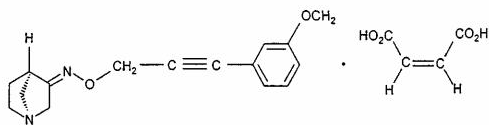


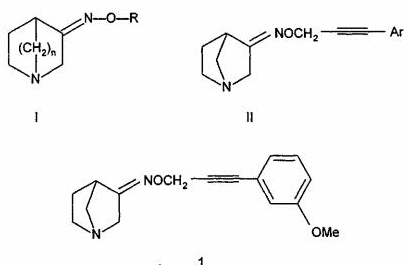
Даний винахід стосується кристалічної солі (R)-(Z)-1-азабікло[2.2.1]гептан-3-он, O-[3-(3-метоксифеніл)-2-пропініл]оксиму та малеїнової кислоти (у співвідношенні 1:1) (сполука), яка є фармацевтичною формою, що за властивостями перевершує вільну основу чи будь-яку іншу фармацевтичну прийнятні сольові форми цієї сполуки.

Ця сіль має таку хімічну структуру:

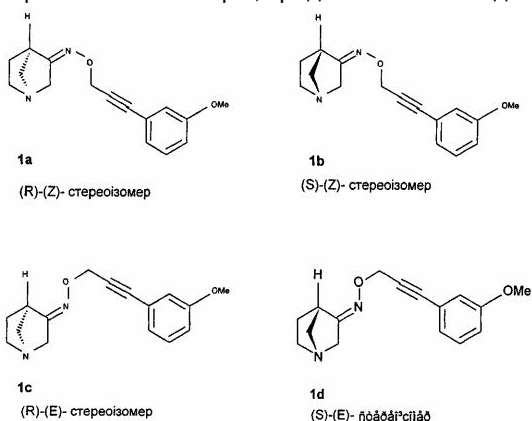


Сполуки наведеної нижче Формули I, а більш конкретно, підгрупа сполук, що мають наведену нижче формулу II, описані у патенті США № 5306718 та у його частковому продовженні патенті США № 5346911, як мускаринові агоністи, які є корисними агентами при лікуванні болю та погіршення пізнавальної здатності, пов'язаний з холінергічними функціональними порушеннями головного мозку, такими як хвороба Альцгеймера.

Сполуки Формули II, де Ar позначає фенільну групу, заміщену однією чи двома метоксигрупами, мають чи не найбільш цікаві характеристики фармакологічної активності *in vitro* (Jaen та ін., Life Sciences, 1995, 56: 845 - 852 (Таблиця I вказаної роботи)). Одна із цих сполук, зокрема, (1), що містить (3-метоксифеніл)пропаргіл оксим у боковому ланцюзі, була ідентифікована у цій та більш ранніх публікаціях (Davis R., та ін., Prog. Brain Res., 1993, 98: 439 - 445) як така, що має дуже сприятливі загальні характеристики фармакологічної активності, про що свідчать її висока спорідненість до мускаринових рецепторів кори мозочку, здатність витіснити радіомічений ліганд агоніста (цис-метилдіоксолан) з мускаринових рецепторів у концентраціях, у 246 разів нижче за такі, що потрібні для витіснення радіоліганду антагоніста (хінуклідинил бензилат), та її здатність селективно стимулювати m1-підтип мускаринових рецепторів без значного стимулювання інших не-m1 мускаринових рецепторів.



Сполука, що має наведену вище хімічну структуру 1, може існувати у формі будь-якого із чотирьох стереохімічних ізомерів, представлених наведеними нижче формулами 1a, 1b, 1c та 1d.



Ізомери 1a та 1b є енантіомерами (тобто дзеркальними відображеннями один одного), і теж саме стосується ізомерів 1c та 1d. Оскільки центр асиметрії цих молекул знаходиться на крайньому атомі вуглецю місточкового зв'язку, який не може епімеризуватись за будь-яких нормальних умов, розділення цих енантіомерних пар (тобто, відокремлення 1a від 1b або відокремлення 1c від 1d) може бути здійснено з використанням методів синтезу чи розділення, описаних у патенті США № 5346911, та є постійним. Це означає, наприклад, що 1a не може перетворитись на його енантіомер 1b, а 1c не може перетворитись на 1d. З іншого боку, 1a та 1c мають одну й ту саму абсолютну стереохімічну формулу у місточкового атома вуглецю, але є геометричними ізомерами один одного відносно оксимового подвійного зв'язку вуглець-азот. Таке ж саме співвідношення існує між 1b та 1d.

Ефективність оксиму 1 як мускаринового агоністу забезпечується переважно ізомером 1a (Jaen, *ibid*, та Таблиця I нижче). Таблиці II та III зазначеної роботи вказують на те, що ізомер 1a (позначений як S-8 у роботі Jaen) проявляє більшу селективність щодо субтипу m1 рецепторів та має більшу активність щодо m1, ніж ізомер 1b (позначений як S-8). Невеличка активність, що її проявляє 1b, може бути спричинена присутністю невеликої кількості 1a у зразках 1b. Порівняння між 1a та сумішшю 1c/1d, наведене нижче у Таблиці I, вказує на те, що 1a є більш сильним та більш ефективним мускариновим агоністом (як це визначено за більшими коефіцієнтами зв'язування хінуклідинил бензилату (QNB) порівняно з цис-метилдіоксоланом (CMD) для 1a). У результаті цих та інших експериментів, 1a було визначено як

оптимальну сполуку (високоєфективний мускариновий агоніст з високою селективністю щодо субтипу m1 мускаринових рецепторів) для створення курсу лікування погіршення пізнавальної здатності, пов'язаного з холінергічними функціональними порушеннями головного мозку, такими як хвороба Альцгеймера.

Таблиця I

Зв'язування мускаринових рецепторів

Сполука	Зв'язування CMD IC ₅₀ (нМ)	Зв'язування QNB IC ₅₀ (нМ)
1a	25	5300
(1c + 1d) ^a	150	14800

^a Для цих аналізів було використано рацемічний (E)-оксим.

Деякі подвійні зв'язки вуглець-азот у оксимах є відносно стабільними, тоді як інші можуть зазнавати повільного перегрупування, звичайно у присутності кислотного каталізатора. Конкретний характер заміщень поряд з оксимною групою звичайно визначає хімічну стабільність оксим у (здатність гідролізуватись на кетонний та гідроксиламіновий компоненти), його стереохімічну цілісність (тенденцію кожного геометричного ізомеру залишатись у E або Z конфігурації), та точне положення термодинамічної рівноваги між обома стереохімічними формами (коли хімічні умови є такими, що рівновага може бути досягнута). Як показано у Таблиці II нижче, Сполука 1a може зазнавати каталізуємої кислотою ізомеризації з утворенням її геометричного ізомеру 1c. Ця рівновага залежить від часу та значення pH. Ми визначили, що термодинамічне рівноважне співвідношення 1a:1c у розчині становить приблизно 85:15.

Таблиця II

Залежність співвідношення площ піків Z:E від pH після інкубування 1a протягом 24 годин при 37°C

pH	Співвідношення площ піків (1a:1c)
0,1N HCl	85:15
pH 1,97	88:12
pH 4,03	99,3:0,7
> 4,03	100:0

Існує багато причин для того, щоб не вважати суміш цих двох ізомерів у співвідношенні 85:15 оптимальною для одержання фармацевтичного препарату: співвідношення ізомерів 85:15 не завжди кількісно точно відтворюється у різних партіях, інтерпретація фармакології, токсичності, клінічної ефективності такої суміші буде значно складніше, ніж при використанні однієї сполуки, і вартість розробки суміші з постійним складом як клінічно корисного лікарського препарату буде також значно вищою; нарешті, фізичні властивості суміші ізомерів у співвідношенні 85:15 є менш оптимальними, ніж властивості чистого 1a з погляду кристалічності, фізичної та хімічної стабільності.

Розробка 1a як фармацевтичного лікарського препарату вимагала ідентифікації сольової форми чи вільної основи 1a, яка б мала оптимальні фізичні та хімічні властивості. Найбільш важливими властивостями є такі: простота та відтворюваність способу одержання, кристалічність, не-гігроскопічність, розчинність у воді, стійкість до видимого та ультрафіолетового світла, низька швидкість розкладу за умов температури та вологості, що використовуються для проведення прискорених випробувань стабільності, низька швидкість ізомеризації 1a на його ізомер 1c за цих умов, та безпечність при довгостроковому введенні людини.

Вільна основа та деякі фармацевтичне прийнятні солі описані у патенті США № 5306718 та його частковому продовженні 5346911. Перелічено такі солі: хлористоводнева, сірчана, фосфорна, оцтова, бензойна, лимоннокисла, малінова, саліцилова, яблучна, фумарова, оксалінова, бурштинова, винна, молочна, глюконова, аскорбінова, малеїнова, аспарагінова, бензолсульфонова, метан- та етансульфонова, оксиметан- та окіетансульфонова. Немає ніяких свідчень чи припущень про те, що малеат є такою сольовою формою вищевказаної сполуки, що має кращі властивості. Очевидно, що чудові властивості малеїнової солі не були відомі чи оцінені до цього часу.

Було виявлено, що на усі солі є однаково корисними, якщо брати до уваги вищенаведений перелік властивостей. Зокрема, ми знайшли несподівано чудові властивості малеїновокислої солі 1a (1:1), які чітко відрізняють цю сіль.

Із великої кількості одержаних та досліджених солей Сполуки 1a цілком несподівано лише малеїнова (1:1) сіль задовольняла усім вимогам винахідників щодо фармацевтичне прийнятних та потрібної солі: простота одержання без ізомеризації, постійна та відтворювана стехіометрія, кристалічність, розчинність у воді, світлостійкість, не-гігроскопічність, нетоксичність, та загальна фізична та хімічна стабільність. Тому даний винахід стосується (1:1) солі Сполуки 1a з малеїновою кислотою, її приготування таким чином, щоб одержувати великі за розміром кристали цієї солі, та способу застосування цієї солі для лікування погіршення пізнавальної здатності та болю. Ця сіль має таку хімічну назву: (R)-(Z)-1-азабіцикло[2.2.1]гептан-3-он, O-[3-(3-метоксифеніл)-2-пропініл]оксим, (Z)-бутендіоева кислота, (1:1 сіль). Більшість кристалічних часток мають розмір, більший за 10 x 10мкм; щонайменше половина часток більші за 10 x 10мкм.

Фігура 1 зображує розділення 1a та 1c методом рідинної хроматографії високого тиску (HPLC).

Фігура 2 є електронною мікрофотографією кристалів 1a, перекристалізованих із етилацетату.

Фігура 3 є електронною мікрофотографією кристалів 1a, одержаних осадженням із діетилового ефіру.

Фігура 4 зображує порівняння біологічної активності оксалатної та малеїнової солей 1a.

Процес вибору солі для використання як мускаринового агоністу за даним винаходом порушує проблеми, які є ключовими для фармацевтичних сполук.

До найбільш важливих властивостей належать: простота та відтворюваність способу одержання,

кристалічність, не-гігроскопічність, розчинність у воді, стійкість до видимого та ультрафіолетового світла, низька швидкість розкладу за умов температури та вологості, що використовуються для проведення прискорених випробувань стабільності, низька швидкість ізомеризації 1а до його ізомеру 1с за цих умов, та безпечність при довгостроковому введенні людині.

Було перевірено солеутворюючі властивості багатьох протиіонів. Дивись Таблицю III нижче. Наведені у Таблиці III дані відповідають на такі запитання: (1) чи утворюється твердий осад солі у ефірі при обробці вільної основи 1а кожною кислотою?; (2) які розчинники використовуються для перекристалізації солі після збирання солі шляхом фільтрації чи випарювання ефіру, та чи одержують кристалічну сіль із кожного розчинника?; (3) інформація про точку плавлення; і (4) загальна оцінка кожної солі з урахуванням простоти утворення та кристалічності.

Таблиця III

Оцінка солей приєднання кислоти (R)-(Z)-1-азабіцикло[2.2.1]гептан-3-ону, O-[3-(3-метоксифеніл)-2-пропініл]оксиму

Аніон кислоти	Результати: Осадження із ефіру	Розчинник для перекристалізації		Результати	Точка плавлення	Загальна оцінка солі
Неорганічні						
1. Гідробромід	Так	1. Et ₂ O	Осадження	Аморфна тверда речовина (дуже гігроскопічна)	-	Низька
2. Гідрохлорид	Так	1. Et ₂ O 2. EtOAc	Осадження Перекристалізація	Біла тверда речовина Біла тверда речовина Утворення E- ізомеру	158 - 160 159 - 160	Висока
Монокарбонові						
3. Ацетат	Ні	1. Et ₂ O 2. Петролейний ефір 3. IPA/Петролейний ефір	Випарювання Тритрування Кристалізація	Масляниста рідина Масляниста рідина Масляниста рідина	-	Низька
4. Бензоат	Ні	1. Et ₂ O 2. Пентан 3. т-бутил метиловий ефір	Випарювання Тритрування Кристалізація	Масляниста рідина Білі кристали Білі кристали	86 - 88 88 - 89	Висока
5. н-Бутират ^a	Ні	1.Et ₂ O 2. Пентан	Випарювання Тритрування	Масляниста рідина Масляниста рідина	-	Низька
6. трет- Бутират ^a	Ні	1. Et ₂ O 2. Пентан	Випарювання Тритрування	Масляниста рідина Масляниста рідина	-	Низька
7. L(+)-Лактат	Ні (MeOH)	1.MeOH 2. Пентан	Випарювання Тритрування	Масляниста рідина Масляниста рідина	-	Низька
8. 1-Нафтоат	Ні	1. Et ₂ O 2. Пентан	Випарювання Тритрування	Масляниста рідина Масляниста рідина	—	Низька
9. 2-Нафтоат	Ні	1. Et ₂ O 2. Пентан 3. Толуол 4. Ацетон 5. т-Бутилметиловий ефір 6. Циклогексан	Випарювання Тритрування Кристалізація Кристалізація Кристалізація	Смола Смола Осад не утворюється Осад не утворюється Осад не утворюється Тверда речовина = 2- нафтойна кислота	-	Низька
^a Було використано рацемічний оксим						
10. Пропіонат	Ні	1. Et ₂ O	Випарювання	Масляниста	-	Низька

		2. Пентан	Тритур ування	рідина Масляниста рідина		
11. Стеарат	Hi	1. Et ₂ O	Кристалізація	Тверда речовина = стеаринова кислота	-	Низька
12. Ундеканоат	Hi	1. Et ₂ O	Випарювання	Масляниста рідина	-	Низька
Полікарбонати						
13. Цитрат	Так	1. Et ₂ O	Осадження	Біла тверда аморфна речовина	53 - 54	Середня
14. Фумарат (0,5екв.)	Hi (MeOH)	1. MeOH 2. EtOAc 3. EtOAc: Пентан (1:1) 4. EtOAc 5. EtOAc/ 6. IPA/ 7. EtOH 8. IPA 9. Циклогексан/CHCl ₃	Випарювання Тритур ування Тритур ування Кристалізація Кристалізація Кристалізація Кристалізація Кристалізація	Смола Тверда речовина Тверда речовина Смола Осад не утворюється Осад не утворюється Осад не утворюється Осад не утворюється	79 - 109 106 - 108	Середня
15. Фумарат (1екв.)	Так	1. Et ₂ O 2. EtOH/Пентан 3. IPA/Пентан 4. Eon 5. IPA 6. EtOAc	Осадження Перекристалізація Перекристалізація Перекристалізація Перекристалізація Перекристалізація	Аморфна тверда речовина Масляниста рідина Масляниста рідина Масляниста рідина Масляниста рідина Масляниста рідина		Низька
16. Малеат	Так	1. Et ₂ O 2. EtOAc 3. IPA/EtOH/Пентан 4. EtOH/Пентан 5. CHCl ₃ /Пентан 6. EtOH	Випарювання Перекристалізація Перекристалізація Перекристалізація Перекристалізація Перекристалізація	Білі кристали Білі кристали Білі кристали Білі кристали Білі кристали Білі кристали	115 - 116 118 - 119 116,5 - 118 118,5 - 121 118 - 119,5 115 - 118	Висока
17. Малат	Так	1. Et ₂ O 3. IPA/EtOH/Пентан 4. EtOH/Пентан	Осадження Перекристалізація Перекристалізація	Біла смола Масляниста рідина Масляниста рідина	-	Низька
18. Оксалат	Так	1. Et ₂ O	Осадження	Біла тверда речовина непостійної стехіометрії	Змінна, 110 - 113 для солі 1:1	Середня
19. Сукцинат	Hi (MeOH)	1. MeOH 2. т-Бутилметиловий ефір/Пентан 3. Et ₂ O/Пентан	Випарювання Кристалізація Кристалізація	Масляниста рідина Масляниста рідина Масляниста рідина		Низька
20. Тартрат (L)-(+) (0,5екв.)	Hi (MeOH)	1. MeOH 2. Пентан 3. MeOH/Ефір 4. т-Бутилметиловий ефір 5. EtOAc 6. EtOAc/ 7.	Випарювання Тритур ування Кристалізація Кристалізація Кристалізація Кристалізація Кристалізація	Смола Липка смола Аморфна біла тверда речовина Осад не утворюється Утворюється	58 (скло)	Низька

		EtOH/Петролейний ефір		маслянистий осад Осад не утворюється Осад не утворюється		
21. Тар трат (L)-(+)(1екв.)	Hi (MeOH)	1. MeOH 2. EtOH/Петролейний ефір	Випарювання Кристалізація	Масляниста рідина Осад не утворюється	-	Низька
22. Тар трат (D)-(-)(0,5екв.)	Hi (MeOH)	1. MeOH 2. EtOH/Петролейний ефір	Випарювання Кристалізація	Смола Осад не утворюється	-	Низька
23. Тартрат (D)-(-)(1екв.)	Hi (MeOH)	1. MeOH	Випарювання	Смола	-	Низька
Сульфононі						
24. Бензол-сульфонат Сульфонат	Hi	1. Et ₂ O 2. Пентан	Випарювання Тритур ування	Масляниста рідина Масляниста рідина	-	Низька
Амінокислотні						
25. N-ацетилгліцина т	Hi (EtOAc/MeOH)	1. EtOAc/MeOH 2. Et ₂ O та пентан	Випарювання Тритур ування	Масляниста рідина	-	Низька
Інші						
26. Сахарин	Hi (MeOH)	1. MeOH 2. Пентан 3. Ефір 4. т-Бутилметиловий ефір 5. Ацетон/Пентан	Випарювання Тритур ування Тритур ування Кристалізація Кристалізація	Масляниста рідина Масляниста рідина Осад не утворюється Утворюється маслянистий осад	-	Низька

Із більш ніж 26 досліджених солей лише чотири солі утворювались у достатньо кристалічній формі: гідрохлорид, оксалат, малеат та бензоат.

Нижче у Таблиці IV наведено величини поглинання води трьома із цих чотирьох солей. Сіль з HCl має найбільшу швидкість поглинання води і поглинає найбільшу її кількість; малеат має найнижчі показники.

Загалом, гігроскопічність є важливим, але не критичним фактором у виборі солі. У виробництві можуть бути прийняті застережні міри для запобігання різноманітних факторів. З іншого боку, за прочих рівних умов, негігроскопічній формі надається дуже велика перевага.

Для Сполуки 1а той факт, що хлористоводнева сіль є дуже гігроскопічною, має велике значення, оскільки поглинання води знижує значення pH у мікросередовищі навколо твердої речовини, що призводить до утворення 1с, навіть у твердому стані. Попередні дослідження показали, що перетворення 1а на 1с відбувається за низьких значень pH. Крім того, хлористоводнева форма погано перекристалізується без перетворення 1а на 1с.

Для фармацевтики високі точки плавлення є більш бажаними, ніж низькі, оскільки сполуки з високими точками плавлення звичайно мають більшу стабільність, як фізичну, так і хімічну, під час виготовлення фармацевтичних препаратів. Як малеїнова, так і хлористоводнева сіль мають бажані з цієї точки зору характеристики.

Оксалатна сіль, хоч і має нижчу гігроскопічність, ніж гідрохлорид, не може бути одержана з постійним стехіометричним складом, що обмежує можливості її використання для розробки препаратів. Крім того, існує значне занепокоєння стосовно токсичності щавлевої кислоти при її довгостроковому введенні пацієнтам (The Merck Index, 10th Edition, Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey 1983: 6784; та Gosselin R.E. та ін., Ed., Clinical Toxicology of Commercial Products. Williams & Wilkins, Baltimore, 4th Edition, 1976; розділ III: 260 - 263).

Таблиця IV

Гігроскопічність солей Сполуки 1а

	Бензоат	Оксалат	Малеат	Гідрохлорид
Гігроскопічність (%мас. ↑) ^a	Не визначалась	6,38 ± 1,40	0,32 ± 0,02	27,77 ± 0,40
Точка плавлення (°C)	89 (ДСК) ^b	110	119 (ДСК)	158

^a Гігроскопічність при відносній вологості; витримання при відносній вологості 81% протягом 16 днів у гофрованих чашках для ДСК

^b ДСК = диференціальна скануюча калориметрія

Для температури, відносної вологості та світла на кристалічні солі 1а

У Таблиці V нижче підсумовано результати дослідження стабільності найменш гігроскопічних кристалічних солей 1а. Солі малеїнової та бензойної кислот було досліджено найбільш детально. Ніякої

зміни властивостей під дією температури/вологості при проведенні прискорених випробувань на стабільність при 30°C/60% відносної вологості протягом 2 тижнів, виявлено не було; як малеат, так і бензоат залишалися стабільними при 25°C/60% відносної вологості та при 30°C/60% відносної вологості.

Таблиця V

Стабільність кристалічних солей 1a при зберіганні за умов прискореного старіння

	Малеат	Бензоат	Оксалат
30°C/60% відносної вологості: 2 тижні	O	O	Не визначалося
Ксенон: 26 годин	O	E	E
Флуоресценція: 5,5 місяців	O	Не визначалося	Не визначалося

Де: E = присутність 2 - 4% 1с. Солі малеїнової та бензойної кислот було перекристалізовано із етилацетату та т-бутилметилового ефіру, відповідно. Опроміювання ксеноновим світлом проводили за допомогою пристрою Atlas SunChex при $(0,4 \pm 0,1) \text{ Вт/м}^2$. Опроміювання флуоресцентним світлом проводили при $10764 \pm 1076,4 \text{ лк}$ ($1000 \pm 100 \text{ фут-свічок}$). O - присутності E не було виявлено.

Розчинність кристалічних солей 1с у воді

Сполуки, такі як мускариновий агоніст 1a, що призначені для довгострокового перорального прийняття, звичайно мають кращу системну біодоступність після перорального прийняття, якщо вони є легкорозчинними у воді. Таким чином, розчинність у воді є ще одним фактором, що має ключове значення при визначенні придатної солі 1a. Як показано у Таблиці VI, розчинність малеїнової солі 1a у воді приблизно у 15 разів більше, ніж бензойнокислої солі 1a.

Таблиця VI

Розчинність у воді малеїновокислого та бензойнокислого 1a

	Малеат	Бензоат
Розчинність у воді (мг/мл, кімнатна температура)	89	6

Як свідчать усі раніше наведені дані, малеїновокисла сіль 1a є єдиною кристалічною сіллю, що відповідає усім критеріям, що задовольняють вимогам оптимального використання 1a у фармацевтиці. Хоч малеїновокислі солі широко використовуються у фармацевтиці, той факт, що лише малеїновокисла сіль 1a із більш ніж 25 досліджених солей має бажані фізичні та хімічні властивості, що забезпечують можливість фармацевтичного застосування 1a, є зовсім несподіваним відкриттям.

ФІГУРА 1. Тест на селективність щодо ізомерів

Для аналітичних цілей було проведено розділення Сполуки 1a від 1с за допомогою колонки Zorbax SCBN 5мкм розміром 4,6 x 250mm (PN 880975.905) на системі HP-1090 з трьома резервуарами для розчинників.

Умови проведення розділення були такими:

A = 80% 50мМ триетиламіну, доведеного до pH 3 за допомогою H_3PO_4 .
B = 10% CH_3CN .
C = 10% MeOH.

Швидкість подання рухомої фази:

1,5мл/хв

Температура:

кімнатна

Обсяг ін'єкції:

100мкл

Швидкість випускання:

83,3мкл/хв.

Фігура 1 зображує типовий приклад розділення зразка малеата 1a, що містить деяку кількість мелеата 1с. Перший пік при 3,3хв. викликаний протиіоном малеата, а пікі 11,3 та 13,0 спричинені 1a та 1с, відповідно. Така ідентифікація підтверджується даними ЯМР. Хроматограма показує, що майже рівноважне співвідношення 1a до 1с становить 85,5:14,5.

ФІГУРИ 2 та 3. Вплив розміру часток

Фігури 2 та 3 зображують різницю у порядку величин розміру часток для малеїновокислої солі сполуки, перекристалізованої із етилацетату (Фігура 2), порівняно з продуктом, одержаним осадженням із ефіру (Фігура 3). Для Фігури 2 діапазон розмірів часток змінюється від 150 x 10мкм до менш ніж 10 x 10мкм; для осадженого із ефіру продукту на Фігурі 3, усі частки були менше ніж 10 x 10мкм. Цей продукт утворюється, коли розчин сполуки у формі вільної основи у діетиловому ефірі змішують з розчином малеїнової кислоти у діетиловому ефірі. Такий тип утворення солі *in situ* дозволяє одержувати дуже тонкодисперсні частки завдяки швидкому осадженню.

Продукт, одержаний осадженням із ефіру (Фігура 3), розчинявся у сорбованій з повітря волозі та через 2 тижня витримання у умовах прискорених випробувань на стабільність - 40°C/75% відносної вологості - повертався до свого рівноважного співвідношення Z- та E-оксимів (85%Z - 15%E). Продукт, одержаний перекристалізацією із етилацетату (Фігура 2), який описано у Таблиці II, був більш стабільним. Ця підвищена стабільність форми продукту, одержаної кристалізацією із етилацетату, викликана, найбільш імовірно, відносно малою загальною площею поверхні більш великих перекристалізованих часток (Фігура 2) порівняно з меншими за розміром осадженими частками (Фігура 3).

ФІГУРА 4. Біологічна активність

Фігура 4 показує порівняння здатності оксалатної та малеатної солей 1a підвищувати результати тестування мишей з недостатністю гіпокампа у водному лабіринті для мишей (дивись Jaep та ін., робота у Life Sci. та посилання у ній для більш детального опису цього тесту).

Цей тест визначає здатність сполуки скорочувати час, потрібний мишам для знаходження прихованої платформи у басейні з водою.

Графік зображує результати двох експериментів, кожен з яких проводився зі своєю власною контрольною групою. Наведені дані демонструють, що оксалатна сіль Сполуки 1a, яку було раніше

використано для визначення впливу 1a при проведенні тестування мишей у водному лабіринті, може скорочувати час, потрібний для знаходження платформи, приблизно на 18 секунд (при дозі 1мг/кг). Використаний у якості позитивного контролю інгібітор ацетилхолінестерази такрин (ТНА) призводив до покращення приблизно на 27 секунд. У окремі серії експериментів, малеїновокисла сіль 1a при дозі 1мг/кг призводила до покращення періоду латентності приблизно на 20 секунд, тоді як у контрольній групі, що одержувала такрин, покращення становило 24 секунди. Ці дані демонструють, що малеїновокисла сіль 1a не спричинює втрати біологічної активності порівняно з іншими дослідженими солями.

Для оцінки потенціалу малеїновокислої солі сполуки щодо утворення поліморфних модифікацій, було досліджено кристалізацію у п'яти різних сумішах розчинників: ізопропанол/етанол/пентан, етанол/пентан, етанол, хлороформ/пентан та дихлорметан/пентан. Об'єм використаного розчинника, відсоток виходу, точка плавлення до перекристалізації та точка плавлення після перекристалізації наведені у Таблиці VI. Для кожного із експериментів у Таблиці VI 1,0г малеїновокислої солі оксиму сполуки розчиняли за звичайних умов у більш полярному із розчинників, що входить до суміші. Після цього повільно додавали зростаючу кількість пентана доти, поки не з'являлись дрібні частки. Після цього суміш запечатували та зберігали у холодильнику протягом ночі, після чого здійснювали холодну фільтрацію, споліскували пентаном, та піддавали дії високого вакууму. Усі продукти були чистими за даними елементного аналізу та аналізу методом рідинної хроматографії високого тиску. Було проведено рентгенівські дифракційні дослідження порошкоподібних зразків з цих партій, які засвідчили, що малеїновокисла сіль сполуки, перекристалізована з різних розчинників, мала одну й ту саму дифракційну картину і одну й ту саму кристалічну форму. Загалом, розчинники, які забезпечують повільну кристалізацію малеїновокислої солі, призводять до одержання матеріалу з більшим розміром часток, який має більшу стабільність за умов проведення прискорених випробувань на стабільність.

Малеїновокисла сіль, як було описано раніше, була ідентифікована як така, що має властивості, значно кращі за усі інші досліджені сольові форми.

Таблиця VI

Перекристалізація при кімнатній температурі

Суміш розчинників	Об'єм (мл/г)	% виходу	Точка плавлення до перекристалізації	Точка плавлення після перекристалізації
Ізопропанол - етанол - пентан	202	77,2	116 - 119	116,6 - 118
Етанол - пентан	125	85,8	116 - 118	118,5 - 121
Етанол	50	50,1	116 - 118	114 - 118
Хлороформ - пентан	32,5	83,1	116 - 118	118 - 119,5
Дихлорметан - пентан	13	64,5	116 - 118	118 - 120

Одержання малеата 1a може бути здійснено різними способами. Наприклад, чистий ізомер 1a може бути одержаний методом хроматографії на колонці суміші 1a та 1c у співвідношенні приблизно 1:1, одержаної шляхом синтезу (США № 5306718, США № 5346911, і Tecle та ін., Bio. Org. Med. Chem. Letters. 1995(5): 631 - 636). Вільну основу 1a одержують типово у вигляді маслянистої рідини або маслянистої твердої речовини. Цю вільну основу можна зберігати охолодженою до -4°C протягом кількох днів без помітного розкладу або ізомеризації до утворення 1c. Приготування малеїновокислої солі типово включає розчинення 1a у органічному розчиннику і додання розчину приблизно одного молярного еквівалента малеїнової кислоти у тому ж самому розчиннику. Придатними для цього органічними розчинниками є, наприклад, розчинники-ефіри, такі як діетиловий ефір, тетрагідрофуран і т.ін., етилацетат, ізопропілацетат і т.ін., спиртові розчинники, такі як метанол, етанол, ізопропанол і т.ін., вуглеводневі розчинники, такі як гексан, бензол, толуол і т.ін., ті будь-які інші органічні розчинники, які не реагують з 1a. Розчинники, яким надається перевага, включають діетиловий ефір, етилацетат і етанол. У залежності від обраного розчинника, сіль або буде осаджуватись безпосередньо із органічного розчинника (такого як діетиловий ефір), або може бути виділена послідовним доданням другого розчинника (таким як доданням діетилового ефіру або гексану до розчину солі у етанолі), або випарюванням розчинника при зниженому тиску. Солі, одержані за цими методиками, звичайно мають кристалічні частки малого розміру. Оскільки малий розмір часток призводить до підвищеної гігроскопічності, одержаний вихідний малеат 1a може бути перекристалізований із органічного розчинника або суміші розчинників, звертаючи при цьому увагу на використання розчинників, які не потребують нагрівання для розчинення солі. Прикладами придатних для цього розчинників є етилацетат, ізопропанол і діетиловий ефір, хоч можуть бути використані і інші нереакційноздатні розчинники, включаючи воду та суміші води зі змішуваними з водою органічними розчинниками. Температури проведення перекристалізації звичайно підтримуються на рівні кімнатної температури або нижче її для обмеження можливості ізомеризації оксиму. У деяких випадках, таких як при використанні апротонних розчинників, таких як етилацетат, температура перекристалізації може бути вищою за кімнатну температуру.

За іншим варіантом, суміші вільних основ 1a та 1c з різним співвідношенням компонентів можуть бути перетворені на відповідні суміші малеїновокислих солей за методиками, подібними до тих, що були описані раніше для чистого 1a, які можуть бути перекристалізовані із органічних чи водних розчинників або сумішей розчинників для одержання чистого малеату 1a. Розчинники, придатні для проведення перекристалізації сумішей малеїновокислих солей 1a/1c включають, наприклад, ізопропанол, етанол, хлороформ, дихлорметан, пентан, гексан, етилацетат і т.ін.

Фізичні властивості малеату 1a мають вплив на його хімічну стабільність. Важливою початковою подією при цьому є, мабуть, розпливання під дією атмосферної вологості. Але розпливання під дією атмосферної вологості у великій мірі залежить розміру часток солі завдяки тому, що маленькі частки мають більшу площу поверхні, що контактує з вологою. Крім того, забруднення малеату 1a, який має вищу точку плавлення,

малеатом 1с з нижчою точкою плавлення сприяє розпливанню часток під дією атмосферної вологи. Таким чином, підвищення стабільності твердого малеату 1а можна досягти шляхом зменшення кількості домішкового ізомеру 1с та проведенням перекристалізацією малеату 1а таким чином, щоб забезпечити утворення кристалів з великим розміром часток.

ПРИКЛАД 1

Одержання [1:11] малеїновокислої солі [R-(Z)]-1-азабіцикло[2.2.1]гептан-3-он. О-[3-(3-метоксифеніл)-2-пропініл]оксиму

Вільну основу [R-(Z)]-1-азабіцикло[2.2.1]гептан-3-он. О-[3-(3-метоксифеніл)-2-пропініл]оксиму (1а) (6,8г, 0,025моль) розчиняли у ефірі. Деяку кількість нерозчинної твердої речовини білого кольору відокремлювали на фільтрі та викидали. Малейнову кислоту (2,942г, 0,025моль) розчиняли у ефірі. Розчин малейнової кислоти по краплям додавали до ефірного розчину вільної основи при енергійному перемішуванні. Осад, що утворюється, відокремлювали на фільтрі, сушили у вакуумі при 40°C протягом 16 годин, одержуючи 8,93г (вихід 92%) малеату 1а, точка плавлення 116,5 - 118,0°C; $[\alpha]_{D}^{20}$ (с = 0,646, MeOH); Масс-спектр: m/z 272 (M^{+1}), 271, 174, 145, 109, 99;

ІЧ (KBr): 2926, 2237, 1697, 1618, 1606, 1576, 1487, 1360, 1294, 1208, 1173, 1055, 1030, 916, 870, 779 cm^{-1} ;

1H ЯМР (ДМСО- d_6): δ 7,31 (1H, т, J = 7,7Гц), 7,00 (м, 3H), 6,04 (с, 2H), 4,92 (с, 2H), 4,09 (дд, 2H, J = 2,4Гц, J = 16,4Гц), 3,76 (с, 3H), 3,52 (д, 1H, J = 0,001), 3,36 (м, 6H), 2,24 (м, 1H), 1,75 (м, 1H);

^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6): δ 26,0, 51,6, 55,7, 55,8, 59,5, 62,4, 85,9, 86,3, 115,9, 116,8, 123,2,

124,4, 130,4, 136,0, 158,5, 159,6, 167,6; Елементний аналіз: (C₁₆H₁₈N₂O₂·C₄H₄O₄)

C, 62,17; H, 5,74; N, 7,25;

Знайдено: C, 61,97; H, 5,77; N, 7,15.

Аналіз методом рідинної хроматографії високого тиску: 100% 1а, час утримання = 6,18хв (Колонка = Altech altima CN 4,5 x 150см, 5мкм; Рухома фаза = 15% MeOH:AcCN (1:1) та 85% 50ммоль розчину Et₃N у H₂O; 1,5мл/хв).

ПРИКЛАД 2 Перекристалізація 1а із етилацетату

Малеїновокислу сіль 1а (0,6297г, 1,6ммоль) розчиняли у 13мл киплячого етилацетату. Після охолодження до кімнатної температури утворювались білі кристали. Залишали суміш у холодильнику на 14 годин. Одержані білі кристали відокремлювали на фільтрі, сушили під високим вакуумом при 50°C, одержуючи 0,528г (вихід 84%) перекристалізованого матеріалу, точка плавлення 118 - 119°C;

Рідинна хроматографія високого тиску: 99,8% 1а, 0,2% 1с, (Колонка = Zorbax CN 4,5 x 250см, 5мкм; Рухома фаза = 15% MeOH:AcCN (1:1) та 85% 50ммоль розчину Et₃N у H₂O; 1,5мл/хв;

$[\alpha]_{D}^{20}$ (с = 0,503, MeOH); Масс-спектр: m/z 272 (M^{+1}), 174, 145, 99, 82;

ІЧ (KBr): 2926, 2237, 1697, 1618, 1606, 1576, 1487, 1360, 1294, 1208, 1173, 1055, 1030, 916, 870, 779 cm^{-1} ;

1H ЯМР (ДМСО- d_6): δ 7,31 (1H, т, J = 7,7Гц), 7,00 (м, 3H), 6,04 (с, 2H), 4,92 (с, 2H), 4,09 (дд, 2H, J = 2,4Гц, J = 16,4Гц), 3,76 (с, 3H), 3,52 (д, 1H, J = 0,01), 3,36 (м, 5H), 2,24 (м, 1H), 1,75(м, 1H);

^{13}C ЯМР (ДМСО- d_6): δ 26,0, 51,6, 55,7, 55,8, 59,5, 62,4, 85,9, 86,3, 115,9, 116,8, 123,2, 124,3, 130,4, 136,1, 158,6, 159,5, 167,6;

Елементний аналіз: (C₁₆H₁₈N₂O₂·C₄H₄O₄)

C, 62,17; H, 5,74; N, 7,25;

Знайдено: C, 61,98; H, 5,69; N, 7,14.

ПРИКЛАД 3 Перекристалізація малеату 1а при кімнатній температурі

Малеїновокислу сіль 1а (15,02г) розчиняли у 800мл абсолютного етанолу при перемішуванні за звичайних умов. Додавали пентан (500мл) порціями по 100мл до початку візуального спостереження кристалізації. Починалось швидке утворення осаду білої кристалічної твердої речовини. Суміш розводили додатковою порцією 600мл абсолютного етанолу при енергійному перемішуванні до одержання гомогенної суміші. Пентан (1,25л) додавали порціями до візуального спостереження кількох маленьких кристалів. Кристалізаційну колбу запечатували та залишали на ніч у морозильнику.

Білі кристали збирали фільтруванням під вакуумом та сушили у високовакуумній печі (приблизно 10мм.рт.ст., 40°C) протягом 2 годин, одержуючи 11,96г (вихід 80%) 1а у вигляді безбарвної кристалічної твердої речовини; точка плавлення 118 - 119°C. Рідинна хроматографія високого тиску: 99,93% 1а, 0,07% 1с (Колонка = Altech altima CN 4,5 x 150см, 5мкм; Рухома фаза = 15% MeOH:AcCN (1:1) та 85% 50ммоль розчину Et₃N у H₂O; 1,5мл/хв);

1H ЯМР (400МГц, ДМСО- d_6): δ 7,31 (1H, т, J = 7,7Гц), 7,04 - 7,00 (м, 2H), 6,99 (с, 1H), 6,06 (с, 2H), 4,93 (с, 2H), 4,19 - 4,03 (м, 2H), 3,77 (с, 3H), 3,52 (д, 1H, J = 4,1Гц), 3,45 - 3,29 (м, 4H), 2,27 - 2,20 (м, 1H), 1,78 - 1,72 (м, 1H)млн⁻¹;

Масс-спектр (хімічна іонізація) (M+1) = 271;

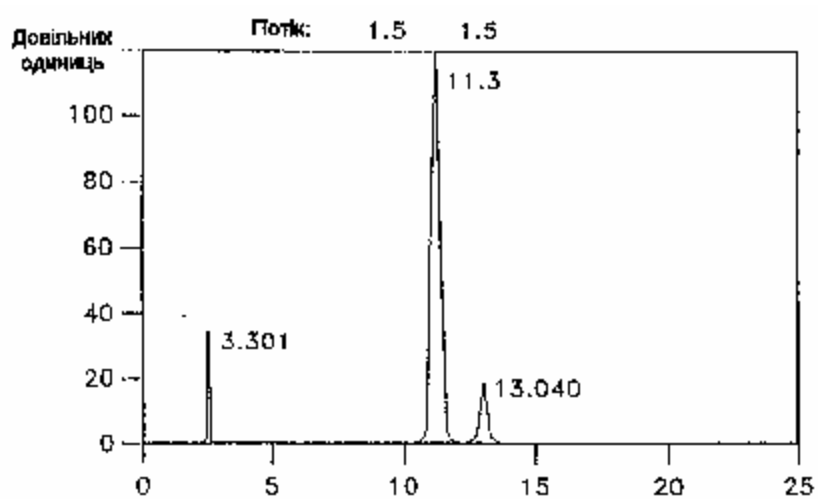
ІЧ (KBr): 2926 (ш), 2237 (ш), 1697 (ш), 1575 (с), 1360 (с), 1293 (середн.), 1207 (с), 1172 (середн.), 1054 (середн.), 1029 (середн.), 960 (ш), 915 (середн.), 871 (середн.), 780 (середн.), 755 (ш), 685 (ш), 647 (ш), 584 (ш) cm^{-1} ;

^{13}C ЯМР (100МГц, ДМСО- d_6): δ 167,67, 159,60, 158,62, 136,19, 130,41, 124,37, 123,18, 116,82, 115,87, 86,33, 85,92, 62,40, 59,48, 55,79, 55,69, 51,58, 26,02 млн⁻¹.

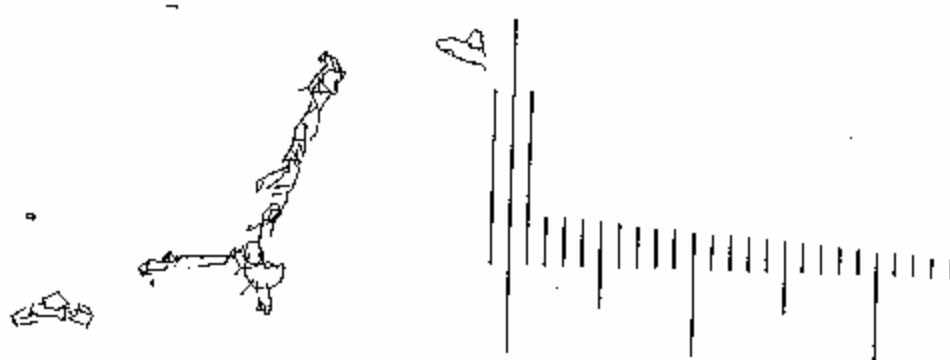
Елементний аналіз: (C₁₆H₁₈N₂O₂·C₄H₄O₄)

C, 62,17; H, 5,74; N, 7,25;

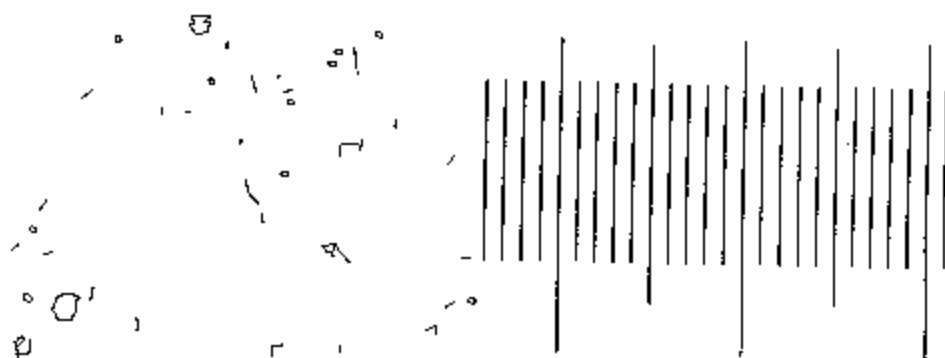
Знайдено: C, 62,27; H, 5,86; N, 7,23.



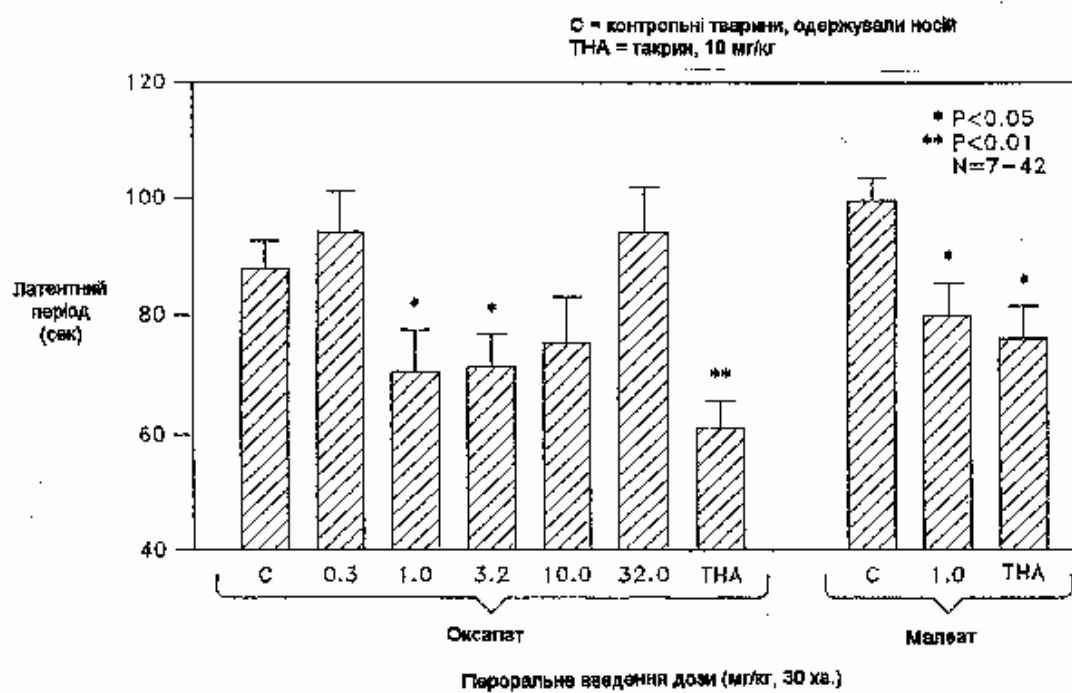
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4