

Представлений винахід стосується класу нових гетероциклічних сполук, їх солей, фармацевтичних композицій, що їх містять та їх застосування в терапії організму людини. Зокрема, винахід стосується класу сполук, які є агоністами мускаринового рецептора M_1 та/або рецептора M_4 , і, отже, є корисними для лікування хвороби Альцгеймера, шизофренії, когнітивних розладів та інших захворювань, опосередкованих мускариновими рецепторами M_1/M_4 , включаючи, але не обмежуючись цим, лікування або полегшення болю.

Передумови створення винаходу

Мускаринові ацетилхолінові рецептори (mAChR) є членами надродини рецепторів пов'язаних з G-білком, які опосередковують дії нейромедіатора ацетилхоліну як у центральній, так і в периферичній нервовій системі. Було клоновано п'ять підтипів mAChR, від M_1 до M_5 . M_1 mAChR переважно постсинаптично експресується в корі головного мозку, гіпокампі, смугастому тілі та таламусі; M_2 mAChR є розташованим переважно в стовбурі головного мозку та таламусі, а також в корі головного мозку, гіпокампі та смугастому тілі, де вони знаходяться на холінергічних синаптичних кінцях (Langmead et al., 2008 Br J Pharmacol). Проте, M_2 mAChR також експресуються периферично у серцевій тканині (де вони забезпечують іннервацію блукаючого нерву серця) та у гладких м'язах та екзокринних залозах. M_3 mAChR експресуються на відносно низькому рівні ЦНС, але широко експресуються в гладких м'язах та залозистих тканинах, таких як потові та слинні залози (Langmead et al., 2008 Br J Pharmacology).

Мускаринові рецептори у центральній нервовій системі, особливо M_1 mAChR, відіграють критичну роль в опосередковуванні вищих когнітивних процесів. Захворювання, пов'язані з когнітивними порушеннями, такі як хвороба Альцгеймера, супроводжуються втратою холінергічних нейронів у базальному відділі переднього мозку (Whitehouse et al., 1982 Science). При шизофренії, яка також характеризується когнітивними порушеннями, щільність mAChR є зниженою у префронтальній корі, гіпокампі та дорсолатеральному відділі стріатуму хворих на шизофренію (Dean et al., 2002 Mol Psychiatry). Крім того, у на тваринних моделях блокада або ураження центральних холінергічних шляхів призводить до глибокого когнітивного дефіциту, та було продемонстровано, що неселективні антагоністи mAChR індукують психотоміметичні ефекти у пацієнтів із психічними розладами. Холінергічна замісна терапія в основному базується на застосуванні інгібіторів ацетилхолінестерази для запобігання розпаду ендogenous ацетилхоліну. Зазначені сполуки продемонстрували в клініці ефективність щодо симптоматичного когнітивного зниження, але викликають обмежені по дозі побічні ефекти, зумовлені стимуляцією периферичних M_2 та M_3 mAChR, включаючи порушення моторики шлунково-кишкового тракту, брадикардію, нудоту та блювання (<http://www.drugs.com/pro/donepezil.html>; <http://www.drugs.com/pro/rivastigmine.html>).

Подальші дослідження щодо відкриття були спрямовані на виявлення прямих агоністів M_1 mAChR, для цільового підвищення когнітивних функцій. В результаті зазначеної роботи було виявлено низку агоністів, прикладом яких є такі сполуки, як ксаномелін, AF267B, сабкомелін, міламелін та цевімелін. Більшість з цих сполук продемонстрували високу ефективність у доклінічних моделях сприйняття як на гризунах, так й на нелюдиноподібних приматах. Міламелін показав ефективність у боротьбі з викликаними скополаміном порушеннями робочої та просторової пам'яті у гризунів; сабкомелін продемонстрував ефективність у завданні зорового розрізнення об'єктів у мармозеток, а ксаномелін усунув викликані антагоністами mAChR порушення когнітивних функцій у парадигмі пасивного уникнення.

Хвороба Альцгеймера (AD) є найпоширенішим нейродегенеративним розладом (26,6 мільйонів людей у всьому світі у 2006 році), яка вражає людей похилого віку, що призводить до глибокої втрати пам'яті та когнітивної дисфункції. Етіологія захворювання є складною, але характеризується двома характерними наслідками для головного мозку: скупченнями амілоїдних бляшок, що в основному складаються з амілоїд- β -пептиду ($A\beta$), та нейрофібрилярних клубків, утворених гіперфосфорильованими тау-білками. Вважається, що накопичення $A\beta$ є центральною ознакою прогресування AD, і тому багато передбачуваних способів лікування AD на даний час націлені на інгібування продукування $A\beta$. $A\beta$ утворюється в результаті протеолітичного розщеплення мембранозв'язаного білка-попередника амілоїду (APP). APP перетворюється двома шляхами, неамілоїдогенним та амілоїдогенним. Розщеплення APP за допомогою γ -секретази є спільним для обох шляхів, але в першому APP розщеплюється за допомогою α -секретази з утворенням розчинного APP α . Сайт розщеплення знаходиться всередині послідовності $A\beta$, що перешкоджає його утворенню. Проте, при амілоїдогенному шляху APP розщеплюється за допомогою β -секретази з утворенням розчинного APP β , а також $A\beta$. Дослідження in vitro показали, що агоністи mAChR можуть сприяти розщепленню APP у напрямку розчинного, неамілоїдогенного шляху. Дослідження in vivo показали, що агоніст mAChR, AF267B, змінює патологію, подібну до хвороби, у трансгенної миші 3xTgAD, що є моделлю різних компонентів хвороби Альцгеймера (Cassano et al., 2006 Neuron). Нарешті, було продемонстровано, що агоніст mAChR цевімелін дає невелике, але значне зниження рівня $A\beta$ у спинномозковій рідині у пацієнтів з хворобою Альцгеймера, демонструючи таким чином потенційну ефективність щодо модифікації захворювання (Nitsch et al., 2000 Neurol).

Крім того, доклінічні дослідження показали, що агоністи mAChR демонструють атиповий антипсихотичний профіль у ряді доклінічних парадигм. Агоніст mAChR, ксаномелін, викликає зворотний розвиток ряду дофамінових форм поведінки, включаючи локомоцію, викликану амфетаміном у щурів, лазіння, викликане апоморфіном у мишей, поворот, викликаний агоністом дофаміну, у щурів з одностороннім ураженням 6-OH-DA та індукований амфетаміном руховий неспокій у мавп (без відповідальності за EPS). Також було показано, що він інгібує спрацювання дофамінових клітин A10, але не A9, та умовне уникнення, а також індукує експресію c-fos у префронтальній корі та прилеглому ядрі, але не в стріатумі у щурів. Всі ці дані свідчать про наявність атипового антипсихотичного профілю (Mirza et al., 1999 CNS Drug Rev). Мускаринові рецептори також беруть участь у нейробіології залежності. Підсилюючі ефекти кокаїну та інших речовин, що викликають залежність, опосередковані мезолімбічною дофаміновою системою, де поведінкові та нейрохімічні дослідження показали, що підтипи холінергічних мускаринових рецепторів відіграють важливу роль у регуляції дофамінергічної нейротрансмісії. Наприклад, миші M(4) (-/-) продемонстрували значно покращену поведінку, орієнтовану на винагороду, в результаті впливу кокаїну (Schmidt et al Psychopharmacology (2011) Aug;216(3):367-78). Крім того, було продемонстровано, що ксаномелін блокує дію кокаїну на цих моделях.

Мускаринові рецептори також беруть участь у контролі руху та потенційно являють собою нові способи лікування рухових розладів, таких як хвороба Паркінсона, СДВГ, хвороба Гантінгтона, синдром Туретта та інші синдроми, пов'язані з дофамінергічною дисфункцією як основним патогенетичним фактором, що викликає захворювання.

Ксаномелін, сабкомелін, міламелін та цевімелін пройшли різні стадії клінічної розробки для лікування хвороби Альцгеймера та/або шизофренії. Клінічні дослідження II фази з використанням ксаномеліну продемонстрували його ефективність щодо різних доменів когнітивних симптомів, включаючи поведінкові порушення та галюцинації, пов'язані з хворобою Альцгеймера (Bodick et al., 1997 Arch Neurol). Зазначена сполука також була оцінена в невеликому дослідженні II фази хворих на шизофренію та показала значне зниження позитивних та негативних симптомів у порівнянні з плацебо-контролем (Shekhar et al., 2008 Am J Psych). Проте, у всіх клінічних дослідженнях ксаномелін та інші споріднені агоністи mAChR показали неприйнятний запас безпеки щодо холінергічних побічних ефектів, включаючи нудоту, болі в шлунково-кишковому тракті, діарею, діафорез (підвищене потовиділення), гіперсалівацію (підвищене слиновиділення), неприйнятність та брадикардію.

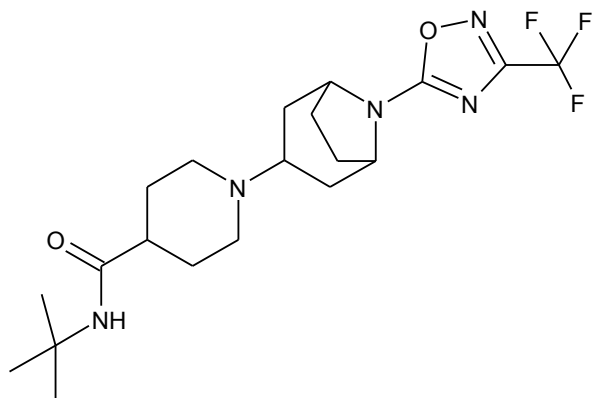
Мускаринові рецептори беруть участь у формуванні центрального та периферичного болю. Біль може бути розділений на три різних типи: гострий, запальний та нейропатичний. Гострий біль виконує важливу захисну функцію, захищаючи організм від подразників, які можуть призвести до пошкодження тканин, проте необхідне купірування післяопераційного болю. Запальний біль може виникати з багатьох причин, включаючи пошкодження тканин, аутоімунну реакцію та інвазію патогенів, та провокується дією медіаторів запалення, таких як нейропептиди та простагландини, що призводить до запалення нейронів та виникненню болю. Нейропатичний біль пов'язаний з аномальними болісними відчуттями на небольові подразників. Нейропатичний біль пов'язаний із низкою різних захворювань/травм, таких як травма спинного мозку, розсіяний склероз, діабет (діабетична нейропатія), вірусна інфекція (наприклад, ВІЛ або герпес). Він також часто зустрічається при раку, як результат захворювання, так і як побічний ефект хіміотерапії. Було продемонстровано, що активація мускаринових рецепторів має знеболювальну дію при ряді больових станів за рахунок активації рецепторів у спинному мозку та вищих больових центрах у головному мозку. Було продемонстровано, що підвищення ендogenous рівня ацетилхоліну за допомогою інгібіторів ацетилхолінестерази, пряма активація мускаринових рецепторів агоністами або алостеричними модуляторами має знеболювальну дію. Навпаки, блокада мускаринових рецепторів антагоністами або використання мишей з нокаутом збільшує больову чутливість. Докази ролі рецептора M₁ у виникненні болю представлені в огляді D. F. Fiorino and M. Garcia-Guzman, 2012.

Нещодавно, було виявлено невелику кількість сполук, які демонструють покращену селективність щодо підтипу M₁ mAChR в порівнянні з підтипами mAChR, що периферично експресуються (Bridges et al., 2008 Bioorg Med Chem Lett; Johnson et al., 2010 Bioorg Med Chem Lett; Budzik et al., 2010 ACS Med Chem Lett). Незважаючи на підвищений рівень селективності по відношенню до підтипу M₃ mAChR, деякі з цих сполук зберігають значну агоністичну активність як щодо даного підтипу, так й підтипу M₂ mAChR. В даному документі, ми описуємо низку сполук, які несподівано демонструють високий рівень селективності до M₁ та/або M₄ mAChR порівняно з підтипами рецепторів M₂ та M₃.

Винахід

Представлений винахід передбачає сполуки, що мають активність як агоністи мускаринових рецепторів M₁ та/або M₄. Зокрема, винахід передбачає сполуки, які проявляють селективність щодо рецепторів M₁ та/або M₄ по відношенню до підтипів рецепторів M₂ та M₃.

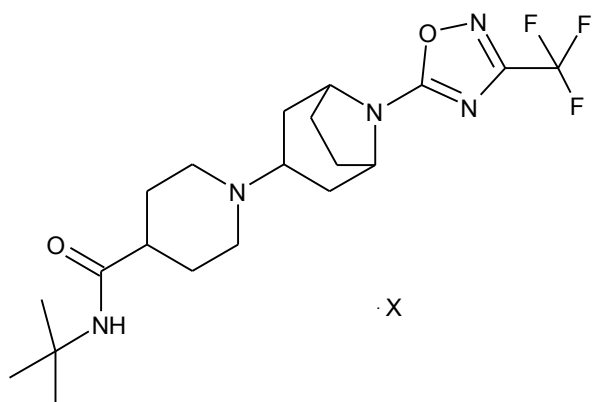
Відповідно, винахід передбачає сполуку формули (1):



(1)

або її сіль.

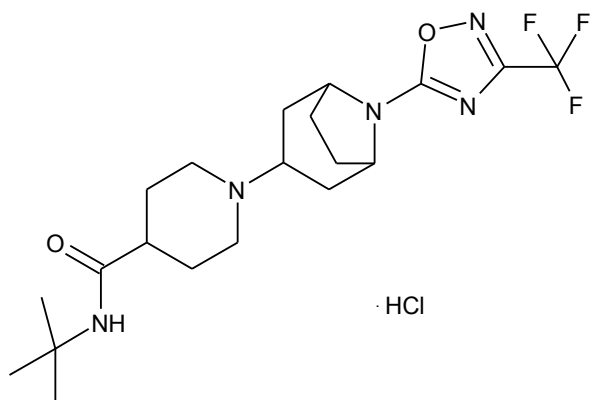
Винахід додатково передбачає сполуку формули (1a):



(1a)

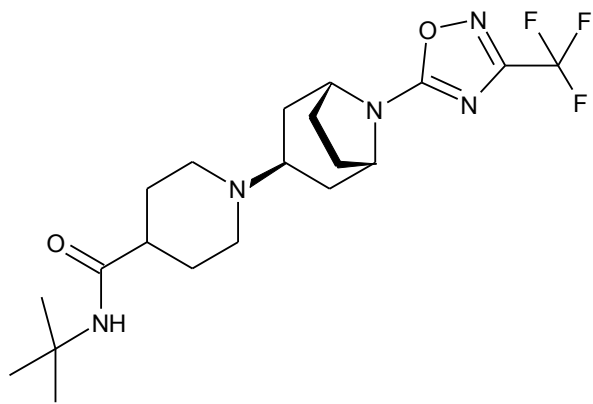
де X означає сіль.

Винахід додатково передбачає сполуку формули (1b):



(1b)

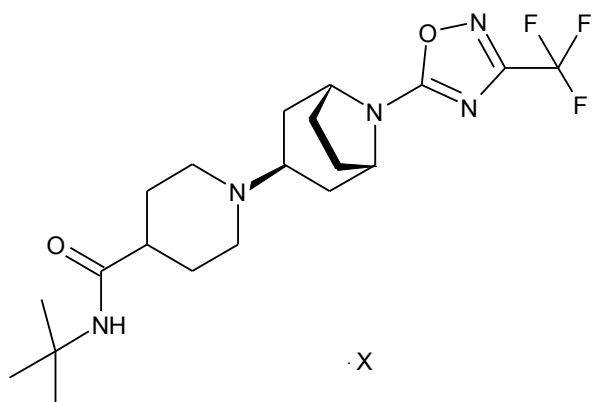
Винахід додатково передбачає сполуку формули (2):



(2)

або її сіль.

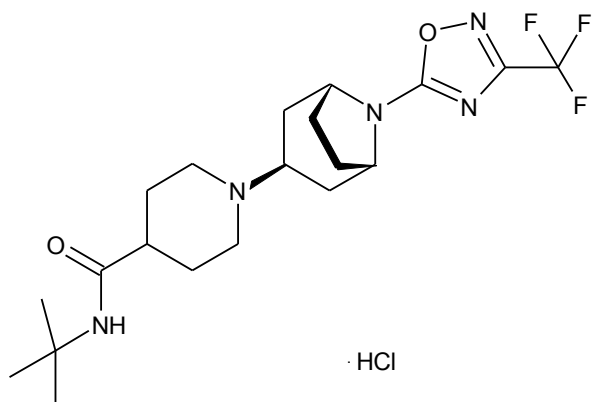
Винахід додатково передбачає сполуку формули (2a):



(2a)

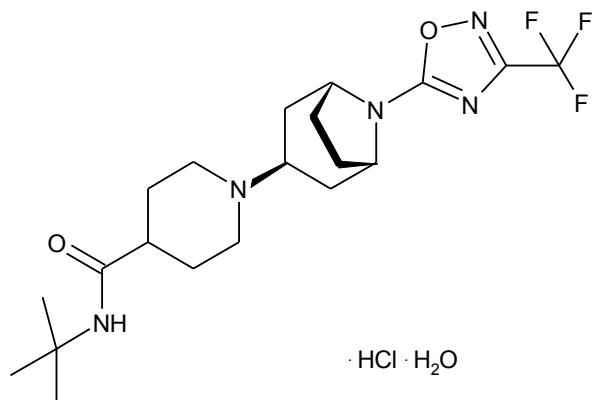
де X означає сіль.

Винахід додатково передбачає сполуку формули (2b):



(2b)

Винахід додатково передбачає сполуку формули (2c):



(2c)

Сполука формули (1) або формули (2) може являти собою фармацевтично прийнятну сіль. Сполука формули (1) або формули (2) може являти собою кислотно-адитивну сіль.

Сполука формули (1) або формули (2) може являти собою гідрохлоридну сіль. Сполука формули (1) або формули (2) може являти собою моногідрохлоридну сіль.

Сполука формули (1) або формули (2) може являти собою моногідрат моногідрохлоридної солі.

В сполуках формули (1a) або формули (2a) X може являти собою фармацевтично прийнятну сіль.

В сполуках формули (1a) або формули (2a) X може являти собою кислотно-адитивну сіль. В сполуках формули (1a) або формули (2a) X може являти собою гідрохлорид.

В сполуках формули (1a) або формули (2a) X може являти собою моногідрохлорид. Сполука формули (1) або формули (2) може являти собою гідрохлоридну сіль.

X може являти собою гідрохлорид. X може являти собою моногідрохлорид. X може являти собою моногідрат моногідрохлориду.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл}піперидин-4-карбоксамід.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-((1R,3r,5S)-8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксамід.

Сполука може являти собою сіль N-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл}піперидин-4-карбоксаміду.

Сполука може являти собою сіль N-трет-бутил-1-((1R,3r,5S)-8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду.

Сполука може являти собою фармацевтично прийнятну сіль N-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл}піперидин-4-карбоксаміду.

Сполука може являти собою фармацевтично прийнятну сіль N-трет-бутил-1-((1R,3r,5S)-8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл}піперидин-4-карбоксаміду гідрохлорид.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-((1R,3r,5S)-8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду гідрохлорид.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл}піперидин-4-карбоксаміду моногідрохлорид.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-((1R,3r,5S)-8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду моногідрохлорид.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл}піперидин-4-карбоксаміду моногідрохлориду моногідрат.

Сполука може являти собою N-трет-бутил-1-((1R,3r,5S)-8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл]-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду моногідрохлориду моногідрат.

Визначення

В даній заявці застосовуються наступні визначення, якщо не зазначено інше.

Термін "лікування" по відношенню до застосування сполук формули (1), формули (1a), формули (1b), формули (2), формули (2a), формули (2b) або формули (2c) використовується для опису будь-якої форми втручання, коли сполуку вводять суб'єкту, який страждає від або схильний до ризику захворювання або потенційно схильний до ризику захворювання або розладу, що розглядається. Таким чином, термін "лікування" охоплює як превентивне (профілактичне) лікування, так і лікування, при якому проявляються симптоми захворювання або розладу, які можна виміряти або виявити.

Термін "ефективна терапевтична кількість", як використовується в даному документі (наприклад, щодо способів лікування захворювання або стану), стосується кількості сполуки, яка є ефективною для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. Наприклад, якщо стан являє собою біль, то

ефективна терапевтична кількість являє собою кількість, достатню для забезпечення бажаного рівня полегшення болю. Бажаним рівнем полегшення болю може бути, наприклад, повне усунення болю або зниження інтенсивності болю.

Солі

Сполуки, описані в даному документі можуть існувати у формі солей, наприклад, кислотно-адитивних солей або, в деяких випадках, солей органічних та неорганічних основ, таких як карбоксилатні, сульфонатні та фосфатні солі. Всі такі солі входять в обсяг даного винаходу, та посилання на сполуки формули (1) та формули (2) включають сольові форми сполук, як визначено в даному документі.

Солі, як правило, являють собою кислотно-адитивні солі.

Солі за представленим винаходом можуть бути синтезовані з вихідної сполуки, яка містить основний або кислотний фрагмент, за допомогою звичайних хімічних способів, таких як способи, описані в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Як правило, такі солі можуть бути отримані шляхом реакції вільних кислотних або основних форм зазначених сполук з прийнятною основою або кислотою у воді або в органічному розчиннику, або в їх суміші; зазвичай, використовують неводні середовища, такі як ефір, етилацетат, етанол, ізопропанол або ацетонітрил.

Кислотно-адитивні солі можуть утворюватися з широким спектром кислот, як неорганічних, так і органічних. Приклади кислотно-адитивних солей, що входять в обсяг винаходу, включають моно- або дисолі, утворені з кислотою, вибраною з групи, що складається з оцтової, 2,2-дихлороцтової, адипінової, альгінової, аскорбінової (наприклад, L-аскорбінової), L-аспарагінової, бензолсульфоновой, бензойної, 4-ацетамідобензойної, бутанової, (+) камфорної, камфорсульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, капринової, капронової, каприлової, коричневої, лимонної, цикламінової, додецилсірчаної, етан-1,2-дисульфоновой, етансульфоновой, 2-гідроксіетансульфоновой, мурашиної, фумарової, галактарової, гентизинової, глюкогептоної, D-глюконової, глюкуронової (наприклад, D-глюкуронової), глутамінової (наприклад, L-глутамінової), α - оксоглутарової, гліколевої, гіппурової, галогеноводневих кислот (наприклад, бромистоводневої, хлористоводневої, йодистоводневої), ізотіонової, молочної (наприклад, (+)-L-молочної, ($\pm$)-DL-молочної), лактобіонової, малеїнової, яблучної, (-)-L-яблучної, маленової, ($\pm$)-DL-мигдальної, метансульфоновой, нафталін-2-сульфоновой, нафталін-1,5-дисульфоновой, 1-гідрокси-2-нафтоїнової, нікотинової, азотної, олеїнової, оротової, щавлевої, пальмітинової, памової, фосфорної, пропіонової, піровиноградної, L- піроглутамінової, саліцилової, 4-аміносаліцилової, себацінової, стеаринової, бурштинової, сірчаної, дубильної, (+)-L-винної, тіоціанової, п-толуолсульфоновой, ундециленової та валеріанової кислоти, а також ацильованих амінокислот та катіонообмінних смол.

Амінні функції в сполуках, описаних в даному документі, можуть утворювати четвертинні амонієві солі, наприклад, шляхом реакції з алкілюючим агентом відповідно до способів, добре відомих фахівця в даній галузі техніки. Такі четвертинні амонієві сполуки є включеними до обсягу винаходу.

Сполуки за винаходом можуть існувати у вигляді моно- або дисолей залежно від рКа кислоти, з якої сіль є утвореною.

Сольові форми сполук за винаходом, як правило, являють собою фармацевтично прийнятні солі, та приклади фармацевтично прийнятих солей є описаними у Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19. Проте, солі, які не є фармацевтично прийнятними, також можуть бути отримані у вигляді проміжних форм, які потім можуть бути перетворені на фармацевтично прийнятні солі. Такі нефармацевтично прийнятні форми солей, які можуть бути корисними, наприклад, при очищенні або розділенні сполук за винаходом, також складають частину винаходу.

Стереоізомери

Посилання на сполуки формули (1), (1a) та (1b) включають всі можливі їх стереоізомерні форми (наприклад, енантіомери, епімери та діастереоізомери, включаючи ендо- екзоізомери), або у вигляді окремих ізомерів, або у вигляді сумішей (наприклад, рацемічних сумішей) або два або більше ізомерів, якщо контекст не потребує іншого.

Відповідно, винахід передбачає сполуку за формулою (1), яка містить хіральні центри.

Ізомери можуть бути охарактеризовані з точки зору їх абсолютної стереохімії з використанням номенклатури "R та S", розробленої Каном, Інгольдом та Прелогом, дивіться *Advanced Organic Chemistry* by Jerry March, 4th Edition, John Wiley & Sons, New York, 1992, pages 109-114, та також дивіться Cahn, Ingold & Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1966, 5, 385-415. Стереоізомери можуть бути розділені за допомогою низки методик, включаючи хіральну хроматографію (хроматографію на хіральному носії), і такі методики є добре відомими фахівцям у даній галузі техніки. Як альтернатива хіральної хроматографії, стереоізомери можуть бути розділені шляхом утворення діастереоізомерних солей з хіральними кислотами, такими як (+)-винна кислота, (-)- піроглутамінова кислота, (-)- дитолуїл-L-винна кислота, (+)-мигдальна кислоти, (-)- яблучна кислота та (-)-камфорсульфорова кислота, розділяючи діастереоізомери за допомогою переважної кристалізації, та потім дисоціюючи

солі з отриманням індивідуального енантіомеру вільної основи.

Коли сполуки за винаходом існують у вигляді двох або більше стереоізомерних форм, один діастереомер у парі діастереомерів може демонструвати переваги в порівнянні з іншим діастереомером, наприклад, з точки зору біологічної активності. Таким чином, за певних обставин може бути бажаним використовувати як терапевтичний засіб тільки один з множини діастереоізомерів.

Відповідно, винахід передбачає композиції, що містять сполуку, яка має один або більше хіральних центрів, де щонайменше 55 % (наприклад, щонайменше 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % або 95 %) сполуки є присутньою у вигляді окремого ізомеру (наприклад, діастереоізомеру).

В одному загальному варіанті здійснення, 99 % або більше (наприклад, практично всі) від загальної кількості сполуки (або сполуки для застосування) є присутньою у вигляді окремого ізомеру.

Наприклад, в одному варіанті здійснення сполука є присутньою як окремий діастереомер, та сполука має площину симетрії.

Ізотопи

Сполуки за винаходом можуть містити одне або більше ізотопних заміщень, та посилання на конкретний елемент включає в свій об'єм всі ізотопи цього елемента. Наприклад, посилання на водень включає в себе ^1H , ^2H (D), та ^3H (T). Подібним чином, посилання на вуглець та кисень включають в їх об'єм ^{12}C , ^{13}C та ^{14}C та ^{16}O та ^{18}O , відповідно.

Аналогічним чином, посилання на конкретну функціональну групу також включає в свій об'єм ізотопні варіації, якщо контекст не зазначає інше. Наприклад, посилання на алкільну групу, таку як трет-бутильна група, також охоплює варіанти, в яких один або більше атомів водню в групі знаходяться у формі ізотопу дейтерію або тритію, наприклад, як у трет-бутиловій групі, в якій всі дев'ять атомів водню знаходяться в ізотопній формі дейтерію (пердейтеро-трет-бутилова група).

Ізотопи можуть бути радіоактивними або нерадіоактивними. Сполуки можуть не містити радіоактивні ізотопи. Такі сполуки є переважними для терапевтичного застосування.

Проте, сполука може містити один або більше радіоізотопів. Сполуки, що містять такі радіоізотопи, можуть бути корисними у діагностичному контексті.

Сольвати

Сполуки за винаходом можуть утворювати сольвати. Переважними сольватами є сольвати, утворені шляхом включення в структуру твердого тіла (наприклад, кристалічну структуру) сполук за винаходом молекул нетоксичного фармацевтично прийнятного розчинника (названого нижче як сольватуєчий розчинник). Приклади таких розчинників включають воду, спирти (такі як етанол, ізопропанол та бутанол) та диметилсульфоксид. Сольвати можуть бути отримані шляхом перекристалізації сполук за винаходом з розчинником або сумішшю розчинників, що містить сольватуєчий розчинник. Утворився чи ні сольват у будь-якому конкретному випадку, можна визначити, піддаючи кристали сполуки аналізу з використанням добре відомих та стандартних способів, таких як термогравіметричний аналіз (TGE), диференціальна скануюча калориметрія (DSC) та рентгеноструктурна кристалографія. Сольвати можуть бути стехіометричними або нестехіометричними сольватами. Особливо переважними сольватами є гідрати, та приклади гідратів включають гемігідрати, моногідрати та дигідрати.

Відповідно, винахід передбачає:

Сполуку у формі сольвату.

Сполуку, в якій сольват являє собою гідрат. Сполуку, в якій сольват являє собою моногідрат.

Для більш детального обговорення сольватів та способів, які використовуються для їх отримання та характеристики, дивіться Bryn et al., *Solid-State Chemistry of Drugs*, Second Edition, опублікований SSCI, Inc of West Lafayette, IN, USA, 1999, ISBN 0-967-06710-3.

Альтернативно, замість того, щоб існувати у вигляді гідрату, сполука за винаходом може бути безводною. Таким чином, винахід передбачає сполуку за винаходом у безводній формі (наприклад, у безводній кристалічній формі).

Кристалічні та аморфні форми

Сполуки можуть перебувати в кристалічному або некристалічному (наприклад, аморфному) стані. Чи перебуває сполука в кристалічному стані, можна легко визначити за допомогою стандартних способів, таких як порошкова рентгенівська дифракція (XRPD). Кристали та їх кристалічна структура можуть бути охарактеризовані з використанням низки способів, включаючи монокристалічну рентгенівську кристалографію, порошкову рентгенівську дифракцію (XRPD), диференціальну скануючу калориметрію (DSC) та інфрачервону спектроскопію (наприклад, інфрачервона спектроскопія на основі перетворення Фур'є (FTIR)). Поведінку кристалів в умовах різної вологості можна проаналізувати за допомогою досліджень гравіметричної сорбції пари, а також за допомогою XRPD. Визначення кристалічної структури сполуки може бути виконано за допомогою рентгенівської кристалографії, яка може бути здійснена відповідно до звичайних способів, таких як описані в даному документі та як описані в *Fundamentals of Crystallography*, C. Giacovazzo, H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti and M. Catti, (International Union of Crystallography/Oxford University Press, 1992 ISBN 0-19-855578-4 (p/b), 0-19-85579-2 (h/b)). Зазначений спосіб включає аналіз та інтерпретацію

монокристалічної рентгенівської дифракції. В аморфному твердому тілі, тривимірна структура, яка, як правило, існує в кристалічній формі, відсутня, та положення молекул відносно одне одного в аморфній формі, по суті, є випадковим, дивіться, наприклад Hancock et al. J. Pharm. Sci. (1997), 86, 1).

Відповідно, винахід передбачає:

Сполуку у кристалічній формі. Сполуку, яка є:

(а) від 50 % до 100 % кристалічною, та більш конкретно, є кристалічною щонайменше на 50 %, або щонайменше на 60 % кристалічною, або щонайменше на 70 % кристалічною, або щонайменше на 80 % кристалічною, або щонайменше на 90 % кристалічною, або щонайменше на 95 % кристалічною, або щонайменше на 98 % кристалічною, або

щонайменше на 99 % кристалічною, або щонайменше на 99,5 % кристалічною, або щонайменше на 99,9 % кристалічною, наприклад на 100 % кристалічною.

Сполуку, яка перебуває у аморфній формі. Комплекси та клатрати

Також охопленими є комплекси (наприклад, комплекси включення або клатрати з такими сполуками, як циклодекстрини або комплекси з металами) сполук за винаходом.

Відповідно, винахід передбачає сполуку у формі комплексу або клатрату.

Біологічна активність та терапевтичне застосування

Сполуки за представленим винаходом мають активність як агоністів мускаринових рецепторів M_1 та M_4 . Мускаринова активність сполук може бути визначеною за допомогою аналізу Phospho-ERK1/2, описаного в прикладі А нижче.

Суттєвою перевагою сполук за винаходом є те, що вони мають високу селективність щодо рецепторів M_1 та M_4 порівняно з підтипами рецепторів M_2 та M_3 . Сполуки за винаходом не є агоністами підтипів рецепторів M_2 та M_3 . Наприклад, в той час як сполуки за винаходом, як правило, мають значення pEC_{50} щонайменше 6 (переважно щонайменше 6,5) та значення E_{max} більше ніж 80 (переважно більше ніж 90 по відношенню до рецептора M_1 у функціональному аналізі, описаному в прикладі А), вони можуть мати значення pEC_{50} менше ніж 5 та значення E_{max} менше ніж 20 % при тестуванні проти підтипів M_2 та M_3 у функціональному аналізі прикладу А.

Що стосується сполук за винаходом, то винахід додатково передбачає: Сполуки для застосування в медицині.

Сполуки для застосування як агоніст мускаринового рецептора M_1 та/або M_4 .

Сполуку, яка являє собою агоніст мускаринового рецептора M_1 , що має значення pEC_{50} більше ніж 6,9 та значення E_{max} щонайменше 80 щодо рецептора M_1 в аналізі прикладу А в даному документі або аналізі, по суті, аналогічному йому.

Сполуку, яка являє собою агоніст мускаринового рецептора M_1 , що має значення pEC_{50} більше ніж 7,0.

Сполуку, що має значення E_{max} щонайменше 90 щодо рецептора M_1 .

Сполуку, яка являє собою агоніст мускаринового рецептора M_1 та M_4 , що має значення pEC_{50} більше 6,0 щодо рецептора M_4 в аналізі прикладу А в даному документі або аналізі, по суті, аналогічному йому.

Сполуку, яка є селективною щодо рецепторів M_1 та M_4 порівняно з мускариновими рецепторами M_2 та M_3 .

Сполуку, яка має значення pEC_{50} менше ніж 5 та значення E_{max} менше ніж 30 щодо підтипів мускаринових рецепторів M_2 та M_3 .

Сполуку для застосування при лікуванні захворювання або стану опосередкованого мускариновим рецептором M_1 та/або M_4 .

Завдяки своїй активності агоністи мускаринових рецепторів M_1 та M_4 , сполуки за винаходом можуть застосовуватися для лікування хвороби Альцгеймера, деменції з тільцями Леві, шизофренії та інших психотичних розладів, когнітивних розладів та інших захворювань, опосередкованих мускариновими рецепторами M_1 та/або M_4 , та також можуть бути використані для лікування різних видів болю.

Відповідно, що стосується сполук за винаходом, то винахід додатково передбачає: Сполуку для застосування в лікуванні когнітивних розладів або психотичних розладів.

Сполуку для застосування в лікуванні когнітивних розладів або психотичних розладів, де когнітивний або психотичний розлад включає, виникає в результаті або пов'язане зі станом вибраним з когнітивного порушення, помірного когнітивного порушення (MCI), (включаючи амнестичне MCI та неамнестичне MCI, та включаючи помірне когнітивне порушення внаслідок хвороби Альцгеймера та/або продромальної стадії хвороби Альцгеймера), лобно-скроневої деменції, судинної деменції, деменції з тільцями Леві, пресенільної деменції, сенильної деменції, атаксії Фрідріха, синдрому Дауна, хореї Гантінгтона, гіперкінезії, манії, синдрому Туретта, хвороби Альцгеймера (включаючи продромальну стадію хвороби Альцгеймера та стадії 1, 2, та 3 ранньої хвороби Альцгеймера як визначено у US Food and Drug Administration's "Early Alzheimer's disease: Developing Drugs for Treatment" available at [fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM596728.pdf](https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM596728.pdf)),

прогресуючого над'ядерного паралічу, порушення когнітивних функцій, включаючи увагу, орієнтацію, розлади навчання, пам'яті (наприклад, розлади пам'яті, амнезію, амнестичні розлади, синдром транзиторної глобальної амнезії та вікові порушення пам'яті) та мовної функції; когнітивних порушень в результаті інсульту, хвороби Гантінгтона, хвороби Піка, деменції, пов'язаної зі СНІДом, або інших станів деменції, таких як деменція з множинними інфарктами, алкогольна деменція, деменція, пов'язана з гіпотиреозом, та недоумство, пов'язане з іншими дегенеративними розладами, такими як атрофія мозочка та бічний аміотрофічний склероз; інших гострих або підгострих станів, які можуть спричинити зниження когнітивних функцій, такі як делірій або депресія (стани псевдодеменції), травми, травми голови, вікового зниження когнітивних функцій, інсульту, нейродегенерації, лікарських станів, нейротоксичних агентів, вікових когнітивних порушень, когнітивних порушень, пов'язаних з аутизмом, синдромом Дауна, когнітивного дефіциту, пов'язаного з психозом, та когнітивних розладів, пов'язаних з електросудомним лікуванням; когнітивних розладів викликаних зловживанням наркотиками або скасуванням наркотиків, включаючи нікотин, канабіс, амфетамін, кокаїн, синдрому дефіциту уваги з гіперактивністю (СДВГ) та дискінетичних розладів, таких як хвороба Паркінсона, нейролептичний паркінсонізм, та пізні дискінезії, шизофренія, шизофреноподібних захворювань, психотичної депресії, манії, гострої манії, параноїдних, галюциногенних та маячних розладів, розладів особистості, обсесивно-компульсивних розладів, шизотипових розладів, маячних розладів, психозів, спричинених злоякісними новоутвореннями, порушеннями обміну речовин, ендокринними захворюваннями або нарколепсією, психозів, спричинених зловживанням наркотиками або їх скасуванням, біполярних розладів та шизоафективних розладів.

Сполуку для застосування в лікуванні хвороби Альцгеймера. Сполуку для застосування в лікуванні деменції з тільцями Леві. Сполуку для застосування в лікуванні шизофренії.

Спосіб лікування когнітивного розладу у суб'єкта (наприклад, пацієнта-ссавця, такого як людина, наприклад, людини, яка потребує такого лікування), який включає введення терапевтично ефективної дози сполуки за винаходом.

Спосіб лікування когнітивного розладу у суб'єкта (наприклад, пацієнта-ссавця, такого як людина, наприклад, людини, яка потребує такого лікування), який включає введення терапевтично ефективної дози сполуки за винаходом, де когнітивний розлад включає, виникає через або пов'язаний зі станом, як визначено вище.

Спосіб лікування когнітивного розладу у суб'єкта (наприклад, пацієнта-ссавця, такого як людина, наприклад, людини, яка потребує такого лікування), який включає введення терапевтично ефективної дози сполуки за винаходом, де когнітивний розлад виникає через хворобу Альцгеймера або є пов'язаний з нею.

Спосіб лікування когнітивного розладу у суб'єкта (наприклад, пацієнта-ссавця, такого як людина, наприклад, людини, яка потребує такого лікування), який включає введення терапевтично ефективної дози сполуки за винаходом, де когнітивний розлад являє собою деменцію з тільцями Леві.

Спосіб лікування когнітивного розладу у суб'єкта (наприклад, пацієнта-ссавця, такого як людина, наприклад, людини, яка потребує такого лікування), який включає введення терапевтично ефективної дози сполуки за винаходом, де когнітивний розлад являє собою шизофренію.

Застосування сполуки за винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування когнітивного розладу.

Застосування сполуки за винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування когнітивного розладу, де когнітивний розлад включає, виникає через або пов'язаний зі станом, як визначено вище.

Застосування сполуки за винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування когнітивного розладу, де когнітивний розлад включає, виникає через або пов'язаний із хворобою Альцгеймера.

Застосування сполуки за винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування когнітивного розладу, де когнітивний розлад включає, виникає через або пов'язаний із деменцією з тільцями Леві.

Застосування сполуки за винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування когнітивного розладу, де когнітивний розлад включає, виникає через або пов'язаний із шизофренією.

Сполуку для лікування або зменшення тяжкості гострого, хронічного, невропатичного або запального болю, артриту, мігрені, кластерного головного болю, невралгії трійчастого нерву, герпетичної невралгії, загальної невралгії, вісцерального болю, болю при остеоартриті, постгерпетичної невралгії, діабетичної невропатії, корінцевого болю, радикуліту, болю у спині, голові або шиї, сильного або непереборного болю, ноцицептивного болю, проривного болю, післяопераційного болю або ракового болю.

Спосіб лікування або зменшення тяжкості гострого, хронічного, невропатичного або запального болю, артриту, мігрені, кластерного головного болю, невралгії трійчастого нерву, герпетичної невралгії, загальної невралгії, вісцерального болю, болю при остеоартриті, постгерпетичної невралгії, діабетичної невропатії, корінцевого болю, радикуліту, болю у спині, голові або шиї, сильного або

непереборного болю, ноцицептивного болю, проривного болю, післяопераційного болю або ракового болю, який включає введення терапевтично ефективної дози сполуки за винаходом.

Сполуку для лікування периферичних розладів, таких як зниження внутрішньоочного тиску при глаукомі та лікування сухості очей та сухості у роті, включаючи синдром Шегрена.

Спосіб лікування периферичних розладів, таких як зниження внутрішньоочного тиску при глаукомі та лікування сухості очей та сухості у роті, включаючи синдром Шегрена, який включає введення терапевтично ефективної дози сполуки за винаходом.

Застосування сполуки за винаходом для виготовлення лікарського засобу для лікування або зменшення тяжкості гострого, хронічного, невропатичного або запального болю, артриту, мігрені, кластерного головного болю, невралгії трійчастого нерву, герпетичної невралгії, загальної невралгії, вісцерального болю, болю при остеоартриті, постгерпетичної невралгії, діабетичної невропатії, корінцевого болю, радикуліту, болю у спині, голові або шиї, сильного або непереборного болю, ноцицептивного болю, проривного болю, післяопераційного болю або ракового болю або для лікування периферичних розладів, таких як зниження внутрішньоочного тиску при глаукомі та лікування сухості очей та сухості у роті, включаючи синдром Шегрена.

Застосування сполуки за винаходом для лікування уражень шкіри, наприклад, викликаних вульгарною пухирчаткою, герпетиформним дерматитом, пемфігоїдом та іншими станами шкіри з утворенням пухирів.

Застосування сполуки за винаходом для лікування, запобігання, полегшення або зміни стану, пов'язаного зі зміненою функцією та моторикою шлунково-кишкового тракту, таких як функціональна диспепсія, синдром подразненого кишечника, гастроезофагеальний кислотний рефлюкс (GER) та порушення моторики стравоходу, симптоми гастропарезу та хронічної діареї.

Застосування сполуки за винаходом для лікування нюхової дисфункції, такої як синдром Босма-Хенкіна-Крістіансена, отруєння хімічними речовинами (наприклад, селеном та сріблом), гіпопітuitarизм, синдром Каллмана, переломи черепа, терапія пухлин та гіпофункція щитоподібної залози.

Застосування сполуки за винаходом для лікування залежності.

Застосування сполуки за винаходом для лікування рухових розладів, таких як хвороба Паркінсона, СДВГ, хвороба Гантінгтона, синдром Туретта та інші синдроми, пов'язані з дофамінергічною дисфункцією як основний патогенетичний фактор, що викликає захворювання.

Застосування сполуки за винаходом для лікування поведінкових та психологічних симптомів деменції (ППСД, включаючи ажитацію, вербальну агресивність, фізичну агресивність, депресію, тривогу, аномальну рухову поведінку, піднесений настрій, дратівливість, апатію, дезінгібування, імпульсивність, марення, галюцинації, зміни сну та зміни апетиту).

Сполуки за винаходом включають Приклад 1, Приклад 1-1 та Приклад 1-2 наведені нижче.

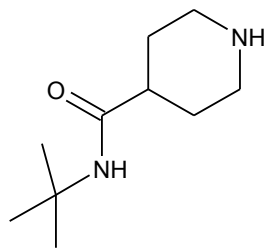


Способи отримання сполук за винаходом

Сполуки за винаходом можуть бути отримані відповідно до синтетичних способів, добре відомих фахівцям в даній галузі техніки, та як описано в даному документі.

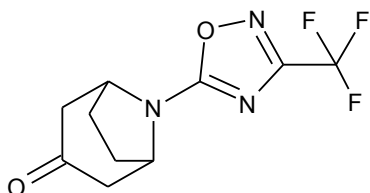
Також передбаченим є спосіб отримання сполуки, як визначено вище, який може включати будь-який один з А, В або С:

(А) реакцію сполуки формули (10):



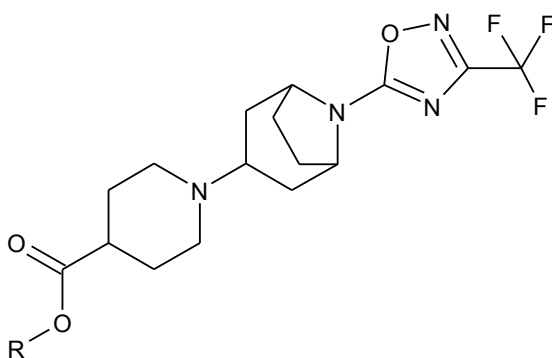
(10)

зі сполукою формули (11):



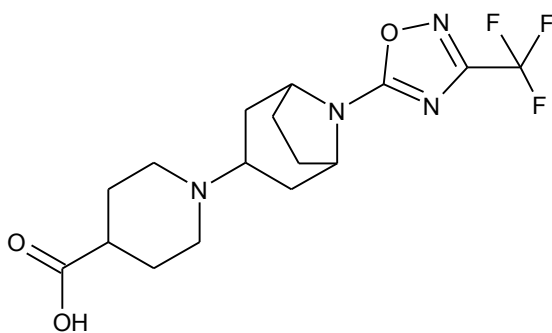
(11)

В умовах відновного амінування; або
(В) реакцію сполуки формули (12):



(12)

з аміном формули $(\text{CH}_3)_3\text{CNH}_2$, де R являє собою прийнятну групу, таку як метил або етил; або
(С) реакцію сполуки формули (13):



(13)

з аміном формули $(\text{CH}_3)_3\text{CNH}_2$.

Такі способи є добре відомими фахівцями в даній галузі техніки. Приклади синтетичних процедур для перетворення однієї функціональної групи на іншу функціональну групу викладені в стандартних текстах, таких як March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 7th Edition, Michael B. Smith, John Wiley, 2013, (ISBN: 978-0-470-46259-1), Organic Syntheses, Online Edition, www.orgsyn.org, (ISSN 2333-3553) and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Volumes 1-17, John Wiley, edited by Mary Fieser (ISBN: 0-471-58283-2).

В реакціях, описаних вище, може бути необхідним захистити одну або більше груп, щоб запобігти перебігу реакції в небажаному місці молекули. Приклади захисних груп та способи захисту та зняття захисту функціональних груп можна знайти у Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fifth Edition, Editor: Peter G. M. Wuts, John Wiley, 2014, (ISBN: 9781118057483).

Сполуки, отримані за вищезазначеними способами, можуть бути виділені та очищені за будь-якими з безлічі способів, добре відомих фахівцям в даній галузі, та приклади таких способів включають способи перекристалізації та хроматографії, такі як колонкова хроматографія (наприклад, флеш-хроматографія), ВЕРХ та SFC.

Фармацевтичні композиції

Хоча активна сполука може бути введеною окремо, переважним є представити її у вигляді фармацевтичної композиції (наприклад, композиції).

Відповідно, передбаченою є фармацевтична композиція, що містить щонайменше одну сполуку за винаходом, як визначено вище, разом з щонайменше одним фармацевтично прийнятним ексципієнтом.

Композиція може бути таблетованою композицією. Композиція може бути капсульною композицією.

Фармацевтично прийнятний ексципієнт(и) може бути вибраний з групи, наприклад, носіїв (наприклад, твердого, рідкого, напівтвердого носія), ад'ювантів, розріджувачів (наприклад, твердих розріджувачів, таких як наповнювачі або об'ємоутворюючі агенти; та рідких розріджувачів, таких як розчинники та співрозчинники), гранулюючих агентів, зв'язуючих речовин, засобів для покращення текучості, покриваючих агентів, агентів, що контролюють вивільнення (наприклад, сповільнюючі або затримуючі вивільнення полімери або воски), зв'язуючих агентів, розпушувачів, буферних агентів, змащувальних речовин, консервантів, протигрибкових та антибактеріальних агентів, антиоксидантів, буферних агентів, агентів, що регулюють тонічність, загусників, ароматизаторів, підсолоджувачів, пігментів, пластифікаторів, маскуючих смакових агентів, стабілізаторів, або будь-яких інших ексципієнтів, які традиційно використовуються у фармацевтичних композиціях.

Термін "фармацевтично прийнятний", як використовується в даному документі, означає сполуки, матеріали, композиції та/або лікарські дозовані форми, які, в межах об'ґрунтованого медичного висновку є прийнятними для застосування в контакт з тканинами суб'єкта (наприклад, суб'єкта-людини) без надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції або інших проблем чи ускладнень, що відповідають розумному співвідношенню користь/ризик. Кожний ексципієнт також має бути "прийнятним" в сенсі сумісності з іншими інгредієнтами композиції.

Фармацевтичні композиції, що містять сполуки за винаходом, можуть бути сформульовані відповідно до відомих методик, дивіться, наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA.

Фармацевтичні композиції можуть бути в будь-якій формі, яка підходить для перорального, парентерального, місцевого, інтраназального, внутрішньобронхіального, сублінгвального, офтальмологічного, оптичного, ректального, інтравагінального або крізьшкірного введення.

Фармацевтичні лікарські дозовані форми, прийнятні для перорального введення, включають таблетки (з покриттям або без покриття), капсули (з твердою або м'якою оболонкою), каплетки, пігулки, льодяники, сиропи, розчини, порошки, гранули, еліксири та суспензії, сублінгвальні таблетки, пастилки або пластирі, такі як букальні пластирі. Таблетовані композиції можуть містити стандартну дозу активної сполуки разом з інертним розчинником або носієм, таким як цукор або цукровий спирт, наприклад; лактоза, сахароза, сорбіт або маніт; та/або розріджувач, що не містить цукру, такий як карбонат натрію, фосфат кальцію, карбонат кальцію або целюлоза або її похідна, така як мікрокристалічна целюлоза (МКЦ), метилцелюлоза, етилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза та крохмалі, такий як кукурудзяний крохмаль. Таблетки також можуть містити такі стандартні інгредієнти, як зв'язуючі та гранулюючі агенти, такі як полівінілпіролідон, розпушувачі (наприклад, набухаючі зшиті полімери, такі як зшита карбоксиметилцелюлоза), змащувальні агенти (наприклад, стеарати), консерванти (наприклад, парабени), та антиоксиданти (наприклад, ВНТ), буферні агенти (наприклад, фосфатний або цитратний буфери) та шипучі агенти, такі як суміші цитрату/бікарбонату. Такі ексципієнти є добре відомими та не потребують детального обговорення в даному документі.

Таблетки можуть бути призначені для вивільнення лікарського засобу або при контакт з шлунковими рідинами (таблетки з негайним вивільненням), або для контрольованого вивільнення (таблетки з контрольованим вивільненням) протягом тривалого періоду часу або певної ділянки шлунково-кишкового тракту.

Фармацевтичні композиції, як правило, містять від приблизно 1 % (мас./мас.) до приблизно 95 %, переважно % (мас./мас.) активного інгредієнта та від 99 % (мас./мас.) до 5 % (мас./мас.) фармацевтично прийнятного ексципієнта (наприклад, як визначено вище) або комбінації таких ексципієнтів. Переважно композиції містять від приблизно 20 % (мас./мас.) до приблизно 90 % (мас./мас.) активного інгредієнта та від 80 % (мас./мас.) до 10 % фармацевтичного ексципієнта або комбінації ексципієнтів. Фармацевтичні композиції містять від приблизно 1 % до приблизно 95 %, переважно від приблизно 20 % до приблизно 90 % активного інгредієнта. Фармацевтичні композиції за винаходом можуть бути, наприклад, у вигляді стандартних дозованих форм, таких як ампули, флакони, супозиторії, попередньо заповнені шприци, драже, порошки, таблетки або капсули.

Таблетки та капсули можуть містити, наприклад, 0-20 % розпушувачів, 0-5 % змащувальних

речовин, 0-5 % засобів для підвищення текучості та/або 0-99 % (мас./мас.) наповнювачів/або об'ємоутворюючих агентів (залежно від дози препарату). Вони також можуть містити 0-10 % (мас./мас.) полімерних зв'язуючих речовин, 0-5 % (мас./мас.) антиоксидантів, 0-5 % (мас./мас.) пігментів. Крім того, таблетки з сповільнюючим вивільненням, як правило, містять 0-99 % (мас./мас.) полімерів, які контролюють (наприклад, затримують) вивільнення (залежно від дози). Плівкові покриття таблетки або капсули, як правило, містять 0-10 % (мас./мас.) полімерів, 0-3 % (мас./мас.) пігментів та/або 0-2 % (мас./мас.) пластифікаторів.

Парентеральні композиції, як правило, містять 0–20 % (мас./мас.) буферів, 0–50 % (мас./мас.) співрозчинників та/або 0–99 % (мас./мас.) води для ін'єкцій (WFI) (залежно від дози та наявності сублімаційної сушки). Композиції для внутрішньом'язових депо можуть містити 0-99 % (мас./мас.) олій.

Фармацевтичні композиції можуть бути представлені пацієнту в "упаковках для пацієнтів", що містять весь курс лікування в одній упаковці, як правило, у блістерній упаковці.

Сполуки за винаходом, як правило, представлені у вигляді стандартної лікарської дозованої форми та, як такі, як правило, містять достатню кількість сполуки для забезпечення бажаного рівня біологічної активності. Наприклад, композиція може містити від 1 нанограму до 2 грамів активного інгредієнта, наприклад, від 1 нанограму до 2 міліграмів активного інгредієнта. В межах зазначених діапазонів конкретні піддіапазони сполуки складають від 0,1 міліграму до 2 грамів активного інгредієнта (частіше від 10 міліграму до 1 граму, наприклад, від 50 міліграмів до 500 міліграмів) або від 1 мікрограму до 20 міліграмів (наприклад, від 1 мікрограма до 10 міліграмів, наприклад, від 0,1 міліграму до 2 міліграмів активного інгредієнту).

Для пероральних композицій, стандартна лікарська дозована форма може містити від 1 міліграму до 2 грамів, більш типово від 10 міліграмів до 1 граму, наприклад, від 50 міліграмів до 1 граму, наприклад, від 100 міліграмів до 1 граму активної сполуки.

Активна сполука буде вводиться пацієнту, який цього потребує (наприклад, пацієнту-людині або тварині) у кількості, достатній для досягнення бажаного терапевтичного ефекту (ефективна кількість). Точна кількість сполуки, що вводиться, може бути визначена лікарем відповідно до стандартних процедур.

Загальні процедури

В тих випадках, коли шляхи отримання не включені, відповідний проміжний продукт є комерційно доступним. Комерційні реагенти використовували без додаткового очищення. Кімнатна температура (кт) стосується приблизно 22-30 °C. Спектри ¹H ЯМР були записані при 400 МГц на приладі Bruker. Значення хімічного зсуву виражаються в мільйонних частках (м.ч.), тобто (δ)-значеннях. Наступні скорочення використовуються для множинності сигналів ЯМР: с = синглет, ш = широкий, д = дублет, т = триплет, кв = квартет, квінт = квінтет, тд = триплет дублетів, тт = триплет триплетів, квд = квартет дублетів, ддд = дублет дублетів дублетів, ддт = дублет дублетів триплетів, м = мультиплет. Константи зв'язку вказані як значення J, виміряні в Гц. Результати ЯМР та мас-спектроскопії були скориговані з урахуванням фонових піків.

PX-МС аналіз

PX-МС-аналіз сполук проводили в умовах електророзпилення з використанням приладів та способів, зазначених у таблицях нижче:

Система	Назва приладу	PX-детектор	Мас-детектор
1	Agilent 1290 RRLC	Діодно-матричний детектор	Agilent 6120
2	Shimadzu Nexera	Фотодіодна матриця	MS-2020

Назва способу	Система розчинника	Використана колонка	Гradient (Розчинник A:B)	УФ-діапазон	Мас-діапазон	Температура колонки °C	Швидкість потоку мл/хв
A	(A) 5мМ ацетат амонію та 0,1 % мурашиної кислоти у воді	VEN C-18 2,1 × 50 мм, 1,7 мкм або еквівалент	98:2 при від 0,01 хв до 0,50 хв, 10:90 при 5,00 хв, 5:95 при від 6,00 хв до 7,00 хв, 98:2 при від 7,01 хв до 8,00 хв	200 -400 нм	60-1000 аом	Навколишнього середовища	0,45
	(B) 0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрилі						
B	(A) 0,1 %	X-BRIDGE	95:5 при 0,01 хв,	200 -	60-1000	Нав-	1,00

	аміаку у воді (В) 0,1 % аміаку в ацетонітрилі	C-18 50 x 4,6мм, 3,5мм або еквівалент	10:90 при 5,00 хв, 5:95 при від 5,80 хв до 7,20 хв, 95:5 при від 7,21 хв до 10,00 хв	400нм	аом	колиш- нього сере- довища	
--	--	--	--	-------	-----	------------------------------------	--

Препаративне очищення ВЕРХ

Препаративне очищення ВЕРХ проводили з використанням бінарної системи Shimadzu LC-20AP з УФ-детектором SPD-20A. Спосіб очищення: [фаза (опис колонки, довжина колонки × внутрішній діаметр, розмір частинок), швидкість потоку розчинника, градієнт – вказується у % рухомої фази В у рухомій фазі А (з плином часу), рухома фаза (А), рухома фаза (В)].

Препаративна ВЕРХ Спосіб А

Препаративна ВЕРХ: [Обернена фаза (X-BRIDGE C-18, 250 × 50 мм, 5 мкм), 85 мл/хв, градієнт 35 % – 70 % (більше 26 хв), 100 % (більше 2 хв), 100 % – 35 % (більше 6 хв), рухома фаза (А): 5 мм бікарбонату амонію у воді + 0,1 % аміаку у воді (В): 100 % ацетонітрил].

Препаративна ВЕРХ Спосіб В

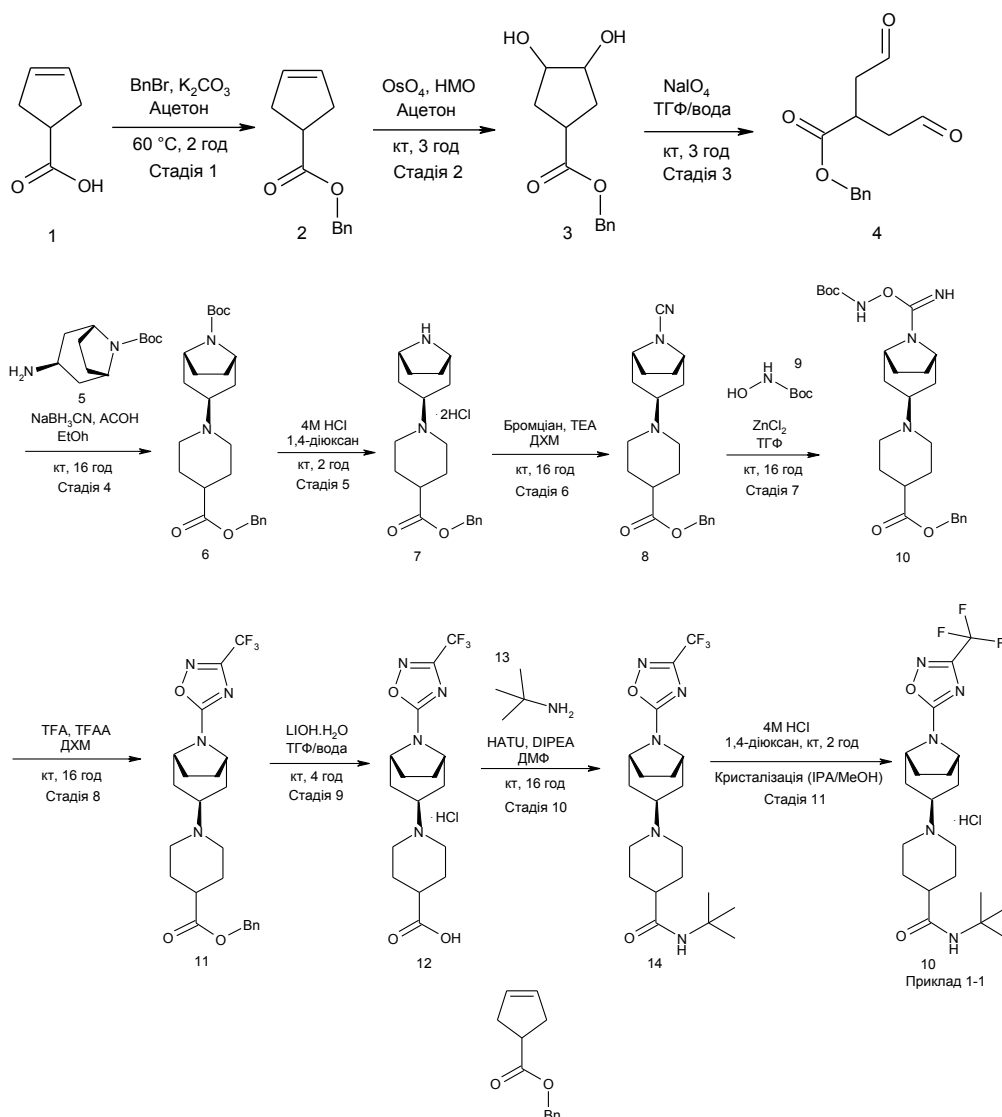
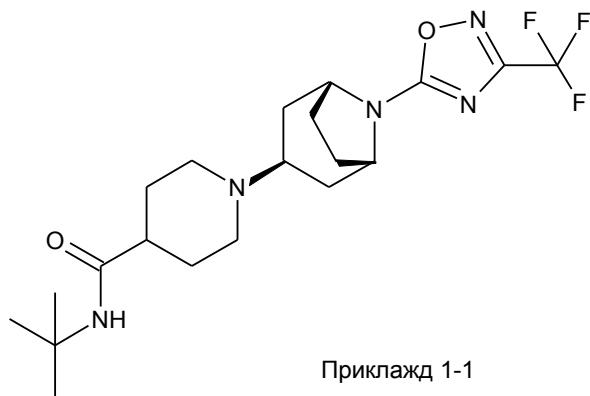
Препаративна ВЕРХ: [Обернена фаза (X-BRIDGE C-18, 250 × 50 мм, 5 мкм), 85 мл/хв, градієнт 40 % – 60 % (більше 26 хв), 60 % (більше 4 хв), 100 % (більше 2 хв), 100 % – 40 % (більше 7 хв), рухома фаза (А): 5 мм бікарбонату амонію у воді + 0,1 % аміаку у воді, (В): 100 % ацетонітрил].

Скорочення	
AcOH	=оцтова кислота
Bn	=бензил
t-BuOH	=трет-бутиловий спирт
CPM	=циклопентилметиловий ефір
DXM	=дихлорметан
DIPEA	=N,N-диізопропілетиламін
DMF	=диметилформаїд
DMCO	=диметилсульфоксид
ESI	=електророзпилювальна іонізація
EtOH	=етанол
год.	=година/с
HATU	=гексафторфосфат азабензотриазол тетраметилуроній
ВЕРХ	=високоєфективна рідинна хроматографія
IPA	=пропан-2-ол
PXMC	=рідинна хроматографія мас-спектрометрія
MeOH	= метанол
хв	=хвилина/с
2-МТГФ	=2-метилтетрагідрофуран
нм	=нанометр(и)
NMO	=4-метилморфолін 4-оксид
ЯМР	=ядерний магнітний резонанс
кт	=кімнатна температура
RT	=час утримування
TEA	=триетиламін
TFA	=трифтороцтова кислота
TFAA	=трифтороцтовий ангідрид
ТГФ	=тетрагідрофуран

Префікси n-, v-, i-, t- та трет- мають свої звичайні значення: нормальний, вторинний, ізо та третинний.

Синтез N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду гідрохлорид (Приклад 1-1)

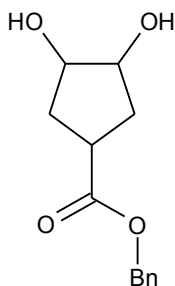
Приклад 1-1



Стадія 1: Синтез бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилату (Проміжна сполука 2)

До суміші циклопент-3-ен-1-карбонової кислоти (CAS: 7686-77-3, Проміжна сполука 1) (25,0 г, 223 ммоль) та K_2CO_3 (61,5 г, 446 ммоль) в ацетоні (375 мл) по краплях додавали (бромметил)бензол (CAS: 100-39-0) (29,1 мл, 245 ммоль). Реакцію перемішували при 60 °C протягом 2 год. та потім залишали охолоджуватись до кімнатної температури. Отриману суміш фільтрували, та фільтрат концентрували при зниженому тиску. Неочищений продукт очищували за допомогою колонкової хроматографії [Нормальна фаза (нейтральний Al_2O_3), 0-10 % (Етилацетат у гексані)] з отриманням бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилату (Проміжна сполука 2) (40,1 г, 89,0 %).

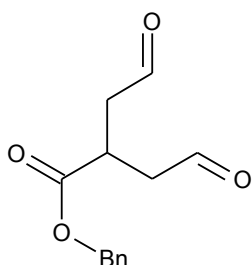
PXMC (Система 1, Спосіб А): (ESI) m/z 203 $[M+H]^+$ RT 5,10 хв, 254 нм.



Стадія 2: Синтез бензил 3,4-дигідроксициклопентан-1-карбоксилату (Проміжна сполука 3) Суміш бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилату (Проміжна сполука 2) (43,8 г, 217 ммоль),

OsO_4 (2 % в $t\text{-BuOH}$, 12,0 мл, 0,94 ммоль) та 4-метилморфолін 4-оксиду (30,44 г, 260 ммоль) в ацетоні (431 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 16 год. Суміш обробляли насиченим водним розчином Na_2SO_3 (500 мл) та потім екстрагували ДХМ (3 × 400 мл). Об'єднані органічні шари сушили (Na_2SO_4) та концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок очищували за допомогою колонкової хроматографії [Нормальна фаза (силікагель), 0-50 % (Етилацетат у гексані)] з отриманням бензил 3,4-дигідроксициклопентан-1-карбоксилату (Проміжна сполука 3) (30,4 г, 59,4 %).

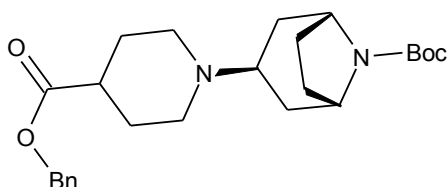
РХМС (Система 2, Спосіб В): (ESI) m/z 237 $[\text{M}+\text{H}]^+$ RT 2,38 хв, 224 нм.



Стадія 3: Синтез бензил 4-оксо-2-(2-оксоетил)бутаноату (Проміжна сполука 4)

Суміш бензил 3,4-дигідроксициклопентан-1-карбоксилату (Проміжна сполука 3) (36,0 г, 153 ммоль) та NaIO_4 (48,7 г, 229 ммоль) в ТГФ (1800 мл) та воді (144 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Додавали воду (1500 мл) до розчинення осаду та потім суміш екстрагували ДХМ (3 × 500 мл). Об'єднані органічні шари сушили (Na_2SO_4) та концентрували при зниженому тиску з отриманням бензил 4-оксо-2-(2-оксоетил)бутаноату (Проміжна сполука 4) (35,8 г, 100,0 %). Неочищений продукт використовували без додаткового очищення.

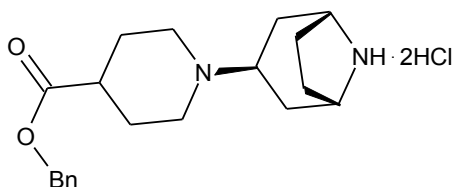
РХМС (Система 2, Спосіб В): (ESI) m/z 233 $[\text{M}-\text{H}]^-$ RT 2,33 хв та 2,74 хв, 202 нм.



Стадія 4: Синтез трет-бутил (1R,3r,5S)-3-(4-((бензилокси)карбоніл)піперидин-1-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октане-8-карбоксилату (Проміжна сполука 6)

Розчин трет-бутил (1R,3r,5S)-3-аміно-8-азабіцикло[3.2.1]октан-8-карбоксилату (CAS: 207405-68-3, Проміжна сполука 5) (34,6 г, 153 ммоль) та бензил 4-оксо-2-(2-оксоетил)бутаноату (Проміжна сполука 4) (35,8 г, 153 ммоль) в EtOH (1400 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв. Потім до нього додавали NaBH_3CN (9,64 г, 153 ммоль) та AcOH (3,0 мл, 52,5 ммоль) та продовжували перемішувати при кімнатній температурі протягом 16 год. Реакційну суміш розбавляли водою (1000 мл) та екстрагували ДХМ (3 × 500 мл). Об'єднані органічні шари сушили (Na_2SO_4) та концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок очищували за допомогою колонкової хроматографії [Нормальна фаза (силікагель), 0-30 % (Етилацетат у гексані)] з отриманням трет-бутил (1R,3r,5S)-3-(4-((бензилокси)карбоніл)піперидин-1-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-8-карбоксилату (Проміжна сполука 6) (41,0 г, 62,6 %).

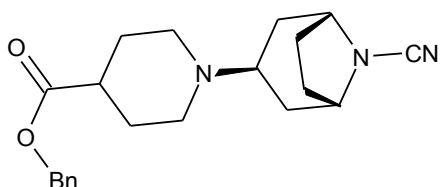
РХМС (Система 2, Спосіб В): (ESI) m/z 429 $[\text{M}+\text{H}]^+$ RT 4,28 хв, 202 нм.



Стадія 5: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилат дигідрохлориду (Проміжна сполука 7)

До розчину трет-бутил (1R,3r,5S)-3-(4-((бензилокси)карбоніл)піперидин-1-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-8-карбоксилату (Проміжна сполука 6) (41,0 г, 96,0 ммоль) у 1,4-діоксані (82,0 мл) при 0 °С по краплях додавали HCl у 1,4-діоксані (4М, 410 мл, 10 об). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год., та потім концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок піддавали азеотропній перегонці з гексаном (2 × 50 мл) та потім тритурували гексаном (2 × 50 мл) з отриманням бензил 1-((1R,3r,5S)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилат дигідрохлориду (Проміжна сполука 7) (38,4 г, 100,0 %).

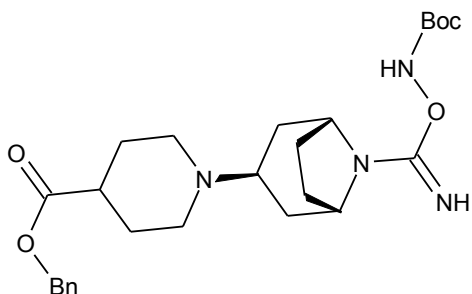
PXMC (Система 1, Спосіб B): (ESI) m/z 329 [M+H]⁺ RT 3,10 хв, 202 нм.



Стадія 6: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-ціано-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 8)

До розчину бензил 1-((1R,3r,5S)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилат дигідрохлориду (Проміжна сполука 7) (38,4 г, 96,0 ммоль) в ДХМ (314 мл) при -20 °С по краплях додавали триетиламін (39,8 мл, 287 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру в межах від -20 °С до 0 °С. потім реакцію перемішували при зазначеній температурі протягом 30 хв. Потім до нього по краплях додавали бромціан (15,1 г, 144 ммоль) у вигляді розчину в ДХМ (31,0 мл), підтримуючи внутрішню температуру в межах від -20 °С до 0 °С. Потім йому давали нагрітися до кімнатної температури та перемішували протягом 16 год. Реакційну суміш розбавляли насиченим водним розчином NaHCO₃ (700 мл) та екстрагували ДХМ (3 × 300 мл). Об'єднані органічні шари сушили (Na₂SO₄) та концентрували при зниженому тиску. Неочищений продукт очищували за допомогою колонкової хроматографії [Нормальна фаза (нейтральний Al₂O₃), 0-30 % (Етилацетат у гексані)] з отриманням бензил 1-((1R,3r,5S)-8-ціано-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 8) (16,0 г, 47,4 %).

PXMC (Система 2, Спосіб B): (ESI) m/z 354 [M+H]⁺ RT 3,69 хв, 202 нм.

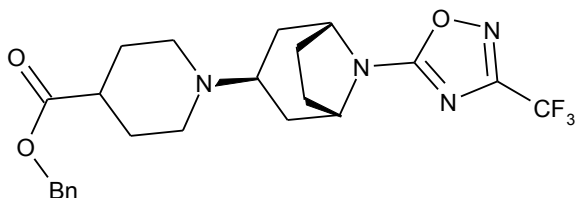


Стадія 7: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-(((трет-бутоксикарбоніл)аміно)окси)(іміно)метил)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 10)

До розчину бензил 1-((1R,3r,5S)-8-ціано-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 8) (16,0 г, 45,3 ммоль) в ТГФ (160 мл) при 0 °С додавали трет-бутил гідроксикарбамат (CAS: 36016-38-3, Проміжна сполука 9) (6,63 г, 49,8 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 0 °С протягом 20 хв. Потім до зазначеного розчину при 0 °С повільно додавали хлорид цинку в 2-МТГФ (1,9 М, 47,7 мл, 90,6 ммоль), з подальшим перемішуванням при кімнатній

температурі протягом 16 год. Реакційну суміш гасили водою (300 мл) та екстрагували етилацетатом (3 × 400 мл). Об'єднані органічні шари сушили (Na₂SO₄) та концентрували при зниженому тиску. Отриманий неочищений продукт тритували гексаном (2 × 50 мл) з отриманням бензил 1-((1R,3r,5S)-8-(((трет-бутоксикарбоніл)аміно)окси)(іміно)метил)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 10) (22,0 г, 100,0 %). Неочищений продукт використовували без додаткового очищення.

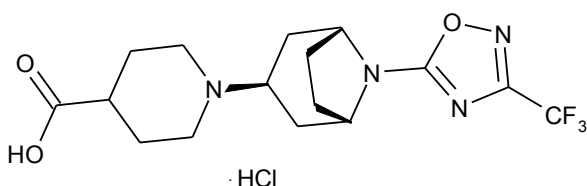
PXMC (Система 2, Спосіб B): (ESI) m/z 487 [M+H]⁺ RT 3,10 хв, 202 нм.



Стадія 8: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 11)

До розчину бензил 1-((1R,3r,5S)-8-(((трет-бутоксикарбоніл)аміно)окси)(іміно)метил)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 10) (22,0 г, 45,3 ммоль) в ДХМ (220 мл) при від 0 °С до 5 °С по краплях додавали TFA (110 мл, 5 об). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 40 хв та потім охолоджували до від 0 °С до 5 °С. Потім до неї по краплях додавали TFAA (28,7 мл, 203,7 ммоль) та перемішували протягом 30 хв перед нагріванням до кімнатної температури та перемішували протягом 16 год. Реакційну суміш розбавляли толуолом (220 мл) та концентрували при зниженому тиску. Додавали насичений розчин NaHCO₃ (800 мл) та реакцію екстрагували етилацетатом (3 × 500 мл). Об'єднані органічні шари сушили (Na₂SO₄) та концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок очищували за допомогою колонкової хроматографії [Нормальна фаза (нейтральний Al₂O₃), 0-30 % (Етилацетат у гексані)] з отриманням бензил 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 11) (12,4 г, 59,0 %).

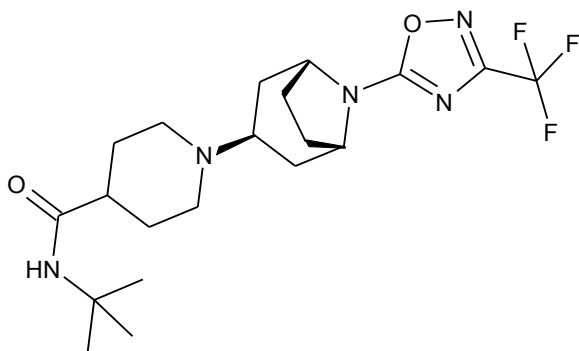
PXMC (Система 2, Спосіб B): (ESI) m/z 465 [M+H]⁺ RT 4,40 хв, 240 нм.



Стадія 9: Синтез 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбонової кислоти гідрохлорид (Проміжна сполука 12)

До розчину бензил 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (Проміжна сполука 11) (12,3 г, 26,5 ммоль) у ТГФ (123 мл) та води (24,6 мл) при кімнатній температурі порціями додавали моногідрат гідроксиду літію (2,78 г, 66,3 ммоль) та потім перемішували при кімнатній температурі протягом 16 год. Реакційну суміш розбавляли водою (100 мл), охолоджували до від 0 °С до 10 °С та рН доводили до рН=5-6 застосовуючи розчин 1М HCl (приблиз. 70-80 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 1 год. та потім водні шари розділяли та ліофілізували з отриманням 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбонової кислоти гідрохлорид (Проміжна сполука 12) (15,1 г, неочищений). Неочищений продукт використовували без додаткового очищення.

PXMC (Система 2, Спосіб B): (ESI) m/z 375 [M+H]⁺ RT 2,10 хв, 236 нм.

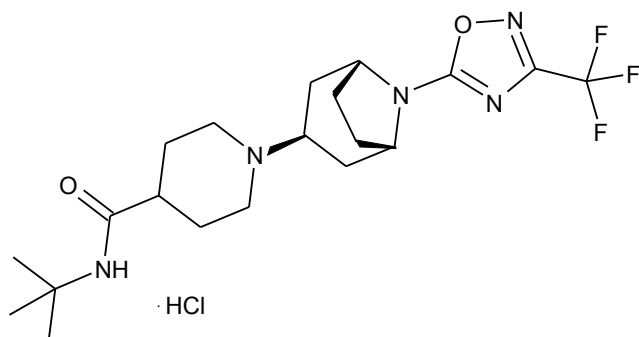


Стадія 10: Синтез N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду (Проміжна сполука 14)

До розчину 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбонової кислоти гідрохлорид (Проміжна сполука 12) (5,8 г, 14,1 ммоль) (використовували 8 г неочищеного виділеного продукту зі стадії 9) в ДМФ (80,0 мл) при від 0 °С до 10 °С порціями додавали НАТУ (12,2 г, 32,0 ммоль). Реакцію перемішували при від 0 °С до 10 °С протягом 40 хв. Потім до неї додавали 2-метилпропан-2-амін (CAS: 75-64-9, Проміжна сполука 13) (6,8 мл, 64,2 ммоль) та DIPEA (11,4 мл, 64,2 ммоль). Отриману реакційну суміш залишали до нагрівання до кімнатної температури та перемішували протягом 16 год. Додавали крижану воду (500 мл), перемішували протягом 20 хв та утворений осад збирали шляхом фільтрування. Осад на фільтрі промивали холодною водою (500 мл) та потім гексаном (500 мл) з отриманням неочищеного продукту (2,5 г). Водні шари екстрагували етилацетатом (2 × 200 мл) та об'єднані органічні шари сушили (Na₂SO₄) та концентрували при зниженому тиску з отриманням додаткового неочищеного продукту (4,5 г). Неочищені продукти об'єднували та очищували за допомогою колонкової хроматографії [Нормальна фаза (силікагель), 0-50 % (Етилацетат у гексані)] з отриманням двох партій продукту з різною чистотою (2,0 г та 3,8 г). Потім кожну партію окремо відбирали та додатково очищували за допомогою препаративної ВЕРХ спосіб А та В, відповідно. Отримані продукти об'єднували та кристалізували використовуючи IPA (10 об) та MeOH (1 об) та осад на фільтрі промивали холодним IPA (2 об) з отриманням N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду (Проміжна сполука 14) (1,9 г, 31,4 %).

PXMC (Система 2, Спосіб В): (ESI) m/z 430 [M+H]⁺ RT 3,54 хв, 240 нм.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,31 (ш. с, 1H), 4,39 – 4,25 (м, 2H), 3,26 – 3,15 (м, 2H), 2,27 – 1,80 (м, 10H), 1,71 – 1,44 (м, 6H), 1,22 (с, 9H).



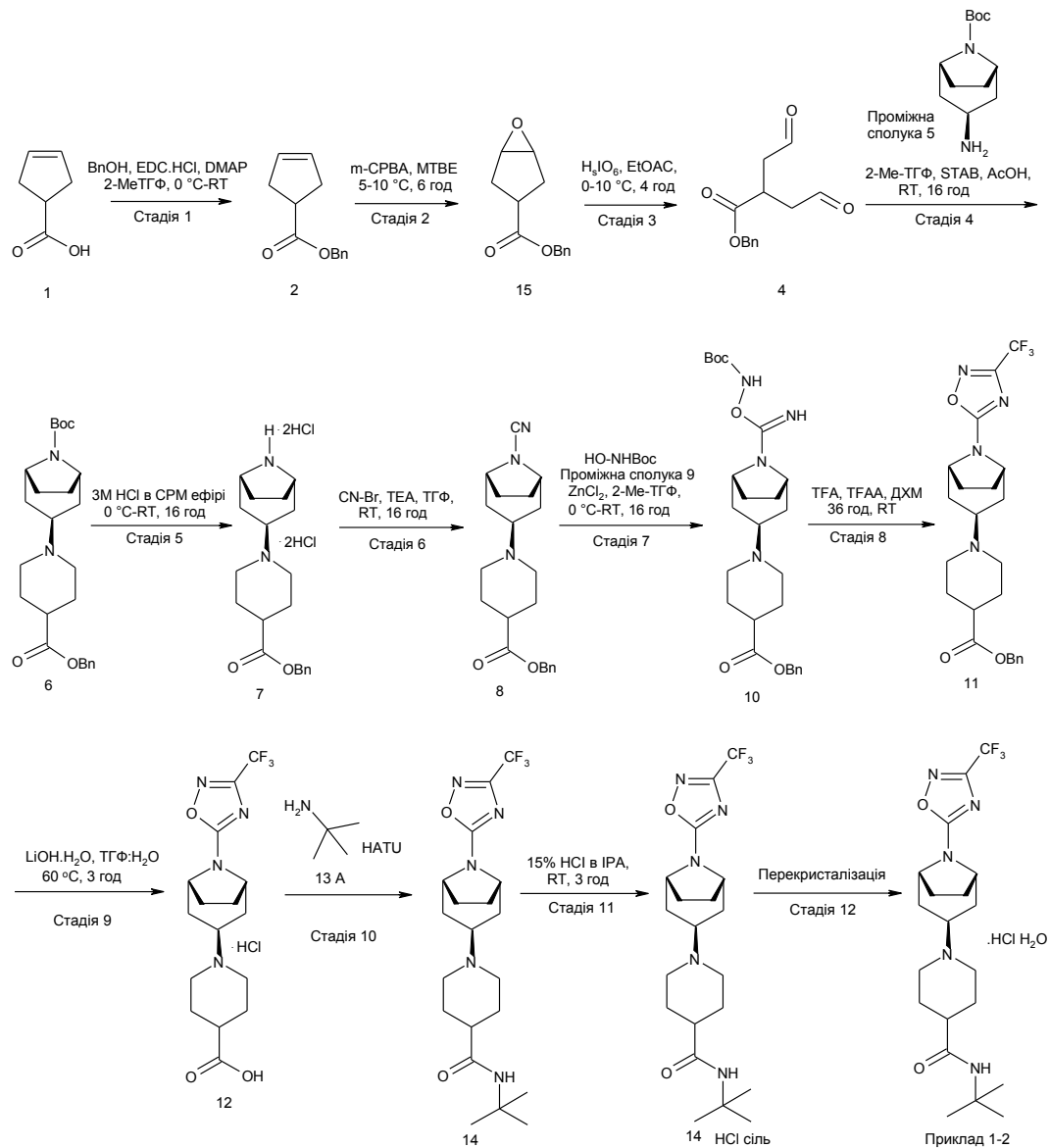
Стадія 11: Синтез N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксамід гідрохлориду (Приклад 1-1)

До розчину N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду (Проміжна сполука 14) (1,9 г, 4,4 ммоль) у 1,4-діоксані (3,8 мл) при 0 °С додавали HCl в 1,4-діоксані (4 М, 19,0 мл, 10 об). Реакцію перемішували при кімнатній температурі протягом 4 год. та потім концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок піддавали азеотропній перегонці з 1,4- діоксаном (2 × 10 мл) та потім тритурували 1,4-діоксаном (10 мл). Тверду речовину збирали шляхом фільтрування та осад на фільтрі промивали 1,4-діоксаном (2 × 5 мл), n- пентаном (10 мл) та сушили при зниженому тиску. Тверду речовину кристалізували з використанням IPA (10 об) та MeOH (1 об) та осад на фільтрі промивали холодним IPA (2 об) з отриманням N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксамід гідрохлориду (Приклад 1-1) (1,8 г, 87,9 %).

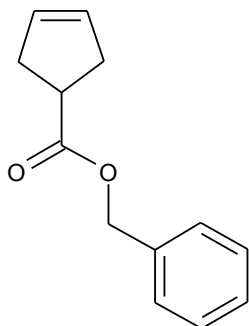
РХМС (Система 2, Спосіб В): (ESI) m/z 430 $[M+H]^+$ RT 3,55 хв, 240 нм.

1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ 10,78 – 10,24 (м, 1H), 7,58 – 7,46 (м, 1H), 4,62 – 4,50 (м, 2H), 3,54 – 3,43 (м, 2H), 3,32 – 3,06 (м, 2H), 2,85 – 2,64 (м, 4H), 2,37 – 2,20 (м, 1H), 2,13 – 2,00 (м, 2H), 1,93 – 1,69 (м, 7H), 1,23 (с, 9H).

Масштабний синтез N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксамід моногідрохлориду моногідрат (Приклад 1-2)



Стадія 1: Синтез бензил циклопент-3-ен-1-карбоксилату (2)



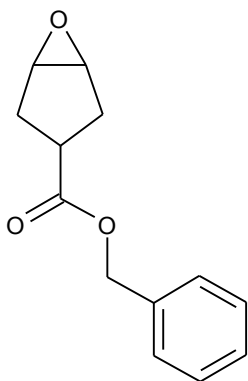
В чисту та суху 5,0 літрову 4-горлу RB колбу, оснащену холодильником, гільзою для термометра в

атмосфері азоту завантажували 2-метил-ТГФ (2550 мл), циклопент-3-ен-1- карбонову кислоту (150 г), EDC.HCl (308,72 г) та бензиловий спирт (137,25 г) при кімнатній температурі (22-25 °С). Реакційну суміш охолоджували до 0-5 °С. До реакційної суміші додавали DMAP (196,10 г) та триетиламін (205 мл) протягом 5 хвилин при 0-5 °С. реакційну суміш повільно нагрівали до кімнатної температури, постійно перемішували при кімнатній температурі (24-25 °С) протягом 18-20 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ТШХ та ВЕРХ до повного завершення. Додавали демінералізовану воду (3000 мл) при кімнатній температурі (24-25 °С) та суміш перемішували при кімнатній температурі (24-25 °С) протягом 30 хвилин. Органічні шари розділяли та 1N HCl (1500 мл) додавали при 0-5 °С та перемішували при 30 хвилин. Органічні шари розділяли та додавали 10 % водний розчин NaHCO₃ (1500 мл) при кімнатній температурі (24-25 °С) та перемішували протягом 15-20 хвилин. Органічні шари розділяли та додавали сольовий розчин (750 мл) при кімнатній температурі (22-25 °С) та перемішували протягом 15-20 хвилин. Органічні шари розділяли та органічний шар дистильовали при зниженому тиску при 45-47 °С з отриманням неочищеної сполуки.

Вага неочищеного продукту: - 248 г, Вихід неочищеного продукту = 91 %, Характер неочищеного продукту: - рідина фіолетового кольору.

Зазначений неочищений продукт безпосередньо використовували на наступній стадії без додаткового очищення.

Стадія-2: Синтез бензил 6-оксабіцикло [3.1.0] гексан-3-карбоксилату (15):

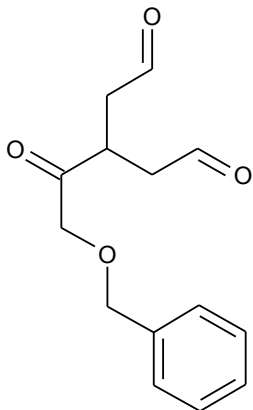


В чисту та суху 5,0 літрову 4-горлу RB колбу, оснащену холодильником, гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували МТБЕ (2450 мл) та бензил циклопент-3-ен- 1-карбоксилат (Проміжна сполука 2, 245 г) при кімнатній температурі (22-25 °С) та реакційну суміш охолоджували до 5-10 °С. m-CPBA (362,6 г) додавали до 5 окремих партій, де колір змінювався з темно-коричневого до жовтого. Реакційну суміш повільно нагрівали до 15-20 °С, постійно перемішували при 15-20 °С протягом 16-20 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ВЕРХ до повного завершення. 20 % водний розчин бісульфіту натрію (3675 мл, 15 об) повільно додавали протягом 15-20 хвилин та перемішували при 20-25 °С протягом 30 хвилин. Органічні шари розділяли та 10 % водного розчину Na₂CO₃ (2450 мл, 10 об) додавали та перемішували при 20-25 °С протягом 15 хвилин. Органічні шари розділяли та 20 % водного розчину бісульфіту натрію (2450 мл, 10 об) додавали та перемішували до вмісту пероксиду, <3 мг/л, пероксидна смужка. Органічні шари розділяли та сушили над сульфатом натрію, фільтрували, органічний шар дистильовали під тиском при 37-40 °С з отриманням бензил 6-оксабіцикло[3.1.0]гексан-3-карбоксилату.

Вага неочищеного продукту:- 234 г, вихід неочищеного продукту:- 88 %, Характер неочищеного продукту:- рідина блідо-жовтого кольору.

Зазначений неочищений продукт безпосередньо використовували на наступній стадії без додаткового очищення.

Стадія-03: Синтез бензил 4-оксо-2-(2-оксоетил) бутаноату (4):



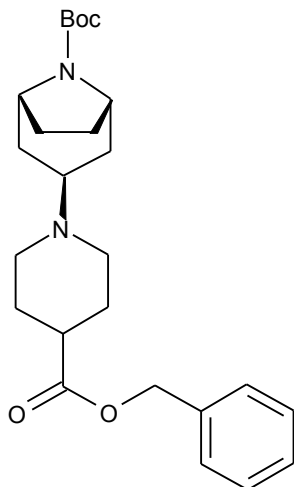
В чисту та суху 2,0 літрову 4-горлу RB колбу, оснащену холодильником, гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували етилацетат (380 мл) та йодну кислоту (87,41 г) при кімнатній температурі (22-25 °С) та білу суспензію охолоджували 0-10 °С. Додавали бензил 6-оксабіцикло [3.1.0] гексан-3-карбоксилат (Проміжна сполука 15, 76 г в

380 мл розчину етилацетату) та спостерігали зміну кольору з темно-коричневого до жовтого. Реакційну суміш повільно нагрівали до 15-20 °С та продовжували перемішувати протягом 3-4 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ТШХ та ВЕРХ до повного завершення. Додавали демінералізовану воду (760 мл, 10 об) та перемішували при 20-25 °С протягом 15-20 хвилин тричі. Органічні шари розділяли та промивали сольовим розчином (380 мл, 5 об) та перемішували при 20-25 °С протягом 5-10 хвилин. Органічні шари розділяли та сушили над сульфатом натрію, фільтрували, органічний шар дистильовали під тиском при 37-40 °С з отриманням бензил-4-оксо-2-(2-оксоетил)бутаноату.

Вага неочищеного продукту: - 82 г, Характер неочищеного продукту: - рідина блідо-жовтого кольору.

Зазначений неочищений продукт безпосередньо використовували на наступній стадії без додаткового очищення.

Стадія-04: Синтез трет-бутил (1R,3r,5S)-3-(4-((бензилокси)карбоніл)піперидин-1-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-8-карбоксилату (6):



В чисту та суху 2,0 літрову 4-горлу RB колбу, оснащену холодильником та гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували 2-метил-ТГФ (570 мл) та бензил-4-оксо-2-(2-оксоетил)бутаноат (Проміжна сполука 4, 57 г *Фактична вага неочищеного продукту становила 82 г безпосередньо зі Стадії 3) при кімнатній температурі (22-23 °С). Додавали Проміжну сполуку 5 (ендоамін) (49,54 г) та реакцію охолоджували до 5-10 °С та реакцію перемішували протягом 30 хвилин. Додавали триацетоксиборгідрид натрію (56,78 г) та крижану оцтову кислоту (5,7 мл) та реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури (22-23 °С) та перемішували протягом 10-12 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ТШХ та ВЕРХ та після завершення додавали насичений розчин бікарбонату (400 мл, 7 об) та перемішували при 20-25 °С протягом 15-20 хвилин. Органічні шари розділяли та сушили над сульфатом натрію, фільтрували, органічний шар дистильовали під тиском

при 37-40 °С з отриманням трет-бутил (1R,3r,5S)-3-(4- ((бензилокси)карбоніл)піперидин-1-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-8-карбоксилат.

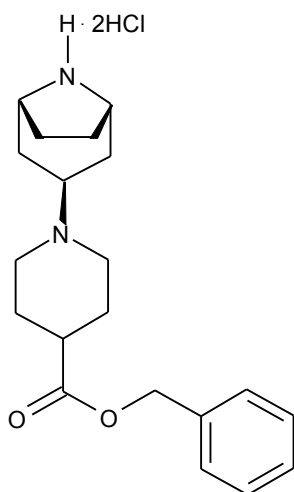
Вага неочищеного продукту: - 115 г, Характер неочищеного продукту: - Густа рідина, Колір:- світло-бордовий

Очищення з використанням утворення солі щавлевої кислоти:

В чисту та суху 500 мл 4-горлу RB колбу з термометром та холодильником завантажували неочищений продукт (25 г) та ацетон (150 мл, 6 об) та охолоджували до 5-10 °С. Додавали щавлеву кислоту (10 г, 2,0 екв.) та реакційну масу нагрівали до кт з перемішуванням протягом 2 год. Реакційну масу дистильовали при 40 °С з отриманням неочищеної маси:- 35 г, потім завантажували 10 об. MTBE при 25-30 °С та перемішували протягом 30 хвилин. Реакційну суміш фільтрували, шар промивали MTBE (1,0 об) з отриманням вологої твердої речовини (оксалатної солі):- 26 г. Тверду речовину суспендували в насиченому розчині бікарбонату (30 об, 780 мл) та етилацетату (25 об, 650 мл) та перемішували протягом 15 хвилин. Органічні шари розділяли, сушили над Na₂SO₄, дистильовали над вакуумом при 37-40 °С з отриманням продукту. Вага продукту:- 8,0 г.

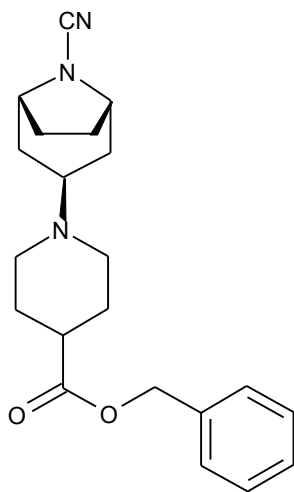
Необов'язково цей матеріал може бути додатково очищений за допомогою колонкової хроматографії з використанням гексан:етилацетат, адсорбцією на нейтральному оксиді алюмінію (Джерело-SDFCL). Градієнт колонки: 5→10→12 % етилацетат:гексан.

Стадія-05: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилат гідрохлориду (7):



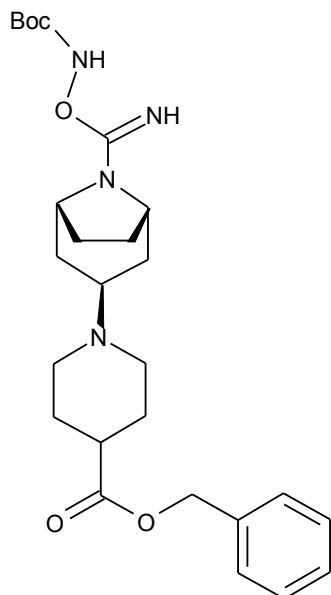
В чисту та суху 5,0 літрову 4-горлу RB колбу, оснащену холодильником та гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували, циклопентилметиловий ефір (452 мл, 4,0 об) та Проміжну сполуку 6 (113 г, 1,0 екв.) та реакційну суміш охолоджували до 0-5 °С. 3М HCl в циклопентилметиловому ефірі (904 мл, 8,0 об) дуже повільно додавали при 0-5 °С та реакційну суміш повільно нагрівали до 22-25 °С та перемішували протягом 16 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ВЕРХ до завершення. Реакційну суміш фільтрували над атмосферою N₂, шар промивали MTBE (2,0 об), вивантажували вологий осад продукту над N₂, та сушили при зниженому тиску при 45-47 °С з отриманням неочищеного продукту, який безпосередньо використовували на наступній стадії без додаткового очищення.

Стадія-06: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-ціано-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (8):



В чисту та суху 5,0 літрову 4-горлу RB колбу, оснащену холодильником та гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували дихлорметан (1860 мл, 10 об), Проміжну сполуку 7 (186,0 г, 1,0 екв.) та триетиламін (355 мл, 5,0 екв.) при 22-25 °С протягом 10-15 хвилин та реакційну суміш додатково перемішували протягом 30-45 хвилин. Реакційну суміш охолоджували до 0-5 °С та додавали ціан бромід (92 г, 1,7 екв.) в ДХМ (372 мл, 2,0 об) при 0-5 °С та реакційну суміш повільно нагрівали до 22-25 °С та перемішували при 22-25 °С протягом 3-4 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ВЕРХ до завершення. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (1860 мл, 10 об), залужнювали із застосуванням насиченого розчину NaHCO_3 (930 мл, 5 об). Органічні шари розділяли та водний шар екстрагували ДХМ (1860 мл, 10 об). Об'єднані органічні шари сушили над Na_2SO_4 та випарювали при зниженому тиску з отриманням 190 г неочищеної сполуки. Неочищену сполуку очищували за допомогою колонкової хроматографії з нейтральним оксидом алюмінію застосовуючи 15 % етилацетат у гексані. Очищені фракції збирали та концентрували при зниженому тиску з отриманням 75 г очищеної сполуки. (Вихід: 46 %).

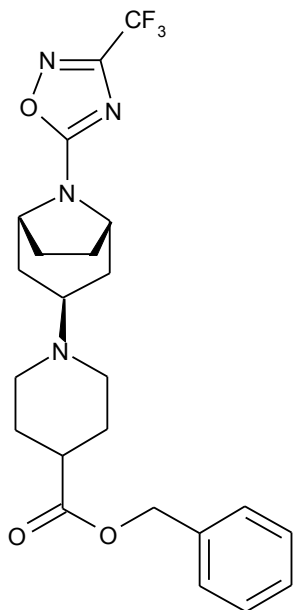
Стадія-07: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-((((третбутоксикарбоніл)аміно)окси)(іміно)метил)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (10):



В чисту та суху 3,0 літрову 4-горлу RB колбу з холодильником та гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували 2-метил ТГФ (800 мл, 10 об.) та Проміжну сполуку 8 (80 г, 1,0 екв.) та реакційну суміш охолоджували до 0-5 °С. Додавали розчин ZnCl_2 (2,2 екв., 1,9 М розчину у 2-метил-ТГФ) та реакційну суміш перемішували при 0 °С протягом 30 хвилин, потім додавали N-Бос-гідроксил амін (Проміжна сполука 9) (1,2 екв.) та реакційну суміш повільно нагрівали до 23-25 °С та продовжували перемішувати протягом 16 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ТШХ та ВЕРХ до повного завершення. Реакційну суміш гасили водою (800 мл, 10,0 об) та потім продукт

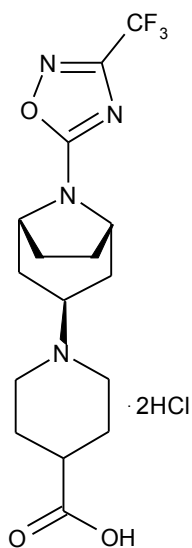
екстрагували етилацетатом (2 × 800 мл). Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄ та випарювали при зниженому тиску з отриманням 110 г (кількісний вихід) неочищеної сполуки. Зазначений продукт безпосередньо використовували на наступній стадії без будь-якого додаткового очищення.

Стадія-08: Синтез бензил 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксилату (11):



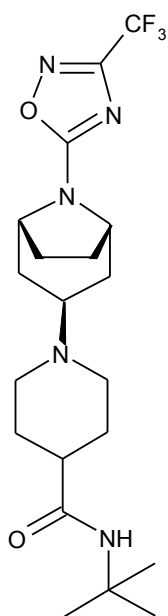
В чисту та суху 3,0 літрову 4-горлу RB колбу з холодильником та гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували ДХМ (1150 мл, 10,0 об) та Проміжну сполуку 10 (115,0 г, 1,0 екв.) та реакційну суміш охолоджували до 0-5 °С. Суміш трифтороцтової кислоти (271 мл, 15,0 екв.) та TFAA (164 мл, 5,0 екв.) додавали по краплях 3 окремими партіями при 0-5 °С з інтервалом 3-4 год. в атмосфері азоту. Реакційну суміш перемішували з RT протягом 12 год., потім протягом додаткових 16 год. до завершення перебігу реакції (контроль за допомогою ТШХ та ВЕРХ). Після завершення реакції, реакційну суміш охолоджували до 0 °С та доводили рН (7-8) застосовуючи насичений водний розчин NaHCO₃ та реакційну суміш перемішували протягом 15 хв. Шари розділяли та водний шар екстрагували ДХМ (2 × 100 мл). Об'єднані органічні шари сушили над Na₂SO₄ та випарювали при зниженому тиску з отриманням 145 г неочищеної сполуки, яку очищували за допомогою колонкової хроматографії із застосуванням нейтрального оксиду алюмінію, застосовуючи гексан та етилацетат як елюент з отриманням 49 г очищеного продукту.

Стадія-09: Синтез 1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбонової кислоти (12):



В чисту та суху 5,0 літрову 4-горлу RB колбу оснащену холодильником та гільзою для термометра в атмосфері азоту завантажували ТГФ (2250 мл) додавали демінералізовану воду (450 мл) та Проміжну сполуку 11 (225 г) при кімнатній температурі (22-25 °С). Моногідрат гідроксиду літію (30,5 г, 2,0 екв.) додавали при кімнатній температурі (22-25 °С) та реакційну суміш перемішували при 60 °С протягом 4 год. Хід реакції контролювали за допомогою ТШХ та ВЕРХ та після завершення реакції, реакційну суміш охолоджували до 0-5 °С. рН доводили до 4-5 шляхом застосування розчину 1N HCl та суміш перемішували протягом 15 хв. Розчинник випарювали та неочищений продукт після додавання MTBE (10,0 об) до неочищеної твердої сполуки при кт, та перемішували протягом 2 год. при кт. Тверду речовину фільтрували, промивали MTBE (1,0 об). Тверду сполуку сушили над вакуумом з отриманням 245 г (*фактична сполука становить 216 г Проміжної сполуки 12, а решту 29,0 г становить сіль хлориду літію) продукту у вигляді білої твердої речовини.

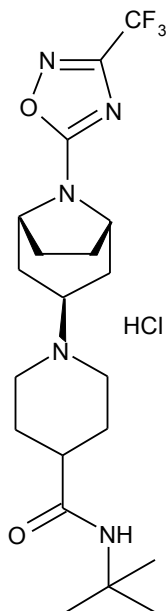
Стадія-10: Синтез N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду



Процедура:

В чисту та суху 3-горлу круглодонну колбу об'ємом 1 л, з механічною мішалкою та входом для азоту, завантажували ацетонітрил (20,0 об) та Проміжну сполуку 12 (1,0 екв.) однією порцією та реакційну масу перемішували протягом 10 хв. Реакційну суміш охолоджували до 0 °С та потім додавали HATU з подальшим повільним додаванням трет-бутиламіну (1,5 екв.), DIPEA (4,0 об) протягом 15 хв. Після завершення додавання реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 год. Перебіг реакції контролювали за допомогою ТШХ та надлишок ацетонітрилу дистильовали при зниженому тиску. Реакцію гасили демінералізованою водою (40.0 V) та твердий матеріал випадав у осад та перемішували протягом 60 хв. Тверду речовину промивали з додаванням демінералізованої води (5,0 об) та сушили шляхом відсмоктування. Тверду сполуку сушили над вакуумом з отриманням 56,0 г продукту у вигляді білої твердої речовини.

Стадія-11: Синтез гідрохлоридної солі N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду



В колбу завантажували вільну основу Проміжної сполуки 14 (56,0 г, 1,0 екв.) в ацетоні (10,0 об) та реакційну суміш перемішували протягом 10 хв. Потім реакційну суміш залишали охолоджувати до 0 °С та по краплях додавали розчин 15 % HCl в IPA при 0 °С. Потім реакційній суміші давали нагрітися до 25-30 °С та перемішували протягом 2 год. при 25-30 °С. Розчинник повністю випарювали при зниженому тиску та спільно дистильовали з 10,0 об н-гептаном двічі. Тверду сполуку сушили над вакуумом з отриманням 59,0 г продукту у вигляді білої твердої речовини.

Стадія-12: Перекристалізація: Синтез моногідрату N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксаміду моногідрохлориду (Приклад 1-2)

В колбу завантажували Проміжну сполуку 14 з сіллю HCl (108,0 г) в IPA (10,0 об) та реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 1 год., проте при температурі кипіння зі зворотним холодильником тверда речовина не повністю розчинялась. MeOH (1,0 об) додавали з безперервним нагріванням протягом 1 год. та отримували розчин. Гарячий розчин пропускали через фільтрувальний папір для видалення нерозчинних часток. Розчинник (приблизно 8 об'ємів з 11 об'ємів розчинника) видаляли при зниженому тиску. Потім приблизно 3 об'ємам розчинника, що залишилися, давали охолонути до 0 °С та перемішували протягом 1 год. при тій самій температурі. Потім тверду речовину фільтрували та промивали мінімальною кількістю охолодженого IPA та сушили шляхом відсмоктування. Тверду сполуку сушили над вакуумом з отриманням 93,5 г продукту у вигляді білої твердої речовини.

Для визначення складу партії було проведено аналіз. Отримано висновок, що зазначена партія являє собою моногідрохлорид моногідрату.

Формула моногідрохлориду моногідрату: $C_{20}H_{33}N_5O_3ClF_3$ Молекулярна маса: 483,96

N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадіазол-5-іл)-8-азабіцикло[3.2.1]октан-3-іл)піперидин-4-карбоксамід моногідрохлорид моногідрат

	% теоретичного	% виміряного	Виміряне проти теоретичного
Вуглець	49,64 %	49,56 %	99,85 %
Водень	6,87 %	6,89 %	100,25 %
Азот	14,47 %	14,45 %	99,86 %
Хлор	7,33 %	7,28 %	99,38 %
Вода	3,72 %	4,33 %	116,40 %

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Приклад А: аналізи на phospho-ERK1/2

Функціональні аналізи проводили із застосуванням аналізу Alphascreen Surefire phospho-ERK1/2 (Crouch & Osmond, Comb. Chem. High Throughput Screen, 2008). Фосфорилування ERK1/2 є наслідком активації рецепторів, зв'язаних з білком як Gq/11, так і Gi/o, що робить його дуже прийнятним для оцінки рецепторів M1, M3 (зв'язаних з Gq/11) та M2, M4 (зв'язаних з Gi/o), а не використовувати різні формати аналізу для різних підтипів рецепторів. Клітини CHO, що стабільно експресують людські

мускаринові рецептори M1, M2, M3 або M4, висівали (25 тис./лунка) на 96-лункові планшети для культури тканин в MEM-альфа + 10 % діалізованого FBS. Після адгезії, клітини витримували у сироватці протягом ночі. Стимуляцію агоністами проводили шляхом додавання 5 мкл агоніста до клітин протягом 5 хв (37 °C). Середовище видаляли та додавали 50 мкл буфера для лізису. Через 15 хв, 4 мкл зразка переносили у 384-лунковий планшет та додавали 7 мкл детектуючої суміші. Планшети інкубували протягом 2 годин при обережному перемішуванні в темряві, а потім зчитували дані на планшетному рідері PHERAstar. На підставі даних для кожного підтипу рецепторів були розраховані значення pEC_{50} і E_{max} , результати яких наведені в табл. 1. Показники pEC_{50} та E_{max} були розраховані виходячи з отриманих даних для кожного підтипу рецептора та результати є наведеними в Таблиці 1 нижче.

Таблиця 1

Мускаринова активність				
Приклад №	pEC_{50} M1 (% E_{max} порівн. ACh)	pEC_{50} M2 (% E_{max} порівн. ACh)	pEC_{50} M3 (% E_{max} порівн. ACh)	pEC_{50} M4 (% E_{max} порівн. ACh)
Ацетилхолін (ACh)	8,05 (96)	7,73 (106)	8,27 (102)	8,00 (108)
1-1	7,17 (92)	< 4,70 (7)	< 4,70 (3)	6,92 (32)

Приклад В: CLint (in vitro гепатоцити) (Приклад 1)

Аналізи стабільності гепатоцитів проводили з використанням об'єднаних кріоконсервованих гепатоцитів (Bioreclamation). Досліджувані сполуки приготовлені в ДМСО, інкубували при початковій концентрації 1мкМ (кінцева концентрація ДМСО 0,25 %, n=2) з гепатоцитами при щільності клітин 1,0 мільйон клітин/мл при 37 °C. Аліквоти відбирали через 0,5, 5, 10, 15, 30, 60 та 120 хвилин для припинення реакції та екстракції сполуки ацетонітрилом, що містить аналітичний внутрішній стандарт (0,5 мкм карбамазепіну). Зразки центрифугували, та фракції супернатанту аналізували на вихідну сполуку за допомогою мас-спектрометрії (PX-МС/МС). Кількість сполуки, що залишилася (виражена у %), визначали за відповіддю МС у кожному зразку відносно відповіді у зразках з T=0 (нормалізовані для внутрішнього стандарту). Для визначення періоду напіввиведення для зникнення сполуки за допомогою співвідношення використовували Ln графіки % залишку:

Період напіввиведення (хв)= $-0,693/\lambda$ (де λ являє собою нахил кривої залежності Ln % від часу).

Внутрішній кліренс in vitro (CLint) у вигляді мкл/хв/мільйон клітин розраховували за формулою:

$CLint$ (мкл/хв/мільйон клітин) = $(0,693/\text{період напіввиведення (хв)}) \times (1000/\text{мільйон клітин на мл інкубації})$

Миша = 7 мкл/хв/мільйон Щур 8 мкл/хв/мільйон

Собака 8 мкл/хв/мільйон

Мавпа <5 мкл/хв/мільйон

Людина <5 мкл/хв/мільйон

Приклад С: MDCK permeability/efflux (Example 1)

Клітини MDR1-MDCK (Solvo Biotechnology) висівали на 24-лункові планшети Transwell з розрахунку $2,35 \times 10^5$ клітин на лунку та використовували у вигляді моношару після 3- денного культивування при 37 °C в 5 % CO_2 . Для визначення типу клітин, досліджувані та контрольні сполуки (пропранолол, вінбластин) додавали (1 мкм, кінцева концентрація ДМСО 0,1 %, n=2) в донорські відсіки планшету Transwell в буфері для аналізу (збалансований сольовий розчин Хенкса, доповнений 25 мм HEPES, відрегульований до pH 7,4) для вимірювання апікально-базолатерального (A>B) та базолатерально-апикального (B>A) співвідношення. Інкубування проводили при 37 °C, зразки вилучали з донорської та акцепторної камер при T=0 та через 1 год. та аналізували за допомогою мас-спектрометрії (ЖХ-МС/МС), включаючи аналітичний внутрішній стандарт.

Значення уявної проникності (Papp) визначали за співвідношенням:

$Papp = (\text{Сполука Акцептор } T=end / (\text{Сполука Донор} \times V \text{ донора}) / \text{Час інкубування}) \times V \text{ донорської ділянки} \times 60 \times 10^{-6} \text{ см/с}$

Де V – об'єм кожного відсіку Transwell (апикальний 125 мкл, базолатеральний 600 мкл) та концентрації являють собою відносні МС-відповіді для сполуки (нормовані на внутрішній стандарт) в донорській камері до інкубування та акцепторній камері в кінці інкубування. Площа = площа клітин, яку піддавали впливу для перенесення препарату (0,33 см²). Коефіцієнт ефлюкса ($Papp \text{ B>A} / Papp \text{ A>B}$) розраховували за середнім значенням Papp в кожному напрямку. Клітинна лінія MDR1-MDCK була сконструйована для надекспресії ефлюксного транспортера MDR1 (P-глікопротеїну), та виявлення гарної проникності B>A, але погана проникність A>B свідчить про те, що сполука є субстратом для даного транспортера. Для оцінки життєздатності клітинного шару, в апікальний буфер у всіх лунках

додавали люциферний жовтий (LY). Оскільки LY не може вільно проникати через ліпофільні бар'єри, високий ступінь транспорту LY свідчить про порушення цілісності клітинного шару, та лунки з Rapp LY > 10 × 10⁻⁶ см/с відбраковувались. Слід зазначити, що порушення цілісності в одній лунці не впливає на достовірність інших лунок планшета. Вилучення сполук з лунок визначали за MC-відповідями (нормованих на внутрішній стандарт) в донорській та акцепторній камерах в кінці інкубування порівняно з відповіддю в донорській камері до інкубування. Відновлення <50 % свідчить про проблеми з розчинністю, стабільністю або зв'язуванням сполуки в аналізі, що може знизити надійність результату.

A-B=66 × 10⁻⁶ см/с

B-A=77 × 10⁻⁶ см/с

B-A/A-B коефіцієнт ефлюкса = 1,2

Приклад D: Дані про розчинність (Приклад 1)

Розчинність у воді (Термодинамічна) – спосіб PXMC/MC

Для досліджуваного зразка готували 10 мм вихідного розчину (в ДМСО). З 10 мм вихідного розчину отримували 1 мкм робочого розчину шляхом розбавлення досліджуваного зразка в розчині рухомої фази (як правило метанол: 2 мм ацетат амонію, що містить прийнятний внутрішній (BC) - карбамазепін/будь-який інший прийнятний BC). Далі, робочий розчин послідовно розбавляли розчином рухомої фази до 5-6 точок лінійності для отримання стандартного розчину для побудови калібрувальної кривої. Площу кожного стандартного зразка аналізували в синглеті за допомогою PXMC/MC. Нормовані значення площі наносяться на графік в залежності від концентрації для отримання рівняння калібрування для визначення невідомого зразка. Для визначення термодинамічної (TD) розчинності досліджуваної сполуки у воді, 1 мг сполуки (порошкоподібної форми) додавали до 1 мл кожного буфера та біорелевантного середовища, зазначених в таблиці нижче, для досягнення теоретичної концентрації, еквівалентної 1 мг/мл. Досліджувану сполуку диспергували в буферному розчині за допомогою вихрового змішувача.

Sr №	Назва реагенту
1	SGF pH – 1,2
2	«порожній» FaSSIF (водний буфер) pH – 6,5
3	FaSSIF pH – 6,5

Отриманий розчин витримували на RotoSpin (шейкері) при 50 об/хв протягом 4 год. для визначення розчинності TD при кімнатній температурі (25 °C). по завершенню інкубаційного періоду, розчин фільтрували за допомогою інжекторних фільтрів з ПВДФ 0,45 мікрон для видалення нерозчинних фракцій сполуки. Фільтрат розбавляли рухомою фазою та потім визначали AUC для розбавлених зразків за допомогою PXMC/MC. За AUC зразка розраховували відповідну концентрацію, застосовуючи 5-6-точкову криву лінійності/калібрування.

Всі числа наведені як мкм.

«порожній» FaSSIF pH 6,5 (n=4)	FaSSIF pH 6,5 (n=4)	SGF pH 1,2 (n=4)
1743	2008	2079
1941	2448	1988
1937	1713	1702
2022	2104	2039

Приклад E: H_uREL (Приклад 1)

Після прибуття 96-лункових планшетів для печінкової співкультури H_uREL human Pool™ середовище замінювали та клітинам давали акліматизуватися при 37 °C протягом ~20 год. Для початку реакції в 96-лункову систему спільної культури H_uREL® додавали інкубаційне середовище H_uREL® (без сироватки) та досліджувану сполуку (кінцева концентрація субстрату 1 мкм; кінцева концентрація ДМСО 0,1 %) (кінцева кількість клітин 30 000 на лунку). Кінцевий об'єм інкубування становив 80 мкл на одну часову точку. До кожного аналізу включали дві контрольних сполуки. Всі інкубування проводили окремо для кожної досліджуваної сполуки.

Кожну сполуку інкубували протягом 0, 2, 6, 24, 48 та 72 год. (0, 120, 360, 1440, 2880 та 4320 хв). Реакції зупиняли шляхом перенесення 60 мкл інкубату в 180 мкл ацетонітрилу, що містить внутрішній стандарт, у відповідних часових точках. Для осаджування будь-якого залишку протеїну, планшети для термінації центрифугували при 3000 об/хв при 4 °C протягом 20 хв.

Кількісний аналіз

Після осаджування протеїну супернатанти зразків об'єднували в касети, що містять до 4 сполук, та аналізували з використанням стандартних умов Cyprotex PX-MC/MC.

Аналіз даних

За допомогою графіка співвідношення площі піку Іп (площа піку сполуки/площа піку внутрішнього стандарту) до часу визначали градієнт лінії. Потім, період напіввиведення ($t_{1/2}$) та внутрішній кліренс (CL_{int}) були розраховані за допомогою наведених нижче рівнянь:

Константа швидкості елімінації (k) = (- градієнт)

$$\text{Період напіввиведення}(t(t_{1/2}))(xv) = \frac{0,693}{k}$$

$$\text{Внутрішній кліренс}(CL_{int})(\text{мкл/хв/мільйонклітин}) = \frac{V \times 0,693}{t_{1/2}}$$

де V = об'єм інкубування (мкл)/кількість клітин)

$CL_{int} < 0,143$ мкл/хв/мільйон

Приклад F: Прогнозована цільова взаємодія для отримання ефективної дози для людини (Приклад

1)
Очікувана потреба у спостереженні ефективності агоніста M_1 у людини становить 6 годин незв'язаного впливу на головний мозок порівняно з EC_{50} рекомбінантного M_1 . Прогнозується, що в прикладі 1 досягається вплив незв'язаної речовини на головний мозок, необхідний для ефективності агоніста M_1 при дозі приблизно 22 мг та має прогнозований період напіввиведення з організму людини 15 год. (Фігура 1).

Параметри, використані для прогнозування зайнятості рецепторів (цільова взаємодія).

$MW=429,48$

M_1 $pEC_{50}=7,17$

$F_u=0,682$

$K_{puu}=1$

Період напіввиведення (прогнозований) = 15 год.

$F=0,61$

$Cl=4,4$ мл/хв/кг

$V=5,9$ мл/хв/кг

$K_a=1$

Визначення:

f_u – частка сполуки, незв'язаної речовини в плазмі крові або гомогенаті тканини головного мозку

F – біодоступність; відсоток введеної дози, що досягає системного кровообігу (плазма) K_p , u_i – співвідношення концентрації незв'язаної речовини в головному мозку до концентрації незв'язаної речовини у плазмі. Кількісно оцінює чистий потік препарату через гематоенцефалічний бар'єр, включаючи кількісну роль транспортерів, без урахування неспецифічного зв'язування у плазмі та тканинах головного мозку. Gupta et al, DMD, 2006; Hammarlund-Udenaes et al, PharmRes, 2008

Приклад G: Послаблення субхронічного РСР-індукованого дефіциту в завданні навчання зворотному операнту у самок щурів Lister Hooded (Приклад 1)

МЕТА ТА РЕЗУЛЬТАТИ

Дослідити здатність препарату за Прикладом 1 (1, 3, 10 та 30 мг/кг, р.о., 1 година до початку лікування, ptt) послаблювати порушення виконання когнітивного завдання, спричинене субхронічним лікуванням фенциклідіном (scPCP) у самок щурів Lister Hooded.

В групі scPCP спостерігалось значне ($P<0,01$) зниження відсотка правильних відповідей у фазі зворотного виконання завдання порівняно з носієм (Фігура 2). Лікування препаратом за

Прикладом 1 у незначних та двох середніх дозах (1, 3 та 10 мг/кг) значно ($P<0,05$, $P<0,05$ та $P<0,01$, відповідно) збільшувало відсоток правильних відповідей порівняно з групою scPCP у фазі зворотній виконання (Фігура 2).

МАТЕРІАЛИ ТА СПОСОБИ

В дослідженні використовували самок щурів породи Lister Hooded. Середня маса щурів на момент дослідження становила $294 \text{ г} \pm 29 \text{ г}$. Щури містилися в групах по 3-5 особин у стандартних лабораторних умовах при 12-годинному циклі світло-темрява (світло включалося в 07:00 год.) та обмеженні їжі до 90 % від маси тіла при вільному годуванні (12 г корму на щура на добу). Дослідження проводилися у світловій фазі. Щури були випадково розподілені на дві групи та отримували носій, $n=8$ (0,9 % фізіологічний розчин, внутрішньовенно) або РСР, $n=48$ (2 мг/кг, внутрішньовенно двічі на день протягом 7 днів). В день дослідження, щури були випадковим чином розподілені на сім груп ($n=6-8$ на групу) для інтенсивного лікування препаратом за Прикладом 1 (1, 3, 10 та 30 мг/кг, перорально, 1 година, ptt) або носієм. Препарат за Прикладом 1 розчиняли в 1 % метилцелюлозі та перорально вводили (р.о.) в об'ємі 5 мл/кг за 1 годину до початку дослідження. Дослідження проводилося відповідно до Закону про наукові процедури з тваринами (Великобританія, 1986 р.) та схвалено AWERB (Animal Welfare and Ethical Review Body) Манчестерського університету.

Процедура Дослідження

Після звикання до оперантних камер, щурів навчали реагувати на їжу за розкладом підкріплень FR1 (фіксоване співвідношення 1) з обома активними важелями. Коли реакція стабілізувалася, щурів

навчали натискати або лівий, або правий важіль для видачі їжі, причому активний важіль змінювався день у день. Кожен сеанс тривав 20 хвилин та на кожному важелі фіксувалася кількість натискань. Потім, щурів навчали реагувати на їжу в залежності від положення візуальної підказки (світлодіоду, що світиться). Половину щурів навчали натискати на важіль під світлодіодом, що світиться, для отримання харчової винагороди, іншу половину навчали протилежній непередбачуваній обставині (натискати на важіль під світлодіодом, що не світиться). Сеанс дослідження закінчувався після 128 натискань на важіль, що займало приблизно 30 хвилин. Потім, щурів навчали доти, доки вони знову не досягали критерію за протилежною непередбачуваною обставиною.

За день до кожного сеансу зворотного навчання, проводився повний 30-хвилинний сеанс оперантного навчання (як описано вище) для забезпечення стабільної відповіді. Для виконання завдання зворотного навчання тварини спочатку піддавалися 5-хвилинному періоду, протягом якого умовний сигнал (положення сигналу щодо активного важеля) був таким самим, як і під час сеансу оперантного навчання. Протягом цього періоду, реєструвалися відповіді на правильні та неправильні натискання на важелі. Ця частина сеансу називається початковою фазою. У наступний 5-хвилинний період, умови змінювали на протилежні. Знову фіксувалися відповіді на правильні та неправильні важелі. Цей другий період називається зворотною фазою. На цій стадії, навчання припинялося, і щури отримували PCP (2 мг/кг внутрішньовенно або носій 0,9 % фізіологічний розчин внутрішньовенно) протягом 7 днів з наступним як мінімум 7-денним періодом вимивання. Щури були рандомізовані таким чином, що всі щури в одній клітці отримували різні препарати для лікування.

Дані представлені у вигляді відсотка правильних відповідей ($\pm$ S.E.M), причому значення для початкової та зворотної фаз є представленими для різних груп лікування препаратами (Фігура 2). Дані про відсоток правильних відповідей використовувалися для визначення значущості впливу препарату на точність відповіді (наприклад, це відображає когнітивну дисфункцію). Статистична значущість приймалася при $P < 0,05$ та визначалася за допомогою одностороннього ANOVA для виявлення основного ефекту лікування препаратом у початковій та зворотній фазах. Загальна кількість натискань на важіль, зареєстрована в початковій та зворотній фазах, істотно не відрізнялася після лікування або носієм або речовиною за Прикладом 1 (Таблиця 2), що підтверджує відсутність неспецифічного впливу на загальну реакцію зазначеного дослідження.

Таблиця 2

Вплив інтенсивного лікування речовиною за Прикладом 1 (1,0, 3,0, 10,0 та 30,0 мг/кг, р.о.) щурів, оброблених scPCP (2 мг/кг, внутрішньовенно двічі на день протягом семи днів, з наступним щонайменше 7-денним періодом вимивання), на загальну продуктивність у завданні зворотного навчання. Дані представлені у вигляді середньої загальної кількості натискань на важіль у початковій та утримуючій фазах в завданні зворотного навчання $\pm$ S.E.M (n=6-9)

Лікування препаратом	Початкова фаза	Зворотна фаза
Scфізіологічний розчин + носій	27,0 $\pm$ 0,2	27,3 $\pm$ 0,2
scPCP + носій	26,5 $\pm$ 0,2	26,0 $\pm$ 0,5
scPCP + Приклад 1 1,0 мг/кг	27,4 $\pm$ 0,2	27,5 $\pm$ 0,3
scPCP + Приклад 1 3,0 мг/кг	27,5 $\pm$ 0,2	26,8 $\pm$ 0,2
scPCP + Приклад 1 10,0 мг/кг	27,0 $\pm$ 0,3	26,6 $\pm$ 0,5
scPCP + Приклад 1 30,0 мг/кг	26,4 $\pm$ 0,6	26,6 $\pm$ 0,3

Короткий опис креслень

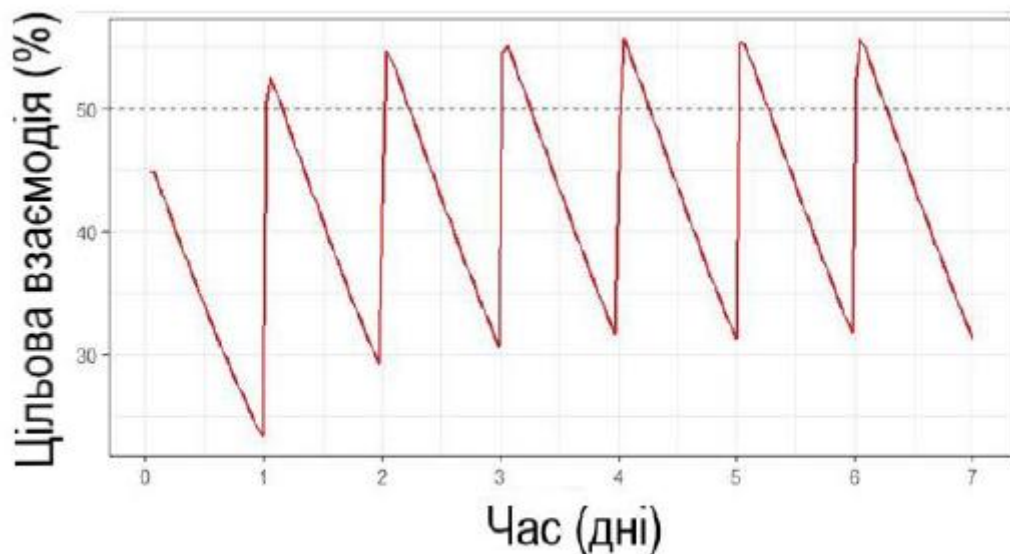
Фігура 1: На фігурі 1 показано прогнозована цільова взаємодія для ефективної дози за Прикладом 1 на основі алометричного масштабування для видів мишей, щурів, собак та мавп після перорального введення. Дані представлені як функція розрахованого % цільової взаємодії рецептора M1, де 50 % еквіваленті впливу незв'язаної речовини, що дорівнює EC₅₀ рекомбінантного рецептора людини (86 нм або 28 нг/мл). На підставі вимірюного еквівалентного профілю розподілу незв'язаної речовини в плазмі крові: головному мозку (K_{piu}=1) наведений вплив є взаємодією або в плазмі крові або у відділі головного мозку.

Фігура 2: На фігурі 2 показано вплив інтенсивного лікування за Прикладом 1 (1,0, 3,0, 10,0 та 30,0 мг/кг, р.о.) щурів, оброблених scPCP (2 мг/кг, внутрішньовенно двічі на день протягом семи днів, з наступним щонайменше 7-денним періодом вимивання), на виконання завдання зворотного навчання. Дані представлені як середнє значення % правильних відповідей $\pm$ S.E.M. (n=6-9). Пунктирна лінія розділяє початкову фазу (ліворуч) та зворотну фазу завдання (праворуч). Дані аналізували за допомогою одностороннього ANOVA з наступним дослідженням LSD. *** $P < 0,001$; значне зниження % правильних відповідей у зворотній фазі завдання порівняно з групою scSaline + Носій. # $P < 0,05$; ## $P = 0,01$; ### $P < 0,001$; значне збільшення % правильних відповідей у зворотній фазі завдання

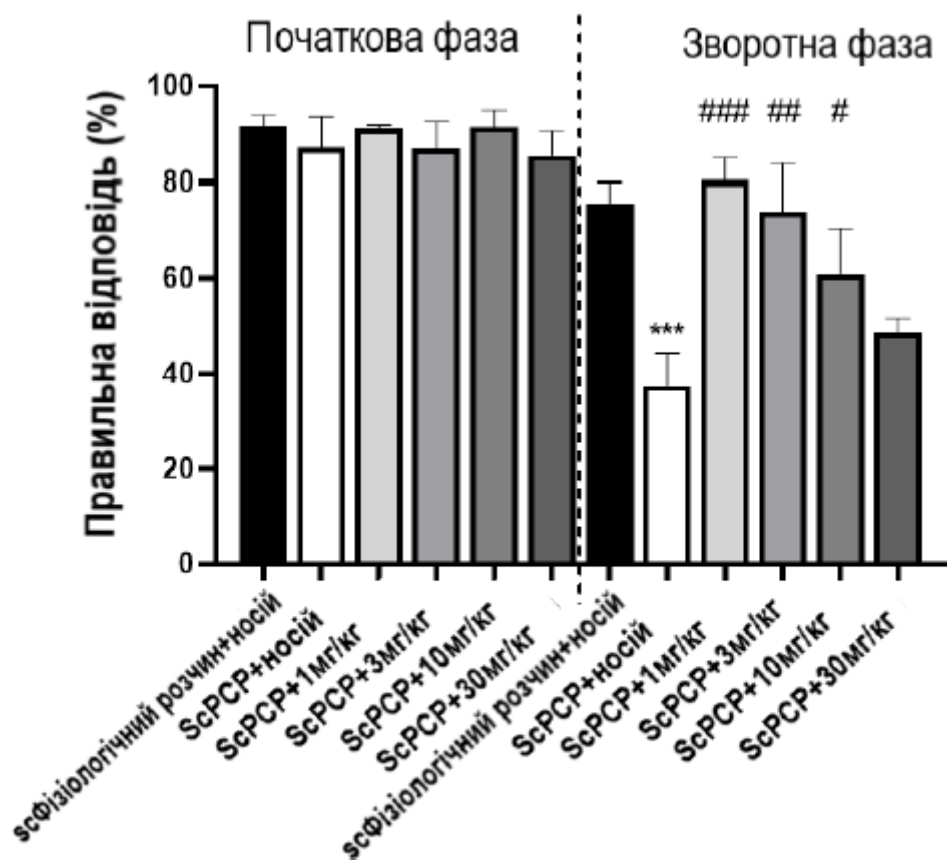
порівняно із групою scPCP + Носій.

Еквіваленти

Наведені вище приклади представлені з метою ілюстрації винаходу та не повинні розглядатися як такі, що обмежують обсяг винаходу. Цілком очевидно, що в конкретні варіанти здійснення винаходу, описані вище та проілюстровані в прикладах, можуть бути внесені численні модифікації та зміни, що не відступають від принципів, що лежать в основі винаходу. Всі такі модифікації та зміни мають бути включені до цієї заявки.



Фіг. 1



Фіг. 2