

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391012 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.15

(22) Дата подачи заявки
2021.10.01

(51) Int. Cl. *C07D 211/46* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ

(31) 20199934.9

(32) 2020.10.02

(33) EP

(86) PCT/EP2021/077100

(87) WO 2022/069709 2022.04.07

(71) Заявитель:
АЗАФАРОС Б.В. (NL)

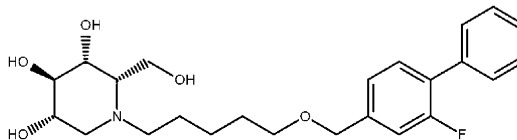
(72) Изобретатель:

Хетт Роберт, Блаттер Фритц, Робин
Дженнифер (NL), Ландскронер Кайл
(CH)

(74) Представитель:

Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Джермакян Р.В. (RU)

(57) Изобретение относится к кристаллической форме соединения (I) и способу получения кристаллической формы соединения (I). Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим кристаллическую форму соединения (I). Кроме того, изобретение относится к способам применения этой кристаллической формы соединения (I) в качестве лекарственного средства и при лечении заболевания, характеризующегося аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или более высокими уровнями гликосфинголипидов.



A1

202391012

202391012

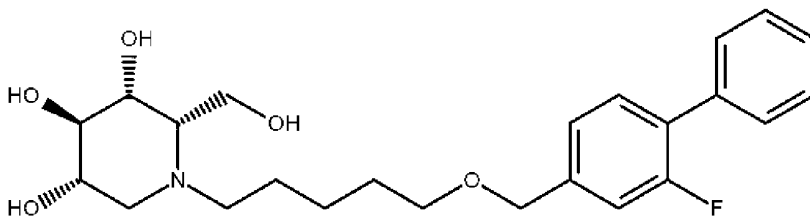
A1

КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I),



(I).

Настоящее изобретение также относится к способу получения кристаллической формы соединения (I), и к фармацевтическим композициям, содержащим кристаллическую форму соединения (I). Кроме того, настоящее изобретение относится к способам применения этой кристаллической формы соединения (I) в качестве лекарственного средства и к способам применения ее при лечении заболеваний, связанных с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

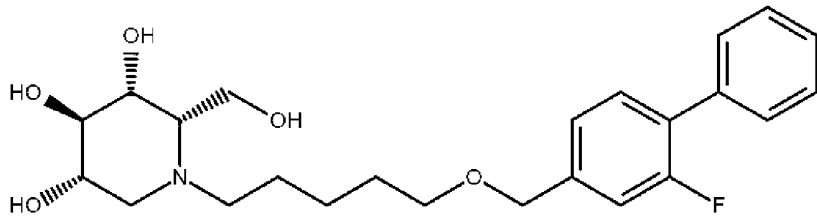
Кристаллическая форма соединения может быть важна, когда это соединение используется в фармацевтических целях. Это связано с тем, что морфология, размер частиц, полиморфизм, сольватация или гидратация кристаллической формы соединения могут влиять на фильтрацию, текучесть, таблетирование, растворимость и биодоступность фармацевтического агента.

Производные дезоксиноджиримицина представляют собой важный класс соединений в медицинской химии и разработке лекарств. *N*-(гидроксиэтил)-дезоксиноджиримицин представлен в продаже как миглитол, и он применяется в качестве антидиабетического средства для лечения диабета типа 2. Миглитол также действует как ингибитор широкого спектра действия нескольких кишечных гликозидаз (мальтазы, сахаразы и лактазы) (Hillebrand et al., *Diabetes*, 1986, Vol. 35, A93-A93; Scott and Spencer, *Drugs*, 2000, Vol. 59, 521-549).

N-бутилдезоксиноджиримицин (миглустат, Zavesca®) был разработан как ингибитор глюкозилцерамидсинтазы (также называемой церамидглюкозилтрансферазой,

ЕС 2.4.1.80, код UniProt: Q16739), и он используется в клиниках для лечения пациентов с лизосомной болезнью накопления, болезнью Гоше (Platt et al., J. Biol. Chem., 1994, Vol. 269, 8362-8365; Cox et al., Lancet, 2000, Vol. 355, 1481-1485) и болезнью Нимана-Пика типа С (Pineda et al. Orphanet J. Rare Dis., 2018, Vol. 13, 140).

В публикации WO 2015/147639 A1 описаны новые производные дезоксиноджиримицина, включая соединение (I),



(I),

которые эффективны при лечении заболеваний, связанных с аномальными уровнями цитозольного или лизосомального глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликофинголипидов. Соединение (I) является мощным двойным ингибитором глюкозилцерамидсинтазы и нелизосомальной глюкозилцерамидазы (GBA2, код UniProt: Q9HCG7).

Терапевтические соединения, полезные для лечения аномальных уровней глюкозилцерамида и/или повышенных уровней гликофинголипидов, часто вводят в форме таблеток. При приготовлении фармацевтических композиций и препаратов, применяемых в виде таблеток, весьма желательно иметь кристаллическую форму терапевтического соединения, имеющую низкий уровень гигроскопичности и/или низкий уровень поглощения влаги из воздуха, приводящий к расплыванию, что позволяет прессовать соединение в желаемую форму с соответствующим размером.

Кроме того, относительно высокая температура плавления (обычно выше приблизительно 80°C) терапевтического соединения способствует его устойчивости к разложению, облегчая тем самым хранение и увеличивая срок годности терапевтического соединения, что является желательным для любого фармацевтического средства.

Также особенно выгодно, чтобы терапевтическое соединение было негигроскопичным или по существу негигроскопичным с точки зрения обращения с ним, производства и хранения фармацевтического средства. Если фармацевтическое средство проявляет гигроскопические свойства, то может возникнуть множество проблем, например, таких как:

- сложность измельчения материала на мелкие частицы или в порошок при его дроблении;

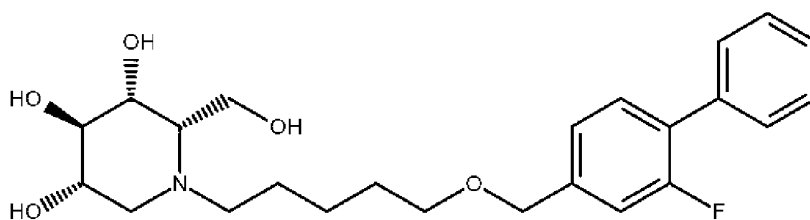
- наличие нежелательной влаги, которая способствует протеканию желательных реакций, и приводящая к образованию нежелательных конечных продуктов, что приводит к низкому качеству продукта и сокращению его срока годности;
- образование мягких таблеток при изготовлении или попадание влаги внутрь упаковки;
- прилипание порошка к конвейерному оборудованию может влиять на процесс наполнения.

Таким образом, желательно иметь кристаллическую форму терапевтического соединения, которая является негигроскопичной или по существу негигроскопичной.

Ранее не сообщалось о кристаллических формах соединения (I). Соответственно, существует потребность в стабильных и/или нерасплывающихся кристаллических формах соединения (I), которые предпочтительно являются по существу негигроскопичными и/или которые имеют относительно высокие температуры плавления.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I)



(I).

Каждый аспект или вариант осуществления настоящего изобретения, как определено в настоящем документе, может быть объединен с любым другим аспектом(ами) или вариантом(ами) осуществления, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или выгодные.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей кристаллическую форму соединения (I), описанную в настоящем документе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения в терапии.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения при лечении заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения при лечении болезни Ниманна-Пика типа С.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов у людей или животных, где способ предусматривает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества кристаллической формы соединения (I), описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения болезни Ниманна-Пика типа С у людей или животных, где способ предусматривает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества кристаллической формы соединения (I), описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения кристаллической формы соединения (I), описанной в настоящем документе, где способ предусматривает приведение образца соединения (I) в контакт с растворителем.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), полученной путем осуществления описанного здесь способа.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению свободного основания соединения (I) для получения кристаллической формы соединения (I).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения кристаллической формы соединения (I), где способ предусматривает кристаллизацию свободного основания соединения (I).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), полученной способом получения кристаллической формы соединения (I), где способ предусматривает кристаллизацию свободного основания соединения (I).

Другие предпочтительные варианты осуществления изобретения описаны в настоящем документе, и, в частности, в примерах.

Авторы настоящего изобретения неожиданно получили кристаллическую форму соединения (I), которая является стабильной и нераспывающейся. Настоящее изобретение обеспечило дополнительные полезные свойства этого соединения, такие как существенное отсутствие гигроскопичности и относительно высокая температура плавления кристаллической формы соединения (I).

Авторы настоящего изобретения неожиданно получили кристаллическую форму соединения (I), которая дополнительно показала хорошую растворимость в воде. Эти свойства делают кристаллические формы по изобретению особенно подходящими для использования их в составе фармацевтической композиции.

Кристаллизация терапевтических соединений часто включает использование различных солей. Как правило, соли легко подвергаются кристаллизации, и полученный материал облегчает последующую кристаллизацию терапевтических соединений. По этой причине использование соли часто является предпочтительным методом кристаллизации терапевтического соединения. Поэтому очень удивительно, что авторы настоящего изобретения смогли получить кристаллическую форму свободного основания соединения (I).

Поскольку кристаллическая форма любого терапевтического соединения в виде свободного основания не требует присутствия противоиона, то концентрация терапевтического соединения в порошке кристаллической формы в виде свободного основания обычно выше, чем в форме соответствующей соли, что очень полезно, поскольку снижает стоимость производства лекарственного препарата.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что кристаллические формы по изобретению проявляют благоприятные эффекты, описанные выше, благодаря их кристаллической структуре.

Краткое описание фигур

Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут дополнительно описаны со ссылкой на прилагаемые фигуры, на которых показано следующее:

На Фигуре 1 представлены иллюстративные изображения, полученные с помощью микроскопии в поляризованном свете, кристаллической формы соединения (I), названной

формой 2, полученной путем уравнивания с ацетонитрилом; слева: в виде сухого порошка, справа: в парафиновом масле.

На Фигуре 2 показана порошковая рентгенограмма формы 2, полученной путем уравнивания с ацетонитрилом.

На Фигуре 3А показана термограмма TG-FTIR формы 2, полученной путем уравнивания с ацетонитрилом.

На Фигуре 3В показана термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) формы 2, полученной путем уравнивания с ацетонитрилом.

На Фигуре 4А показана изотерма динамической сорбции паров (ДСП) формы 2, полученной уравниванием с ацетонитрилом: изменение содержания воды (красная кривая) и относительной влажности (синяя кривая) в зависимости от времени.

На Фигуре 4В показана изотерма ДСП формы 2, полученная уравниванием с ацетонитрилом: изменение содержания воды в зависимости от относительной влажности.

На Фигуре 5 представлены иллюстративные изображения, полученные с помощью микроскопии в поляризованном свете, кристаллической формы соединения (I), названной формой 3, полученной уравниванием с ацетонитрилом, анизолом или этилацетатом соответственно.

На Фигуре 6А показана порошковая рентгенограмма формы 3, полученной уравниванием с ацетонитрилом.

На Фигуре 6В показано наложение порошковых рентгенограмм форм 3, полученных путем уравнивания с ТВМЕ, водой, изопропанолом, этилацетатом, ацетонитрилом или анизолом, соответственно.

На Фигуре 7 показано наложение порошковых рентгенограмм двух кристаллических форм соединения (I), полученных уравниванием с ацетонитрилом:

- 1) форма 3 (Пример 3) и
- 2) форма 2 (Пример 2).

На Фигуре 8А показана термограмма TG-FTIR формы 3, полученной уравниванием с этилацетатом.

На Фигуре 8В показана термограмма TG-FTIR формы 3, полученной уравниванием с изопропанолом.

На Фигуре 8С показана термограмма ДСК формы 3, полученной уравниванием с этилацетатом.

На Фигуре 9А показана изотерма ДСП формы 3, полученной уравниванием с этилацетатом: изменение содержания воды (красная кривая) и относительной влажности (синяя кривая) в зависимости от времени.

На Фигуре 9В показана изотерма ДСП формы 3, полученной уравниванием с этилацетатом: изменение содержания воды в зависимости от относительной влажности.

На Фигуре 10 показаны приблизительные медио-сагиттальные уровни, полученные в соответствии с протоколом сечений, согласно Paxinos & Franklin "The Mouse Brain Atlas, 2nd edition", с указанием стереотаксических координат.

На Фигуре 11 показано процентное изменение массы тела мышей между 11-м днем после рождения (PND) и 9-й неделей жизни.

На Фигуре 12 показаны уровни глюкозилцерамидов C16:0 и C18:0 после регулярного перорального введения мышам из группы в возрасте PND 11-70.

На Фигуре 13 показана оценка клинических признаков у мышей NPC(-/-) из группы в возрасте PND 56-70, получавших носитель и AZ-3102.

На Фигуре 14 показаны показатели оценки тремора у мышей NPC(-/-) из группы PND 56-70, получавших носитель и AZ-3102.

На Фигуре 15 показано определение областей интереса (ROI). На изображении показаны контуры ROI мозжечка (cerebellum), образования гиппокампа (hippocampus), мозолистого тела (corpus callosum) и полосатого тела (дорсального стриатума, caudate-putamen).

На Фигуре 16 показана иммуногистохимия головного мозга: мечение кальбиндином-D28k у мышей NPC(-/-) и NPC(+/-), получавших носитель, по сравнению с мышами NPC(+/, мыши дикого типа) и NPC(-/-), получавшими AZ-3102.

На Фигуре 17 показан обобщенный механизм действия кристаллической формы соединения (I) (AZ-3102).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Если не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют смысловые значения, которые обычно понимают специалисты в данной области. Значение и определения используемых терминов должны быть ясны, однако в случае любой скрытой двусмысленности, приведенные здесь определения имеют приоритет над любым словарным или сторонним определением.

Следует понимать, что выражения, представленные в единственном числе, часто используются для удобства, однако все выражения и определения, представленные в единственном числе, предназначены для охвата вариантов во множественном числе, если явно не указано иное или не следует из контекста. Термины «содержащий», «включающий» и «имеющий» предназначены для включения и они подразумевают, что могут быть дополнительные элементы, отличные от перечисленных. Кроме того, следует

понимать, что все ссылки, включая журнальные статьи, книги, патенты, техническую литературу и т.п., упомянутые в данном документе, включены в настоящий документ во всей своей полноте и для всех целей посредством ссылки.

Термин «приблизительно», используемый здесь для числовых показателей, относится к их значению в пределах 10% от основного параметра (т. е. плюс или минус 10%), а термин «приблизительно», используемый в начале строки числовых показателей, относится к каждому значению (т.е. выражение «приблизительно 1, 2 и 3» эквивалентно выражению «приблизительно 1, приблизительно 2 и приблизительно 3»). Например, температура, указанная как «приблизительно 85°C», может включать температуры в диапазоне от 75°C до 95°C.

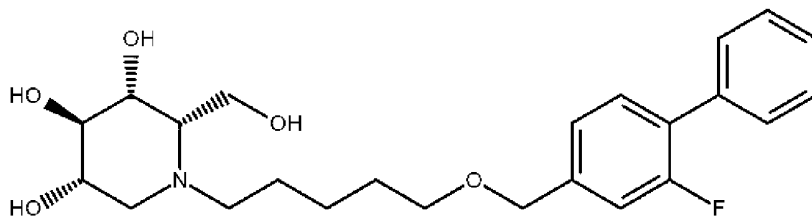
Термин «температура плавления» хорошо известен в данной области техники. Термин «относительно высокая температура плавления», как он используется в данном документе, предназначен для описания кристаллических форм, которые достаточно стабильны, чтобы использовать их для изготовления фармацевтических композиций. Предпочтительно, когда термин «относительно высокая температура плавления» описывает температуру плавления, превышающую приблизительно 65°C. Еще более предпочтительно - когда температура плавления выше приблизительно 80°C.

Термин «композиция», используемый в данном документе, охватывает продукт, содержащий указанные ингредиенты в указанных количествах, а также любой продукт, который прямо или косвенно является результатом комбинации указанных ингредиентов в указанных количествах. Предполагается, что такой термин в отношении фармацевтической композиции включает продукт, содержащий кристаллическую форму соединения (I), и, необязательно, дополнительные ингредиенты, входящие в состав носителя, а также любой продукт, который прямо или косвенно является результатом комбинации, комплексообразования или агрегации любых двух или более ингредиентов, или диссоциации одного или более ингредиентов, или других типов реакций или взаимодействий одного или более ингредиентов. Соответственно, фармацевтические композиции настоящего изобретения охватывают любую композицию, содержащую кристаллическую форму по изобретению и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель. Под «фармацевтически приемлемым» подразумевается, что носитель, разбавитель или эксципиент должны быть совместимы с другими ингредиентами композиции, и при этом не оказывать вредного воздействия на реципиента.

Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество кристаллической формы или фармацевтической композиции, которое при введении пациенту с целью лечения заболевания достаточно для осуществления такого лечения

заболевания. «Терапевтически эффективное количество» будет варьироваться в зависимости от заболевания и его тяжести, а также от возраста и массы тела пациента, подлежащего лечению. Термин «пациент» (или «субъект») включает, но без ограничения, животных, таких как, например, млекопитающие. Предпочтительно, когда пациент является человеком.

Настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I)



(I).

Кристаллическая форма соединения (I) может находиться в любом кристаллическом состоянии. Кристаллическая форма соединения (I) может представлять собой кристаллическую соль или кристаллическое свободное основание (в неионизированной форме). Предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) представляет собой кристаллическое свободное основание. Кроме того, соединение (I) может образовывать сокристаллы.

Если кристаллическая форма соединения (I) представляет собой кристаллическую соль, то молекулярная структура указанного выше соединения (I) включает протонированный атом азота.

Настоящее изобретение не ограничивается монокристаллической формой соединения (I). Твердые материалы могут существовать более чем в одной кристаллической форме. Эти альтернативные кристаллические формы называются полиморфами. Каждый полиморф имеет различную ориентацию и/или конформацию молекул в кристаллической решетке. Каждое кристаллическое состояние, или «полиморф», обладает уникальным набором физико-химических свойств из-за различий в кристаллической структуре.

Полиморфные формы могут иметь различные механические свойства, такие как текучесть и прессуемость порошка, которые влияют на технологические свойства соединения. Стабильность и продолжительность хранения соединения также могут зависеть от конкретного типа полиморфа.

Полиморфы можно отличать друг от друга по-разному. Полиморфы ярко проявляют спектроскопические свойства, и их можно определить, например, с помощью инфракрасной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния и

спектроскопии ^{13}C -ЯМР. Ввиду того факта, что каждая кристаллическая форма преломляет рентгеновские лучи по-разному, то для характеристики полиморфов также может использоваться метод порошковой рентгеновской дифракции (ПРД). Кроме того, тепловые методы, такие как дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) и термогравиметрический анализ (ТГА), также могут предоставить уникальную информацию о конкретном полиморфе.

Как хорошо известно в области порошковой рентгеновской дифракции, относительные высоты пиков порошковых рентгеновских дифракционных спектров могут использоваться для описания различных кристаллических форм. Соответственно, в одном аспекте, касающемся «формы 3», настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), характеризующейся отражением на порошковой рентгеновской дифрактограмме, указанным как значение 2θ , при $17,8 \pm 0,2^\circ$, где отражение при $17,8 \pm 0,2^\circ$ является одним из четырех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Предпочтительно, когда отражение при $17,8 \pm 0,2^\circ$ является одним из трех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме, или отражение при $17,8 \pm 0,2^\circ$ является одним из двух самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Более предпочтительно, когда отражение при $17,8 \pm 0,2^\circ$ является самым сильным отражением на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Еще более предпочтительно, когда в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) характеризуется отражением на порошковой рентгеновской дифрактограмме, указанным как значение 2θ , при $17,8 \pm 0,1^\circ$, где отражение при $17,8 \pm 0,1^\circ$ является одним из четырех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Предпочтительно, когда отражение при $17,8 \pm 0,1^\circ$ является одним из трех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме, или отражение при $17,8 \pm 0,1^\circ$ является одним из двух самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Более предпочтительно, когда отражение при $17,8 \pm 0,1^\circ$ является самым сильным отражением на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

Термин «наиболее сильное отражение» описывает самый высокий пик порошковой рентгеновской дифрактограммы. Высота пика на порошковой рентгеновской дифрактограмме определяется по интенсивности рентгеновского излучения (в единицах импульсов или импульсов/сек). Таким образом, самым сильным отражением является отражение, которое показывает наибольшую интенсивность рентгеновского излучения на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Например, самым сильным отражением на

порошковой рентгеновской дифрактограмме, показанной на Фигуре 6А, является отражение, указанное как значение 2θ , при $17,8 \pm 0,2^\circ$.

Если прямо не указано иное, то все порошковые рентгеновские дифрактограммы получены с использованием К-альфа-излучения меди при температуре приблизительно 25°C .

Предпочтительно, когда в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) дополнительно характеризуется одним или более отражений, выраженных как значение 2θ , при одном или более углов из $4,1 \pm 0,2^\circ$, $8,3 \pm 0,2^\circ$, $12,4 \pm 0,2^\circ$, $13,6 \pm 0,2^\circ$, $14,5 \pm 0,2^\circ$, $14,9 \pm 0,2^\circ$, $15,2 \pm 0,2^\circ$, $17,2 \pm 0,2^\circ$, $19,3 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$, $22,4 \pm 0,2^\circ$, $22,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,3 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Еще более предпочтительно, когда в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) дополнительно характеризуется одним или несколькими отражениями, выраженными как значение 2θ , при одном или более углов из $4,1 \pm 0,1^\circ$, $8,3 \pm 0,1^\circ$, $12,4 \pm 0,1^\circ$, $13,6 \pm 0,1^\circ$, $14,5 \pm 0,1^\circ$, $14,9 \pm 0,1^\circ$, $15,2 \pm 0,1^\circ$, $17,2 \pm 0,1^\circ$, $19,3 \pm 0,1^\circ$, $21,2 \pm 0,1^\circ$, $22,4 \pm 0,1^\circ$, $22,9 \pm 0,1^\circ$ и $23,3 \pm 0,1^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

Положения пиков на порошковой рентгеновской дифрактограмме относительно нечувствительны к деталям эксперимента. Таким образом, кристаллические соединения по изобретению могут быть охарактеризованы порошковой рентгеновской дифрактограммой с определенными положениями пиков. Соответственно, в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) предпочтительно характеризуется отражениями, выраженными как значение 2θ , при $17,2 \pm 0,2^\circ$, $17,8 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$ и $22,4 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Более предпочтительно, когда в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) характеризуется отражениями, выраженными как значение 2θ , при $4,1 \pm 0,2^\circ$, $8,3 \pm 0,2^\circ$, $12,4 \pm 0,2^\circ$, $13,6 \pm 0,2^\circ$, $14,5 \pm 0,2^\circ$, $14,9 \pm 0,1^\circ$, $15,2 \pm 0,2^\circ$, $17,2 \pm 0,2^\circ$, $17,8 \pm 0,2^\circ$, $19,3 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$, $22,4 \pm 0,2^\circ$, $22,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,3 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Еще более предпочтительно, когда в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) характеризуется отражениями, выраженными как значение 2θ , при $17,2 \pm 0,1^\circ$, $17,8 \pm 0,1^\circ$, $21,2 \pm 0,1^\circ$ и $22,4 \pm 0,1^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Наиболее предпочтительно, когда в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) характеризуется отражениями, выраженными как значение 2θ , при $4,1 \pm 0,1^\circ$, $8,3 \pm 0,1^\circ$, $12,4 \pm 0,1^\circ$, $13,6 \pm 0,1^\circ$, $14,5 \pm 0,1^\circ$, $14,9 \pm 0,1^\circ$, $15,2 \pm 0,1^\circ$, $17,2 \pm 0,1^\circ$, $17,8 \pm 0,1^\circ$, $19,3 \pm 0,1^\circ$, $21,2 \pm 0,1^\circ$, $22,4 \pm 0,1^\circ$, $22,9 \pm 0,1^\circ$ и $23,3 \pm 0,1^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

Кристаллические формы соединения можно охарактеризовать с помощью термограммы дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Таким образом, кристаллическая форма соединения (I) в аспекте, касающемся «формы 3» предпочтительно характеризуется термограммой ДСК, которая показывает начало эндотермического теплового потока приблизительно при 87°C и/или температуру плавления равную приблизительно 92,4°C, как показано на Фигуре 8С. Соответственно, предпочтительно, когда в аспекте, касающемся «формы 3», кристаллическая форма соединения (I) имеет температуру плавления от 89°C до 96°C, определенную методом ДСК. Предпочтительно, когда кристаллическая форма в аспекте, касающемся «формы 3», имеет температуру плавления от 90°C до 95°C, определенную методом ДСК. Еще более предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) в аспекте, касающемся «формы 3», имеет температуру плавления от 91°C до 94°C, определенную методом ДСК. Наиболее предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) в аспекте, касающемся «формы 3», имеет температуру плавления от 92°C до 93°C, определенную методом ДСК.

Кристаллические формы соединения можно охарактеризовать по их гигроскопичности. Гигроскопичность продукта отражает увеличение или уменьшение содержания в нем воды в зависимости от относительной влажности при определенной температуре. По существу негигроскопичные продукты показывают или характеризуются лишь незначительным изменением содержания воды в результате изменений относительной влажности. В сильно гигроскопичных продуктах содержание воды может варьироваться в широких пределах. Соответственно, предпочтительно, чтобы кристаллическая форма соединения (I) была по существу негигроскопичной.

Кристаллические формы соединения можно охарактеризовать по их термогравиметрическим показателям. Таким образом, кристаллическую форму соединения (I) предпочтительно можно охарактеризовать по ее термогравиметрическим показателям. В одном варианте осуществления кристалл соединения (I) характеризуется термогравиметрическими показателями, представленными на Фигуре 8А или Фигуре 8В.

Кристаллические формы соединения также могут быть охарактеризованы профилем динамической сорбции паров (ДСП). Соответственно, кристаллическую форму соединения (I) предпочтительно можно охарактеризовать по профилю ДСП, представленному на Фигуре 9А и Фигуре 9В. Предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) имеет обратимый профиль сорбции/десорбции. Предпочтительно, когда профиль ДСП показывает по существу негигроскопичную природу кристаллической формы.

По существу негигроскопичные вещества имеют водопоглощение менее приблизительно 2% при относительной влажности приблизительно 95%, измеренной при температуре приблизительно 25°C. Предпочтительно, когда водопоглощение составляет менее приблизительно 1% при относительной влажности приблизительно 95%, измеренной при температуре приблизительно 25°C. Значения водопоглощения получают путем измерения прироста массы испытуемой кристаллической формы по отношению к исходной массе при относительной влажности приблизительно 95% и температуре приблизительно 25°C.

Соответственно, кристаллическая форма соединения (I) предпочтительно поглощает от 0% до 2% воды при относительной влажности приблизительно 95% при температуре приблизительно 25°C. Еще более предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) поглощает от 0% до 1,5% воды при относительной влажности приблизительно 95% при температуре приблизительно 25°C. Наиболее предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) поглощает от 0% до 1% воды при относительной влажности приблизительно 95% при температуре приблизительно 25°C.

Кроме того, кристаллическая форма по изобретению предпочтительно является стабильной. Например, продолжительная инкубация в этилацетате (в течение 1 недели) при температуре приблизительно 25°C привела к получению кристаллических форм соединения (I) хорошего качества, как показано на Фигуре 5.

В одном аспекте, касающемся «формы 2», настоящее изобретение относится к дополнительной кристаллической форме соединения (I). Эта кристаллическая форма (форма 2) характеризуется отражением, выраженным как значение 2θ , при $16,9 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, где отражение при $16,9 \pm 0,2^\circ$ является одним из четырех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Предпочтительно, когда отражение при $16,9 \pm 0,2^\circ$ является одним из трех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме, или отражение при $16,9 \pm 0,2^\circ$ является одним из двух самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Более предпочтительно, когда отражение при $16,9 \pm 0,2^\circ$ является самым сильным отражением на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Еще более предпочтительно, когда кристаллическая форма в аспекте, касающемся «формы 2», характеризуется отражением, выраженным как значение 2θ , при $16,9 \pm 0,1^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, где отражение при $16,9 \pm 0,1^\circ$ является одним из четырех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Предпочтительно, когда отражение при $16,9 \pm 0,1^\circ$ является одним из трех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме, или

отражение при $16,9 \pm 0,1^\circ$ является одним из двух самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Более предпочтительно, когда отражение при $16,9 \pm 0,1^\circ$ является самым сильным отражением на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

Предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», характеризуется одним или несколькими отражениями, выраженными как значение 2θ , при одном или более углов из $15,2 \pm 0,2^\circ$, $16,1 \pm 0,2^\circ$, $16,5 \pm 0,2^\circ$, $18,9 \pm 0,2^\circ$, $23,1 \pm 0,2^\circ$, $25,5 \pm 0,2^\circ$, $27,7 \pm 0,2^\circ$ и $28,5 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Еще более предпочтительно, когда в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) характеризуется одним или несколькими отражениями, выраженными как значение 2θ , при одном или более углов из $15,2 \pm 0,1^\circ$, $16,1 \pm 0,1^\circ$, $16,5 \pm 0,1^\circ$, $18,9 \pm 0,1^\circ$, $23,1 \pm 0,1^\circ$, $25,5 \pm 0,1^\circ$, $27,7 \pm 0,1^\circ$ и $28,5 \pm 0,1^\circ$.

В аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», эта кристаллическая форма соединения (I) также может характеризоваться отражениями, выраженными как значение 2θ , при $16,1 \pm 0,2^\circ$, $16,5 \pm 0,2^\circ$, $16,9 \pm 0,2^\circ$, $18,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,1 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме. Предпочтительно когда в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) также может характеризоваться отражениями, выраженными как значение 2θ , при $16,1 \pm 0,1^\circ$, $16,5 \pm 0,1^\circ$, $16,9 \pm 0,1^\circ$, $18,9 \pm 0,1^\circ$ и $23,1 \pm 0,1^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

В аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) может быть охарактеризована с помощью термограммы ДСК, которая показывает начало эндотермического теплового потока приблизительно при 58°C и температуру плавления приблизительно 70°C , как показано на Фигуре 3В. Соответственно, в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) имеет температуру плавления от 67°C до 74°C . Предпочтительно, когда в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) имеет температуру плавления от 68°C до 73°C . Еще более предпочтительно, когда в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) имеет температуру плавления от 69°C до 72°C . Наиболее предпочтительно, когда в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) имеет температуру плавления от 69°C до 71°C .

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что в аспекте, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) особенно растворима в

воде. Соответственно, в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) имеет растворимость в воде от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 85 мг/мл, измеренную приблизительно при 25°C. Более предпочтительно, когда в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма имеет растворимость в воде от приблизительно 78 мг/мл до приблизительно 82 мг/мл, измеренную при температуре приблизительно 25°C. Наиболее предпочтительно, когда в аспекте настоящего изобретения, касающемся «формы 2», кристаллическая форма соединения (I) имеет растворимость в воде приблизительно 80 мг/мл, измеренную приблизительно при 25°C.

Способы измерения растворимости известны в данной области техники; например, метод со встряхиванием колбы, метод с обработкой ультразвуком, метод элюирования с колонки и метод ультрафиолетовой или видимой спектроскопии. Если прямо не указано иное, то растворимость в воде определяют с помощью метода со встряхиванием колбы и/или методом с обработкой ультразвуком.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей кристаллическую форму соединения (I), описанной в настоящем документе.

Обычно кристаллическую форму соединения (I) вводят пациенту в виде фармацевтической композиции или препарата. Такие фармацевтические композиции можно вводить пациенту любым приемлемым способом введения, включая, но без ограничения, пероральный, местный (включая трансдермальный) и парентеральный способы введения.

Фармацевтические композиции по изобретению обычно готовят с использованием фармацевтически приемлемого носителя и одного или нескольких необязательных ингредиентов. При необходимости или желании полученная однородно смешанная смесь может быть затем сформована или загружена в таблетки, капсулы, пилюли, емкости, картриджи, дозаторы и т.п. с использованием обычных процедур и оборудования.

Фармацевтические композиции по изобретению, предназначенные для перорального введения в виде твердой лекарственной формы (т.е. в виде капсул, таблеток, пилюль и т.п.), обычно содержат кристаллическую форму соединения (I) в качестве активного ингредиента. Предпочтительно, когда фармацевтическая композиция по изобретению содержит кристаллическую форму соединения (I), и при этом она не содержит других активных ингредиентов. Предпочтительно, когда фармацевтическая композиция по изобретению содержится в капсуле. Предпочтительно, когда фармацевтическая композиция по изобретению содержится в капсуле без какого-либо другого активного ингредиента. Капсула может представлять собой желатиновую капсулу

или капсулу из гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ). Альтернативно, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать кристаллическую форму соединения (I) в качестве активного ингредиента и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Подходящие фармацевтически приемлемые носители известны специалистам в данной области, и они представляют собой, например, жиры, воду, физиологический раствор, спирт (например, этанол), глицерин, полиолы, водный раствор глюкозы, разжижающий агент, дезинтегрирующий агент, связующее, смазывающее вещество, смачивающий агент, стабилизатор, эмульгатор, диспергатор, консервант, подсластитель, краситель, вкусовую добавку или ароматизатор, концентрирующий агент, разбавитель, буферное вещество, растворитель или солюбилизующий агент, химическое соединение для эффективного хранения, соль для изменения осмотического давления, покрывающий агент или антиоксидант, сахараиды, такие как лактоза или глюкоза; крахмал кукурузный, пшеничный или рисовый; жирные кислоты, такие как стеариновая кислота; неорганические соли, такие как алюминат метасиликата магния или безводный фосфат кальция; синтетические полимеры, такие как поливинилпирролидон или полиалкиленгликоль; спирты, такие как стеариловый спирт или бензиловый спирт; синтетические производные целлюлозы, такие как метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза; а также другие обычно используемые добавки, такие как желатин, тальк, растительное масло и гуммиарабик.

Фармацевтическую композицию, содержащую кристаллические формы соединения (I), также можно вводить трансдермально или трансмукозально с использованием известных систем доставки и эксципиентов. Например, фармацевтическая композиция может быть смешана с усилителями проницаемости, такими как пропиленгликоль, монолаурат полиэтиленгликоля, азациклоалкан-2-он и т.п., и она может быть включена в пластырь или подобную систему доставки. Также могут быть использованы дополнительные эксципиенты, включая гелеобразующие агенты, эмульгаторы и буферы.

Препараты для инъекций, предназначенные для парентерального введения, включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Водные растворители включают, например, дистиллированную воду для инъекций и/или физиологический раствор. Примеры неводных растворителей включают спирты, такие как этанол.

Предпочтительно, когда фармацевтическая композиция содержит один или несколько дополнительных фармацевтически активных агентов. Такая комбинированная терапия предусматривает использование кристаллической формы соединения (I) в

сочетании с одним или несколькими дополнительными фармацевтически активными агентами, либо представленными вместе (например, приготовленными вместе в составе одного препарата), либо представленными отдельно (например, упакованными в виде отдельных единичных дозированных лекарственных форм).

У здорового человека основной гликофинголипид, такой как глюкозилцерамид, гидролизуется в лизосомах кислой глюкозилцерамидазой (также называемой глюкоцереброзидазой или GBA1, ЕС 3.2.1.45, код UniProt: P04062). Кроме того, нелизосомальная глюкозилцерамидаза (GBA2, код UniProt: Q9HCG7), находящаяся в цитоплазме, также способна процессировать глюкозилцерамид. В результате, как GBA1, так и GBA2, участвуют в нейропатологических эффектах, наблюдаемых при некоторых лизосомных болезнях накопления.

У пациентов с лизосомной болезнью накопления возникают дефекты биосинтеза или деградации гликофинголипидов, что приводит к аномальным уровням глюкозилцерамида и/или других гликофинголипидов.

Ранее в публикации WO 2015/147639 A1 было показано, что соединение (I) эффективно при лечении заболеваний, связанных с аномальными уровнями цитозольного или лизосомального глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликофинголипидов. Поскольку биодоступность кристаллических форм соединения (I) сравнима с биодоступностью аморфного соединения (I), то кристаллические формы соединения (I) также эффективны при лечении заболеваний, связанных с аномальными уровнями клеточного глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликофинголипидов. В частности, кристаллические формы соединения (I) эффективны при лечении заболеваний, связанных с аномальными уровнями цитозольного или лизосомального глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликофинголипидов.

Как показано в Примере 4, кристаллическая форма соединения (I) (форма 3) эффективна при лечении заболеваний, связанных с аномальными уровнями цитозольного или лизосомального глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликофинголипидов. В частности, показано, что форма 3 улучшает клинические признаки у мышей с болезнью Ниманна-Пика типа С.

Соответственно, настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения в терапии.

Настоящее изобретение также относится к кристаллической форме, описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

Предпочтительно, когда настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения при лечении заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов. Предпочтительно, когда заболевание, сопровождающееся аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или повышенными уровнями гликосфинголипидов, представляет собой лизосомную болезнь накопления, такую как болезнь Гоше (типа 1, 2 и 3), болезнь Фабри, ганглиозидозы GM1, ганглиозидозы GM2 (такие как болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа и вариант АВ), сиалидоз, болезнь Ниманна-Пика типа С и синдром миоклонуса движения-почечной недостаточности, или симптом одного из заболеваний, в совокупности классифицируемых как метаболический синдром, например ожирение, резистентность к инсулину, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, поликистозная болезнь почек, диабет типа II и хроническое воспаление, или нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Паркинсона или деменция с тельцами Леви, или атеросклероз. Еще более предпочтительно, когда кристаллическая форма соединения (I) или фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую форму соединения (I), применяется для лечения ганглиозидозов GM1 и/или ганглиозидозов GM2 (таких как болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа и вариант АВ).

Еще более предпочтительно, когда настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанного в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения при лечении болезни Ниманна-Пика типа С.

Настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения при лечении болезни Сандхоффа.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов у людей или животных, где способ предусматривает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества кристаллической формы соединения (I), описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

Настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения для облегчения симптомов заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов.

Настоящее изобретение еще более предпочтительно относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения для облегчения симптомов болезни Ниманна-Пика типа С.

Настоящее изобретение относится к кристаллической форме соединения (I), описанной в настоящем документе, или к фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, для применения для облегчения симптомов болезни Сандхоффа.

Настоящее изобретение также относится к способу облегчения симптомов заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов у пациентов-людей или животных, где способ предусматривает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества кристаллической формы соединения (I), описанной в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

Кристаллическая форма соединения (I) (например, форма 3) может быть использована для улучшения различных клинических симптомов, например, таких как:

- 1) потеря массы тела, связанная с заболеванием;
- 2) тремор; и/или
- 3) атаксическая походка.

Как показано в Примере 4, кристаллическая форма соединения (I) (например, форма 3) эффективно проникает в головной мозг. Таким образом, кристаллическая форма соединения (I) (например, форма 3) может быть использована для лечения или облегчения заболевания или симптомов заболевания, возникающих в головном мозге. Например, кристаллическая форма соединения (I) (например, форма 3) может быть использована для предотвращения или уменьшения потери клеток Пуркинье в мозжечке. Кристаллическая форма соединения (I) (например, форма 3) может быть использована для предотвращения или уменьшения гибели нейронов. Кристаллическая форма соединения (I) (например, форма 3) может быть использована для предотвращения или уменьшения церебральной атрофии.

Считается, что высокая эффективность кристаллической формы соединения (I) при лечении заболеваний, связанных с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с

повышенными уровнями гликофинголипидов, является результатом высокой активности кристаллической формы соединения (I) в отношении глюкозилцерамидсинтазы (GCS) и нелизосомальной глюкозилцереброзидазы (GBA2).

Описанные здесь способы могут быть способами *in vitro* или *in vivo*.

Введение может быть осуществлено либо перорально, с использованием таблеток, пилюль, капсул, гранул, порошков, растворов и т.п., либо путем парентерального введения, такого как инъекции, включая внутрисуставные, внутривенные и внутримышечные инъекции, путем введения с использованием суппозиторий, офтальмологических растворов, глазных мазей или средств для наружного применения, таких как трансдермальные жидкие препараты, мази, трансдермальные пластыри, трансмукозальные жидкие препараты, трансмукозальные пластыри, ингаляторы и т.п.

При пероральном введении суточная доза обычно составляет приблизительно от 0,0001 до 10 мг/кг, предпочтительно от 0,001 до 1 мг/кг или от 0,005 до 5 мг/кг, и более предпочтительно - от 0,01 до 0,5 мг/кг массы тела, и суточную дозу можно вводить одной дозой или 2-4 отдельными дозами. Например, для человека массой 70 кг оптимальная суточная доза для перорального введения составляет приблизительно 0,01-30 мг/день. В случае внутривенного введения суточную дозу целесообразно вводить из расчета приблизительно от 0,00001 до 10 мг/кг массы тела один раз в день или два или более раз в день. Кроме того, трансмукозальное средство вводят в дозе приблизительно от 0,0001 до 10 мг/кг массы тела один раз в день или два или более раз в день. Дозу подбирают соответствующим образом в зависимости от конкретного случая, принимая во внимание симптомы, возраст, пол и т.п.

Поскольку эффективность кристаллической формы соединения (I) при лечении заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликофинголипидов (например, такого как болезнь Нимана-Пика типа C), очень высока, а требуемая доза относительно низка, то кристаллическая форма соединения (I) вызывает меньше побочных эффектов, чем известные соединения, используемые для лечения таких заболеваний, в частности, например, миглитол (его доза составляет 1200 мг/кг/день).

Настоящее изобретение также относится к способу получения кристаллической формы, описанной в настоящем документе, где способ предусматривает приведение в контакт образца соединения (I) с растворителем. Растворитель предпочтительно выбирают из ацетонитрила, этилацетата, изопропанола, анизола, воды и трет-бутилметилового эфира (ТВМЕ). Еще более предпочтительно, когда растворителем является этилацетат, ацетонитрил или изопропанол. Предпочтительно, когда перед

контактированием образца соединения (I) с растворителем образец соединения (I) очищают для удаления эфиров борной кислоты. Предпочтительно, когда образец соединения (I) очищают с помощью хроматографии. Еще более предпочтительно, когда образец соединения (I) очищают с использованием хроматографической колонки с силикагелем. Дополнительно и/или альтернативно образец соединения (I) очищают перегонкой с метанолом.

Кристаллическую форму формы 3 соединения (I) можно получить любым из следующих иллюстративных способов:

1) перемешиванием смеси приблизительно 74 мг соединения (I) и 2,0 мл ацетонитрила в течение трех дней при температуре от 20°C до 30°C, например, при приблизительно 25°C, с последующим фильтрованием, с получением кристаллической формы соединения (I);

2) перемешиванием смеси приблизительно 74 мг соединения (I) и 2,0 мл анизола в течение трех дней при температуре в диапазоне от 20°C до 30°C, например, при приблизительно 25°C, с последующим фильтрованием, с получением кристаллической формы соединения (I);

3) перемешиванием смеси приблизительно 82 мг соединения (I) и 1,0 мл этилацетата в течение трех дней при температуре от 20°C до 30°C, например, при приблизительно 25°C, с последующим фильтрованием, с получением кристаллической формы соединения (I);

4) перемешиванием смеси приблизительно 82 мг соединения (I) и 1,0 мл изопропанола в течение трех дней при температуре от 20°C до 30°C, например, при приблизительно 25°C, с последующим фильтрованием, с получением кристаллической формы соединения (I);

5) перемешиванием смеси приблизительно 45 мг соединения (I) и 1,0 мл воды в течение трех дней при температуре от 20°C до 30°C, например, при приблизительно 25°C, с последующим фильтрованием, с получением кристаллической формы соединения (I);

6) перемешиванием смеси приблизительно 100 мг соединения (I) и 3,0 мл ТВМЕ в течение трех дней при температуре в диапазоне от 20°C до 30°C, например, при приблизительно 25°C, с последующим фильтрованием, с получением кристаллической формы соединения (I).

Предпочтительно, когда перед смешиванием соединения (I) с растворителем образец соединения (I) очищают для удаления эфиров борной кислоты. Предпочтительно, когда образец соединения (I) очищают с помощью хроматографии. Еще более предпочтительно, когда образец соединения (I) очищают с использованием

хроматографической колонки с силикагелем. Дополнительно и/или альтернативно образец соединения (I) очищают перегонкой с метанолом.

Способы фильтрации известны специалистам в данной области техники, и они включают, но без ограничения, фильтрацию с использованием бумажного фильтра и фильтрацию с использованием фильтра из пористого стекла.

Способы получения формы 3 соединения (I), описанные в настоящем документе, можно осуществлять в более крупном масштабе, поддерживая аналогичное соотношение используемых реагентов. Например, кристаллическую форму формы 3 соединения (I) можно получить путем перемешивания смеси соединения (I) с этилацетатом в соотношении 0,05-1 г на 1 мл [соединение (I):этилацетат] в течение трех дней при температуре от 20°C до 30°C, например, при приблизительно 25°C, с последующим фильтрованием, с получением кристаллической формы соединения (I).

Описанные здесь способы получения формы 3 соединения (I) очень эффективны. Выход способов, описанных в данном документе, обычно превышает 70% (выраженное как массовое отношение количества полученной формы 3 к первоначально использованному количеству соединения (I)). Предпочтительно, когда для описанных здесь способов выход превышает 75%.

Предпочтительно, когда кристаллическая форма 2 образуется в качестве промежуточного продукта перед образованием кристаллической формы 3.

Предпочтительно, когда кристаллическая форма 2, характеризующаяся отражениями, выраженными как значение 2θ , при $16,1 \pm 0,2^\circ$, $16,5 \pm 0,2^\circ$, $16,9 \pm 0,2^\circ$, $18,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,1 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, образуется в качестве промежуточного продукта перед образованием кристаллической формы 3, характеризующейся отражениями, выраженными как значение 2θ , при $17,2 \pm 0,2^\circ$, $17,8 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$ и $22,4 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

Настоящее изобретение также относится к кристаллической форме соединения (I), полученной путем осуществления описанного здесь способа.

Настоящее изобретение также относится к применению свободного основания соединения (I) для получения кристаллической формы соединения (I).

Настоящее изобретение также относится к способу получения кристаллической формы соединения (I), где способ предусматривает кристаллизацию свободного основания соединения (I).

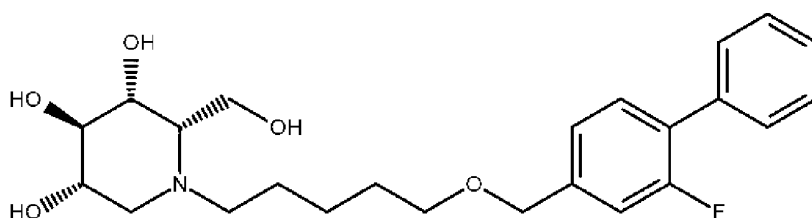
Настоящее изобретение также относится к кристаллической форме соединения (I), полученной способом получения кристаллической формы соединения (I), где указанный способ предусматривает кристаллизацию свободного основания соединения (I).

Считается, что помимо других преимуществ настоящего изобретения, образование кристаллической формы соединения (I) полезно для очистки соединения (I). Например, кристаллическая форма соединения (I), полученная описанными здесь способами, имеет чистоту более 90%, а обычно более 95%.

Предшествующее подробное описание было представлено с целью пояснения и иллюстрации настоящего изобретения, и оно не предназначено для ограничения объема притязаний, определяемого прилагаемой формулой изобретения. Многие варианты предпочтительных осуществлений настоящего изобретения, проиллюстрированных здесь, будут очевидны специалистам в данной области техники, и этим варианты находятся в пределах объема притязаний, определенных прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентов.

Настоящее изобретение может быть дополнительно охарактеризовано определениями, представленными в следующих пунктах:

1. Кристаллическая форма соединения (I),



(I).

2. Кристаллическая форма по пункту 1, где кристаллическая форма представляет собой кристаллическое свободное основание.

3. Кристаллическая форма по пункту 1 или пункту 2, где кристаллическая форма характеризуется отражением, выраженным как значение 2θ , при $17,8 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, при этом отражение при $17,8 \pm 0,2^\circ$ является одним из четырех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

4. Кристаллическая форма по пункту 3, дополнительно характеризующаяся одним или несколькими отражениями, выраженными как значение 2θ , при одном или более углах из $4,1 \pm 0,2^\circ$, $8,3 \pm 0,2^\circ$, $12,4 \pm 0,2^\circ$, $13,6 \pm 0,2^\circ$, $14,5 \pm 0,2^\circ$, $14,9 \pm 0,2^\circ$, $15,2 \pm 0,2^\circ$, $17,2 \pm 0,2^\circ$, $19,3 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$, $22,4 \pm 0,2^\circ$, $22,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,3 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

5. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1-4, характеризующаяся отражениями, выраженными как значение 2θ , при углах $17,2 \pm 0,2^\circ$, $17,8 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$ и $22,4 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

6. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1-5, имеющая температуру плавления от 89°C до 96°C .

7. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1-6, имеющая температуру плавления от 92°C до 93°C .

8. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1-7, где кристаллическая форма является по существу негигроскопичной.

9. Кристаллическая форма по пункту 1 или пункту 2, где кристаллическая форма характеризуется отражением, выраженным как значение 2θ , при угле $16,9 \pm 0,2^{\circ}$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, при этом отражение при $16,9 \pm 0,2^{\circ}$ является одним из четырех самых сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

10. Кристаллическая форма по пункту 9, дополнительно характеризующаяся одним или несколькими отражениями, выраженными как значение 2θ , при одном или более углах из $15,2 \pm 0,2^{\circ}$, $16,1 \pm 0,2^{\circ}$, $16,5 \pm 0,2^{\circ}$, $18,9 \pm 0,2^{\circ}$, $23,1 \pm 0,2^{\circ}$, $25,5 \pm 0,2^{\circ}$, $27,7 \pm 0,2^{\circ}$ и $28,5 \pm 0,2^{\circ}$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

11. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1, 2, 9 или 10, характеризующаяся отражениями, выраженными как значение 2θ , при углах $16,1 \pm 0,2^{\circ}$, $16,5 \pm 0,2^{\circ}$, $16,9 \pm 0,2^{\circ}$, $18,9 \pm 0,2^{\circ}$ и $23,1 \pm 0,2^{\circ}$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

12. Кристаллическая форма по любому из пунктов 9-11, имеющая температуру плавления от 67°C до 74°C .

13. Кристаллическая форма по любому из пунктов 9-12, имеющая температуру плавления от 69°C до 71°C .

14. Кристаллическая форма по любому из пунктов 9-13, имеющая растворимость в воде от 75 мг/мл до 85 мг/мл .

15. Фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую форму по любому из пунктов 1-14.

16. Фармацевтическая композиция по пункту 15, где фармацевтическая композиция содержится в капсуле.

17. Фармацевтическая композиция по пункту 16, где фармацевтическая композиция содержится в капсуле без какого-либо другого ингредиента.

18. Фармацевтическая композиция по пункту 15 или 16, содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

19. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1-14 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15-18 для применения в терапии.

20. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1-14 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15-18 для применения в качестве лекарственного средства.

21. Кристаллическая форма по любому из пунктов 1-14 или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15-18 для применения при лечении заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов.

22. Кристаллическая форма или фармацевтическая композиция для применения по пункту 21, где заболевание, связанное с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов, представляет собой лизосомную болезнь накопления, такую как болезнь Гоше, болезнь Фабри, ганглиозидозы GM1, ганглиозидозы GM2 (такие как болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа и вариант АВ), сиалидоз, болезнь Ниманна-Пика типа С и синдром миоклонуса движения-почечной недостаточности, или симптом одного из заболеваний, которые в совокупности классифицируются как метаболический синдром, например, ожирение, резистентность к инсулину, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, поликистоз почек, диабет типа II и хроническое воспаление или нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Паркинсона или деменция с тельцами Леви, или атеросклероз.

23. Кристаллическая форма или фармацевтическая композиция для применения по пункту 21 или 22, где заболевание представляет собой ганглиозидозы GM1 или ганглиозидозы GM2 (такие как болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа или вариант АВ).

24. Способ лечения заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов у пациентов-людей или у животных, где способ предусматривает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества кристаллической формы по любому из пунктов 1-14, или фармацевтическая композиция по любому из пунктов 15-18.

25. Способ получения кристаллической формы по любому из пунктов 1-8, где способ предусматривает приведение в контакт образца соединения (I) с растворителем.

26. Способ по пункту 25, в котором растворитель выбирают из ацетонитрила, этилацетата, изопропанола, анизола, воды и трет-бутилметилового эфира (ТВМЕ).

27. Способ по пункту 25 или 26, в котором образец соединения (I) очищают перед приведением в контакт образца соединения (I) с растворителем.

28. Способ по пункту 27, в котором образец соединения (I) очищают с помощью хроматографии.

29. Способ по пункту 28, в котором образец соединения (I) очищают с помощью колоночной хроматографии на силикагеле.

30. Способ по любому из пунктов 27-29, в котором образец соединения (I) после очистки не содержит боратных эфиров.

31. Способ по любому из пунктов 25-30, в котором кристаллическая форма по любому из пунктов 9-14 образуется в качестве промежуточного продукта перед образованием кристаллической формы по любому из пунктов 1-8.

32. Кристаллическая форма соединения (I), полученная в результате осуществления способа по любому из пунктов 25-31.

33. Применение свободного основания соединения (I) для получения кристаллической формы.

34. Способ получения кристаллической формы соединения (I), где способ предусматривает кристаллизацию свободного основания соединения (I).

35. Кристаллическая форма соединения (I), полученная способом по пункту 34.

36. Способ получения кристаллической формы соединения (I), где способ предусматривает выполнение следующих стадий:

i. добавление соединения (I) в колонку для очистки, с получением очищенного образца соединения (I);

ii. добавление растворителя к очищенному образцу соединения (I), с получением суспензии соединения (I) в растворителе;

iii. перемешивание суспензии соединения (I) в растворителе, с получением кристаллической формы соединения (I); и

iv. отделение кристаллической формы соединения (I), с получением чистого образца кристаллической формы соединения (I).

37. Способ по пункту 36, в котором очищенный образец соединения (I) не содержит боратных эфиров.

38. Способ по пункту 36 или 37, в котором растворитель выбирают из ацетонитрила, этилацетата, изопропанола, анизола, воды и трет-бутилметилового эфира (ТВМЕ).

39. Способ по любому из пунктов 36-38, в котором стадию ii проводят при температуре 25-35°C.

40. Способ по любому из пунктов 36-39, в котором перемешивание на стадии (iii) проводят при температуре 20-35°C.

41. Способ по любому из пунктов 36-40, в котором перемешивание на стадии (iii) проводят в течение по меньшей мере 1 часа.

42. Способ по пункту 41, в котором перемешивание на стадии (iii) проводят в течение по меньшей мере 16 часов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Анализы методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) выполняли на приборе TA Instruments Q2000 (использовали закрытую алюминиевую кювету или алюминиевую кювету с точечным отверстием в крышке, скорость нагрева 20 град/мин). Под температурой плавления принимали максимум пика.

Анализы методом динамической сорбцией паров (ДСП) выполняли на приборе SPS11-100n «Sorptions Prüfsystem» от ProUmid (панее «Projekt Messtechnik»), August-Nagel-Str. 23, 89079, Ульм (Германия). В алюминиевую кювету для образцов помещали от 5 до 20 мг образца. Использовали скорость изменения влажности 5% в час. Программа измерений может быть описана следующим образом:

Образец помещали на алюминиевый или платиновый держатель сверху микровесов, и давали ему уравновеситься при относительной влажности (RH) 50% перед запуском предварительно заданных программ изменения влажности:

- (1) 2 часа при относительной влажности 50%;
- (2) 50 → 0% относительной влажности (5%/час); 5 часов при 0% относительной влажности;
- (3) 0 → 95% относительной влажности (5%/час); 5 часов при относительной влажности 95%;
- (4) 95 → 0% относительной влажности (5%/час); 5 часов при 0% относительной влажности;
- (5) 0 → 95% относительной влажности (5%/час); 5 часов при относительной влажности 95%;
- (6) 95 → 50% относительной влажности (5%/час); 2 часа при относительной влажности 50%.

Анализы методом порошковой рентгеновской дифракции выполняли на дифрактометре Stoe Stadi P с детектором Mythen1K, работающим на излучении Cu-K α_1 . Измерения на этом приборе проводили при напряжении на трубке 40 кВ и силе тока 40 мА. Измерения проводили с использованием изогнутого Ge монохроматора для излучения Cu-K α_1 . На дифрактометре устанавливали режим со следующими параметрами: шаг 0,02° 2 θ , время шага 12 секунд, диапазон сканирования 1,5–50,5° 2 θ , и шаг детектора 1° 2 θ (режим детектирования при пошаговом сканировании). Для типичной пробоподготовки приблизительно 10 мг образца помещали между двумя ацетатными пленками, и образец

устанавливали в держатель для образцов дифрактометра Stoe. Во время измерения образец вращался. Всю подготовку образцов и измерения проводили в атмосфере окружающего воздуха (приблизительно 25°C).

Приблизительную растворимость определяли путем постепенного добавления растворителя приблизительно к 10 мг соединения, с последующим встряхиванием и/или обработкой ультразвуком в течение короткого периода времени. Если вещество не растворилось при добавлении в общей сложности не менее 10 мл растворителя, то растворимость указывали как <1 мг/мл. Эксперименты проводили при температуре приблизительно 25°C.

Термогравиметрические измерения, выполненные путем совместного анализа методами термогравиметрии и инфракрасной спектроскопии (TG-FTIR), проводили с помощью Netzsch Thermo-Microbalance TG 209, соединенного со спектрометром Bruker FTIR Spectrometer Vector 22 (использовали чашки для образцов с точечным отверстием, атмосфера N₂, скорость нагрева 10°C/мин).

Примеры

Следующие неограничивающие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение.

Пример 1. Образование кристаллической соли

Исследования по программе высокопроизводительного скрининга солей соединения (I) выполняли с использованием 16 различных солеобразователей, указанных в Таблице 1, при попытке получения кристаллической формы соединения (I) в шести различных условиях.

Первоначальные эксперименты по скринингу проводили путем добавления 0,05 М раствора соединения (I) в ацетоне в каждую лунку кварцевого 96-микротитрационного планшета, с последующим добавлением маточных растворов солеобразователя в концентрации 0,1 М. Растворители выпаривали из каждой лунки под током азота при комнатной температуре. Твердые остатки в лунках исследовали с помощью микроскопии в поляризованном свете.

Таблица 1. Кислоты, выбранные для исследования по программе скрининга солей

Солеобразователь	Молекулярная масса	Класс по Штало
Адипиновая кислота	146,14	1
Бензолсульфоновая кислота	158,17	2
Бензойная кислота	122,12	2

Лимонная кислота	192,12	1
Фумаровая кислота	116,07	1
Гентизиновая кислота	154,12	2
Хлористоводородная кислота	36,46	1
L-молочная кислота,	90,08	1
Малеиновая кислота	116,07	1
L-яблочная кислота	134,09	1
DL-миндальная кислота	152,15	1
Фосфорная кислота	97,99	1
Янтарная кислота	118,09	1
Серная кислота	98,08	1
L-винная кислота	150,09	1
Толуолсульфоновая кислота	190,22	2

Хотя целью этих первоначальных экспериментов было получение соотношения 1:1 соединения (I) к солеобразователю, исследования с помощью световой микроскопии выявили некоторые экспериментальные условия, подходящие для образования кристаллической формы. Например, при смешивании соединения (I) с бензолсульфоновой кислотой, соляной кислотой, DL-миндальной кислотой, L-винной кислотой, фосфорной кислотой и серной кислотой происходило образование кристаллических остатков.

В другом эксперименте по скринингу были выбраны шесть систем растворителей, а именно ацетон, ацетонитрил, этилацетат, этанол, смесь изопропанол/вода (3:1) и смесь ацетон/вода (9:1). К остатку в каждую лунку добавляли 200 мкл растворителя для уравнивания суспензии. Подготовленный таким образом микротитровальный планшет встряхивали при 400 об/мин в течение одного дня при комнатной температуре (приблизительно 25°C). Затем растворители упаривали в токе азота, и полученные твердые остатки исследовали с помощью микроскопии в поляризованном свете.

На основании исследований с помощью световой микроскопии были обнаружены признаки возможного образования солей при использовании бензолсульфоновой кислоты, гентизиновой кислоты, соляной кислоты, L-молочной кислоты, D-миндальной кислоты, фосфорной кислоты, L-винной кислоты и толуолсульфоновой кислоты. Некоторые из наиболее многообещающих образцов были отобраны для последующих экспериментов в масштабе от 50 до 200 мг (эксперименты с увеличенным масштабом).

Эксперименты с увеличенным масштабом для всех испытанных условий привели к образованию аморфных форм соединения (I) или жидкокристаллических солей

соединения (I). Хотя микроскопическое исследование часто выявляло двойное лучепреломление, однако фильтрация полученных смесей была невозможна, и ни в одном из экспериментов не удалось выделить твердый материал.

Подводя итог, можно отметить, что во всех экспериментах с солеобразователями не удалось получить кристаллическую форму соединения (I).

Пример 2. Кристаллическая форма формы 2.

Поскольку эксперименты, описанные в Примере 1, не привели к получению полезного кристаллического материала, то была исследована кристаллическая форма свободного основания соединения (I).

Соединение (I) очищали с использованием колонки с силикагелем для удаления эфиров борной кислоты, с последующим кратковременным уравниванием с ацетонитрилом (в течение приблизительно 1-5 минут). Установлено, что растворимость очищенного соединения (I) в ацетонитриле составила от 5 мг/мл до 8 мг/мл. Также была исследована растворимость очищенного соединения (I) в других растворителях, и результаты представлены в Таблице 2. Эти значения определяли путем добавления небольших аликвот растворителя к ~10 мг твердого соединения (I) и последующего встряхивания или путем обработки ультразвуком в течение короткого периода времени при комнатной температуре (приблизительно при 25°C).

Таблица 2. Приблизительные значения растворимости очищенного соединения (I)

Растворитель	Растворимость S [мг/мл]	Растворитель	Растворимость S [мг/мл]
Уксусная кислота	$S > 120$	МЕК	$40 < S < 50$
Ацетон	$55 < S < 73$	Метанол	$S > 160$
Ацетонитрил	$5 < S < 8$	1-пропанол	$13 < S < 15$
DCM	$S > 160$	2-пропанол	$19 < S < 20$
Этиловый спирт	$40 < S < 53$	THF	$S > 200$
Этилацетат	$12 < S < 13$	Вода	$S \sim 80$

Кристаллическую форму формы 2 соединения (I), полученную в результате короткого (приблизительно 1-5 минут) уравнивания с ацетонитрилом, исследовали с помощью микроскопии в поляризованном свете, экспериментов с использованием методов порошковой рентгеновской дифракции (ПРД), TG-FTIR, дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и динамической сорбции паров (ДСП).

Результаты исследования микроскопии в поляризованном свете представлены на Фигуре 1, а дифрактограмма, полученная с помощью ПРД, показана на Фигуре 2. Эта кристаллическая форма 2 соединения (I) показала самые сильные отражения при значениях 2θ , равных $16,1 \pm 0,2^\circ$, $16,5 \pm 0,2^\circ$, $16,9 \pm 0,2^\circ$, $18,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,1 \pm 0,2^\circ$.

Результаты термоаналитической оценки характеристик кристаллической формы 2 соединения (I), полученной в результате короткого уравнивания с ацетонитрилом (термограммы TG-FTIR), представлены на Фигуре 3А, а результаты, полученные с помощью ДСК, показаны на Фигуре 3В. Результаты показывают, что образец содержал приблизительно 0,5% воды, которая высвобождается при нагревании приблизительно до 120°C . При более высоких температурах наблюдали термическое разложение. Анализ с помощью ДСК выявил два значительных эндотермических события. За первым сильным эндотермом с пиковой температурой приблизительно 70°C и энтальпией приблизительно 54 Дж/г, следовал более слабый сигнал при 81°C и энтальпией приблизительно 3 Дж/г.

Кроме того, было исследовано поведение кристаллического образца свободного основания при различных давлениях водяного пара. При высокой относительной влажности образец поглощал приблизительно 18% воды; однако большая часть абсорбированной воды высвобождалась, когда относительная влажность возвращалась к относительной влажности на уровне 50%. Результаты измерений, полученных с помощью метода ДСП, представлены на Фигуре 4А и Фигуре 4В.

Обобщенные показатели, характеризующие кристаллическую форму соединения (I), полученную в рамках Примера 2, представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Обобщенные показатели, характеризующие кристаллическую форму 2 соединения (I)

Показатель	Значение/описание показателя
Температура плавления	$\sim 70^\circ\text{C}$
Гигроскопичность	18% при относительной влажности 95%; гигроскопичная форма
Растворимость в воде	~ 80 мг/мл

Полученная кристаллическая форма 2 соединения (I) имеет низкую стабильность, и она в дальнейшем переходит в кристаллическую форму 3 соединения (I) при воздействии повышенной температуры (более приблизительно 30°C) в течение приблизительно 1-5 минут. Альтернативно, форма 2 переходит в форму 3 при уравнивании с растворителем (например, ацетоном) в течение времени более 5 минут при температуре

приблизительно 25°C. Эта кристаллическая форма 3 свободного основания соединения (I) обладала лучшей стабильностью и уникальным набором физико-химических свойств.

Пример 3. Форма 3

Стабильную кристаллическую форму соединения (I) получали в результате независимых экспериментов по уравниванию суспензии очищенного соединения (I) с различными соответствующими растворителями, например, с ацетонитрилом, этилацетатом, изопропанолом, анизолом, водой или ТВМЕ, соответственно, при комнатной температуре (приблизительно при 25°C).

В частности, кристаллическую форму формы 3 соединения (I) получали с помощью следующих экспериментальных методов:

1) приблизительно 74 мг соединения (I) добавляли к 2,0 мл ацетонитрила, и суспензию перемешивали в течение трех дней при комнатной температуре (приблизительно 25°C), а затем ее отфильтровывали;

2) приблизительно 74 мг соединения (I) добавляли к 2,0 мл анизола, и суспензию перемешивали в течение трех дней при комнатной температуре (приблизительно 25°C), а затем ее отфильтровывали;

3) приблизительно 82 мг соединения (I) добавляли к 1,0 мл этилацетата, и суспензию перемешивали в течение трех дней при комнатной температуре (приблизительно 25°C), а затем ее отфильтровывали;

4) приблизительно 82 мг соединения (I) добавляли к 1,0 мл изопропанола, и суспензию перемешивали в течение трех дней при комнатной температуре (приблизительно 25°C), а затем ее отфильтровывали;

5) приблизительно 45 мг соединения (I) добавляли к 1,0 мл воды, и суспензию перемешивали в течение трех дней при комнатной температуре (приблизительно 25°C), а затем ее отфильтровывали;

6) приблизительно 100 мг соединения (I) добавляли к 3,0 мл ТВМЕ, и суспензию перемешивали в течение трех дней при комнатной температуре (приблизительно 25°C), а затем ее отфильтровывали.

Перед добавлением растворителя соединение (I) очищали для удаления эфиров борной кислоты с использованием колонки с силикагелем.

Полученную кристаллическую форму соединения (I) охарактеризовывали с помощью методов микроскопии в поляризованном свете, порошковой рентгеновской дифракции, TG-FTIR, ДСК и ДСП.

Результаты исследования методом микроскопии в поляризованном свете для выбранных растворителей представлены на Фигуре 5.

Дифрактограмма, полученная методом ПРД для кристаллической формы 3 соединения (I), полученной в результате экспериментов по уравниванию суспензии с ацетонитрилом, показана на Фигуре 6А. Наложение дифрактограмм ПРД кристаллических форм 3 соединения (I), полученных в результате экспериментов по уравниванию суспензии с другими растворителями, показано на Фигуре 6В. Эта кристаллическая форма соединения (I) показывает самые сильные отражения при значении 2θ равных $17,2 \pm 0,2^\circ$, $17,8 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$ и $22,4 \pm 0,2^\circ$. Эти результаты согласуются между собой, несмотря на то, что для получения кристаллической формы соединения (I) использовались разные растворители.

Для сравнения, на Фигуре 7 показано наложение дифрактограммы ПРД для кристаллической формы, полученной в Примере 2 (форма 2), и кристаллической формы, полученной в рамках настоящего Примера (форма 3). Две кристаллические формы имеют разные дифрактограммы ПРД.

Результаты типичных экспериментов по определению характеристик методом TG-FTIR для кристаллической формы 3 соединения (I), показаны на Фигуре 8А (этилацетат) и Фигуре 8В (изопропанол).

На Фигуре 8А показано, что образец кристаллической формы 3 соединения (I), полученной уравниванием с этилацетатом, содержит приблизительно 0,7% этилацетата, несмотря на сушку в вакууме при 40°C в течение нескольких дней. Этилацетат высвобождается при температуре приблизительно от 100°C до 200°C . При более высоких температурах наблюдается термическое разложение.

Образец формы 3, полученной в результате образования суспензии соединения (I) в изопропанол (ИПА) и сушки на воздухе при комнатной температуре, неожиданно показал, что начальное содержание изопропанола составляет менее 0,5% (см. Фигуру 8В).

Типичные результаты измерений методом ДСК для образца кристаллической формы 3 соединения (I), полученной путем уравнивания с этилацетатом, представлены на Фигуре 8С; при этом показан острый эндотермический пик плавления приблизительно при 92°C , связанный с энтальпией, составляющей приблизительно 103 Дж/г. Таким образом, кристаллическая форма формы 3 соединения (I), полученная в рамках этого Примера, имеет более высокую температуру плавления, чем кристаллическая форма по Примеру 2 (форма 2).

Кроме того, исследовали поведение образца кристаллической формы 3 соединения (I), полученной уравниванием с этилацетатом, при различных давлениях водяного

пара. При самой высокой относительной влажности, равной 95%, образец поглощал приблизительно 1,2% воды, которая высвобождалась, когда относительная влажность возвращалась к 50% относительной влажности. Результаты измерения методом ДСП показаны на **Фигуре 9А** и **Фигуре 9В**. Количество поглощенной воды оказалось незначительным, и сорбция воды была обратимой. Таким образом, эта кристаллическая форма формы 3 соединения (I) является негигроскопичной или по существу негигроскопичной.

Обобщенные показатели, характеризующие кристаллическую форму 3 соединения (I), полученную в рамках Примера 3, представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Обобщенные показатели, характеризующие кристаллическую форму 3 соединения (I)

Показатель	Значение/описание показателя
Температура плавления	~ 92,5°C
Гигроскопичность	~1% при относительной влажности 95%; по существу негигроскопичная форма
Растворимость в воде	не измеряли

Пример 4. Эффект от введения кристаллической формы соединения (I) мышам, страдающим болезнью Ниманна-Пика типа С (NPC)

В этом Примере AZ-3102-00 представляет собой название формы 3 соединения (I).

Цель исследования

Цель исследования состояла в том, чтобы оценить эффективность лечения молодых мышей NPC1 (NPC(-/-) (возраст P11-P70)) прогнозируемой фармакологически активной дозой AZ-3102-00 с использованием перорального зонда, а также оценить ФК и гистологические маркеры для характеристики невропатологии, которая может возникнуть.

Схема исследования

В это исследование было включено 38 мышей, из них: 30 мышей NPC(-/-) с нокаутом (КО), 4 гетерозиготных мыши NPC(+/-) и 4 мыши NPC(+/+) дикого типа (мыши WT, Valb/c). Мыши NPC1(-/-) имеют преждевременное усечение белка с делецией 11 трансмембранных доменов из 13, при этом первые два трансмембранных домена остаются без изменений. Мыши NPC1(-/-), гомозиготные по рецессивному аллелю гена NIN Нимана Пика типа C1 (Npc1m1N), характеризуются двойным дефицитом активности сфингомиелиназы и глюкоцереброзидазы (JAX# 003092). Животные были выведены из линии мышей BALB/c OlaHsd.

24 мышам NPC1(-/-) через пероральный желудочный зонд вводили AZ-3102-00 с 11-го дня после рождения (P11) до 70-го дня после рождения (P70). Контрольные мыши того же возраста включали 6 мышей NPC(-/-) и 4 мыши NPC(+/-), получавших носитель, а также 4 мыши NPC(+/+), получавших AZ-3102-00. После последней обработки в день P70 мышей NPC(-/-) (n=4 для каждого момента времени) подвергали эвтаназии путем внутрибрюшинной инъекцией 600 мг/кг пентобарбитала в следующие моменты времени: 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 8 часов и 24 часа. После последней обработки также умерщвляли контрольных мышей (не критично по времени). Терминальную кровь собирали путем пункции сердца в пробирки, покрытые ЭДТА. Плазму крови собирали центрифугированием (3000×g в течение 10 минут при комнатной температуре), и аликвоты 50 мкл плазмы переносили в пробирки объемом 1,5 мл, замораживали на сухом льду и хранили при -80°C.

После транскардиальной перфузии извлекали мозг и его рассекали пополам. Правое полушарие мозга постфиксировали и помещали в криоформы для дальнейшего иммуногистохимического анализа. Левое полушарие мозга замораживали на сухом льду для дальнейшего анализа.

Мозг подвергали криотомии (12 уровней по 5 срезов для каждого). Затем использовали по 5 срезов от одного животного для количественного иммунофлуоресцентного мечения микроглии (MAC1) и астроцитов (GFAP) в двух областях мозга.

Тестовая система и обоснование тестовой системы

Болезнь Ниманна-Пика типа С (NPC) представляет собой аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, связанное с мутациями в генах NPC1 и NPC2, и она характеризуется накоплением неэтерифицированного холестерина и гликофинголипидов (GSL). Приблизительно 95% случаев болезни Ниманна-Пика типа С вызваны генетическими мутациями в гене NPC1, и называемыми болезнью Ниманна-Пика типа С1; 5% вызваны мутациями в гене NPC2, и называемыми болезнью Ниманна-Пика типа С2. Клинические проявления болезни Ниманна-Пика типов С1 и С2 сходны, поскольку оба соответствующих гена участвуют в выходе липидов, особенно холестерина, из поздних эндосом или лизосом. Ген NPC1 кодирует белок, расположенный в мембранах внутри клетки, и он участвует в перемещении холестерина и липидов внутри клеток. Дефицит этого белка приводит к аномальному накоплению липидов и холестерина в клеточных мембранах. Ген NPC2 кодирует белок, который связывает и транспортирует холестерин. Мыши, гомозиготные по рецессивному аллелю гена НИ с болезнью Нимана-Пика типа С1, обнаруживают двойной дефицит активности сфингомиелиназы и

глюкоцереброзидазы. Мутантные мышцы начинают терять вес и проявляют тремор и атаксическую походку приблизительно в возрасте 7 недель. Потеря веса продолжается, а тремор и атаксия становятся более тяжелыми, и продолжаются до самой смерти в возрасте приблизительно 12–14 недель. Печень и селезенка также увеличены, а клетки Пуркинье в мозжечке сильно истощены. Некоторые из этих признаков у мышей напоминают признаки болезни Ниманна-Пика типа С у людей.

Таблица 5. Сведения об элементах теста

Элемент теста	Определение/значение
Название тестируемого соединения	AZ-3102-00
Номер партии тестируемого соединения	CR-20-02149
Товарное наименование	Неприменимо
Стабильность	Дата повторного тестирования - апрель 2021 года
Состав	Неприменимо
Чистота	99,4%
Молекулярная масса	433,5 г/моль
Дата истечения срока действия	Дата повторного тестирования - апрель 2021 года
Условия хранения (для рецептуры)	Хранение и стабильность в носителе: стабильно хранится в атмосфере азота при комнатной температуре в защищенном от света месте не менее 24 часов; хранится в атмосфере азота в холодильнике (2-8°C) не менее 8 дней; хранится в атмосфере азота в замороженном состоянии в морозильной камере ($\leq -15^{\circ}\text{C}$) по меньшей мере в течение 21 дня (3 недели)
Носитель	Подкисленная вода
Лечебные дозы	1,5 мг/кг (для P11-P25) и 3 мг/кг (для P26-P70)
Путь введения и объем	Через пероральный желудочный зонд, 10 мл/кг
Частота введения	Ежедневное введение в течение 60 дней

Подготовка соединений:

Дозированные препараты разделяли на аликвоты, где это требовалось, чтобы их можно было дозировать в каждом случае введения.

Таблица 6. Сведения о препаратах

Дозируемый препарат	Форма препарата для введения	Процедура	Частота приготовления препаратов	Установленные условия хранения
Тестируемое соединение	Раствор	Препараты (мас./мас.) готовили путем растворения тестируемого соединения в воде <i>Аmpuwa</i> в атмосфере азота	Не реже одного раза в неделю или два раза в неделю, если во время растворения нельзя использовать атмосферу азота	2-8°C в защищенном от света месте

Требуемое количество тестируемого соединения взвешивали и растворяли в воде *Elix* (мас./мас.), и pH доводили до кислого значения. Дополнительные вспомогательные вещества не добавляли.

Не делали никаких поправок на удельный вес испытуемого соединения или чистоту/состав тестируемого соединения.

После приготовления каждой дозы оставшуюся часть раствора замораживали для ее анализа в конце исследования.

Анализ в отношении стабильности, выполненные ранее в связи с разработкой и проверкой метода, показали, что испытуемое соединение стабильно в носителе при приготовлении и хранении в тех же условиях при концентрациях, граничащих с теми, которые использовались в этом исследовании, по меньшей мере в течение 24 часов при комнатной температуре в защищенном от света месте; по меньшей мере в течение 8 дней в холодильнике (2-8°C) и по меньшей мере в течение 3 недель в морозильной камере ($\leq -15^\circ\text{C}$) при концентрациях, близких к тем, которые использовались в настоящем исследовании (от 0,01 до 2 мг/мл).

Обращение с животными

Размещение животных

Животных содержали в индивидуальных вентилируемых клетках на стандартных подстилках для грызунов, поставляемых *Rettenmaier*. В каждой клетке содержали не более

пяти мышей. Температуру в виварии поддерживали в интервале от 20°C до 24°C, а относительную влажность поддерживали в интервале от 45% до 65%. Животных содержали при постоянном световом цикле (12 часов свет/темнота). У животных был неограниченный доступ к сухому гранулированному стандартному корму для грызунов (Altromin), а также к обычной водопроводной воде. Влажный корм давали животным под руководством лечащего ветеринара.

Идентификация животных

Животных нумеровали последовательно классическими обозначениями.

Каждую клетку идентифицировали цветной карточкой с указанием номера исследования, пола, индивидуальных регистрационных номеров (ИРН) животных, даты рождения, а также распределения по группам лечения. Генотип (трансгенный или дикий тип) каждого животного определяли с помощью ПЦР, специфичной для трансгенной конструкции. Каждая мышь была генотипирована с использованием ДНК, выделенной из биопсии уха до начала исследования.

Распределение по группам

В исследование включали животных только с удовлетворительным состоянием здоровья. Рандомизацию распределения по группам проводили для каждой клетки. Животных распределяли по разным исходным группам (когортам), включая животных в группах, получающих лечение. Количество животных в стартовой группе было ограничено, чтобы обеспечить одинаковый возраст животных и одинаковые условия содержания.

Состояние здоровья и наблюдения за клетками с животными

Перед включением животных в исследование оценивали состояние здоровья каждого отдельного животного. Во время исследования проводили ежедневные наблюдения, и регистрировали любые замечания в отношении поведения животных в клетках, о чем немедленно сообщались руководителю исследования и лечащему ветеринару, которые принимали решение о дальнейших действиях (например, об эвтаназии).

Массу тела и состояние здоровья животных регистрировали ежедневно в течение первой недели, а затем один раз в неделю.

Преждевременное прекращение эксперимента и гуманные конечные точки

Ни одно животное не было подвергнуто преждевременной эвтаназии.

Материалы и методы

Животные

Линия мышей	NPС(-/-)
-------------	----------

Поставщик:	QPS Austria GmbH, Грамбах, Австрия
Возраст на момент начала эксперимента:	От 11-го дня после рождения (P11) до 70-го дня после рождения (P70)
Пол:	Смешанный
Количество животных:	30 NPC(-/-); 4 NPC(+/-); 4 NPC(+/+)

Уход за животными

24 мыши NPC1(-/-) (группы D - I) получали AZ-3102-00 через пероральный желудочный зонд (10 мл/кг) с 11-го дня после рождения (P11) до 70-го дня после рождения (P70). Дозировка начиналась с 1,5 мг/кг в период с P11 по P25, а затем в период с P26 до P70 вводили 3 мг/кг. Контрольные мыши включали: 6 мышей NPC1(-/-) и 4 мыши NPC(+/-), получавших носитель, и 4 мыши NPC (+/+), получавших AZ-3102-00 (группы А - С).

После последнего введения в день P70 мышью NPC(-/-) (n=4 для каждого момента времени; группы D - I) подвергали эвтаназии внутрибрюшинной инъекцией 600 мг/кг пентобарбитала в следующие моменты времени: 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 8 часов и 24 часа. Контрольных мышей (группы А, В и С) также умерщвляли после последнего дозирования (не критично по времени).

Таблица 7: Описание групп животных, получавших лечения

Группа	Животные	Пол в группе	Путь введения	Вводимое соединение	Концентрация (а)	n
A	NPC(-/-)	Смешанный	П/О	Носитель	NA	6
B	NPC(+/-)	Смешанный	П/О	Носитель	NA	4
C	NPC(+/+)	Смешанный	П/О	AZ-3102-00	Доза 1 и 3 мг/кг	4
D	NPC(-/-)	Смешанный	П/О	AZ-3102-00	Доза 1 и 3 мг/кг	4
E	NPC(-/-)	Смешанный	П/О	AZ-3102-00	Доза 1 и 3 мг/кг	4
F	NPC(-/-)	Смешанный	П/О	AZ-3102-00	Доза 1 и 3 мг/кг	4

G	NPC(-/-)	Смешанный	П/О	AZ-3102-00	Доза 1 и 3 мг/кг	4
H	NPC(-/-)	Смешанный	П/О	AZ-3102-00	Доза 1 и 3 мг/кг	4
I	NPC(-/-)	Смешанный	П/О	AZ-3102-00	Доза 1 и 3 мг/кг	4
<p>^(a) мыши получали 1 мг/кг в течение P11-P25, а затем 3 мг/кг в течение P26-P70</p> <p>П/О - пероральное введение</p> <p>NA - неприменимо</p>						

Отбор проб тканей

После последнего введения в день P70 мышей подвергали эвтаназии внутрибрюшинной инъекцией: через 30 минут (группа D), через 1 час (+/- 5 минут, группа E), через 2 часа (+/- 5 минут, группа F), через 4 часа (+/- 5 минут, группа G), через 8 часов (+/- 5 минут, группа H) и через 24 часа (+/- 5 минут, группа I) (все времена критичны).

6 мышей NPC1(-/-) из группы A, 4 мыши NPC(+/-) из группы B и 4 мыши NPC(+/+) из группы C служили в качестве контроля, и они также были подвергнуты эвтаназии в день P70 (приблизительно через 2 часа после последнего введения).

Мышей перед эвтаназией анестезировали внутрибрюшинной инъекцией пентобарбитала (600 мг/кг, доза 10 мкл/грамм массы тела).

Отбор проб крови

Вскрывали грудную клетку мышей и собирали кровь путем пункции сердца иглой 23 калибра. Иглу удаляли, и кровь переносили в пробирку для проб (MiniCollect® K2EDTA (калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты)). Пробирку тщательно переворачивали, чтобы облегчить равномерное распределение ЭДТА и предотвратить свертывание. Образцы крови центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут при комнатной температуре (22°C). Аликвоты плазмы объемом 50 мкл переносили в предварительно меченые LoBind 1,5-мл пробирки Эппендорфа, замороженные на сухом льду, и хранили при -80°C.

Перфузия

Затем животных подвергали транскардиальной перфузии с использованием 0,9% физиологического раствора. С этой целью иглу 23-го калибра, соединенную с флаконом с 0,9% физиологическим раствором, вводили в левый желудочек. Грудную аорту между легкими и печенью пережимали кровоостанавливающими щипцами, чтобы блокировать кровоток от сердца к брюшной полости, но позволяя крови течь к мозгу. Правый

желудочек вскрывали ножницами. Поддерживали постоянное давление перфузионного раствора от 100 до 120 мм рт. ст. путем подсоединения флакона с раствором к воздушному компрессору с манометрическим управлением. Перфузию продолжали до тех пор, пока поверхность черепа не становилась белой, и из правого желудочка выходил только перфузионный раствор вместо крови.

Отбор проб мозга

После перфузии вскрывали череп, осторожно удаляли мозг и рассекали его пополам на охлажденной поверхности. Левое полушарие взвешивали, быстро замораживали на сухом льду и хранили при -80°C . Правое полушарие фиксировали погружением в 4% раствор параформальдегида в фосфатном буфере (pH 7,4) на 2 часа при комнатной температуре.

Гистология

Подготовка ткани

Правое полушарие мозга мышей фиксировали погружением в свежеприготовленный 4% раствор параформальдегида в PB (pH 7,4) на два часа при комнатной температуре. После этого полушария переносили в 15% раствор сахарозы/PBS и хранили при 4°C до погружения в среду для криозащиты. Затем блоки ткани обрезали по мере необходимости, переносили в криоформы, заливали среду OCT, замораживали в изопентане, охлаждаемом сухим льдом, и хранили в морозильной камере сверхглубокого охлаждения (целевая температура -80°C).

Получение срезов

На криотоме Leica получали пять последовательных криосрезов толщиной 10 мкм в сагиттальном направлении. Следующие 25 срезов для каждого уровня отбрасывали. Эту схему получения срезов повторяли для 12 уровней, и она могла быть изменена для получения срезов с правильных уровней, например, если мозг был меньше из-за молодого возраста или генотипа. Всего получали $12 \times 5 = 60$ срезов. Уровни для срезов выбирали в соответствии с атласом мозга (Paxinos and Franklin «The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates», 2nd edition, 2001). Сбор срезов начинали на уровне $\sim 0,2$ мм латеральнее средней линии и затем продолжали через полушарие, чтобы обеспечить систематическую случайную выборку, охватывающую целевые области (см. Фигуру 10 и Фигуру 15). Срезы хранили при -20°C . В результате были получены срезы почти всего головного мозга, и после сбора всех срезов блок остаточной ткани утилизировали.

Иммунофлуоресценция Exr3531 (Кальбиндин-D28k)

Для каждой инкубации отбирали однородный систематический случайный набор из пяти срезов от одной мыши (по одному срезу на уровнях 2, 4, 6, 8, 10); для получения

информации о систематической случайной выборке см. ссылку:
<http://www.stereology.info/sampling/>.

Все указанные ниже стадии выполняли в забуференном фосфатом физиологическом растворе Дульбекко с pH 7,2-7,8 (PBS) при комнатной температуре, если не указано иное:

1. криосрезы высушивали на воздухе в течение 45 минут и промывали в PBS 10 минут;

2. неспецифическое связывание блокировали за счет 10% нормальной ослиной сыворотки (Jackson Immuno Research) в 0,1% растворе TritonX-100/PBS в течение 60 минут во влажной камере;

3. каждый срез промывали 3 x 5 минут в PBS;

4. срезы инкубировали с первичными антителами в 1% нормальной ослиной сыворотке/PBS в течение ночи при 4°C во влажной камере;

- использовали поликлональное антитело морской свинки к Calbindin-D28k (Synaptic Systems, 214005) в разведении 1:1000;

5. каждый срез промывали 3 x 5 минут в PBS;

6. срезы инкубировали с вторичными антителами в 1% нормальной ослиной сыворотке/PBS в течение 60 минут во влажной камере (с защитой от света);

- использовали Cy3-конъюгированное вторичное ослиное антитело к антителам морской свинки (H+L), (Jackson ImmunoResearch, 706-165-148) в разведении 1:500;

7. каждый срез промывали 3 x 5 минут в PBS (с защитой от света);

8. срезы инкубировали с рабочим раствором DAPI в течение 15 минут (с защитой от света)

9. срезы промывали 2 x 5 минут в PBS (с защитой от света);

10. срезы промывали 5 минут в ddH₂O (с защитой от света);

11. срезы покрывали слоем Mowiol и покровными стеклами (с защитой от света).

Визуализация

Полные сканы окрашенных срезов регистрировали с помощью автоматического микроскопа Zeiss AxioScan Z1 с объективами с высокой апертурой, оснащенного монохромной камерой Zeiss Axioscam 506 и камерой Hitachi 3CCD HV-F202SCL, и с использованием программного обеспечения Zeiss ZEN 2.3.

Количественная оценка

Анализ изображений выполняли с помощью программного обеспечения Image Pro 10 (Media Cybernetics). В начале на изображениях определяли целевые области (мозжечок и гиппокамп или мозолистое тело и полосатое тело) путем обрисовки областей интереса

(ROI). Дополнительно из ROI исключали морщины, пузырьки воздуха или любые другие артефакты, мешающие измерению. После этого количественно оценивали иммунофлуоресценцию в пределах идентифицированных участков.

Для количественного определения при необходимости использовали коррекцию фона и выявляли иммунореактивные объекты с помощью адекватной пороговой и морфологической фильтрации (по размеру и форме). Затем количественно определяли различные характеристики объекта, включая процент совокупной площади объекта на основе размера ROI (иммунореактивная площадь - это наиболее полный параметр, указывающий на наличие различий в иммунореактивности), количество объектов, нормализованных к размеру ROI (плотность объектов), среднюю интенсивность сигнала выявленных объектов (средняя интенсивность указывает на наличие различий в уровне клеточной экспрессии белков-мишеней) и размеры надпороговых объектов. После того как определены параметры целевых объектов в тестовом прогоне, то количественный анализ изображения запускается автоматически, поэтому результаты не зависят от оператора и они полностью воспроизводимы.

Необработанные данные систематизировали с использованием программы Excel, а затем их анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism для статистического анализа и подготовки графиков. Графики, полученные с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, являются частью отчета об исследовании, а таблицы с необработанными данными прилагаются к окончательному отчету после выполнения проверок качества.

Измерение AZ-3102 и глюкозилцерамида в плазме и мозговой ткани мышей

Сначала из образцов плазмы осаждали белки раствором ацетонитрил/ультрачистая вода/метанол (90:5:5), содержащим 500 нМ внутреннего стандарта глюкозилцерамида C17:0 (GlcCer C17:0) и 0,1% муравьиной кислоты. После перемешивания в течение 5 минут при комнатной температуре образцы центрифугировали (5 минут, 13000 об/мин, 20°C), и 50 мкл супернатантов переносили в силиконизированный 96-луночный планшет МТР.

Ткани головного мозга гомогенизировали в растворе ультрачистой воды с метанолом (1:1) с добавкой 0,1% муравьиной кислоты (4 мл на каждый грамм ткани) с использованием гомогенизатора FastPrep 24™ Microtube. Затем для осаждения белка гомогенаты тканей смешивали с раствором ацетонитрил/ультрачистая вода/метанол (90:5:5), содержащим 500 нМ GlcCer C17:0 и 0,1% муравьиной кислоты. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре образцы центрифугировали (5 минут,

13000 об/мин, 20°C), и 50 мкл супернатантов переносили в силиконизированный 96-луночный планшет МТР.

Измерения AZ-3102

Сначала для осаждения белка смешивали образцы плазмы с раствором ацетонитрила, содержащим 50 нг /мл AZ-3101 (внутренний стандарт). После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре образцы центрифугировали (5 минут, 13000 об/мин, 4°C), и супернатанты разбавляли в 10 раз ультрачистой водой с 0,1% муравьиной кислоты.

Ткани головного мозга гомогенизировали в растворе ультрачистой воды с метанолом (1:1) с добавкой 0,1% муравьиной кислоты (4 мл на каждый грамм ткани) с использованием гомогенизатора FastPrep 24™ Microtube (MP Biomedicals, США). Для осаждения белков гомогенаты мозга смешивали с раствором ацетонитрила, содержащим 10 нг /мл AZ-3101 (внутренний стандарт). После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре образцы центрифугировали (5 минут, 13000 об/мин, 4°C), и супернатанты разбавляли в 10 раз ультрачистой водой с 0,1% муравьиной кислоты.

Разбавленные супернатанты плазмы и ткани головного мозга вводили в систему жидкостной хроматографии Agilent LC (Agilent, США) с помощью автоматического инжектора образцов (SIL-30, Shimadzu, США). Аналиты разделяли методом жидкостной хроматографии с использованием линейного градиента подвижной фазы В при скорости потока 0,800 мл/мин на обращенно-фазовой колонке XBridge ВЕН С8 (2,1*50 мм, размер частиц 2,5 мкм; Waters, США) при температуре 40°C. Подвижная фаза А состояла из ультрачистой воды с добавкой 0,1% муравьиной кислоты. Подвижная фаза В представляла собой ацетонитрил с добавкой 0,1% муравьиной кислоты.

Регистрацию осуществляли в режиме положительной ионизации с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра API 5500 (AB Sciex, США), оснащенного интерфейсом Turbo Ion Spray. Данные нормировали и количественно оценивали с использованием программного обеспечения для анализа данных Analyst™ (AB Sciex, версия 1.6.3). Нижний предел количественного обнаружения (LLOQ) для AZ-3102 составил 0,2 нг/мл в образцах плазмы и 2 нг/г ткани головного мозга, соответственно.

Измерение глюкозилцерамида

Сначала из образцов плазмы осаждали белок раствором ацетонитрил/ультрачистая вода/метанол (90:5:5), содержащим в качестве внутреннего стандарта 500 нМ глюкозилцерамида C17:0 (GlcCer C17:0) и 0,1% муравьиной кислоты. После перемешивания в течение 5 минут при комнатной температуре образцы

центрифугировали (5 минут, 13000 об/мин, 20°C), и 50 мкл супернатантов переносили в силиконизированный 96-луночный планшет МТР.

Ткани головного мозга гомогенизировали в растворе ультрачистая вода/метанол (1:1) с добавкой 0,1% муравьиной кислоты (4 мл на каждый грамм ткани) с использованием гомогенизатора FastPrep 24™ Microtube. Затем для осаждения белка гомогенаты тканей смешивали с раствором ацетонитрил/ультрачистая вода/метанол (90:5:5), содержащим 500 нМ GlcCer C17:0 и 0,1% муравьиной кислоты. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре образцы центрифугировали (5 минут, 13000 об/мин, 20°C), и 50 мкл супернатантов переносили в силиконизированный 96-луночный планшет МТР.

Концентрации глюкозилцерамида C16:0 (GlcCer C16:0), глюкозилцерамида C18:0 (GlcCer C18:0) и глюкозилцерамида C24:1 (GlcCer C24:1) в образцах головного мозга количественно определяли с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Супернатанты анализировали с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС с использованием колонки HALO HILIC (150*4,6 мм, 2,7 мкм) от Advanced Materials Technology для различения изомеров галактозил- и глюкозилцерамидов. Данные МС/МС получали в режиме положительной ионизации с использованием тройного квадруполя API 4000 (Applied Biosystems, США), с интерфейсом Turbo Ion Spray. Анализ GlcCer C16:0 и GlcCer C18:0 проводили с использованием градиента с подвижной фазой А: 5 мМ ацетата аммония в растворе 94,5% ацетонитрила, 2,5% метанола, 2,5% ультрачистой воды и 0,5% муравьиной кислоты, и с подвижной фазой В: сверхчистая вода и 0,1% муравьиной кислоты. LLOQ в образцах головного мозга для GlcCer 16:0, GlcCer 18:0 и GlcCer 24:1 составлял 25,1, 250 и 381,5 пмоль на грамм ткани, соответственно.

Статистика

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9. Данные представляли в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего (SEM) или среднего значения + стандартная ошибка среднего.

Данные *in vivo*: Различия между группами проверяли с помощью двустороннего анализа ANOVA для повторных измерений с последующим апостериорным анализом Бонферрони или Даннетта.

Гистология: Распределение данных нельзя было проверить из-за низкого значения *n*, и поэтому предполагали наличие нормального распределения. Различия между группами проверяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим

апостериорным анализом Даннетта. Группу А (мышь NPC^{-/-}, получавшие носитель) использовали в качестве контрольной группы для попарных сравнений.

Полученные результаты

Масса тела

На Фигуре 11 показано процентное изменение массы тела между днем PND 11 и 9-ой неделей. График представляет изменение массы тела [г] в каждой группе, при ежедневных измерениях в течение первой недели лечения, а затем один раз в неделю.

Полученные результаты показывают, что общее состояние здоровья животных, о чем свидетельствует средний процент прироста массы тела, не ухудшалось под действием AZ-3102, и мыши NPC^(-/-) обоих полов, получавших AZ-3102, прибавляли в весе больше, чем мыши NPC^(-/-) не получавшие лечения.

Фармакокинетика

Таблица 8. Соотношения при действии AZ-3102 на мозг: показатели в плазме после регулярного перорального введения в дни PND 11-70.

Параметр	Мозг: показатели в плазме	
	Самцы	Самки
AUC ₀₋₂₄	0,95	1,37
Stax	0,26	0,41

Уровни глюкозилцерамида

На Фигуре 12 показаны уровни глюкозилцерамида C16:0 и C18:0 после регулярного перорального введения в дни PND 11-70.

У мышей, получавших AZ-3102, наблюдали повышенные уровни глюкозилцерамида C16:0 и C18:0 в головном мозге.

Клинические признаки

Определения клинических показателей и гуманных конечных точек

Клинические признаки отслеживали ежедневно, начиная с дня P45 до конца исследования (в соответствии со схемой, приведенной ниже в Таблице 9). Регистрировали параметры «потеря массы тела», «общее состояние здоровья», «клинические данные» и «линия поведения», и их оценивали по бальной шкале. Для общей оценки использовали сумму баллов.

Таблица 9. Таблица оценки клинических признаков

Эксперимент №:		Линия: NPC1			Дата:		Время:			Экспериментатор (имя/инициалы):								
Которта	Груша	ИРН	Потеря массы тела		Общее здоровье/активность					Клинические данные				Линия поведения				
			Без изменений или прибавка в весе	Изменение <5%	Потеря массы тела 5-10%	Потеря массы тела 11-20%	Потеря массы тела 20%	Гладкая и блестящая шерсть, нормальная активность	Жесткая шерсть, мутные глаза	Небольшие раны, грязный волосяной покров, умеренная степень пролапса, неправильная осанка, сниженная активность	Влажные запущенные отверстия, обезвоживание, сторбленная поза, высокий уровень пролапса, изоляция (сильное снижение активности)	Нормальная температура и дыхание	Небольшое отклонение от нормы	Чувство холода у животного, большее чем обычно, холодные конечности, учащенное поверхностное дыхание	Умеренное отклонение температуры или дыхания, увеличение живота	Сильное отклонение температуры или дыхания (тяжелое затрудненное дыхание)	Наличие установочного рефлекса, нормальные движения	Небольшое нарушение координации, легкий умеренный тремор
Баллы	0	1	5	10	20	0	1	5	10	20	0	1	5	10	20	СУММА БАЛЛОВ		Примечания (указать клинические признаки*)

* Отметка в разделе «Примечания» (отклонения от следующих критериев клинического обследования или симптомов)

a: потеря массы тела	c: подвижность	e: поверхность меха/кожи	g: живот	i: поведение /активность
b: осанка	d: глаза	f: обезвоживание	h: дыхание	k: температура
m: тремор	o: выпадение прямой кишки	p: пролапс половых органов	s: конкретное исследование	

Оценка, результат	Сумма баллов
Уровень стресса 0 = нет стресса	0
Уровень стресса 1 = легкий уровень стресса, за которым следует внимательно следить	1-9
Уровень стресса 2 = средний уровень стресса, ветеринар должен быть проинформирован	10-19
Уровень стресса 3 = высокий уровень стресса, ветеринарный врач и руководитель исследования должны быть проинформированы, ветеринарная помощь или даже эвтаназия, если требуется	20 или больше

Таблица 10. Оценка тремора.

Оценка тремора	Описание <i>(Тремор у животного наблюдается при ручном наклоне клетки и/или при открытии клетки под рабочим столом)</i>
Индивидуальная оценка линии поведения = 1 «небольшое нарушение координации, легкий-умеренный тремор»:	Животное еще может ходить по прямой линии. У животного легкие нарушения походки (шатающаяся походка и легкий тремор).
Индивидуальная оценка линии поведения = 5 «высокий уровень тремора, некоординированные движения»:	Животное часто не может ходить по прямой линии при перемещении по клетке и имеет более отчетливое нарушение походки, чем при оценке = 1. Из-за сильного тремора и потери координации животное иногда падает.
Индивидуальная оценка линии поведения = 10 «снижение рефлекса восстановления»:	У животного проявляются те же симптомы, которые описаны для оценки = 5. Кроме того, животному требуется несколько секунд (приблизительно не менее 2-3 секунд), чтобы принять лежачее положение на груди после того, как исследователь перевернул его на спину.

На Фигуре 13 показаны обобщенные результаты общих оценок клинических признаков для каждой мыши в период PND 56-70 по всем группам показателей и для всех групп животных NPC(-/-), получавших носитель и AZ-3102. Слева: общие баллы для животных и по группам лечения, визуализированные с помощью градиента: более низкие баллы отмечены зеленым цветом, а более высокие баллы отмечены красным цветом. Правая сторона: баллы, выраженные численными показателями. Пороговые баллы, превышающие значение 7, редко встречаются в группах животных, получавших лечение; тем не менее, группы, не получавшие лечение, имели более высокие общие баллы в ходе исследования.

Результаты показывают, что у мышей NPC(-/-), получавших носитель, наблюдали ухудшение (большие баллы) общих клинических признаков по сравнению с животными NPC(-/-), получавшими AZ-3102. Это также показано на Фигуре 13: правая сторона, на

которой баллы, например, превышающие 8, чаще наблюдались в группе животных NPC(-/-), получавших носитель, по сравнению с животными NPC(-/-), получавшими AZ-3102. Исследуя эти показатели, авторы изобретения установили, что появление, продолжительность и интенсивность тремора также уменьшались при лечении животных с использованием AZ-3102 (Фигура 14). Высокий уровень тремора наблюдали у всех животных NPC(-/-), получавших носитель, кроме одной мыши, тогда как AZ-3102 по существу устранил этот высокий уровень тремора у всех животных, кроме одной мыши, из 24 протестированных животных.

На Фигуре 14 показана оценка тремора в дни 56-70 после рождения (PND 56-70) у мышей NPC(-/-), получавших носитель и AZ-3102. Розовые (=светло-серые) столбцы отражают появление и продолжительность сильного тремора (5 баллов); тогда как зеленые (= темно-серые) столбцы отражают появление и продолжительность легкого или умеренного тремора. За исключением одной мыши в группе, не получавшей лечения, все остальные животные показали высокий уровень тремора (у 4 из 5 мышей). Напротив, только у одной мыши в группе, получавшей AZ-3102, был высокий уровень тремора (у 1 из 24). Оценки тремора: 0: нет тремора; 1: легкое нарушение координации, легкий-умеренный тремор; 5: высокий уровень тремора, некоординированные движения; 10: снижение рефлекса восстановления (такой оценки не было ни у одного животного).

Гистологические результаты

Определение целевых областей

Целевые области отмечали вручную, определяя область интереса (ROI) для последующего количественного анализа с флуоресцентным мечением.

Показатели для количественного анализа

В таблице, приведенной ниже, представлены четыре стандартных показателя.

- **Размер области [мм²]:** Этот показатель характеризует среднюю площадь участка мозга, охватываемого целевой областью. Этот показатель важен для проверки правильности отбора проб. Также полезно идентифицировать атрофию головного мозга, которая является частью фенотипа некоторых животных моделей.

- **Иммунореактивная область [%]:** процент области интереса, которая покрыта надпороговыми иммунореактивными объектами (например: соматы клеток, нейриты, бляшки); это наиболее полный показатель, указывающий на наличие общих различий в иммунореактивности.

- Плотность объектов [количество объектов на мм^2]: количество надпороговых иммунореактивных объектов, нормированное к размеру целевой области; этот показатель особенно полезен для обнаружения изменений в плотности нейронов.

- Яркость объекта [a.u.]: средняя яркость пикселей надпороговых иммунореактивных объектов; этот показатель указывает на наличие различий в уровне клеточной экспрессии белков-мишеней.

- Размер объекта [$\mu\text{км}^2$]: размер надпороговых иммунореактивных объектов; этот показатель полезен для обнаружения различий в активации микроглии или роста бляшек.

Кальбиндин-D28k

Иммунофлуоресценцию кальбиндина-D28k регистрировали с помощью поликлональных антител морской свинки, и сигнал количественно определяли в мозжечке и гиппокампе. Мыши NCP(-/-) показали значительно сниженные уровни кальбиндина-D28k по сравнению с мышами NCP(+/-) и NPC(+/+). Лечение тестируемым соединением значительно увеличивало уровни кальбиндина-D28k в мозжечке во всех группах. Все эффекты являются регион-специфическими, поскольку в гиппокампе мышей в различных группах не было обнаружено существенных различий.

На Фигуре 16 показаны результаты иммуногистохимии головного мозга: мечение кальбиндином-D28k у мышей NCP(-/-) и NPC(+/-), получавших носитель, по сравнению с мышами NPC(+/, мыши дикого типа) и NPC(-/-), получавшими лечение. На графиках представлены средние значения иммунофлуоресцентного сигнала, измеренного в пределах ROI в 5 срезах мозга мыши ($n = 2-4$ на группу). Данные анализировали с помощью однофакторного анализа ANOVA и апостериорного критерия Даннета. Интервалы на гистограмме представляют собой средние показания для группы + SEM. * значение $P: <0,001$.

Применяя иммуногистологические методы с использованием кальбиндин-D28k в качестве маркера для клеток Пуркинье, авторы изобретения обнаружили, что обработка AZ-3102, по сравнению с мышами NPC(-/-), получавшими носитель, значительно ограничивала потерю клеток Пуркинье в мозжечке (Фигура 16).

Выводы

AZ-3102 представляет собой новое низкомолекулярное соединение для перорального применения, разработанное для лечения различных лизосомных нарушений накопления. Уникальный механизм действия AZ-3102 заключается в его высокой эффективности в отношении глюкозилцерамидсинтазы (GCS), нелизосомальной

глюкозилцереброзидазы (GbA2), а также в отношении ее свойств по прониканию в мозг свойства. AZ-3102 исследовали на мышинной модели болезни Нимана-Пика типа С [1,2] в которой мыши NPC, гомозиготные по рецессивному аллелю гена NIN, начинают терять массу тела, проявляют тремор и атаксическую походку приблизительно в возрасте 7 недель [3]. Тяжесть заболевания связана со значительной потерей мозжечком клеток Пуркинье, и клинические признаки ухудшаются до тех пор, пока не будет достигнута гуманная конечная точка (обычно в возрасте 12–14 недель) [3]. В этом исследовании авторы настоящего изобретения исследовали эффективность ежедневного перорального введения AZ-3102 с 11-го по 70-й день после рождения (PND) для мышей NPC(-/-), NPC(-/+), и WT (NPC(+/+); Valb/c) для оценки фармакокинетических (ФК) свойств AZ-3102, его способности модулировать глюкозилцерамид (GlcCer C16:0, GlcCer C18:0) и улучшать клинические признаки заболевания. Кроме того, авторы настоящего изобретения также исследовали влияние лечения на иммуногистохимический маркер клеток Пуркинье, которые коррелируют с тяжестью невропатологии. После регулярного ежедневного перорального введения AZ-3102 в дни PND 11-70 общее состояние здоровья животных не ухудшалось, о чем свидетельствует средний процент прироста массы тела, и мыши NPC(-/-) обоих полов, получавших AZ-3102, прибавляли в весе больше, чем животные NPC(-/-), не получавшие лечения (Фигура 11). AZ-3102 оказал высокое воздействие на мозг: см. показатели для плазмы (Таблица 8). В соответствии с целевым воздействием AZ-3102, имело место увеличение количества видов GlcCer, измеренное в гомогенатах цельного мозга, по сравнению с животными, получавшими носитель: более чем в 2 раза для GlcCer 16:0 и приблизительно в 9 раз для GlcCer 18:0. Эти два вида GlcCer, вероятно, являются представителями других видов GlcCer, которые также будут реагировать на действие AZ-3102. Чтобы оценить, достигает ли AZ-3102 достаточных концентраций в мозге, чтобы воздействовать на более специфические признаки, характеризующие общее состояние здоровья и невропатологий, оценивали различные клинические признаки (Таблица 9). Баллы, суммированные за весь период наблюдения, дают картину состояния здоровья в период PND 56-70. На Фигуре 13 представлено графическое изображение результатов оценки состояния каждого животного в наблюдаемой когорте в течение времени. На этой фигуре видно, что у мышей NPC(-/-), получавших носитель, наблюдалось ухудшение общих клинических признаков (большие баллы) по сравнению с животными NPC(-/-), получавшими AZ-3102. Количественная оценка дополнительно иллюстрирует (Фигура 13: правая сторона), что более высокие баллы, например, более 8, чаще наблюдались в группе мышей NPC(-/-), получавших носитель, по сравнению с группой мышей NPC(-/-), получавших AZ-3102. Исследуя эти показатели, авторы настоящего изобретения

установили, что возникновение, продолжительность, а также интенсивность тремора также уменьшались при лечении AZ-3102 (Фигура 14). Высокий уровень тремора наблюдался у всех животных NPC(-/-), получавших носитель, кроме одной мыши; тогда как AZ-3102 по существу устранил этот высокий уровень тремора у всех из 24 протестированных животных, кроме одной мыши. Применяя иммуногистологические методы с использованием кальбиндина-D28k, маркера для клеток Пуркинье, авторы настоящего изобретения установили, что обработка AZ-3102 по сравнению с мышами NPC(-/-), получавшими носитель, значительно ограничивала потерю клеток Пуркинье в мозжечке (Фигура 16). Это открытие имеет отношение к клинике болезни Ниманна-Пика типа С у человека, поскольку гибель нейронов и, в частности, клеток Пуркинье, а также церебральная атрофия являются отличительными признаками этого заболевания [4]. Поскольку функция мозжечка важна для движения, то улучшение клинических признаков и значительное снижение высокого уровня тремора являются, вероятно, результатом выживания клеток Пуркинье в мозжечке.

Таким образом, AZ-3102, перорально доступный высокоэффективный ингибитор (на уровне нМ) GCS и GbA2, способен проникать в мозг животных NPC(-/-) и дикого типа. Кроме того, AZ-3102 ингибировал эти ферменты в головном мозге, что ясно следует из результатов модуляции видов GlcCer, улучшая клинические признаки, значительно снижая высокий уровень тремора и ограничивая потерю клеток Пуркинье в мозжечке, по сравнению с животными, получавшими носитель.

1. Loftus, S.K., et al., Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science*, 1997. 277(5323): p. 232-5.

2. Zervas, M., K. Dobrenis, and S.U. Walkley, Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001. 60(1): p. 49-64.

3. Santiago-Mujica, E., et al., Hepatic and neuronal phenotype of NPC1^{-/-} mice. *Heliyon*, 2019. 5(3).

4. Vanier, M.T., Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2010. 5(1): p. 16.

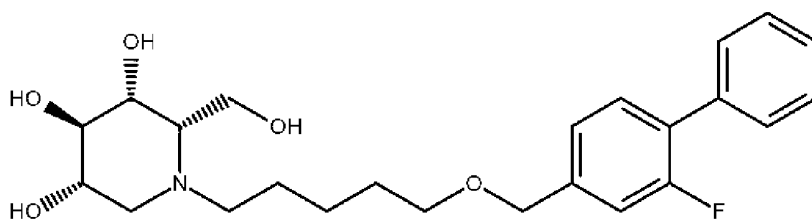
Пример 5. Эффект введения кристаллической формы соединения (I) мышам, страдающим болезнью Сандхоффа (нарушение гена Hexb у мышей [Hexb(-/-)] посредством мутаций)

Мышам с болезнью Сандхоффа вводили терапевтически эффективное количество соединения AZ-3102. Полученные первичные результаты показывают, что, как и в случае

лечения болезни Ниманна-Пика типа С, клинические признаки у больных животных улучшились.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая форма соединения (I),



(I).

2. Кристаллическая форма по п.1, где кристаллическая форма представляет собой кристаллическое свободное основание.

3. Кристаллическая форма по п. 1 или 2, где кристаллическая форма характеризуется отражением, выраженным как значение 2θ , при $17,8 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, при этом отражение при $17,8 \pm 0,2^\circ$ является одним из четырех наиболее сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

4. Кристаллическая форма по п.3, дополнительно характеризующаяся одним или более отражений, выраженных как значение 2θ , при одном или более углов из $4,1 \pm 0,2^\circ$, $8,3 \pm 0,2^\circ$, $12,4 \pm 0,2^\circ$, $13,6 \pm 0,2^\circ$, $14,5 \pm 0,2^\circ$, $14,9 \pm 0,2^\circ$, $15,2 \pm 0,2^\circ$, $17,2 \pm 0,2^\circ$, $19,3 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$, $22,4 \pm 0,2^\circ$, $22,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,3 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

5. Кристаллическая форма по любому из пп. 1-4:

а) имеющая температуру плавления от 89°C до 96°C ; и/или

(b) кристаллическая форма практически негигроскопична.

6. Кристаллическая форма по п. 1 или 2, где кристаллическая форма характеризуется отражением, выраженным как значение 2θ , при $16,9 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, при этом отражение при $16,9 \pm 0,2^\circ$ является одним из четырех наиболее сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме, и кристаллическая форма необязательно дополнительно характеризуется одним или несколькими отражениями, выраженными как значение 2θ , при одном или более углов из $15,2 \pm 0,2^\circ$, $16,1 \pm 0,2^\circ$, $16,5 \pm 0,2^\circ$, $18,9 \pm 0,2^\circ$, $23,1 \pm 0,2^\circ$, $25,5 \pm 0,2^\circ$, $27,7 \pm 0,2^\circ$ и $28,5 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую форму по любому из пп. 1-6.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где фармацевтическая композиция содержится в капсуле, и при этом фармацевтическая композиция необязательно содержится в капсуле:

- (a) без каких-либо других ингредиентов; или
- (b) по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем.

9. Кристаллическая форма по любому из пп. 1-6 или фармацевтическая композиция по п. 7 или 8 для применения в терапии.

10. Кристаллическая форма по любому из пп. 1-6 или фармацевтическая композиция по п. 7 или 8 для применения в качестве лекарственного средства.

11. Кристаллическая форма по любому из пп. 1-6 или фармацевтическая композиция по п. 7 или 8 для применения при лечении заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов, при котором заболевание необязательно связано с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или с повышенными уровнями гликосфинголипидов, и заболевание представляет собой лизосомальную болезнь накопления, такую как болезнь Гоше, болезнь Фабри, ганглиозидозы GM1, ганглиозидозы GM2 (такие как болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа или вариант АВ), сиалидоз, заболевание Ниманна-Пика типа С и синдром миоклонуса движения-почечной недостаточности, или симптом одного из заболеваний, которые в совокупности классифицируются как метаболический синдром, например, ожирение, резистентность к инсулину, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, поликистоз почек, диабет типа II и хроническое воспаление или нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви или атеросклероз.

12. Способ получения кристаллической формы по любому из пп. 1-6, предусматривающий приведение в контакт образца соединения (I) с растворителем, и при этом необязательно:

- (a) растворитель выбирают из ацетонитрила, этилацетата, изопропанола, анизола, воды и трет-бутилметилового эфира (ТВМЕ); и/или
- (b) образец соединения (I) очищают перед приведением в контакт образца соединения (I) с растворителем, при этом образец соединения (I) необязательно очищают с помощью хроматографии.

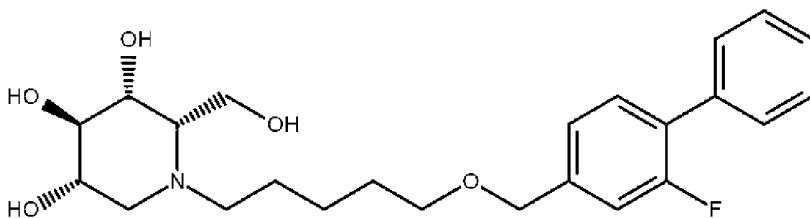
13. Кристаллическая форма соединения (I), полученная в результате осуществления способа по п. 12.

14. Применение свободного основания соединения (I) для получения кристаллической формы.

15. Способ получения кристаллической формы соединения (I), предусматривающий кристаллизацию свободного основания соединения (I).

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДСТАВЛЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ

1. Кристаллическая форма соединения (I),



(I),

где кристаллическая форма характеризуется отражением, выраженным как значение 2θ , при $17,8 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме, при этом отражение при $17,8 \pm 0,2^\circ$ является одним из четырех наиболее сильных отражений на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

2. Кристаллическая форма по п.1, дополнительно характеризующаяся одним или более отражений, выраженных как значение 2θ , при одном или более углов из $4,1 \pm 0,2^\circ$, $8,3 \pm 0,2^\circ$, $12,4 \pm 0,2^\circ$, $13,6 \pm 0,2^\circ$, $14,5 \pm 0,2^\circ$, $14,9 \pm 0,2^\circ$, $15,2 \pm 0,2^\circ$, $17,2 \pm 0,2^\circ$, $19,3 \pm 0,2^\circ$, $21,2 \pm 0,2^\circ$, $22,4 \pm 0,2^\circ$, $22,9 \pm 0,2^\circ$ и $23,3 \pm 0,2^\circ$ на порошковой рентгеновской дифрактограмме.

3. Кристаллическая форма по п. 1 или 2:

а) имеющая температуру плавления от 89°C до 96°C ; и/или

(b) кристаллическая форма практически негигроскопична.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую форму по любому из пп. 1-3.

5. Фармацевтическая композиция по п.4, где фармацевтическая композиция содержится в капсуле.

6. Фармацевтическая композиция по п.5, где фармацевтическая композиция содержится в капсуле:

(a) без каких-либо других ингредиентов; или

(b) по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем.

7. Применение кристаллической формы по любому из пп. 1-3 или фармацевтической композиции по любому из пп. 4-6 в терапии.

8. Применение кристаллической формы по любому из пп. 1-3 или фармацевтической композиции по любому из пп. 4-6 в качестве лекарственного средства.

9. Применение кристаллической формы по любому из пп. 1-3 или фармацевтической композиции по любому из пп. 4-6 при лечении заболевания, связанного с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или повышенными уровнями гликофинголипидов.

10. Применение по п.9, где заболевание, связанное с аномальными уровнями глюкозилцерамида и/или повышенными уровнями гликофинголипидов, представляет собой лизосомальную болезнь накопления, такую как болезнь Гоше, болезнь Фабри, ганглиозидозы GM1, ганглиозидозы GM2 (такие как болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа или вариант АВ), сиалидоз, заболевание Ниманна-Пика типа С и синдром миоклонуса движения-почечной недостаточности, или симптом одного из заболеваний, которые в совокупности классифицируются как метаболический синдром, например, ожирение, резистентность к инсулину, гиперлипидемия, гиперхолестеринемия, поликистоз почек, диабет типа II и хроническое воспаление или нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви или атеросклероз.

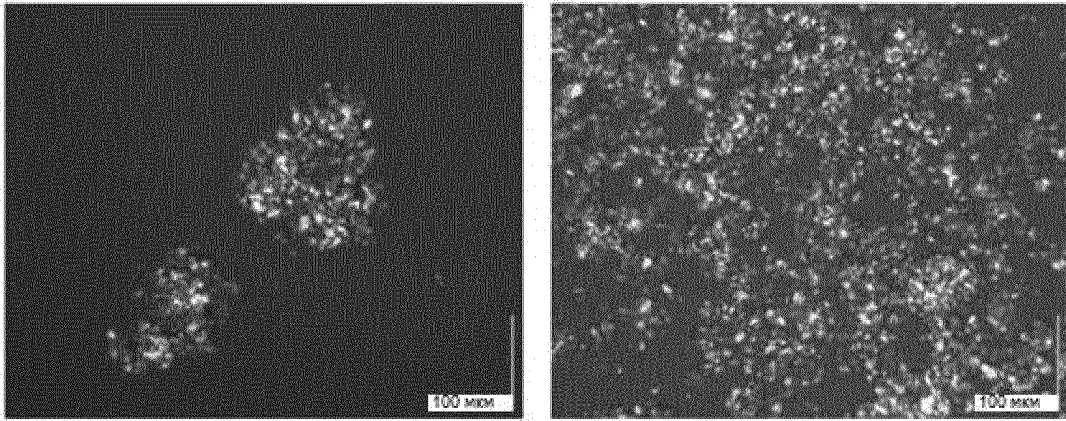
11. Способ получения кристаллической формы по любому из пп. 1-3, предусматривающий приведение в контакт образца соединения (I) с растворителем, и при этом необязательно:

(a) растворитель выбирают из ацетонитрила, этилацетата, изопропанола, анизола, воды и трет-бутилметилового эфира (ТВМЕ); и/или

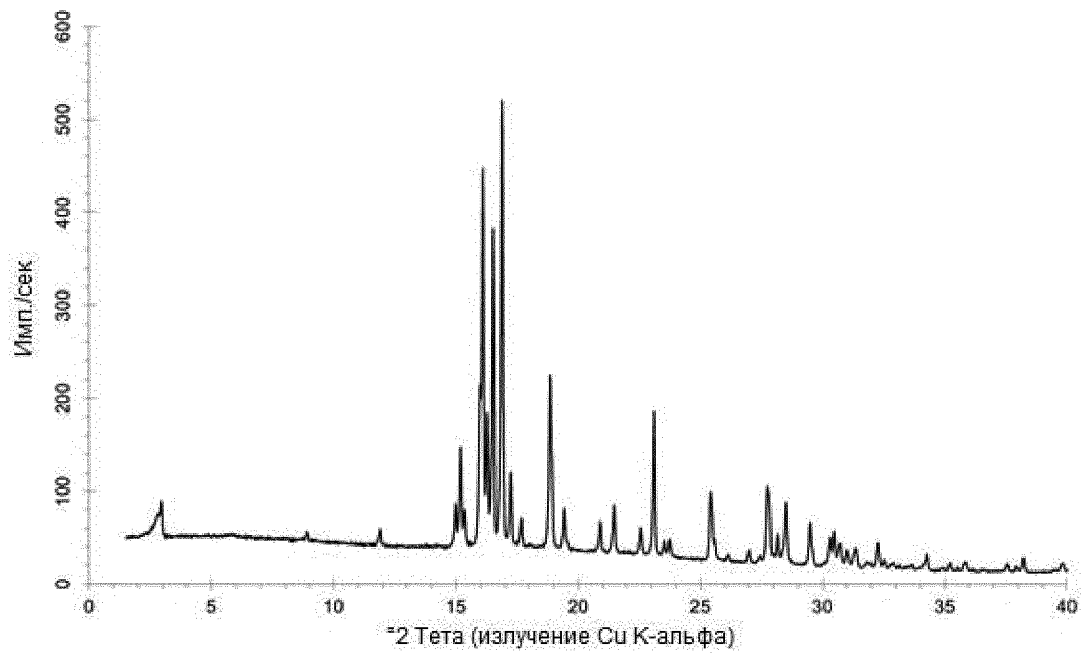
(b) образец соединения (I) очищают перед приведением в контакт образца соединения (I) с растворителем, при этом образец соединения (I) необязательно очищают с помощью хроматографии.

12. Применение свободного основания соединения (I) для получения кристаллической формы по любому из пп. 1-3.

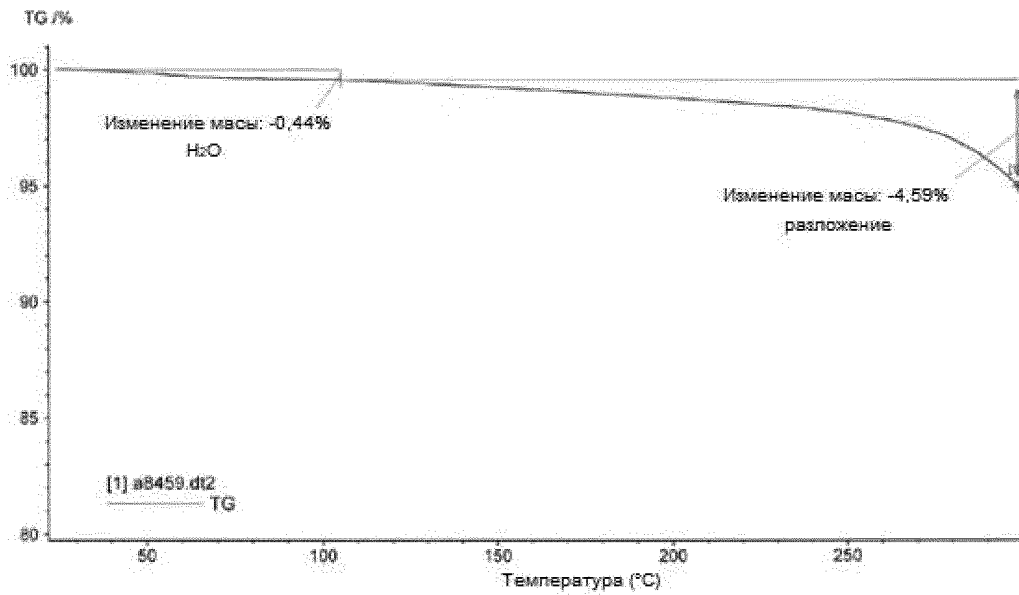
13. Способ получения кристаллической формы соединения (I) по любому из пп. 1-3, предусматривающий кристаллизацию свободного основания соединения (I).



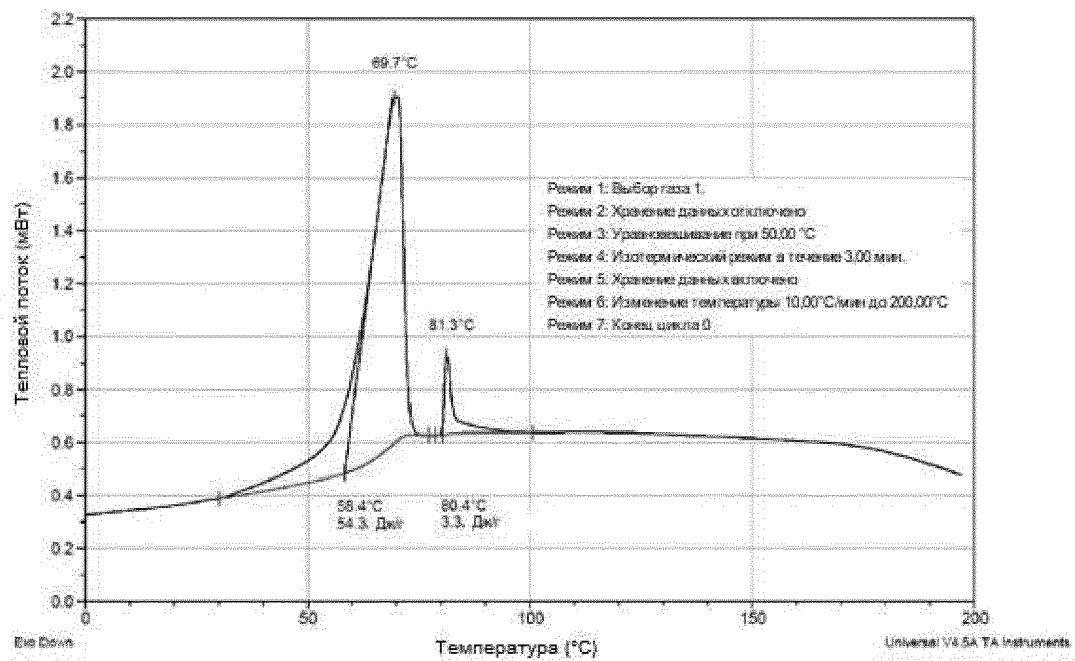
Фиг. 1



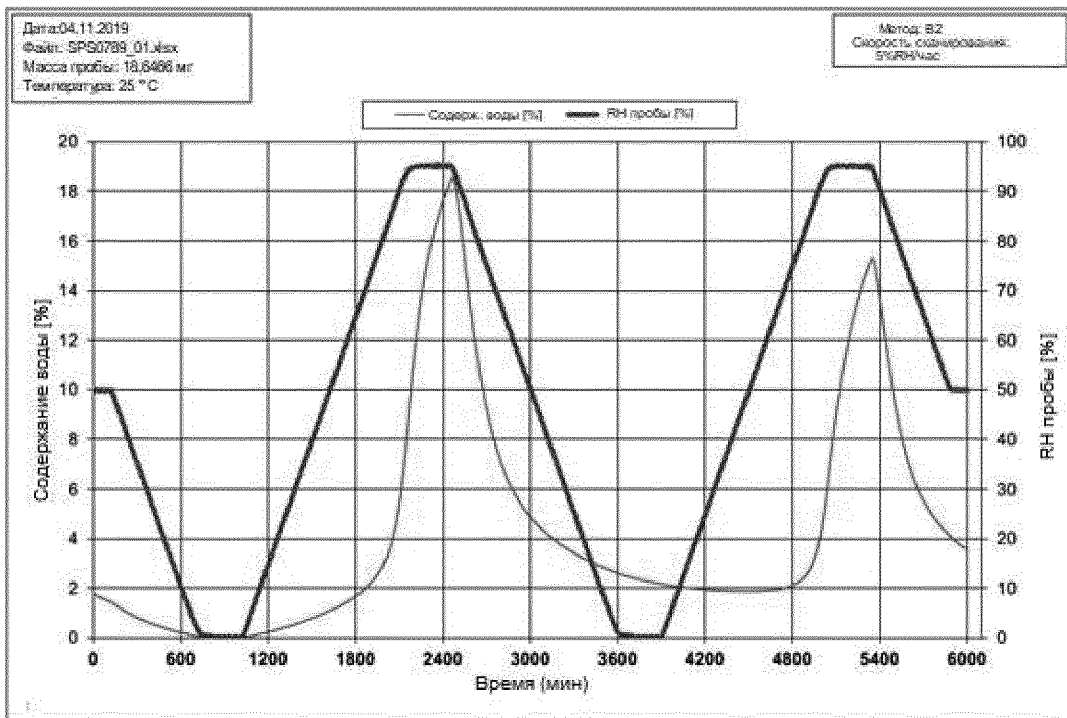
Фиг. 2



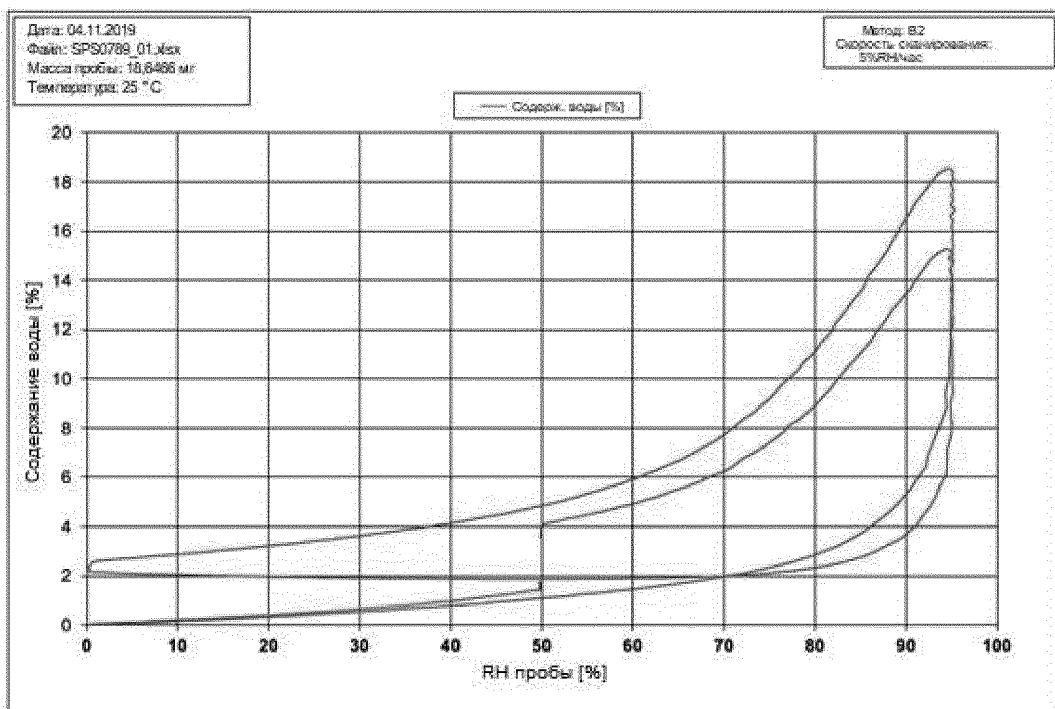
Фиг. 3А



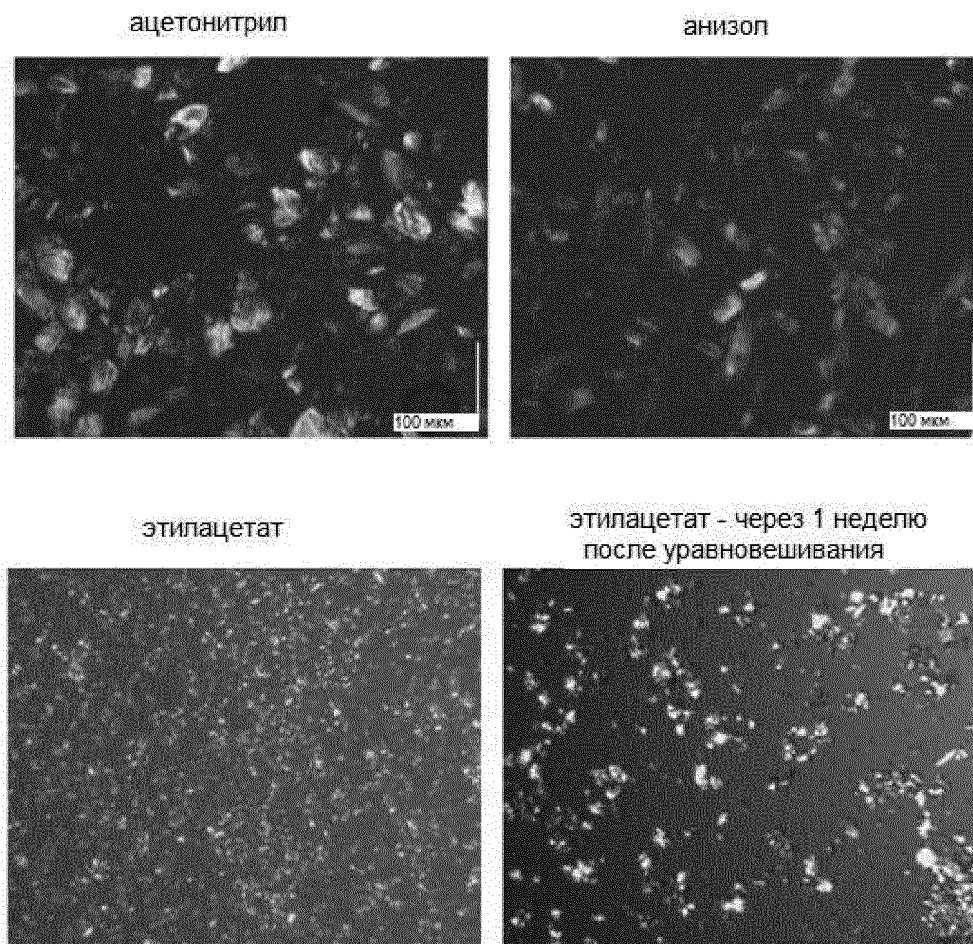
Фиг. 3В



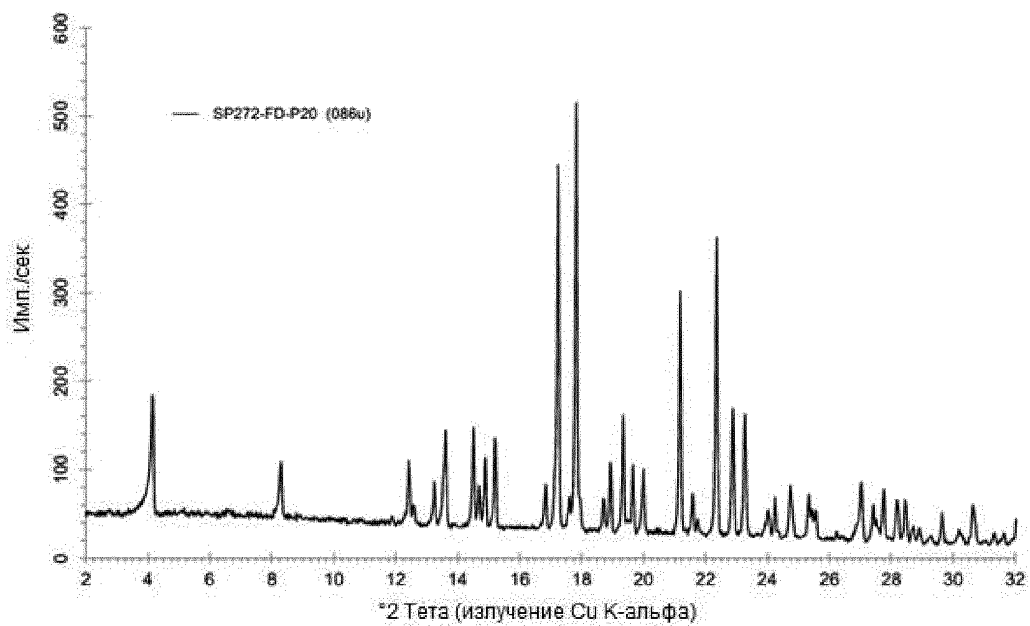
Фиг. 4А



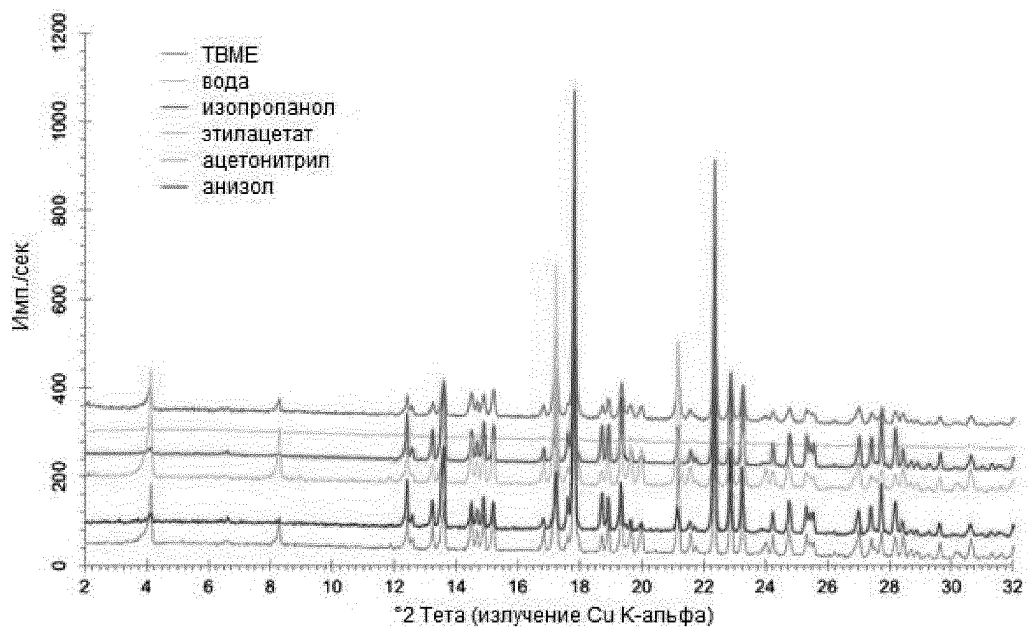
Фиг. 4В



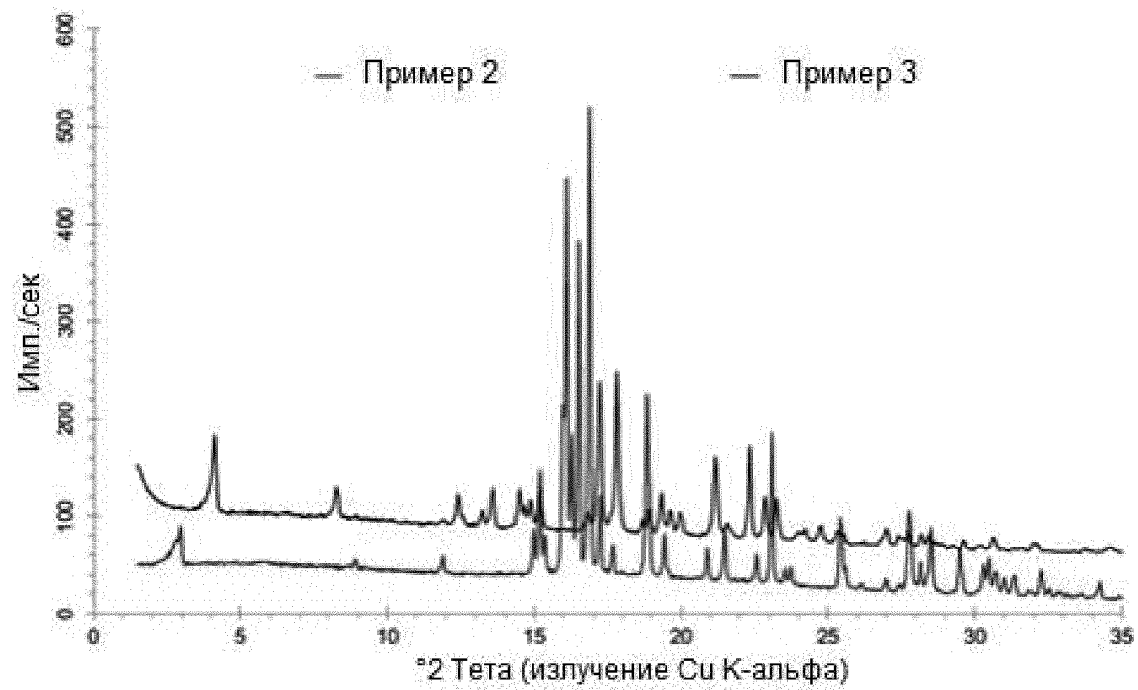
Фиг. 5



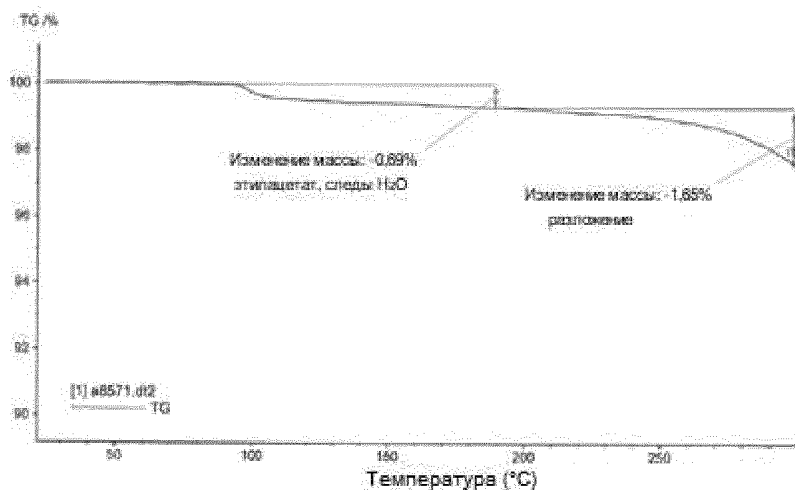
Фиг. 6А



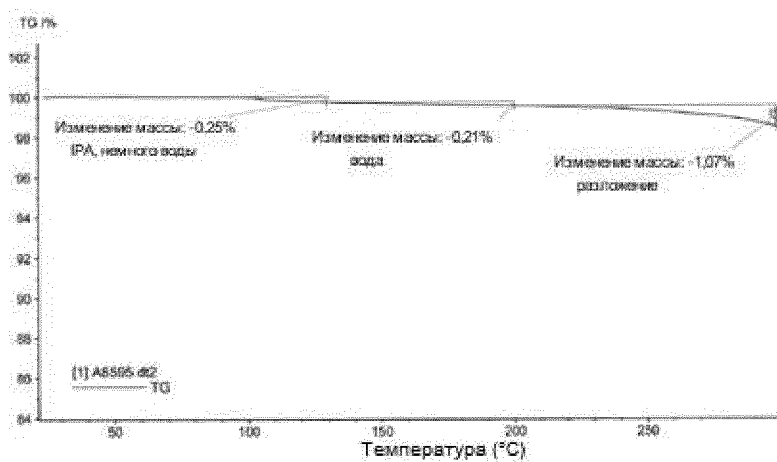
Фиг. 6В



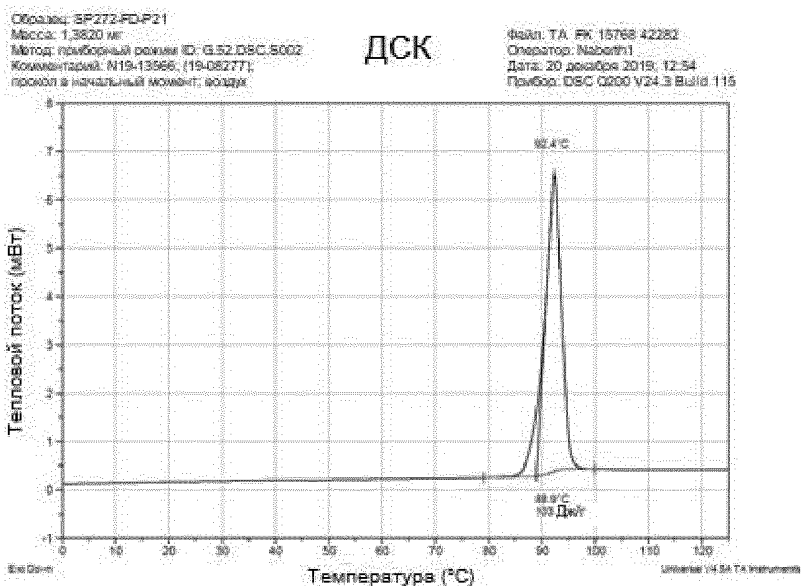
Фиг. 7



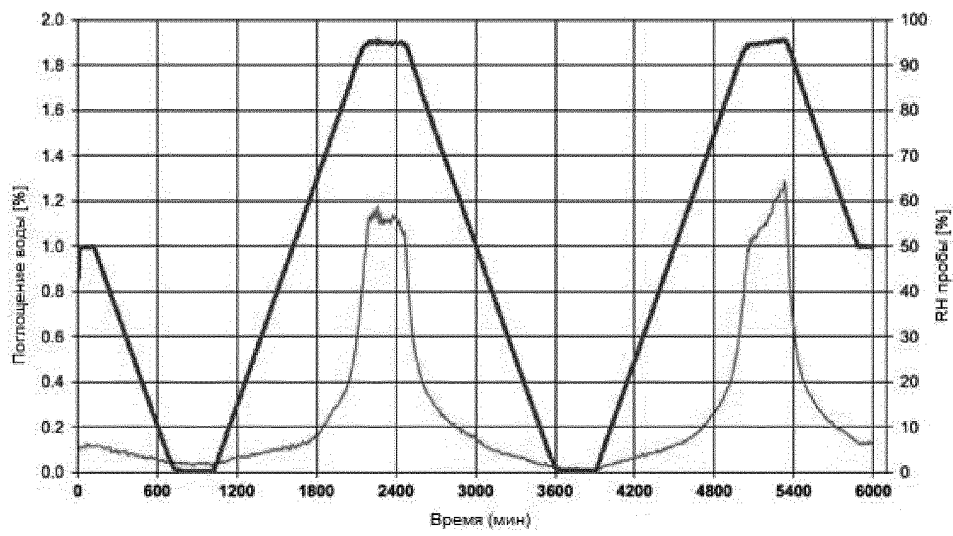
Фиг. 8А



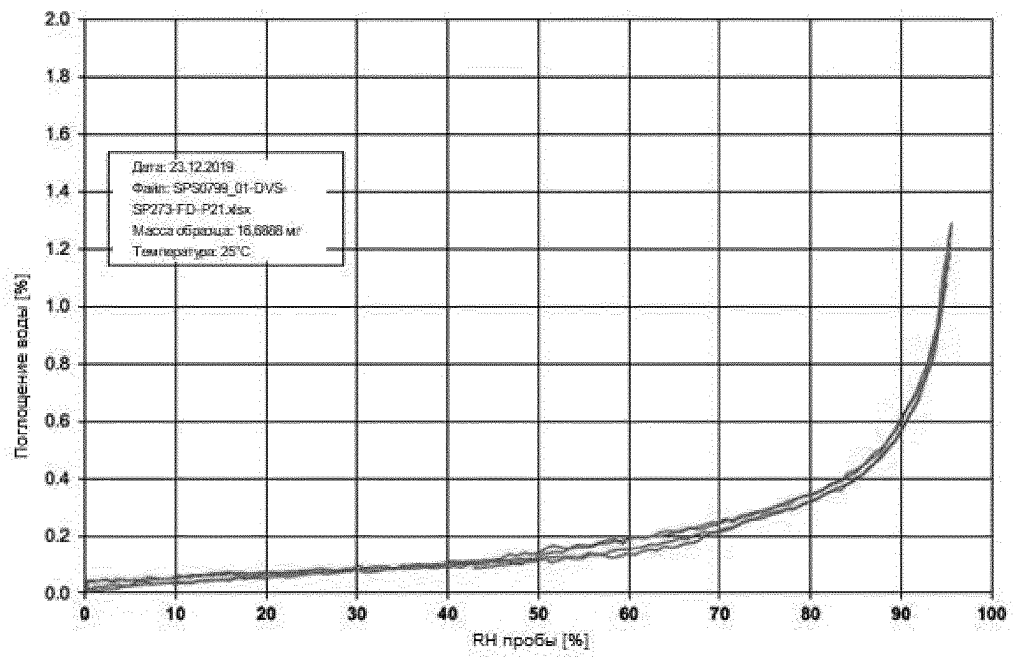
Фиг. 8В



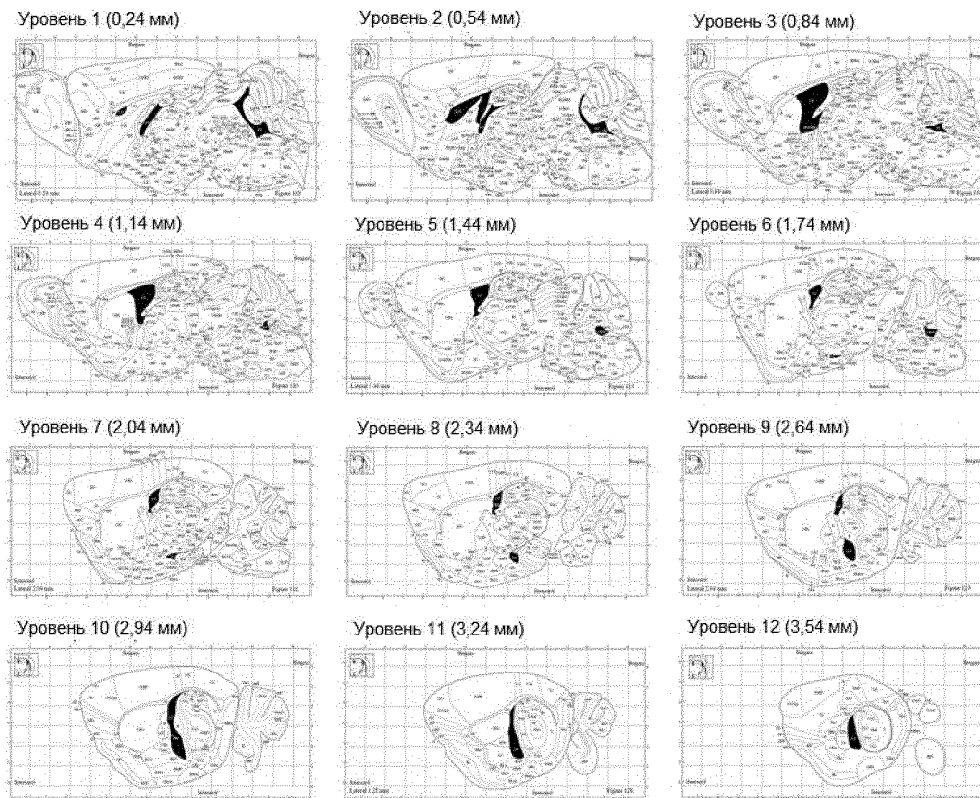
Фиг. 8С



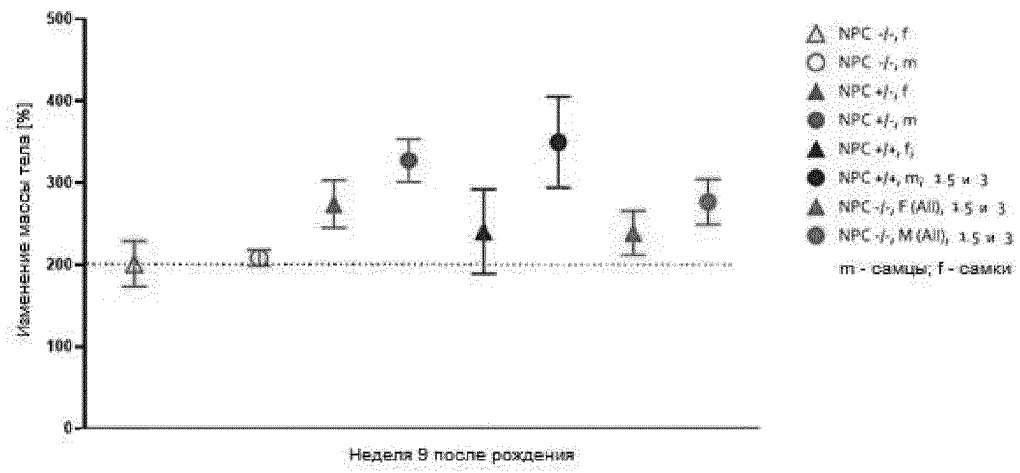
Фиг. 9А



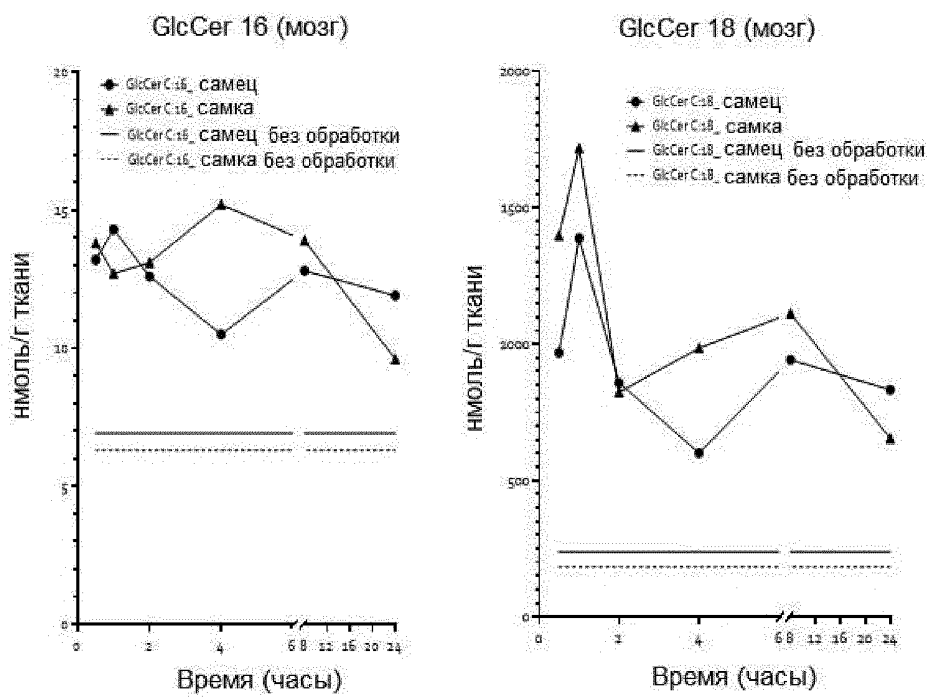
Фиг. 9В



Фиг. 10



Фиг. 11

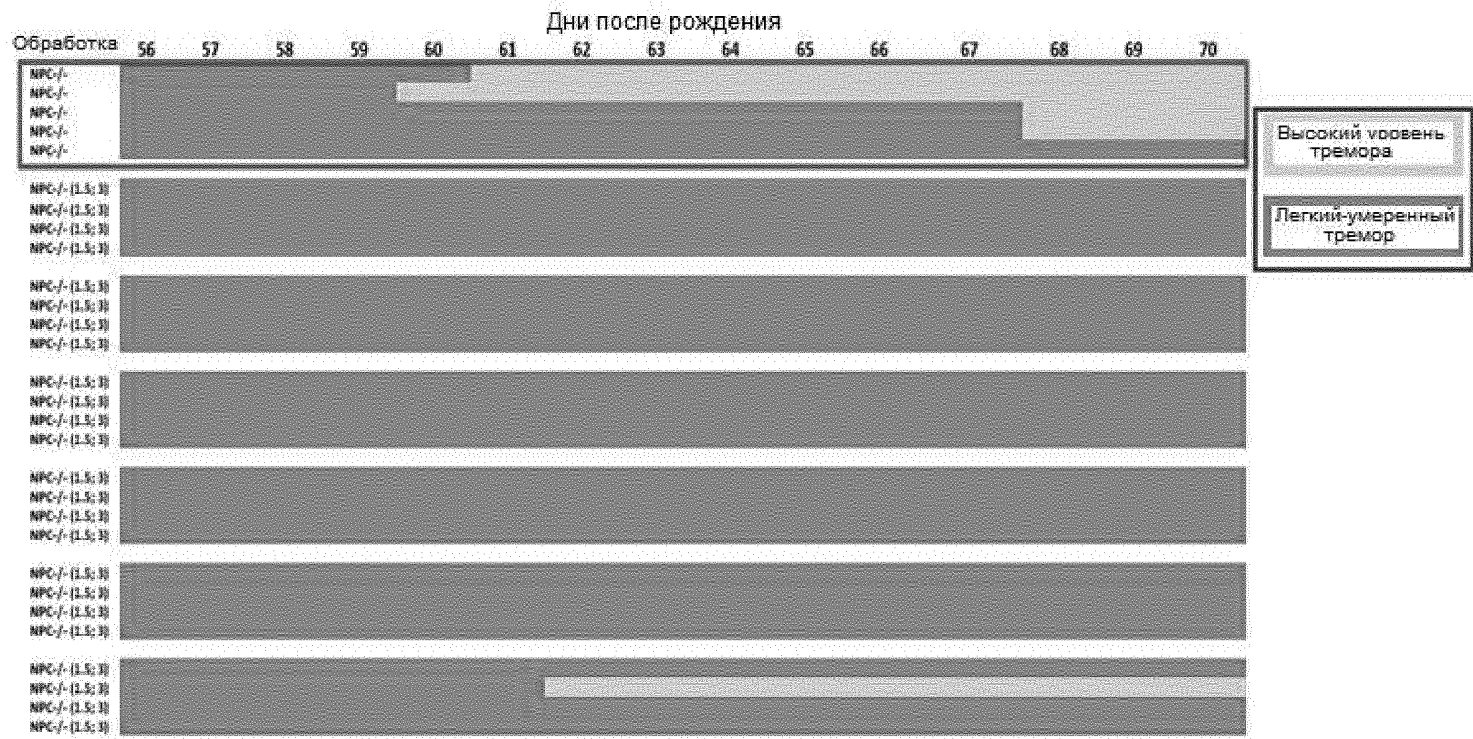


Фиг. 12

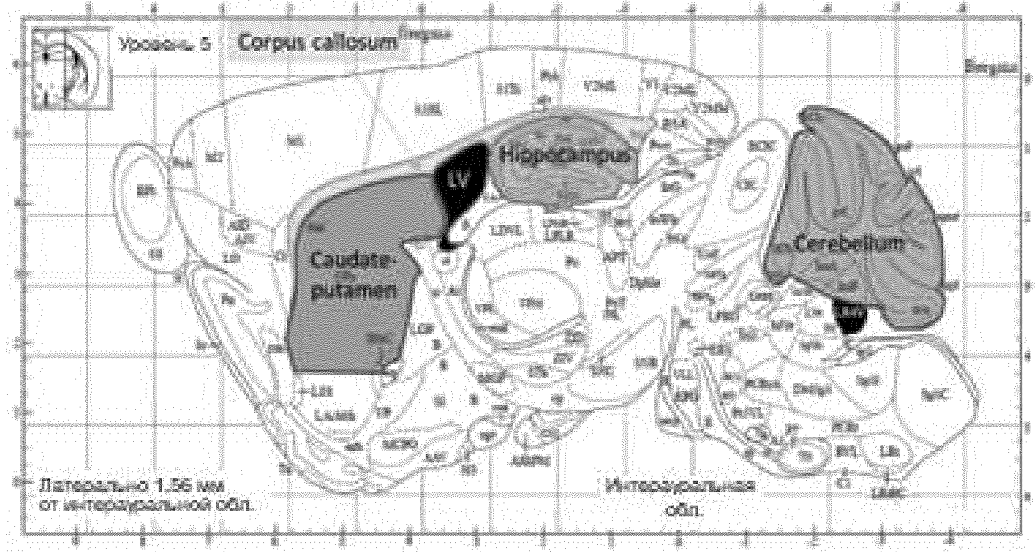
		Дни после рождения													Нормализованные клинические признаки с оценкой > % [#]								
		56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	>5	>6	>7	>8	>9	>15	
f	И	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Всего: 75	65% (49)	47% (35)	21% (16)	21% (16)	21% (16)	5% (4)
	М	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3		28% (21)	17% (13)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	ИМ	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3		37% (28)	29% (22)	19% (14)	19% (14)	19% (14)	5% (4)
	Средн.	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1							
m	И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Всего: 60	7% (4)	5% (3)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	М	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		3% (2)	2% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	ИМ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		5% (3)	4% (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	Средн.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0							
f	И	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Всего: 60	28% (17)	10% (6)	5% (3)	5% (3)	5% (3)	0% (0)
	М	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		3% (2)	2% (1)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	ИМ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		27% (16)	8% (5)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	Средн.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0							
m	И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Всего: 60	35% (21)	17% (10)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	М	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		5% (3)	5% (3)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	ИМ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		30% (18)	12% (7)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
	Средн.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0							
f	И	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Всего: 60	15% (9)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	М	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		10% (6)	2% (1)	2% (1)	2% (1)	2% (1)	0% (0)
	ИМ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		5% (3)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	Средн.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0							
m	И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Всего: 60	47% (28)	18% (11)	8% (5)	8% (5)	8% (5)	0% (0)
	М	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		7% (4)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	ИМ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		40% (24)	13% (8)	5% (3)	5% (3)	5% (3)	0% (0)
	Средн.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0							
f	И	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Всего: 64	47% (30)	20% (13)	6% (4)	6% (4)	6% (4)	2% (1)
	М	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		22% (14)	14% (9)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	0% (0)
	ИМ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		25% (16)	6% (4)	3% (2)	3% (2)	3% (2)	2% (1)
	Средн.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0							

f - самки, m - самцы

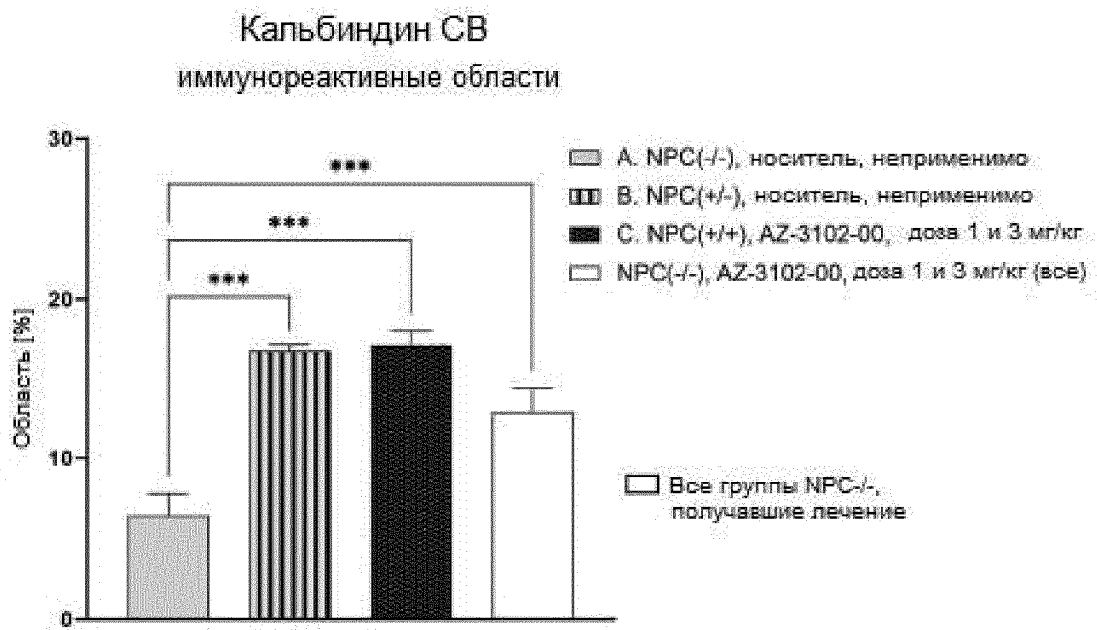
Фиг. 13



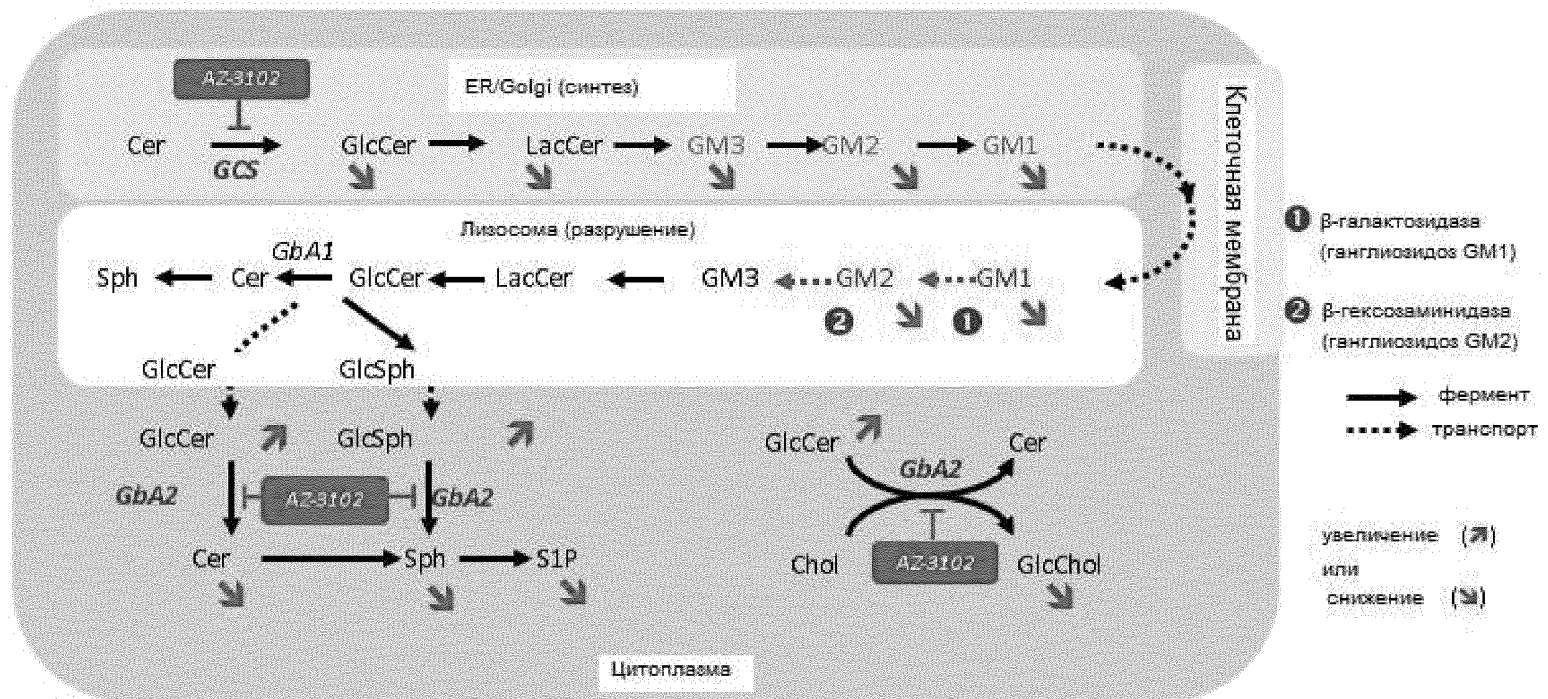
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17