
19. Применение соли по любому из пп.1-11, лекарственного средства по п.12 или фармацевтической композиции по п.13 для уменьшения сигнальной активности грелина в клетках.

20. Применение соли по любому из пп.1-11, лекарственного средства по п.12 или фармацевтической композиции по п.13 для уменьшения сигнальной активности грелина у субъекта.

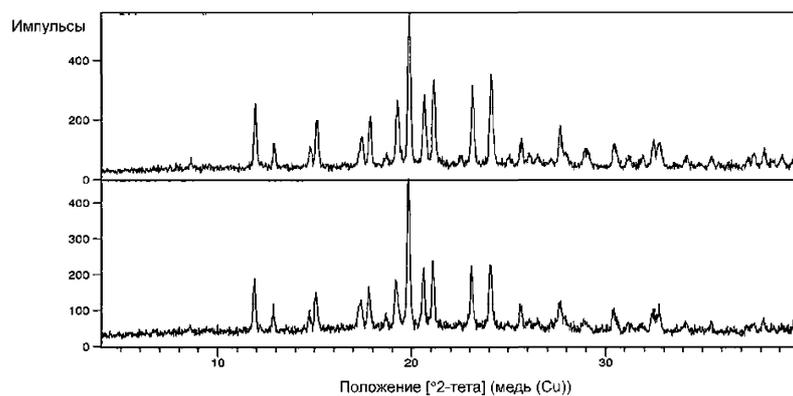
21. Применение соли по любому из пп.1-11, лекарственного средства по п.12 или фармацевтической композиции по п.13 для лечения субъекта, страдающего патологическим состоянием или нарушением, связанным с увеличением концентрации грелина.

22. Применение по п.21, в котором патологическое состояние или нарушение выбрано из чрезмерного потребления пищи, алкогольной зависимости и синдрома Прадера-Вилли.

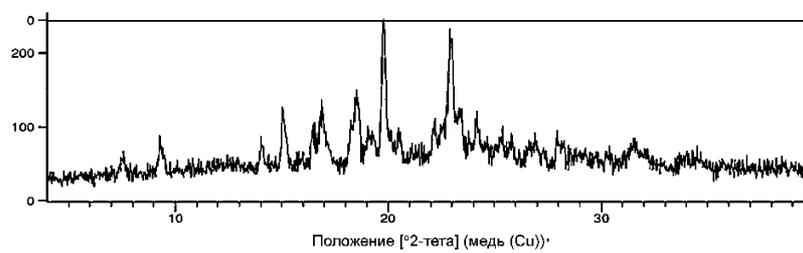
23. Применение по п.21 или 22, в котором патологическое состояние или нарушение выбрано из компульсивного перекармливания, ожирения, возобновления увеличения массы тела после диеты и гиперфагии.



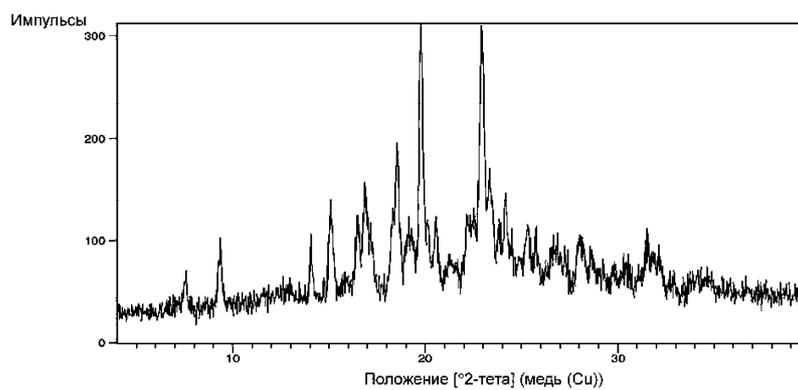
Фиг. 1А



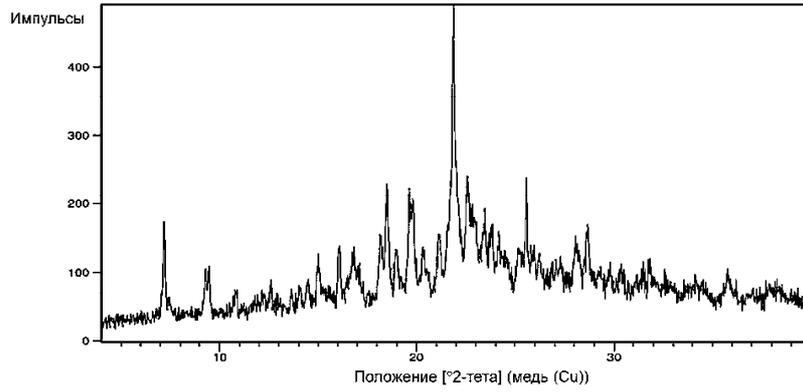
Фиг. 1Б



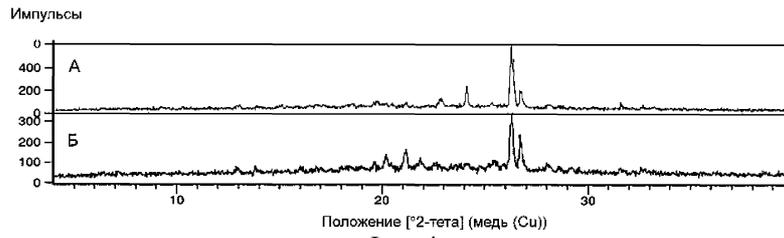
Фиг. 1В



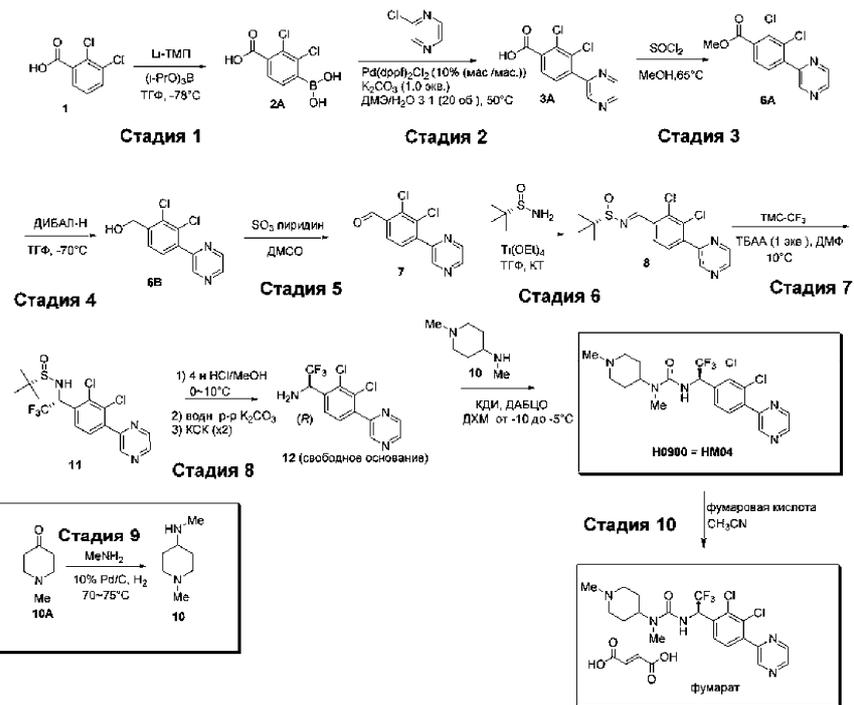
Фиг. 2



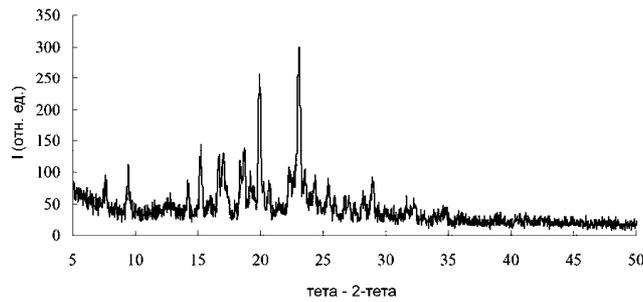
Фиг. 3



Фиг. 4

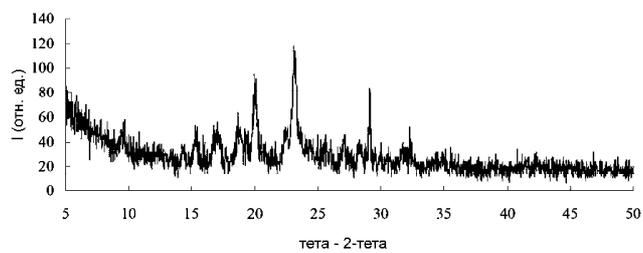


Фиг. 5

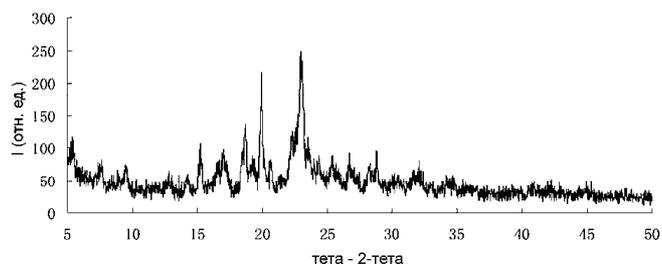


Фиг. 6

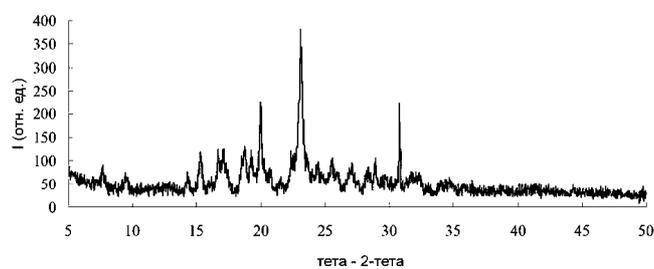
042192



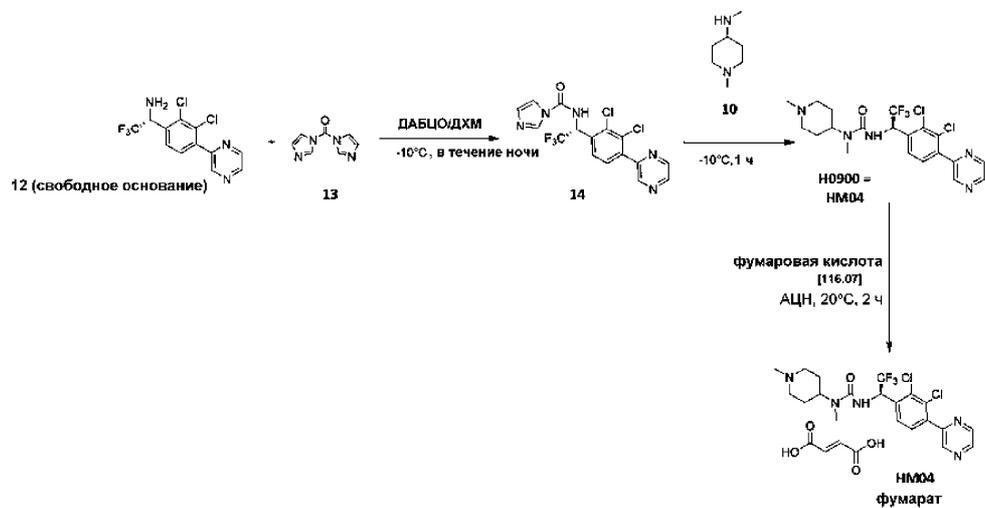
Фиг. 7



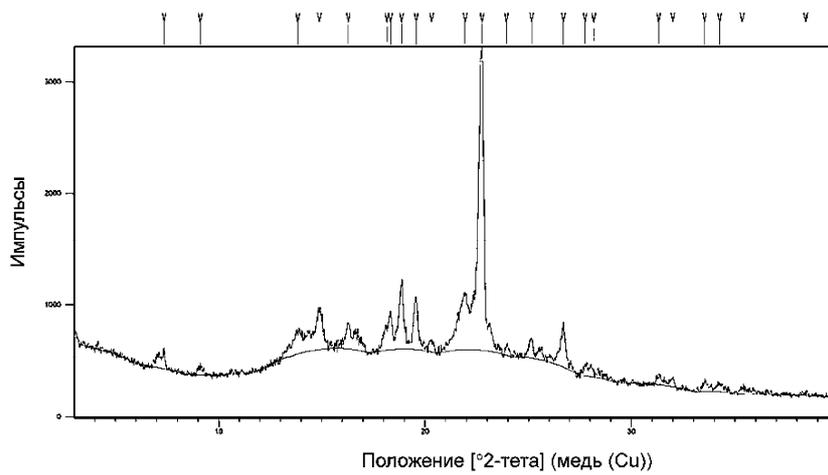
Фиг. 8



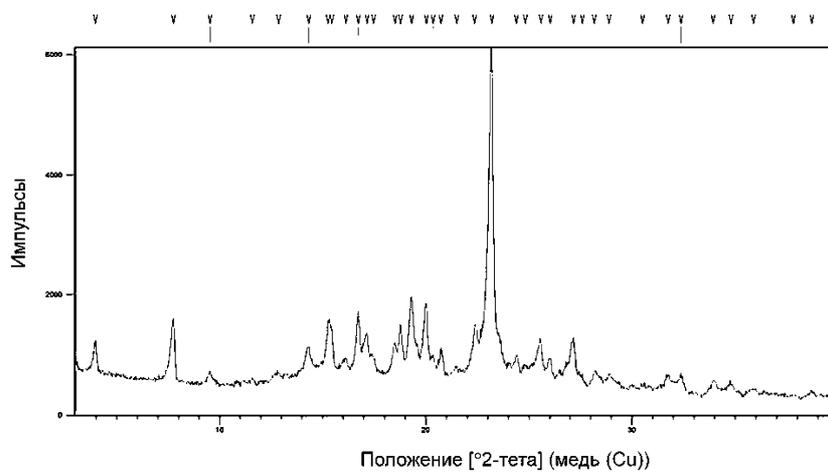
Фиг. 9



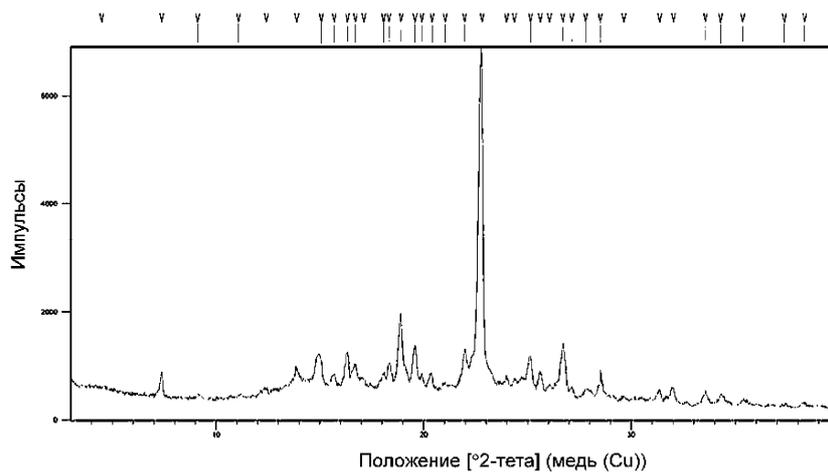
Фиг. 10



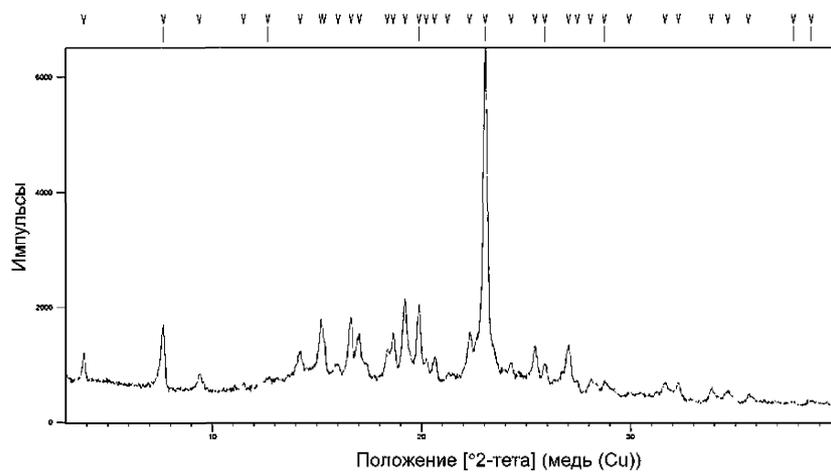
Фиг. 11



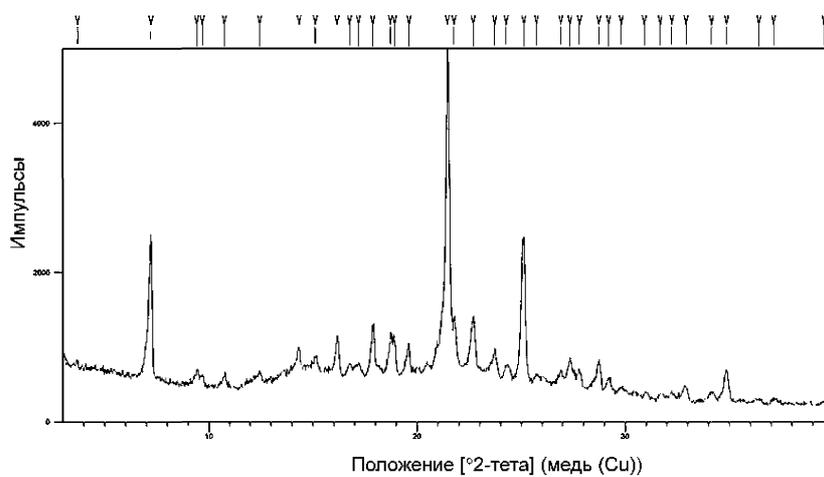
Фиг. 12



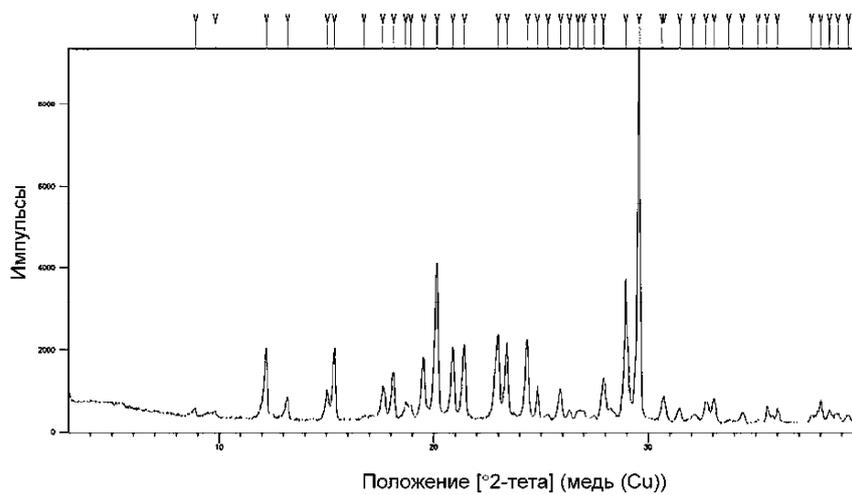
Фиг. 13



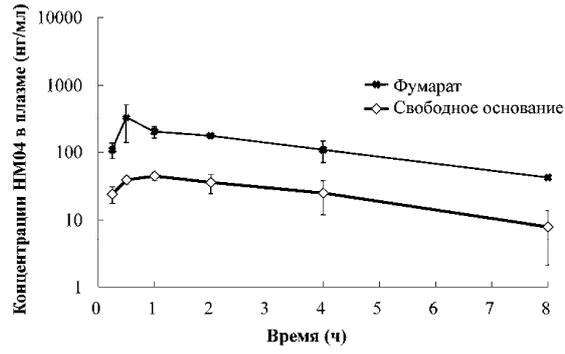
Фиг. 14



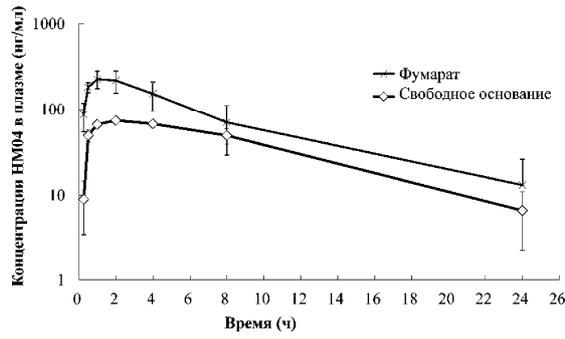
Фиг. 15



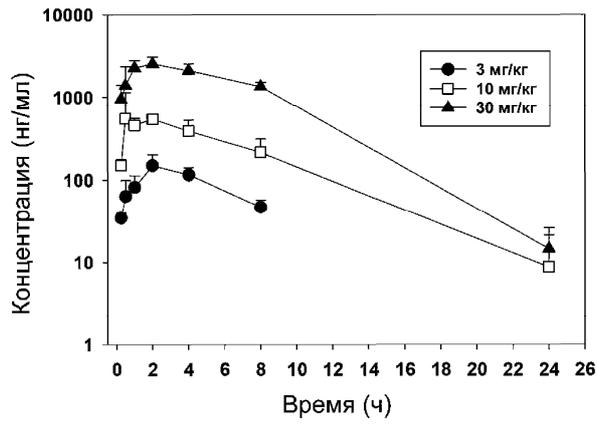
Фиг. 16



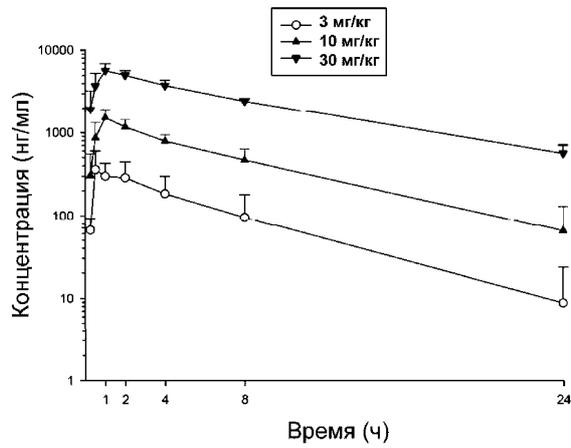
Фиг. 17



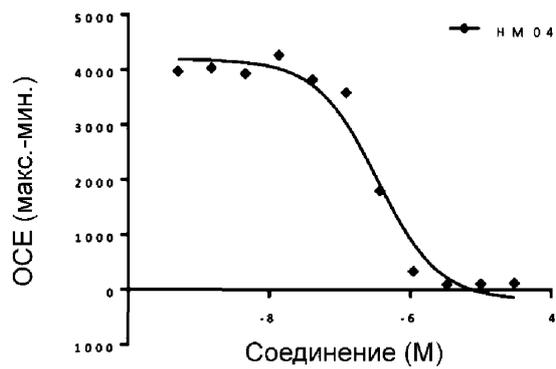
Фиг. 18



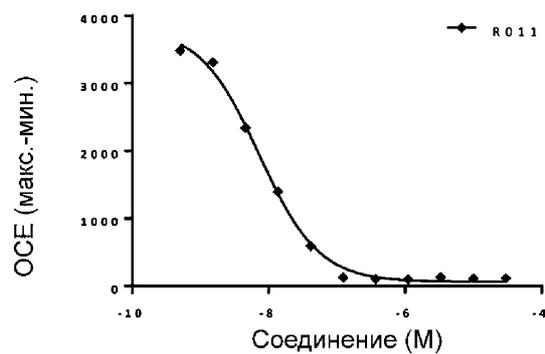
Фиг. 19



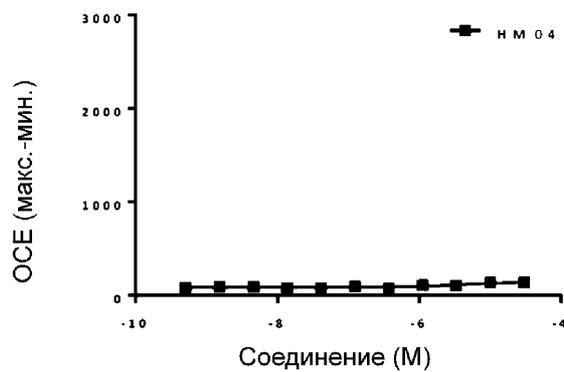
Фиг. 20



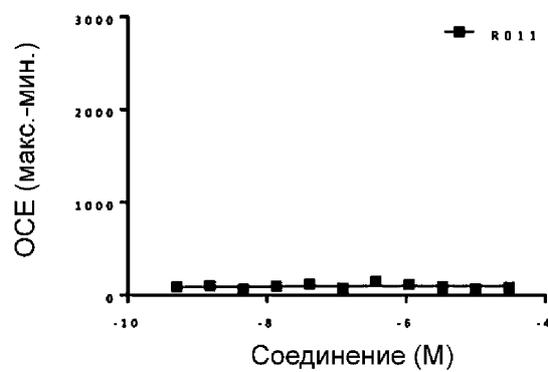
Фиг. 21А



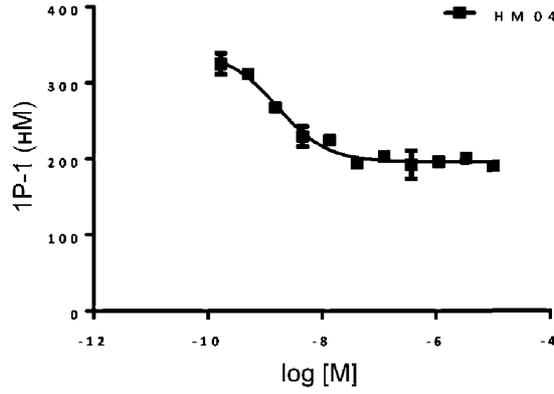
Фиг. 21Б



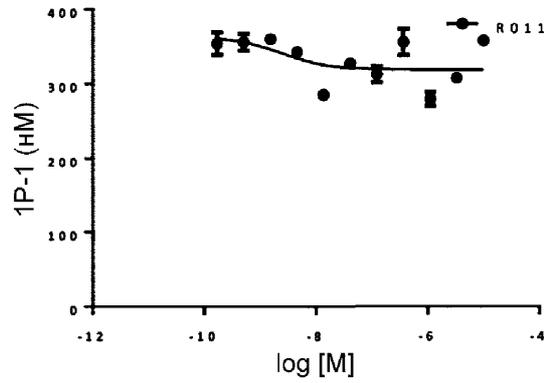
Фиг. 21В



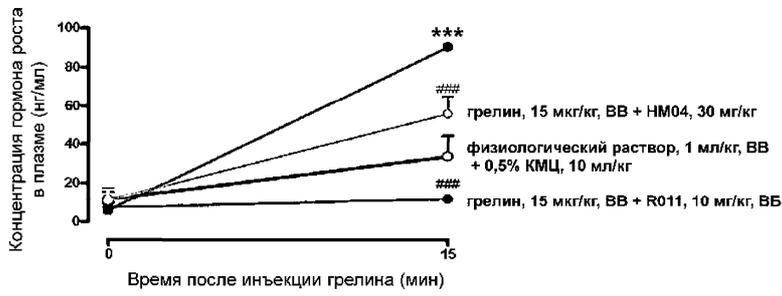
Фиг. 21Г



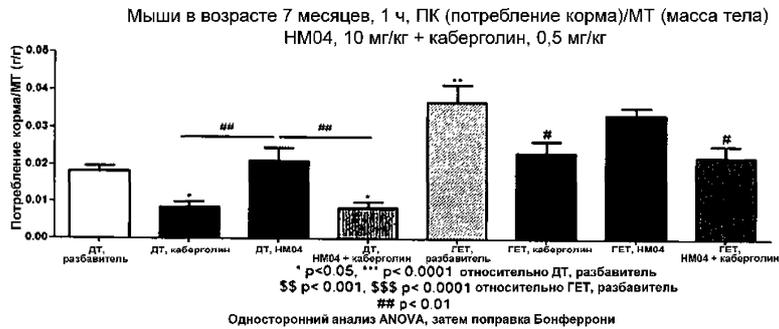
Фиг. 21Д



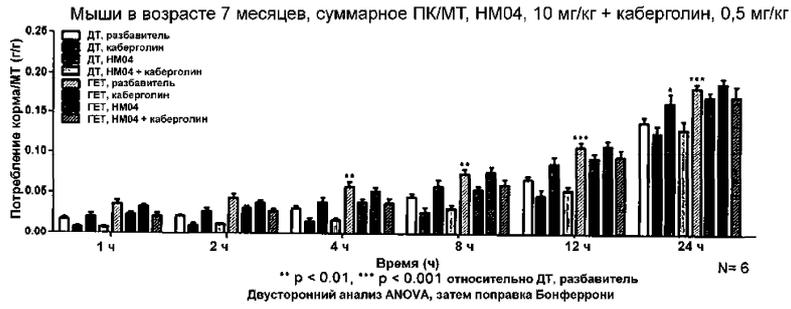
Фиг. 21Е



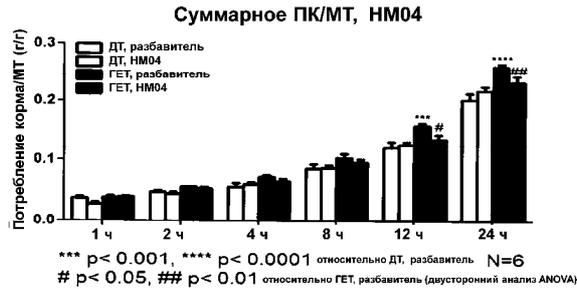
Фиг. 22



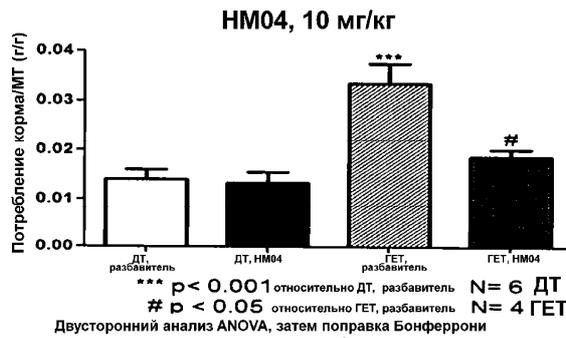
Фиг. 23А



Фиг. 23Б



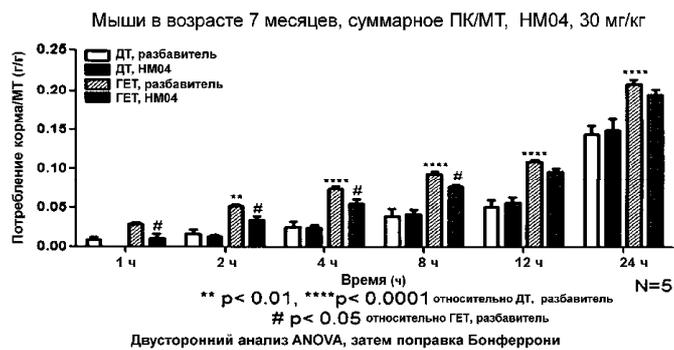
Фиг. 24



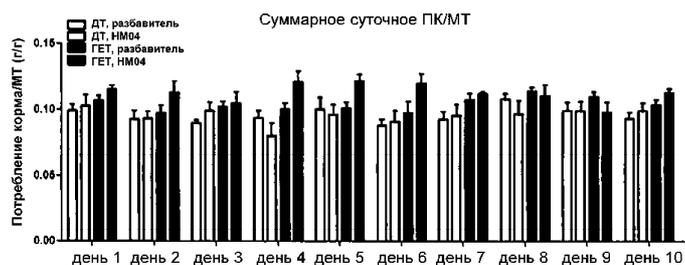
Фиг. 25А



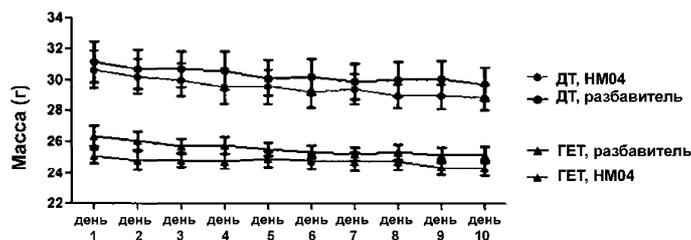
Фиг. 25Б



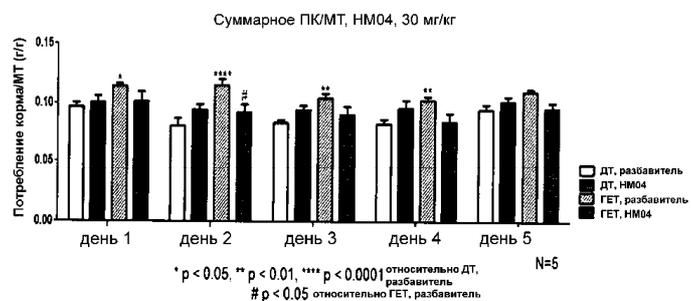
Фиг. 26



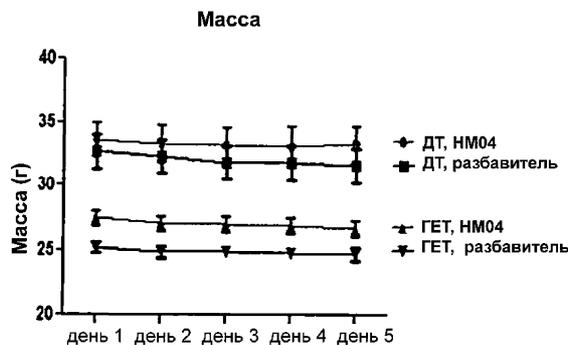
Масса
Фиг. 27А



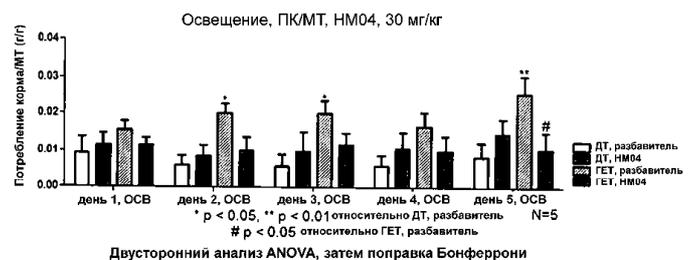
Фиг. 27Б



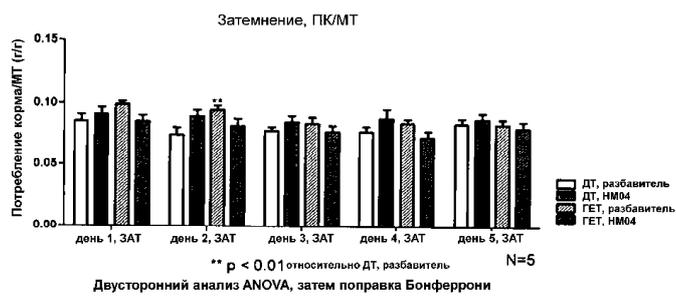
Фиг. 28А



Фиг. 28Б



Фиг. 29А



Фиг. 29Б

