



УКРАЇНА

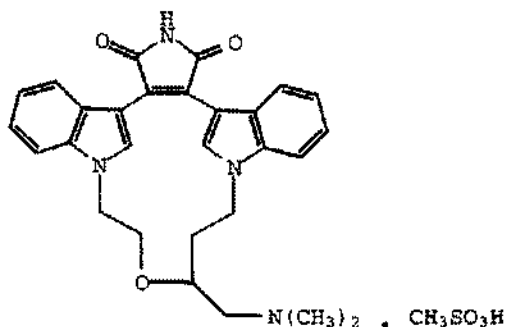
(19) UA (11) 61897 (13) C2

(51) 7 A61K31/395, C07D413/14

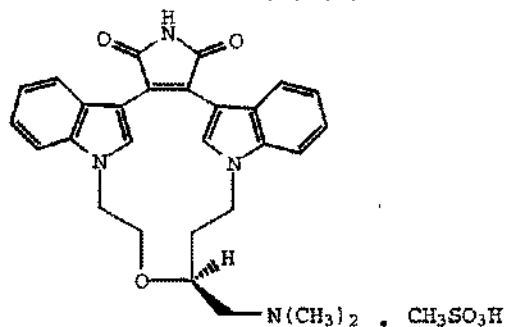
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**(54) ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНКИНАЗИ С, СПОСІБ ЇХ ОДЕРЖАННЯ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ МІКРОСУДИННИХ ДІАБЕТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ**

1

- (21) 98052515  
(22) 18 11 1996  
(24) 15 12 2003  
(86) PCT/US96/18512, 18 11 1996  
(31) 60/006, 970  
(32) 20 11 1995  
(33) US  
(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.  
(72) Інджел Гарі Лоуелл, US, Фарід Нейгі Альфонс, US, Фолл Маргарет Мері, US, Джироусек Майкл Роберт, US, Річардсон Лорі Енн, US, Уіннероскі Леонард Ларрі, US  
(73) Елі Лілл'енд Компані, US  
(56) MURRAY et al 'Protein Kinases and Phosphates' Structural Biology and Synthetic Inhibitors' In Annual Reports in Medicinal Chemistry Edited by J. Bristol et al. San Diego Academic Press, 1994, Vol. 29, Chapter 26, pages 255-264, see pages 258-259  
(57) 1 Мезилат формули

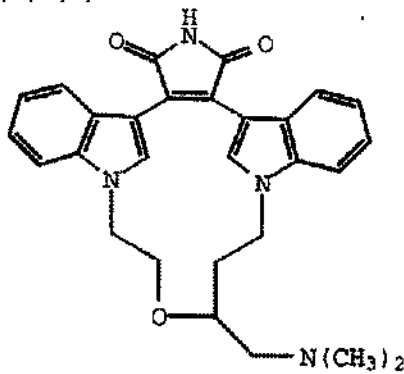


та сольвати цієї солі  
2 Сіль за п. 1, яка має формулу



2

- та її сольвати  
3 Сіль за п. 1 або п. 2, яка є, по суті, кристалічною  
4 Сіль за п. 3, яка є (S)-13-[(диметиламіно)метил]-10,11,14,15-тетрагідро-4,9,16,21-диметено-1H,13H-добензо[E,K]піроло[3,4-H][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2H)-діонметансульфонатмоногідратом  
5 Сіль за будь-яким з пп. 1-4, до складу якої входить менш ніж приблизно 5% в'язучих речовин  
6 Спосіб лікування мікросудинних діабетичних ускладнень, при якому ссавцю, який потребує цього, вводять фармацевтично ефективну кількість сполуки за будь-яким з пп. 1-5  
7 Спосіб за п. 6, де фармацевтично ефективна кількість становить від 0,05 мг/кг/день до 0,25 мг/кг/день  
8 Фармацевтична композиція, яка містить фармацевтично ефективну кількість солі за будь-яким з пп. 1-5 і один або декілька фармацевтично прийнятних розріджувачів, наповнювачів або носіїв  
9 Фармацевтична композиція за п. 8, яка відрізняється тим, що фармацевтично ефективна кількість становить від приблизно 1 мг до приблизно 20 мг  
10 Сіль за будь-яким з пп. 1-5 для використання як лікарського засобу  
11 Сіль за будь-яким з пп. 1-5 для використання при лікуванні мікросудинних діабетичних ускладнень  
12 Спосіб одержання солі за будь-яким з пп. 1-5, при якому проводять реакцію сполуки, яка має формулу



з метансульфоною кислотою у нереактивному органічному розчиннику

(13) C2

(11) 61897

(19) UA

13 Спосіб за п. 12, де як розчинник використовують ацетон-воду

14 Спосіб за п. 13, де як розчинник використовують ацетон-воду у співвідношенні за об'ємом від приблизно 5:1 до приблизно 10:1

15 Спосіб за п. 14, де як розчинник використовують ацетон-воду у співвідношенні за об'ємом приблизно 9:1

16 Сполука, одержана способом за будь-яким з пп. 12-15

Протеїнкіназа С (PKC) утворює сімейство близькоспоріднених ферментів, які функціонують, як кінзи серину/треоніну. Протеїнкіназа С відіграє важливу роль у передачі міжклітинних сигналів, експресуванні генів та у контролюванні диференціювання та росту клітин. На цей час відомо, що, найменше, десять ізоферментів PKC, які відрізняються за їх розподілом у тканинах, ферментною специфічністю та регуляцією. Нішізукі І (Nishizuka Y.) *Annu Rev Biochem* 58:31-44 (1989), Nishizuka Y. *Science* 258:607-614 (1992).

Ізоферменти протеїнкінази С є поліпептидами з одним ланцюгом, довжина якого складає від 592 до 737 амінокислот. До складу ізоферментів входять регуляторний домен та каталітичний домен, пов'язані лінійним пептидом. Регуляторний та каталітичний домени можуть далі підрозділятися на константні та варіабельні ділянки. Каталітичний домен протеїнкінази С дуже схожий на домен, який мають інші протеїнкінази, у той час як регуляторний домен є

унікальним для ізоферментів PKC. Ізоферменти PKC демонструють 40-80% гомологію на рівні амінокислот у межах групи. Однак, гомологія поодинокого ферменту між різними видами, загалом, перевищує 97%.

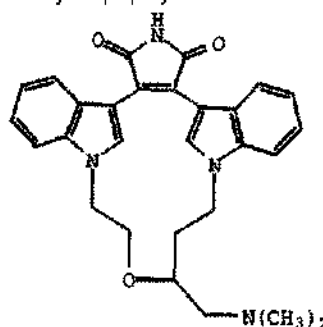
Протеїнкіназа С є ферментом мембрани, який алостерично регулюється рядом факторів, до яких належать фосфоліпіди мембрани, кальцій та певні ліпіди мембрани, наприклад, діацилгліцеролі, які вивільнюються у відповідь на діяльність фосфоліпаз. Белл Р.М. (Bell R.M.) та Бернс Д.Дж. (Burns D.J.) *J Biol Chem* 266:4661-4664 (1991), Нішізукі І. *Science* 258:607-614 (1992). Ізоферменти PKC альфа, бета-1, бета-2 та гамма для повної активації потребують мембранного фосфоліпіду, кальцію та діацилгліцеролового/форболового ефірів. Дельта, епсилон, ета та тета форми PKC є кальційнезалежними щодо свого режиму активації. Дзета та ламбда форми PKC незалежні як від кальцію, так і від діацилгліцерину і для своєї активації, як гадають, потребують лише мембранних фосфоліпідів.

До даного хворобливого стану може бути залучено лише один або два ізоферменти PKC. Наприклад, наслідком підвищення рівнів глюкози у крові, які реєструються при діабеті, є ізофермент-специфічне підвищення рівня ізофермента бета-2 у судинних тканинах. Іногучі (Inoguchi) та інші, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11059-11065 (1992). Пов'язане з діабетом підвищення бета ізоферменту у тромбоцитах людини корелює зі зміною їх реакції на агоністи. Бастир III Е.Дж. (Bastyr III E.J.) та Лу Дж. (Lu J.) *Diabetes* 42 (Додаток 1):97A (1993). Було показано, що рецептор вітаміну D людини

вибірково фосфорилується PKC бета. Це фосфорилування пов'язується зі зміною функціонування рецептору С1 (Hsieh) та інші, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9315-9319 (1991), С1 та інші, *J Biol Chem*, 268:15118-15126 (1993). На додаток до цього, у останній роботі було показано, що ізофермент бета-2 відповідає за проліферацію еритролейкемічних клітин, у той час, як альфа ізофермент залучено до диференціювання мегакаріоцитів у тих же самих клітинах. Муррей (Murray) та інші, *J Biol Chem* 268:15847-15853 (1993).

Убіквітарна природа ізоферментів PKC та їх важлива роль у фізіології є стимулом до продукування високовибіркових інгібіторів PKC (протеїнкінази С). Приймаючи до уваги свідчення, які демонструють зв'язок певних ізоферментів з хворобливими станами, можна зробити цілком обґрунтований висновок про те, що інгібіторні сполуки, селективні по відношенню до одного або двох ізоферментів PKC, порівняльно до інших ізоферментів PKC та інших протеїнкіназ, є чудовими терапевтичними агентами. Такі сполуки демонструють підвищену ефективність та знижену токсичність внаслідок їх специфічності.

Клас N,N'-містечкових бісіндолілмалеїмідів було розкрито у Європейському патенті № 0657458 (заявка США № 08/413735) (на ім'я Хіта (Heath) та інші), опублікованому 14 червня 1995р. Переважною сполукою у цьому N,N'-містечковому ряді є сполука формули I.

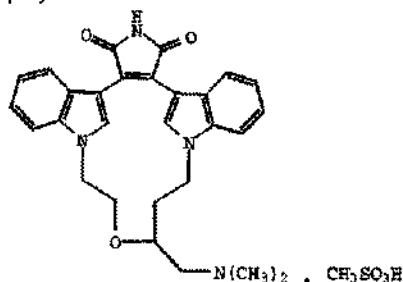


(I)

Цей винахід надає сполуку формули I у вигляді нової сильнодіючої солі. Вкрай несподівано, згадана сіль має поліпшену розчинність та значно поліпшену біодоступність для пацієнту. Крім того, сіль легко одержують та очищують у кристалічній формі. Таким чином, згадана сіль є більш фармацевтично придатним та набагато поліпшеним терапевтичним агентом. Згадана сіль є придатною для лікування станів, пов'язаних з цукровим діабетом та його ускладненнями, шемі, запалень, розладів центральної нервової системи, серцево-судинних хвороб, дерматологічних захворювань та

раку

Винахід надає мезилатну сіль сполуки формули I. Таким чином, цей винахід надає сполуки формули Ia



та її сольвати

Додатковим аспектом цього винаходу є спосіб інгібування РКС, який включає введення ссавцю, який потребує такого лікування, фармацевтично ефективної кількості сполуки формули Ia. Цей винахід додатково надає способи лікування станів, у патології яких відіграє роль РКС, наприклад, ішемії, запалень, розладів центральної нервової системи, серцево-судинних хвороб, дерматологічних захворювань та раку, які включають введення ссавцю, який потребує такого лікування, фармацевтично ефективної кількості сполуки формули Ia.

Цей винахід особливо придатний, як фармацевтичний і, зокрема, при лікуванні мікросудинних діабетичних ускладнень, зокрема, діабетичної ретинопатії, нефропатії та невропатії. Таким чином, цей винахід додатково надає спосіб лікування цукрового діабету та його ускладнень, який включає введення ссавцю, який потребує такого лікування, фармацевтично ефективної кількості сполуки формули Ia.

Заключним аспектом цього винаходу є фармацевтичні лікарські форми, до складу яких входить сполука формули Ia разом з одним або більше фармацевтично прийнятними наповнювачами, носіями або розріджувачами.

Для цілей цього винаходу, який розкривається та заявляється у цьому описі, подальші терміни та скорочення визначаються таким чином:

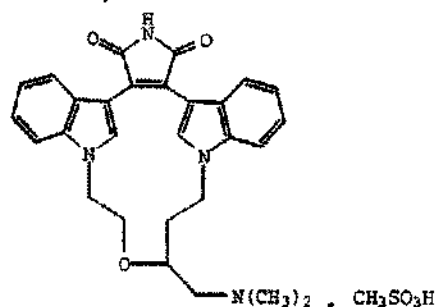
Термін "фармацевтично ефективна кількість", який використовують у цьому описі, означає кількість сполуки, що здатна до інгібування активності РКС у ссавців. Конкретна доза сполуки, введеної відповідно до цього винаходу, буде, звичайно, визначатись конкретними обставинами випадку, у тому числі, сполукою, яку введено, шляхом введення, конкретним станом, який піддається лікуванню та іншими обставинами. Сполука може вводиться різними шляхами, у тому числі перорально, ректально, черезшкірно, підшкірно, місцево, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або інтраназально. У переважному випадку сполуку вводять перорально. Для всіх показань типова денна доза буде містити приблизно від 0,01 мг/кг до 20 мг/кг активної сполуки за цим винаходом. Переважні денні дози будуть містити приблизно від 0,01 до 10 мг/кг, більш переважні - менш, ніж 1 мг/кг і найбільш переважні - приблизно від 0,05 до 0,5 мг/кг.

Термін "лікування", який використовують у цьому описі, описує допомогу та обслуговування пацієнту з метою подолання хвороби, стану або

розладу, і включає введення сполуки за цим винаходом для попередження появи симптомів або ускладнень, полегшення симптомів або ускладнень, або ліквідації хвороби, стану або розладу.

Термін "загальні пов'язані речовини", який використовують у цьому описі, означає відносні кількості домішок у кінцевому продукті. До домішок належать, але ними не обмежуються, проміжні продукти попередньої реакції або небажані побічні продукти реакції у кінцевому продукті. Загальні пов'язані речовини є мірилом чистоти.

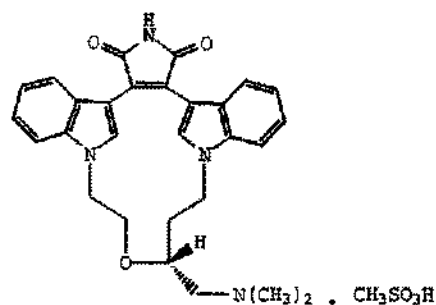
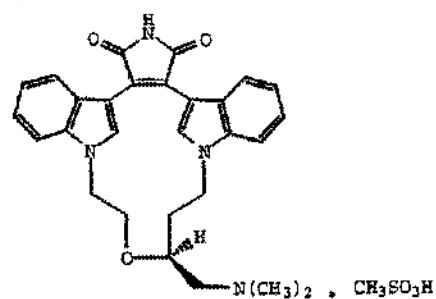
Як зазначалось перед тим, цей винахід надає сполуки формули Ia, які вибірково інгібують протеїнкіназу C.



та її сольвати

Сполуки формули Ia можуть існувати, як сольвати, наприклад, з водою (підрати), метанолом, етанолом, диметилформамідом, етилацетатом та іншими. Можна також одержувати суміші таких підратів та сольватів. Джерелом такого підрату та/або сольвату може бути розчинник кристалізації, який входить до складу розчинника для одержання або кристалізації, або ж сторонній до такого розчинника. Такі підрати та сольвати входять до обсягу цього винаходу. У переважному випадку, сполуки формули Ia одержують, як монопідрати або трипідрати.

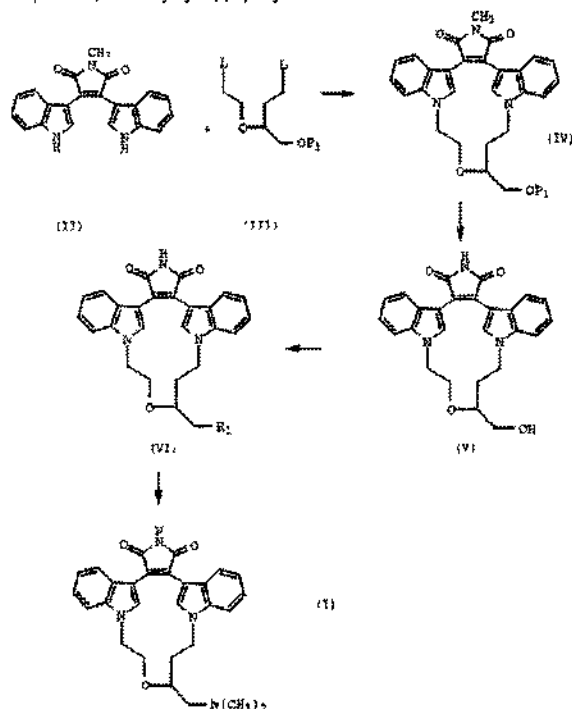
Визнається, що можуть існувати різні стереоізомерні форми сполук формули Ia. Переважними сполуками цього винаходу є сполуки формул Ib та Ic.



Однак, рацемати та окремі енантіомери та їх

суміші утворюють частину цього винаходу

Препарат вільної основи, формула I, описано у Європейському патенті №0857458, опублікованому 14 червня 1995р (на ім'я Хіта), який включено до цього опису як посилання. У переважному варіанті, сполуку одержують таким чином



$R_1$  - О-мезил або Br;  $P_1$  - гідроксильна захисна група, переважно, третбутилдифенілсілілокси (TBDPS), третбутилдиметилсілілокси (TBDMS), трифенілметил (тритил), моно- або диметокситритил, або алкільовий або ариловий ефір; L - відщеплювана група, наприклад, хлор, бром, йод, мезил, тозил та інші. У переважному випадку L-О-мезил або Br.

Реакція для одержання сполуки IV здійснюється будь-якими відомими способами одержання N-заміщених індолів. До реакції, звичайно, залучають приблизно еквімолярні кількості реактивів II та III, хоча придатними є інші співвідношення, особливо ті, де алкілюючий реактив використовують у надлишковій кількості. Реакцію найкраще проводити у полярному апротонному розчиннику з використанням солі лужного металу або інших умов алкілювання, відомих у цій галузі техніки. До реакційних умов належать наступні: калію гексаметилдісілазид у диметилформаміді або тетрагідрофурані, натрію пїрид у диметилформаміді. У переважному випадку, реакцію здійснюють за умов повільного зворотного додавання карбонату цезія у ацетонітрилі або диметилформаміді (DMF). Температура реакційної суміші, у переважному випадку, коливається у межах, приблизно, від температури докочинного середовища до температури перегонки.

Сполуку IV перетворюють на сполуку V за способами, відовими у цій галузі техніки для позбавлення захисту гідрокси. Сполуку V, звичайно, перетворюють на сполуку VI шляхом реагування сполуки V з метансульфоновим ангідридом та піридином у THF або метиленхлориді у атмосфері

азоту, або реагування спирту з бромом у присутності трифенілфосфіну або трифенілфосфту та піридину у метиленхлориді, THF або ацетонітрилі, або іншому придатному розчиннику. Сполуку VI перетворюють на диметиламін, сполуку I, шляхом реагування сполуки VI з диметиламіном у полярному розчиннику, наприклад, DMF, THF/воді, диметилацетаміді або за інших умов, відомих у цій галузі техніки.

Мезилатну сіль, що заявлена, одержують шляхом реагування сполуки формули I з метансульфоновою кислотою у неактивному органічному розчиннику, переважно, суміші органічної кислоти/води, найбільш переважно, води-ацетону. Придатними є інші розчинники, наприклад, метанол, ацетон, етилацетат та їх суміші. Співвідношення розчиннику та води не є критичним і, взагалі, визначається розчинністю реактивів. Переважні співвідношення розчиннику до води складають, взагалі, від 0,1:1 до 100:1 розчиннику до води за об'ємом. Переважним співвідношенням є 1:1-20:1 і найбільш переважним 5:1-10:1. Оптимальне співвідношення залежить від обраного розчиннику, яким є, переважно, ацетон, і складає 9:1 (співвідношення розчинник:вода). До реакції, звичайно, залучають приблизно еквімолярні кількості двох реактивів, хоча придатними є інші співвідношення, особливо ті, де метансульфову кислоту використовують у надлишковій кількості. Швидкість додавання метансульфонові кислоти не є критичною для реакції. Вона може додаватись швидко (<5 хвилин) або повільно, впродовж 6 або більше годин. Реакцію здійснюють при температурі у межах від 0°C до температури перегонки. Реакційну суміш перемішують до завершення утворення солі, що визначається за допомогою рентгенівської порошкової дифракції і може тривати від 5 хвилин до 12 годин. Солі за цим винаходом переважно і легко одержують у кристалічній формі. Тригідратну форму солі можна легко перетворити на моногідратну шляхом висушування або піддавання дії 20-60% відносної вологості. Сіль є, по суті, кристалічною, і демонструє певну точку плавлення, подвійне променезаломлення та рентгенограму. Взагалі, до складу кристалів входить менш, ніж 10% аморфної твердої речовини, у переважному випадку, менш, ніж 5% і у найбільш переважному випадку, менш, ніж 1% аморфної твердої речовини.

Мезилатну сіль виділяють фільтруванням або іншими способами відокремлення, відовими у цій галузі техніки, безпосередньо з реакційної суміші з виходом, який складає від 50% до 100%. Для подальшого очищення солі, у разі потреби, можна застосовувати перекристалізацію або інші способи очищення, відові у цій галузі.

Наступні приклади та препарати наведено тільки з метою додаткового ілюстрування цього винаходу. Обсяг цього винаходу не розглядається, як такий, що обмежується наступними прикладами. У подальших прикладах та препаратах температура плавлення, спектри ядерного магнітного резонансу, мас-спектри, рідинна хроматографія високого тиску на силікагелі, N,N-диметилформамід, паладій на деревному вугіллі, тетрагідрофуран та етилацетат скорочуються таким чином: M P, NMR, MS, HPLC, DMF, Pd/C, THF.

та EtOAc, відповідно. Терміни "NMR" та "MS" вказують на те, що спектр відповідає необхідній структурі

#### Препарат 1

3-(2-[(метилсульфоніл)окси]етокси)-4-(трифенілметокси)-1-бутанолметансульфонат

Тритилхлорид (175,2г, 0,616 моль) розчиняли у 500мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  у атмосфері  $\text{N}_2$ . Додавали триетиламін (71,9г, 100мм, 0,710 моль), потім R,S-глицидний спирт (50,0г, 0,648 моль), і реакційну суміш нагрівали у колбі зі зворотним холодильником при температурі 42°C впродовж 4 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і двічі екстрагували 250мл водного насиченого розчину хлориду амонію та 250мл розсолу. Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 100мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , органічний шар сушили ( $\text{MgSO}_4$ ) та випарювали in vacuo до одержання тритилглицидного спирту у вигляді масла, яке перекристалізовували з етанолу до одержання 104,4г (54%) тритилглицидного спирту у вигляді твердої речовини.

1М THF розчину вінілмагнійброміду (50мл, 50 ммоль, 2,0екв) охолоджували до -20°C у атмосфері  $\text{N}_2$  і додавали каталітичну кількість йодиду міді (0,24г, 1,26 ммоль, 0,05екв). Одержану суміш перемішували при -20°C впродовж 5 хвилин, після чого впродовж 15 хвилин при -20°C прикrapлювали 12 розчин тритилглицидного спирту (7,91г, 25,0 ммоль) у 40мл сухого THF. Реакційну суміш перемішували впродовж 3 годин при -20°C, після чого витримували до нагрівання до кімнатної температури і перемішували впродовж 15 хвилин. Реакцію припиняли охолодженням реакційної суміші до -30°C і повільно додавали 125мл водного насиченого розчину хлориду амонію. Одержану суміш екстрагували 200мл етилацетату. Після цього органічний шар екстрагували водним розчином 0,93г (2,50 ммоль, 0,1екв) дигідрату динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) у 125мл деіонізованої води для видалення будь-яких металів. Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 50мл етилацетату, змішані органічні шари промивали 100мл розсолу, сушили ( $\text{MgSO}_4$ ) випарювали in vacuo до одержання масла, яке фільтрували через діоксид кремнію (76 г) з застосуванням 1,2 л (3/1) гексанів/етилацетату. Фільтрат випарювали in vacuo до одержання 9,07г 1-0-(трифенілметил)-2-гідроксипентанолу у формі масла світло-жовтого кольору (100%).

60% суспензію гідриду натрію у мінеральному маслі (6,13г, 0,153 моль, 1,5екв) суспендували у 175мл сухого THF, який додавали при кімнатній температурі. Утворену суміш перемішували при кімнатній температурі впродовж 1,5 години, після чого за допомогою шприца додавали 17,7мл (0,204 ммоль, 2,0екв) свіжодистильованого алілброміду. Реакційну суміш нагрівали до 45°C впродовж 1 години. Розвиток реакції контролювали за допомогою TLC або HPLC. Реакційну суміш охолоджували до 0°C і для гасіння надлишкової основи повільно додавали 400мл водного насиченого розчину хлориду амонію. Утворену суміш екстрагували 800мл етилацетату і органічний шар промивали 500мл води. Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 100мл етилацетату, змішані

органічні шари промивали 200мл розсолу, сушили ( $\text{MgSO}_4$ ) і випарювали in vacuo до одержання 41,5г (>100%)

1,1',1''-[[[2-(2-пропенілокси)-4-пентеніл]окси]метилідин]трис[бензолу] у вигляді масла жовтого кольору 1,1',1''-[[[2-(2-пропенілокси)-4-

пентеніл]окси]метилідин]трис[бензолу] (39,3г, 0,102 моль) розчиняли у розчині 390мл безводного метилового спирту та 60мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  і охолоджували до -40° - -50°C з одночасним барботуванням  $\text{N}_2$  через в'язкий реакційний розчин. Озон барботували через реакційну суміш при температурі від -50°C до -40°C впродовж 80 хвилин, доки колір реакційної суміші не став блідо-голубим. Одержану реакційну суміш витримували до нагрівання до 0°C у атмосфері  $\text{N}_2$ , після чого для зупинки реакції повільно додавали розчин борогідриду натрію (23,15г, 0,612 моль, 6екв) у 85мл етанолу/85мл води з одночасним підтриманням температури реакційної суміші нижче 10°C. Реакційну суміш перемішували на льодяній бані впродовж 30 хвилин, після чого витримували до нагрівання до кімнатної температури і перемішували впродовж ночі. Температура після нагрівання підвищувалась до 31 °C. Реакційну суміш розводили 400мл водного насиченого розчину хлориду амонію і екстрагували 800мл етилацетату. Органічний шар промивали 400мл води і водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 150мл етилацетату. Змішаний органічний шар промивали 200мл розсолу, сушили ( $\text{MgSO}_4$ ) і випарювали in vacuo до одержання каламутного масла. Це масло перекристалізовували з (2/1) гексанів/етилацетату трьома заходами до одержання 28,9г 3-(2-гідроксиетокси)-4-(трифенілметокси)-1-бутанолу (72%).

3-(2-гідроксиетокси)-4-(трифенілметокси)-1-бутанол (14,0г, 35,7 ммоль) розчиняли у 140мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , охолоджували до 0°C у атмосфері  $\text{N}_2$  і додавали триетиламін (10,8г, 14,9мм, 0,107 моль, 3,0екв). Після цього при <5°C прикrapлювали метансульфонілхлорид (11,0г, 7,46мм, 96,4 ммоль, 2,7екв). Одержану реакційну суміш розводили додатковою кількістю  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300мл) і промивали 200мл води і 200мл водного насиченого розчину хлориду амонію. Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 50мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , змішаний органічний шар промивали 100мл розсолу, сушили ( $\text{MgSO}_4$ ) і випарювали in vacuo до одержання 18,4г (94%)

3-(2-[(метилсульфоніл)окси]етокси)-4-(трифенілметокси)-1-бутанолметансульфонату у вигляді твердої речовини білого кольору

#### Препарат 2

(S)-тритилглицидний спирт

Тритилхлорид (2866г, 10,3 моль) розчиняли у 7л  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  у атмосфері  $\text{N}_2$ . Додавали триетиламін (1189г, 1638мм, 11,8 моль), потім (R)-(+)-глицидний спирт (795,0г, 10,6 моль) з використанням 1л  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , як рідини для промивки. Реакційний розчин нагрівали у колбі зі зворотним холодильником при температурі 42°C впродовж 3-4 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і додавали 3 л розсолу. Органічний шар сушили (600г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) і випарювали in vacuo до одержання цільової сполуки у вигляді масла, яке перекристалізовували з етанолу до одержання 2354г (70%) цільової сполуки у вигляді твердої

речовини

Препарат 3

(S)-3-[2-[(метилсульфоніл)окси]етокси]-4-(трифенілметокси)-1-бутанолметансульфонат

1М THF розчину вінілмагнійброміду (5,76л, 5,76 моль, 1,96екв) охолоджували до -20°C у атмосфері N<sub>2</sub> і додавали каталітичну кількість йодиду міді (28,2г, 0,148 ммоль, 0,05екв) Одержану суміш перемішували при -20°C впродовж 5 хвилин, після чого впродовж 1,5 годин при -20°C прикrapлювали розчин (S)-третилгліцидного спирту (929,0г, 2,94 моль) у 3,2л сухого THF

Реакційну суміш перемішували впродовж 1 години при -20°C Реакцію припиняли охолодженням реакційної суміші до -30°C і повільно додавали 5 л насиченого розчину хлориду амонію Після цього органічний шар двічі екстрагували 1л 10% (маса/об'єм) розчину дигідрату динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти EDTA для видалення будь-яких металів Органічний шар промивали 2 л розсолу, сушили (MgSO<sub>4</sub>) і випарювали in vacuo до одержання 1061г (96%) (S)-1-О-трифенілметил-4-гідроксипентанолу у вигляді масла

60% суспензію пдриду натрію у мінеральному маслі (268,9г, 6,72 моль, 1 екв) суспендували у 2,8л сухого THF у атмосфері N<sub>2</sub>, і при кімнатній температурі додавали розчин (S)-1-О-трифенілметил-4-гідроксипентанолу (1543г, 4,48 моль) у 5,8л сухого THF Одержану суміш перемішували при кімнатній температурі впродовж 1,5 годин, потім, впродовж 20 хвилин, додавали 770мл (8,89 моль, 2,0екв) свіжодистильованого алілброміду Реакційну суміш нагрівали до 45°C впродовж 1-2 годин Реакційну суміш охолоджували до 15°-20°C і для гасіння надлишкової основи повільно додавали 2л водного насиченого розчину хлориду амонію Утворену суміш розводили 1 л етилацетату та 1 л води і виділяли органічний шар Водний шар піддавали зворотному екстрагуванню 500мл етилацетату і змішані органічні шари сушили (MgSO<sub>4</sub>) і випарювали in vacuo до одержання 1867г (98%) (S)-1,1',1''-[[[2-(2-пропенілокси)-4-пентеніл]окси]метилідин]трис[бензолу] у вигляді масла жовтого кольору

(S)-1,1',1''-[[[2-(2-пропенілокси)-4-пентеніл]окси]метилідин]трис[бензолу] (1281г, 3,33 моль) розчиняли у розчині 4 л безводного метилового спирту та 3,6л CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> і охолоджували до -40° - -50°C з одночасним барботуванням N<sub>2</sub> через в'язкий реакційний розчин До реакційної суміші додавали індикатор судан III, і озон барботували через реакційну суміш при температурі від -50°C до -35°C впродовж 13 годин, доки колір реакційної суміші не змінювався з персикового на світло-зелений/жовтий Одержану реакційну суміш витримували до нагрівання до 0°C у атмосфері N<sub>2</sub> після чого впродовж 40 хвилин повільно додавали до розчину борогдриду натрію (754г, 19,9 моль, 6екв) у 2,5л етанолу/2,5л води з одночасним підтриманням температури реакційної суміші нижче 30°C Після цього реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі впродовж ночі Проходження реакції контролювали за допомогою HPLC Реакційну суміш охолоджували до 10°C-15°C і повільно додавали до 4л водного насиченого розчи-

ну хлориду амонію при <20°C Після цього охолоджену реакційну суміш фільтрували і тверді речовини промивали 3л CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Органічний шар виділяли і промивали 3л водного насиченого розчину хлориду амонію, водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 1л CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Змішаний органічний шар сушили (MgSO<sub>4</sub>) і випарювали in vacuo до одержання 1361г (>100%) (S)-3-(2-гідроксиетокси)-4-(трифенілметокси)-1-бутанолу у вигляді масла

(S)-3-(2-гідроксиетокси)-4-(трифенілметокси)-1-бутанол (500г, 1,27 моль) розчиняли у 4,8л CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, охолоджували до 0°C у атмосфері N<sub>2</sub> і додавали триетиламін (386,4г, 532мл, 3,81 моль, 3,0екв) Після цього впродовж 30 хвилин при <5°C прикrapлювали метансульфонілхлорид (396,3г, 268мл, 3,46 моль, 2,7екв) Одержану реакційну суміш перемішували при 0°-5°C впродовж 1-2 годин, розвиток реакції контролювали за допомогою HPLC Реакційну суміш розводили додатково кількістю CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> і двічі промивали 2л води і 2л водного насиченого розчину хлориду амонію Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 1л CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, змішаний органічний шар сушили (MgSO<sub>4</sub>) і випарювали in vacuo до одержання неочищеної твердої речовини, яку перекристалізовували з (1/1) гептану/етилацетату до одержання 615г (88%) (S)-3-[2-[(метилсульфоніл)окси]етокси]-4-(трифенілметокси)-1-бутанолметансульфонату трьома заходами у вигляді твердої речовини MS NMR

Препарат 4

3-[2-[йодоетокси]-4-(трифенілметокси)-1-йодобутан

Розчин 3-(2-[(метилсульфоніл)окси]етокси)-4-(трифенілметокси)-1-бутанолметансульфонату (5,0г, 9,10 ммоль) у 500мл ацетону аналітичної чистоти обробляли бікарбонатом натрію (0,0770г, 0,910 ммоль, 0,1екв) та йодидом натрію (34,2г, 0,228 моль, 25екв) Утворену суміш перемішували при 50°C у атмосфері N<sub>2</sub> впродовж, приблизно, 16 годин Розвиток реакції можна контролювати за допомогою HPLC Ацетон видаляли з реакційної суміші in vacuo і одержану тверду речовину екстрагували сумішшю 300мл етилацетату/200мл води Органічний шар промивали додатково 200мл води, змішаний водний шар піддавали зворотному екстрагуванню за допомогою додаткових 100мл етилацетату Змішаний органічний шар промивали 200мл 10% водного розчину сульфату натрію (завдяки цьому промиванню видалили жовтий колір), 100мл розсолу, сушили (MgSO<sub>4</sub>) і випарювали in vacuo до одержання 5,45г (98%) 3-[2-[йодоетокси]-4-(трифенілметокси)-йодобутану у вигляді прозорого масла MS NMR

Препарат 5

(S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-[метансульфонілокси(метил)]-4,9,16,21-диметено-1H,13H-дибензо[E,K]піролор 4-H1], [3,4,13]оксадіазациклогексадецин-1 3-діон 3,4-(біс)-(1H-індол-3-іл)-N-метилмалеїмід (10,04г, 29,4 ммоль) та (S)-3-(2-йодоетокси)-4-(третбутилдифенілсилілокси)-1-йодобутан (17,9г, 29,4 ммоль) змішували і розчиняли у безводному DMF (80мл) Розчин за допомогою шприц-насосу впродовж 72 годин додавали до суспензії карбона-

ту цезію (38,3г, 118 ммоль) у безводному DMF (1,7л) при 50°C у атмосфері  $N_2$  DMF видаляли in vacuo. Залишок розподіляли між  $CHCl_3$ /1N HCl. Кислий шар піддавали зворотному екстрагуванню хлороформом та етилацетатом. Змішані органічні шари промивали 1N HCl (1х), водою (2х), розсолон (2х), сушили над  $Na_2SO_4$  і відновлювали до одержання твердого фуксину. Неочищену реакційну суміш використовували без подальшого очищення.

Неочищену реакційну суміш суспендували у етанолі (700мл) і обробляли 5N KOH (800мл). Температуру реакції підвищували до 80°C. Через 72 години етанол видаляли in vacuo, водну суспензію охолоджували до 0°C і підкислювали 5N HCl. Осад фіолетового кольору збирали і пропускали через шар діоксиду кремнію з елюванням етилацетатом. Елюент концентрували до одержання 8,7г частково сипльованого малеїмиду у вигляді твердого фуксину, який використовували у наступній реакції без подальшого очищення.

До розчину (1л) вищезгаданого ангідриду (8,7г, 19,7 ммоль) у DMF додавали 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазан (41,6мл, 197 ммоль) та метанол (4мл, 98,5 ммоль) у атмосфері азоту при температурі доколишнього середовища. Через 40 годин реакційну суміш концентрували in vacuo, додавали розчин (100мл) (2:1 у об'ємному відношенні) MeCN/1N HCl. Залишок перемішували впродовж 1 години. Органічний розчинник видаляли, водну суспензію екстрагували етилацетатом. Розчинники видаляли до одержання 8,9г малеїмиду, який було використано без подальшої очистки.

До суспензії (800мл) вищезгаданого малеїмиду (8,9г, 20 ммоль) у  $CH_2Cl_2$  у атмосфері азоту при температурі доколишнього середовища додавали придин (4,85мл, 60 ммоль) та незначний надлишок метансульфонового ангідриду (4,21г, 24 ммоль). Через 16 годин реакційну суміш промивали 0,1N HCl, розсолон і органічний шар концентрували. Залишок пропускали через шар діоксиду кремнію з малим градієнтом 0-10% MeCN у  $CH_2Cl_2$ . Елювану фракцію, яка містила у собі необхідний мезилат, концентрували до одержання 2,8г цільової сполуки у вигляді твердого фуксину. Загальний вихід з дийодиду складав 18%. MS

Препарат 6

(S)-13-[(диметиламіно)метил]-10,11,14,15-тетрагідро-4,9,16,21-диметено-1H,13H-добензо[E,K]піроло[3,4-H][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2H)-діон 2,3-біс-(1H-індоп-3-іл)-N-метилмалеїмід (114,7г, 0,336 моль) та (S)-3-[2-[(метилсульфоніл)окси]етокси]-4-(трифенілметокси)-1-бутанолметансульфонат (220,0г, 0,401 моль, 1,2екв) розчиняли у 4,3 л DMF. Після цього цей розчин реактивів повільно додавали впродовж 70 годин (приблизно, 1мл/хвилину) до 50°C суспензії карбонату цезію (437,8г, 1,34 моль, 4,0екв) у 7л DMF. Через 70-72 години реакційну суміш охолоджували і фільтрували, DMF видаляли in vacuo до одержання залишку, який розчиняли у 4,6л  $CH_2Cl_2$ . Органічний шар екстрагували 1,15л водної 1N HCl, потім 4,6 л розсолу. Змішані водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 1,1л  $CH_2Cl_2$ . Змішаний органіч-

ний шар сушили ( $Na_2SO_4$ ) і фільтрували. Більшу частину розчинника видаляли in vacuo і утворений розчин фільтрували через 2кг сипкагелю з застоуванням додаткової кількості  $CH_2Cl_2$  (4-5 галонів (15-19л)) для видалення вихідного матеріалу. Розчинник видаляли in vacuo і одержану тверду речовину пурпурового кольору розчиняли у 7 об'ємах ацетонітрилу (виходячи з маси неочищеного (S)-10,11,14,15-тетрагідро-2-метил-13-[(трифенілметокси)метил]-4,9,16,21-диметено-1H,13H-добензо[E,K]піроло[3,4-H][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2H)-діону до одержання 150,2г (57%) (S)-10,11,14,15-тетрагідро-2-метил-13-[(трифенілметокси)метил]-4,9,16,21-диметено-1H,13H-добензо[E,K]піроло[3,4-H][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2H)-діону після сушіння (89% чистота за даними HPLC у порівнянні зі стандартом).

(S)-10,11,14,15-тетрагідро-2-метил-13-[(трифенілметокси)метил]-4,9,16,21-диметено-1H,13H-добензо[E,K]піроло[3,4-H][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2H)-діон (32,7г, 46,9 ммоль) суспендували у 1,6л етанолу та 1,6л водного 10N KOH. Одержану суміш нагрівали у колбі зі зворотним холодильником при температурі 78°C впродовж 19 годин. Більша частина твердих речовин розчинилась при досягненні температури перегонки. Реакційний розчин охолоджували до 10-15°C, і при температурі <15°C повільно додавали водну 10N HCl (1,2л) для доведення pH до 1. Внаслідок підкислення утворилась суспензія червоного кольору. Реакційну суміш розводили 500мл  $CH_2Cl_2$ , перемішували впродовж 20 хвилин і фільтрували для видалення більшості солей. Солі промивали додатковою кількістю  $CH_2Cl_2$  (1,5л) і фільтрат двічі екстрагували 1л води. Змішані водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 1л  $CH_2Cl_2$  і органічний шар сушили ( $MgSO_4$ ). Розчинник видаляли in vacuo до одержання 36,0г (>100%) (S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-[(трифенілметокси)метил]-4,9,16,21-диметено-13H-добензо[E,K]фуоро[3,4-H][1,4,13]-оксадіазациклогексадецин-1,3-діону у вигляді твердого речовини пурпурового кольору (80% чистота за даними HPLC).

(S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-[(трифенілметокси)метил]-4,9,16,21-диметено-13H-добензо[E,K]фуоро[3,4-H][1,4,13]-оксадіазациклогексадецин-1,3-діон (36,0г, приблизно 46,9 ммоль) розчиняли у 320мл сухого DMF у атмосфері  $N_2$  і обробляли попередньо змішаним розчином 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазану (99мл, 75,7г, 0,469 моль, 10екв) та метанолу (9,5мл, 7,51г, 0,235 моль, 5екв). Утворений розчин нагрівали при 45°C впродовж 7 годин. Розвиток реакції можна контролювати за допомогою HPLC. Більшу частину DMF видаляли in vacuo, одержаний залишок екстрагували 200мл етилацетату і промивали 200мл води та двічі 100мл водного 5% розчину UCl. Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 100мл етилацетату. Змішаний органічний шар промивали 200мл насиченого водного розчину хлориду амонію. Змішаний органічний шар сушили ( $MgSO_4$ ) і випарювали in vacuo до одержання 35,9г (>100%) неочищеного (S)-10,11,14,15-

тетрагідро-13-[(трифенілметокси)метил]-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону у вигляді твердої речовини пурпурового кольору

(S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-

[(трифенілметокси)метил]-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діон (34,0мл, приблизно 46,8 ммоль) розчиняли у 350мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  і охолоджували до  $-25^\circ\text{C}$  у атмосфері  $\text{N}_2$ . Безводну газоподібну  $\text{HCl}$  барботували через реакційну суміш впродовж, приблизно, 1-2 хвилин при  $<0^\circ\text{C}$ . Утворену суміш витримували до нагрівання до кімнатної температури і перемішували впродовж 1 години. Розвиток реакції можна контролювати за допомогою HPLC. Суспензію фільтрували і тверді речовини промивали 200мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Тверді речовини сушили у вакуумній печі при  $50^\circ\text{C}$  до одержання 18,6г (90%) (S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-(гідроксиметил)-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону у вигляді твердої речовини пурпурового кольору (93% чистота за даними HPLC).

Суспензію (S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-(гідроксиметил)-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону (18,2г, 41,2 ммоль) у 900мл THF обробляли при діном (9,78г, 10,0мл, 0,124 ммоль, 3екв) та метансульфоновим ангідридом (14,3г, 80,4 ммоль, 2екв) і нагрівали у колбі зі зворотним холодильником при температурі  $67^\circ\text{C}$  впродовж 16 годин у атмосфері  $\text{N}_2$ . Розвиток реакції можна контролювати за допомогою HPLC. Після цього реакційну суміш охолоджували, розводили 600мл етилацетату та двічі екстрагували 300мл  $\text{IN HCl}$  та один раз 600мл води. Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню 300мл етилацетату, органічний шар сушили ( $\text{MgSO}_4$ ). Розчинник видаляли *in vacuo* до одержання 19,0г (S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-[[метилсульфоніл]окси]метил]-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону, який розпорошували у 190мл гарячого ( $40^\circ\text{C}$ )  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , фільтрували у гарячому стані і промивали додатковими 100мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  кімнатної температури до одержання 17,3г (81%) (S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-[[метилсульфоніл]окси]метил]-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону у вигляді твердої речовини пурпурового кольору (96% чистоти за даними HPLC).

(S)-10,11,14,15-тетрагідро-13-

[[метилсульфоніл]окси]метил]-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діон (9,50г, 16,3 ммоль) розчиняли у 475мл THF і додавали 172мл 40% водного розчину диметиламіну (0,173 моль, 75екв), утворений розчин нагрівали при  $65^\circ\text{C}$  у герметизованій реакційній судині (8-10 фунтів/дюйм<sup>2</sup> (56,25-70,31кгс/см<sup>2</sup>)) впродовж 19 годин. Реакційну суміш охолоджували і розводили 900мл етилацетату, органічний шар двічі екстрагу-

вали 450мл води і один раз 200мл розеолу. Водні шари піддавали зворотному екстрагуванню додатковими 250мл етилацетату, органічний шар сушили ( $\text{MgSO}_4$ ), розчинник видаляли *in vacuo* до одержання 7,82г (S)-13-[(диметиламіно)метил]-10,11,14,15-тетрагідро-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону (91%).

#### Приклад 1

Мезилатна сіль

(S)-13-[(диметиламіно)метил]-10,11,14,15-тетрагідро-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діон (3,0г, 6,4 ммоль) суспендували у 90мл ацетону аналітичної чистоти. Метансульфонову кислоту (0,62г, 1екв) розчиняли у 10мл деіонізованої води і додавали до суспензії основа/ацетон. Утворену суспензію червонувато-оранжевого кольору перемішували і фільтрували з застосуванням 25мл ацетону, як рідини для промивки, до одержання 2,92г (81%) мезилатної солі після сушіння. Усі процедури, у тому числі й промивки, здійснювали при кімнатній температурі.

#### Приклад 2

Монохлористоводнева сіль

Монохлористоводневу сіль (S)-13-[(диметиламіно)метил]-10,11,14,15-тетрагідро-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону одержували шляхом

суспендування основи (3,0г, 6,4 ммоль) у 120мл (1екв) метанолу. Додавали водний розчин  $\text{IN HCl}$ . Утворену суміш перемішували, приблизно, впродовж 16 годин і фільтрували з застосуванням 25мл метанолу, як рідини для промивки. Одержану сіль сушили у вакуумній печі впродовж ночі при  $50^\circ\text{C}$  до одержання хлористоводневої солі. Усі процедури, у тому числі й промивки, здійснювали при кімнатній температурі.

#### Приклади 3-8

Солі хлористоводнева, сульфат, тартрат, сукцинат, ацетат та фосфат. Солі хлористоводнева, сульфат, тартрат, сукцинат, ацетат та фосфат одержували з використанням розчинювальної суміші метанол/вода за допомогою способів, відомих у цій галузі. Кожну з солей одержували шляхом додавання водного розчину кислоти до суспензії (S)-13-[(диметиламіно)метил]-10,11,14,15-тетрагідро-4,9 16,21-диметено-1Н, 13Н-дibenзо[Е,К]піроло[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону у метанолі.

Вкрай несподівано, згадана сіль має поліпшену розчинність і, найбільш суттєво, значно поліпшену біодоступність для пацієнту. Сіль легко одержують у вигляді поодиноких кристалів, наслідком чого є більш значне зниження кількості домішок. Наступні приклади дають змогу проведення порівняльного аналізу для демонстрації несподіваних та чудових властивостей згаданої солі.

#### Приклад 9

Порівняння виходу, загальних пов'язаних речовин та залишкової кількості розчинників



Термін "загальні пов'язані речовини" означає відносно кількості домішок у кінцевому продукті і, таким чином, є мірипом чистоти. Відносно одержаних солей, найвищий вихід, 82%, спостерігали під час одержання сульфату (Таблиця I), найнижчий вихід, 52%, спостерігали у разі сукцинату. Незважаючи на те, що під час одержання кожної зі згаданих солей було досягнуто зниження кількості загальних пов'язаних речовин (TRS), найбільше

зменшення, яке дорівнювало 5,26%, спостерігали під час одержання мезилату. Хлористоводнева сіль була єдиною, до складу якої входив залишковий метанол (0,62мас %) після сушіння при 50°C у вакуумній печі впродовж, приблизно, 16 годин. До складу сукцинату, ацетату та фосфату входило від 0,18 до 1,32% THF (за даними GC), який, як гадають, залишився у солях з передостаннього етапу синтезування, який було здійснено у водному THF.

Таблиця I

Вихід, %-ний вміст TRS та %-ний вміст залишкового розчинника різних солей

Сіль	Вихід(%)	TRS (%; HPLC) <sup>a</sup>	Залишкові розчинники, (%) <sup>b</sup>
HCl	69	9,12	0,62 MeOH
Сульфат	82	7,28	відсутні
Тартрат	77	8,95	відсутні
Мезилат	63	4,72	відсутні
Сукцинат <sup>c</sup>	52	7,86	1,32 THF
Ацетат <sup>c</sup>	68	8,05	1,12 THF
Фосфат <sup>d</sup>	79	6,28	0,18 THF

<sup>a</sup> Вільна основа, яку було використано для одержання цих солей, мала 9,98% TRS. <sup>b</sup> Межа визначення складала 0,1% (1000 частин на мільйон). Усі солі перед проведенням випробувань одержували у метанолі/воді і сушили, приблизно, впродовж 16 годин у вакуумній печі при 50°C. <sup>c</sup> Сукцинат та ацетат не були повністю відтитровані за умов одержання, як визначено рентгенівською порошковою дифракцією. <sup>d</sup> Фосфат було частково титровано, як визначено рентгенівською порошковою дифракцією.

Приклад 10

Порівняння рентгенівської дифракції

Солі також порівнювались за допомогою поляризаційної мікроскопії для визначення ступеню кристалічності (двозаломлення). Рентгенівська порошкова дифракція засвідчила, що тільки хлористоводнева, мезилатна, сукцинатна та ацетатна солі були кристалічними і мали унікальні рентгенограми. Рентгенограми сукцинату та ацетату були дуже схожими і, як було показано, корелювали з

рентгенограмою вільної основи. Сульфат, тартрат та фосфат мали низький ступінь кристалічності і були, значною мірою, аморфними. Перевага надається кристалічним солям завдяки легкості очищення та наступного маніпулювання.

Приклад 11

Порівняння розчинності

Розчинність кожної солі у воді визначали за допомогою УФ-аналізу (Таблиця II) і порівнювали. Вкрай несподівано, мезилатна сіль мала найвищу розчинність у воді, 1,76мг/мл. Розчинність мезилату значно вища, аніж у інших солей. Дані Таблиці II свідчать про те, що розчинність згаданої солі у воді у 6 разів перевищує розчинність найбільш поширеної фармацевтично прийнятої солі, хлористоводневої (0,268мг/мл). Наступні дослідження постійно демонстрували 2-6-кратне підвищення розчинності. Високий pH, який спостерігався у разі сукцинату та ацетату, свідчив про присутність не-титрованої вільної основи.

Таблиця II

Розчинність у воді

Сіль	Розчинність (мкг солі/мл H <sub>2</sub> O)	Розчинність (мкг основи/мл H <sub>2</sub> O)	pH (насичений водний розчин)
HCl	268	249	4,98
Сульфат	14	12	2,57
Мезилат	1760	1460	4,69
Сукцинат	0,5	0,4	7,72
Тартрат	71	54	3,77
Ацетат	1	0,9	7,80
Фосфат	736	609	3,78

Розчинність мезилатної солі у воді значною мірою залежить від pH, оскільки оптимальна розчинність спостерігалась при pH 4,0-5,0, переважно, при pH 4,5 (2,25 мг/мл). Розчинність явно падає

при більшому або меншому pH. На додаток до залежності розчинності від pH, розчинність мезилатної солі у воді явно падає у разі додавання хлориду у формі хлориду натрію внаслідок утво-

рення хлористоводневої солі

Приклад 12

Порівняння результатів термогравіметричного аналізу (TGA) диференційної сканувальної калориметрії (DSC та високотемпературної мікроскопії за

Метлером

Кожну сіль було проаналізовано засобами TGA, DSC, високотемпературного мікроскопіювання за Метлером з порівнянням результатів (Таблиця III). Солі демонстрували 0,73-5,50% втрату маси при нагріванні від 20° до 100°C. Сульфат, тартрат та фосфат демонстрували найвищу втрату маси, яка дорівнювала 5,50% у кожній з них. При нагріванні солей від 100 до 200°C, подальша втрата маси спостерігалась тільки у хлористовод-

невої, сукцинатної та ацетатної солей. Результати DSC засвідчили, що мезилатна сіль давала гострий пік ендотермічного розтоплення при 261,6°C. Сульфатна сіль демонструвала дещо ширшу ендотерму при 267,4°C. За даними DSC, хлористоводнева, сукцинатна, тартратна, ацетатна та фосфатна солі не мали ендотермічного розтоплення. За даними DSC, сукцинат, ацетат та фосфат демонстрували екзотермію приблизно при 245°C. Зразки було досліджено також засобами високотемпературного мікроскопіювання за Метлером. У хлористоводневої солі будь-які ознаки реального розтоплення були відсутні до температури 300°C. У інших перевірених солей ознаки розрідження спостерігались при температурах від 215 до 270°C.

Таблиця III

Результати TGA, DSC та високотемпературного мікроскопіювання

Сіль	TGA (втрати маси (%)) 20-100°C	TGA (втрати маси (%)) 100-200°C	DSC максимальна ендотерма (°C)	Високотемпературне мікроскопіювання (°C)
HCl	1,42	0,9	немає точки плавлення	немає точки плавлення
Сульфат	5,50	-	267,4	260-270
Мезилат	3,97	-	261,6	230-264
Сукцинат	0,73	1,90	немає точки плавлення	230-270
Тартрат	5,50	-	немає точки плавлення	215-255
Ацетат	0,77	1,44	немає точки плавлення	245-265
Фосфат	5,50	-	немає точки плавлення	230-250

Приклад 13

Порівняння гігроскопічності

Солі перевірялись на гігроскопічність при 27%, 35%, 65% та 80% відносній вологості (RH), що відображено у Таблиці IV. Спочатку зразки було

піддано вакуумуванню для встановлення вихідної точки для даних по відносній вологості. Кількість води, яка входила до складу кожної солі, була також визначеною за методом Карла-Фішера (кулонометрично).

Таблиця IV

Гігроскопічність та результати визначення за методом Карла-Фішера (K F)

Сіль	Гігроскопічність (вихідний (мас) %)	Вакуумування	RH 27%	RH 35%	RH 65%	RH 80%	K F (%)
HCl	100	98,7	98,2	99,3	100,4	100,6	1,3
Сульфат	100	98,9	98,4	99,8	100,9	101,9	4,9
Мезилат	100	99,0	98,5	99,4	100,7	104,4	3,6
Сукцинат	100	99,3	98,5	99,1	100,0	100,5	0,2
Тартрат	100	97,9	98,2	101,3	103,8	105,4	5,1
Ацетат	100	99,4	98,6	99,2	100,2	100,6	0,3
Фосфат	100	98,2	98,6	102,6	105,5	106,6	4,6

При порівнянні маси солей від вакуумування до піддавання впливу 80% RH виявлялось, що маса солей зростала на 1,2-8,4%. Фосфатна сіль була найбільш гігроскопічною, за нею йшли тартрат, мезилат, сульфат, ацетат, хлористоводнева сіль та сукцинат. Дані визначення за методом Карла-Фішера дуже добре співпадали з визначенням гігроскопічності у тому, що до складу тартрату, сульфату, фосфату та мезилату (солей) входила найбільша кількість води.

Приклад 14

Розчинники для одержання солей

Мезилатну сіль одержували у метанолі/воді, 100% ацетоні, (9/1) ацетоні/воді, (3/1) ацетоні/воді та (1/1) ацетоні/воді. До складу основи, яку було використано для одержання цих солей, входило 9,98% TRS. Дані відносно виходів та кількості TRS, одержаних для кожної з цих солей, наведено у Таблиці V. З метою порівняння введено дані відносно хлористоводневої солі. Позначка N/A у Таблиці V вказує на відсутність даних.

Таблиця V

Вихід та % TRS для хлористоводневої та мезилатної солей				
Сіль	Розчинник	Вихід %	TRS (% HPLC) <sup>a</sup>	Залишковий розчинник (%) <sup>c</sup>
HCl	30 1 MeOH/H <sub>2</sub> O	69	9,12 <sup>a</sup>	0,62 MeOH
HCl	9 1 Ацетон/H <sub>2</sub> O	83	4,73 <sup>a</sup>	N A
HCl	20 1 MeOH/H <sub>2</sub> O	82	2,23 <sup>b</sup>	0,05 MeOH
Мезилат	7 1 MeOH/H <sub>2</sub> O	63	4,72 <sup>a</sup>	відсутній
Мезилат	Ацетон	85	9,80 <sup>a</sup>	N A
Мезилат	9 1 Ацетон/H <sub>2</sub> O	73	2,00 <sup>a</sup>	N A
Мезилат	5 1 Ацетон/H <sub>2</sub> O	39	0,69 <sup>a</sup>	N A
Мезилат	1 1 Ацетон/H <sub>2</sub> O	29	4,12 <sup>a</sup>	N A
Мезилат	9 1 Ацетон/H <sub>2</sub> O	81	0,91 <sup>b</sup>	0,69 Ацетон

<sup>a</sup>До складу основи, яку було використано для одержання цих солей, входило 9,98% TRS. <sup>b</sup>До складу основи, яку було використано для одержання цих солей, входило 7,03% TRS. <sup>c</sup>Межа визначення складала 0,1% (1000 частин на мільйон).

Мезилатна сіль, одержана з ацетону/води (5 1), мала 0,7% TRS, тобто на 9,3% менше, ніж вміст TRS вільної основи, однак вихід був нижче на 39%. У разі використання ацетону/води (9 1), вихід зріс до 73% з 2,0% TRS. Вміст TRS хлористоводневої солі також зменшився на 4,7% (зменшення складало 5,3%), однак з'явилось 2,4% невідомої пов'язаної речовини. Наслідком здатності до продукування згаданих солей зі значно зменшеним вмістом TRS є одержання більш ефективного препарату та запобігання дорогого подальшого очищення.

Оскільки хлористоводнева сіль є найбільш поширеною фармацевтичною сіллю і конкретно розкрита у патентній заявці США №08/413,735 (Хіп та інші), яку було опубліковано 14 червня 1995, як Європейський патент №0657458 (Приклад 5), провели біологічне порівняння мезилатної та хлористоводневої солей. Вкрай несподівано, згадана мезилатна сіль виявилась значно більш біодоступною, аніж хлористоводнева сіль. Біодоступність солі визначали на 4 коротконогих хортах (самцях) шляхом перорального введення одноразової дози 20 мг/кг хлористоводневої та мезилатної солей у 10% суспензії аравіської камеї. Між дозами було встановлено тижневий період виведення. Дози вводили за перехресною схемою (2 собаки/сіль/експериментальний собака). Контролювали концентрацію активної сполуки у плазмі та рівень активного метаболіту. Після перорального введення згаданої мезилатної солі, концентрація (8)-13-[(диметилпамино)метил]-10,11,14,15-тетрагідро-4,9,16,21-диметено-1Н,1Н-добензо[Е,К]піропро[3,4-Н][1,4,13]оксадіазациклогексадецин-1,3(2Н)-діону та метаболіту у плазмі кожної собаки була вищою, аніж у разі еквівалентної дози хлористоводневої солі. Середня максимальна концентрація у плазмі ( $C_{max}$ ±похибка) після введення хлористоводневої солі складала 400±142нг/мл (сполука) та 862±255нг/мл (метаболіт). Середня максимальна концентрація у плазмі ( $C_{max}$ ±похибка) після введення згаданої мезилатної солі складала 898±243нг/мл (сполука) та 2455±930нг/мл (метаболіт). Це представляє приблизно 260% підвищення концентрації сполуки та метаболіту у плаз-

мі

Концентрацію сполуки та метаболіту у плазмі наносили на графік, як функцію часу під час дослідження. Співвідношення площі під кривою концентрації (AUC) є мірилом біодоступності сполуки для пацієнту. Співвідношення AUC для хлористоводневої та згаданої мезилатної солей було вираховано і є відображенням у Таблиці VI.

Таблиця VI

Співвідношення AUC після одноразової пероральної дози 20мг/кг, введеної у вигляді хлористоводневої та мезилатної солей. Співвідношення AUC

Собака №	Метаболіт Мезилат HCl	Сполука Мезилат HCl
1	2,77	3,89
2	2,97	1,62
3	2,02	2,14
4	2,74	2,56
Середнє	2,62	2,55
Стандартна похибка	0,21	0,49

Вкрай несподівано, дані Таблиці VI демонструють, що біодоступність мезилатної солі у 2,58 рази перевищує біодоступність хлористоводневої солі. Це значне підвищення біодоступності дозволяє вводити пацієнту меншу дозу для досягнення такого ж самого фармацевтичного ефекту. Таким чином, вплив на пацієнта зводиться до мінімуму. На додаток до цього, менша стандартна доза зменшує вартість сполуки та її кількість, необхідну для виготовлення. Таким чином, доза мезилатної солі за цим винаходом повинна складати від 0,5мг/кг/дозу до 0,25мг/кг/дозу, більш переважно - від 0,1 до 0,2мг/кг/дозу. Ця доза є суттєво нижчою, аніж доза хлористоводневої солі, яка забезпечує такий же самий рівень у крові.

Узагальнення фізичних даних для семи солей свідчить про те, що мезилатна сіль має значно поліпшені фізичні властивості з-поміж досліджених солей, які розкрито у EP 0657458 (Хіп та інші). Найбільш суттєвим є те, що порівняння біодоступності згаданої солі та хлористоводневої солі демонструє, що згадані мезилатні солі є значно поліпшеними терапевтичними агентами. Таким чином, до переваг згаданих мезилатних солей

належить

- (1) висока розчинність у воді,
- (2) велике зниження вмісту TRS (за даними HPLC),
- (3) відсутність залишкових розчинників (за даними GC),
- (4) кристалічність (за даними рентгенівської порошкової дифракції та поляризаційної мікроскопії),
- (5) чітка точка плавлення (за даними DSC), та
- (6) біодоступність, яка у 2,5 рази перевищує біодоступність хлористоводневої солі

Як згадувалось перед тим, сполуки за цим винаходом є активними, як вибіркові інгібітори протеїнази С. Активність сполуки розкрито у Європейському патенті №0657458 (Хіт та інші), опублікованому 14 червня 1995 року. Активність визначали за допомогою кальцієвої кальмодулін-залежної протеїназної проби, казеїнової протеїназної (II) проби, проби з цАМФ-залежною каталітичною підгрупою протеїнази та протеїн-тирозинкіназної проби. Було встановлено, що мезилатна сіль у цих пробах була активною та ізоферментвибірковою при значенні  $IC_{50}$  менш, ніж 10 мкМ. Сполуки з цією продемонстрованою фармакологічною активністю є придатними для лікування станів, у патології яких відіграє роль протеїназа С. До станів, що визначаються у цій галузі, належать цукровий діабет та його ускладнення (у тому числі ретинопатія, невропатія та нефропатія), ішемія, запалення, розлади центральної нервової системи, серцево-судинні хвороби, хвороба Альцгеймера, дерматологічні захворювання та рак.

Сполуки, що заявлені, переважно, вводяться до складу лікарських форм перед введенням. Таким чином, ще одним варіантом втілення цього винаходу є фармакологічна лікарська форма, до складу якої входить сполука Формули Ia та один або більше фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

Ці фармацевтичні лікарські форми виготовляють за відомими способами з використанням добре відомих та легкодоступних інгредієнтів. При виготовленні композицій за цим винаходом активний інгредієнт, звичайно, змішують з носієм, розбавляють носієм або розміщують у такому носії, який може мати вигляд капсули, саше або поємника, виготовленого з паперу або іншого матеріалу. Коли носій використовують, як розріджувач, він може бути твердим, напівтвердим або рідким матеріалом, який діє як носій, наповнювач або середовище для активного інгредієнту. Таким чином, композиції можуть бути у формі таблеток, порошків, коржиків, саше, крохмальних облаток, еліксирів, суспензій, емульсій, розчинів, сиропів, аерозолів (як у твердому вигляді, так і у рідкому середовищі), м'яких та твердих желатинових капсул, супозиторіїв, стерильних розчинів для впроркування та стерильних розфасованих порошків.

До деяких прикладів придатних носіїв, наповнювачів та розріджувачів належать лактоза, декстроза, цукроза, сорбіт, маніт, крохмаль, аравійська камедь, фосфат кальцію, альгірати, трагакант, желатина, силікат кальцію, мікрокристалічна целюлоза, полівінілпіролідон, целюлоза, вода, сироп, метилцелюлоза, метил та пропілгідроксибензоати,

тальк, стеарат магнію та мінеральне масло. До складу лікарських форм додатково можуть входити змащувальні речовини, зволожуючі речовини, емульгуючі та суспензуючі речовини, консервуючі речовини, підсопложуючі речовини або коригенти. Композиції за цим винаходом можна виготовляти таким чином, щоб забезпечити швидке, повільне або пролонговане виділення активного інгредієнту після введення хворому. Композиції, переважно, виготовляються у стандартній дозованій формі, до складу кожної дози входить, приблизно, від 1 до 20 мг, більш переважно, приблизно, від 2 до 10 мг активного інгредієнту. Слід розуміти, однак, що терапевтична доза, яка вводиться, буде визначатись лікарем у світлі відповідних обставин, до яких належить стан, який піддається лікуванню, вибір сполуки для введення, обраний шлях для введення, внаслідок чого вищезгадані діапазони дозувань не призначені до обмеження обсягу цього винаходу будь-яким чином. Термін "стандартна дозована форма" означає фізично дискретні одиниці, придатні, як одноразові дози для людей та інших ссавців, до складу кожної дози входить попередньо визначена кількість активного матеріалу, розрахована на викликання необхідного терапевтичного ефекту, у поєднанні з придатним фармацевтичним носієм.

Наведені далі приклади лікарських форм є тільки ілюстративними і не призначені до будь-якого обмеження обсягу цього винаходу.

#### Лікарська форма 1

Тверді желатинові капсули виготовляють з використанням наведених далі інгредієнтів

	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	7
Целюлоза мікрокристалічна	78
Кремнію діоксид, фумігований	10
Стеаринова кислота	5
Разом	100мг

Вищезгадані інгредієнти змішують і засипають до твердих желатинових капсул у кількості 100мг.

#### Лікарська форма 2

Таблетки виготовляють з використанням наведених далі інгредієнтів

	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	5
Крохмаль, висушений	85
Стеарат магнію	10
Разом	100мг

Компоненти змішують і пресують до утворення таблеток, маса кожної з яких дорівнює 100мг.

#### Лікарська форма 3

Таблетки, до складу кожної з яких входить 10мг активного інгредієнту, виготовляють таким чином

	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	10мг
Крохмаль	45мг
Целюлоза мікрокристалічна	35мг
Полівінілпіролідон (у вигляді 10% розчину у воді)	4мг
Натрійкарбоксиметильований крохмаль	4,5мг

Магнію стеарат	0,5мг
Тальк	1мг
Разом	100мг
Активний інгредієнт, крохмаль та целюлозу пропускають через сито №45 (0,353мм) і ретельно змішують. Розчин полівінілпіролідону змішують з утвореними порошками, які після цього пропускають через сито №14 (1,41мм). Утворені таким чином гранули висушують при 50°C і пропускають через сито №18 (1,00мм). Натрійкарбоксиметильований крохмаль, стеарат магнію та тальк, попередньо пропущені через сито №60 (0,248мм), додають до гранул, які після перемішування пресують на таблетковій машині до утворення таблеток, маса кожної з яких складає 100мг.	
Лікарська форма 4	
Капсули, кожна з яких вміщує 8мг медикаменту, виготовляють таким чином.	

	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	8мг
Крохмаль	95мг
Мікрокристалічна целюлоза	95мг
Стеарат магнію	2мг
Разом	200мг
Активний інгредієнт, целюлозу, крохмаль та стеарат магнію змішують, пропускають через сито №45 і засипають до твердих желатинових капсул у кількості 200мг.	
У наведеному описі викладено принципи, переважні варіанти втілення та способи дії цього винаходу. Винахід, який захищається цим описом, однак, не повинен розглядатись як такий, що обмежується конкретними розкритими формами, оскільки вони повинні розглядатись, скоріше, як ілюстративні, аніж обмежувальні. Фахівцями у цій галузі техніки можливе внесення варіацій та змін без відходу від духу цього винаходу.	