

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035519**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.29

(21) Номер заявки
201891239

(22) Дата подачи заявки
2016.11.30

(51) Int. Cl. **C07D 417/14** (2006.01)
A61K 31/433 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) 1,3,4-ТИАДИАЗОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

(31) 62/260784

(32) 2015.11.30

(33) US

(43) 2018.11.30

(86) PCT/EP2016/079253

(87) WO 2017/093301 2017.06.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE); КЭНСЕР
РИСЕРЧ ТЕКНОЛОДЖИ ЛИМИТЕД
(GB)**

(72) Изобретатель:
**Финлей Морис Реймонд Верскойл,
Перкинс Дэвид Роберт, Ниссинк
Йоханнес Вилхелмус Мария, Раубо
Петр Энтони, Смит Питер Дункан,
Бэйли Эндрю (GB)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) AJIT G. THOMAS ET AL.:
"Small molecule glutaminase inhibitors block
glutamate release from stimulated microglia",
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH
COMMUNICATIONS, vol. 443, no. 1, 1 January 2014
(2014-01-01), pages 32-36, XP055200049, ISSN:
0006-291X, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.043, table 1
US-A1-2014142081
WO-A1-2013078123
WO-A1-2015181539

(57) Изобретение относится к соединениям, определенным в формуле изобретения, и их фармацевтически приемлемым солям. Также изобретение относится к фармацевтической композиции для ингибирования глутаминазы 1 (GLS1), содержащей соединение по изобретению или его фармацевтически приемлемую соль. Кроме того, изобретение относится к применению соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли в лечении заболевания, опосредованного GLS1, а также к способу лечения заболевания, опосредованного GLS1, у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, включающему введение теплокровному животному соединения по изобретению или его фармацевтически приемлемой соли.

035519 B1

035519 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Описание в целом относится к замещенным 1,3,4-тиадиазольным соединениям и их фармацевтически приемлемым солям. Эти соединения воздействуют на фермент глутаминазу 1 ("GLS1"), и поэтому описание также относится к применению таких соединений и их солей для лечения или предупреждения GLS1-опосредованного заболевания, в том числе рака. Описание дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения и соли; наборам, содержащим такие соединения и соли; способам изготовления таких соединений и солей; промежуточным соединениям, применимым в изготовлении таких соединений и солей; и к способам лечения заболевания, опосредованного GLS1, в том числе рака, с применением таких соединений и солей.

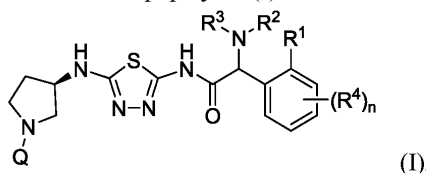
Предпосылки изобретения

Глутамин является наиболее распространенной в плазме крови аминокислотой и вовлекается во множество путей, стимулирующих рост. В частности, глутамин вовлекается в окисление в цикле трикарбоновых кислот и в поддержание окислительно-восстановительного равновесия в клетке, а также обеспечивает азот для синтеза нуклеотидов и аминокислот (Curi et al., Front. Biosci. 2007, 12, 344-57; DeBerardinis and Cheng, Oncogene 2010, 313-324, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте). Многие раковые клетки зависят от метаболизма глутамина вследствие метаболических изменений в клетке, включая эффект Варбурга, где гликолитический пируват скорее превращается в молочную кислоту, чем используется для образования ацетил-коэнзима А (Koppenol et al., Nature Reviews 2011, 11, 325-337, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Вследствие этой зависимости от метаболизма глутамина такие раковые клетки чувствительны к изменениям уровней экзогенного глутамина. Кроме того, существующие данные свидетельствуют о том, что глутаминолиз играет ключевую роль при некоторых типах рака (Hensley et al., J. Clin. Invest. 2013, 123, 3678-3684, которая полностью включена ссылкой) и связан с известными онкогенами, такими как Мус (Dang, Cancer Res. 2010, 70, 859-863, которая полностью включена ссылкой).

Первая стадия катаболизма глутамина до глутамата катализируется глутаминазой, которая существует в виде двух изоформ, GLS1 и GLS2, которые изначально идентифицированы как экспрессируемые в почках и печени соответственно. Известно, что глутаминаза почек (GLS1) является в большей степени повсеместно экспрессируемой, нежели глутаминаза печени (GLS2), и имеет 2 сплайс-варианта, KGA и более короткую GAC-изоформу, оба из которых локализируются в митохондриях (Elgadi et al., Physiol. Genomics 1999, 1, 51-62; Cassago et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2012, 109, 1092-1097, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте). Экспрессия GLS1 связана с ростом опухоли и злокачественного новообразования в ряде типов заболеваний (Wang et al., Cancer Cell 2010, 18, 207-219; van der Neufel et al., Cancer Bio. Ther. 2012, 13, 1185-1194, каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте). Поэтому ожидается, что ингибиторы GLS1 будут применимы при лечении рака в виде монотерапии или в комбинации с другими противораковыми средствами.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте предложено соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил, 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

каждый из R² и R³ независимо представляет собой C₁-C₆ алкил, или R² и R³ вместе образуют -(CH₂)₃-;

или R¹ и R² вместе образуют -(CH₂)₂- и R³ представляет собой -CH₃;

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n принимает значение 0, 1 или 2.

В другом аспекте фармацевтическая композиция включает в себя соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

В другом аспекте соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в лечении рака.

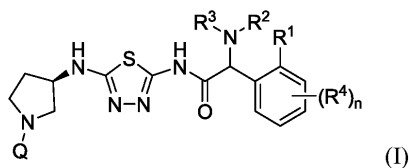
В другом аспекте применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли предназначено для изготовления лекарственного препарата для лечения рака.

В другом аспекте способ лечения рака у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, включает введение теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Другие аспекты будут очевидны из описания и формулы изобретения.

Подробное описание

Многие варианты осуществления подробно раскрыты в описании и будут очевидны читателю-специалисту в данной области техники. Настоящее изобретение не должно интерпретироваться ограниченным каким(и)-либо определенным(и) вариантом(вариантами) его осуществления. Предусмотрено соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил, 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

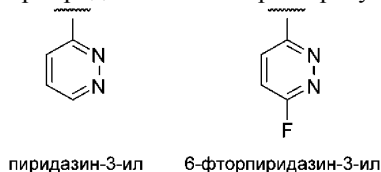
каждый из R² и R³ независимо представляет собой C₁-C₆ алкил, или R² и R³ вместе образуют -(CH₂)₃-;

или R¹ и R² вместе образуют -(CH₂)₂- и R³ представляет собой -CH₃;

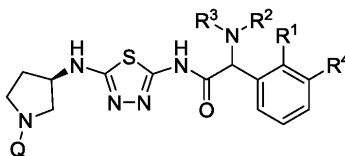
R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n принимает значение 0, 1 или 2.

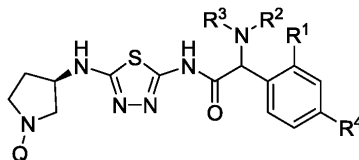
Кольца пиридазин-3-ила и 6-фторпиридазин-3-ила характеризуются следующими структурами:



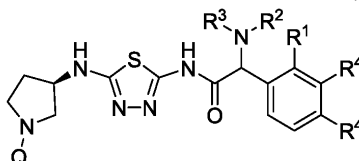
В некоторых вариантах осуществления если n равно 1, то R⁴ может быть в 3-м положении, т.е.



В некоторых вариантах осуществления если n равно 1, то R⁴ может быть в 4-м положении, т.е.



В некоторых вариантах осуществления если n равно 2, то одно расположение R⁴ может быть в 3-м положении, а другое расположение R⁴ может быть в 4-м положении, т.е.



Термин "фармацевтически приемлемый" применяется для указания того, что объект (например, соль, лекарственная форма, разбавитель или носитель) является подходящим для применения пациентами. Иллюстративный перечень фармацевтически приемлемых солей можно найти в Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth, editors, Weinheim/Zurich: Wiley-VCH/VHCA, 2002, который включен посредством ссылки во всей своей полноте. Подходящей фармацевтически приемлемой солью соединения формулы (I) является, например, соль присоединения кислоты. Соль присоединения кислоты соединения формулы (I) может быть образована посредством приведения в контакт соединения с подходящей неорганической или органической кислотой при условиях, известных специалисту. Соль присоединения кислоты может быть образована с применением, например, неорганической кислоты, такой как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота и фосфорная кислота. Соль присоединения кислоты может также быть образована с применением, например, органической кислоты, такой как трифторуксусная кислота, метансульфоновая кислота или бензолсульфоновая кислота. Поэтому в одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, трифторуксусной кислоты, метансульфоновой кислоты или бензолсульфоновой кислоты.

В одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль хлористоводородной кислоты или бромистоводородной кислоты.

Дополнительной подходящей фармацевтически приемлемой солью соединения формулы (I) является соль присоединения основания. Соль присоединения основания соединения формулы (I) может быть образована посредством приведения в контакт соединения с подходящим неорганическим или органическим основанием при условиях, известных специалисту. Соль присоединения основания может, например, быть образована с применением, например, неорганического основания, такого как гидроксид щелочного металла (такого как гидроксид натрия, калия или лития) или гидроксид щелочно-земельного металла (такого как гидроксид кальция или гидроксид магния). Соль присоединения основания также может быть образована с применением, например, органического основания, такого как метиламин, диметиламин, триметиламин, пиперидин, морфолин или транс-(2-гидроксиэтил)амин.

Поэтому в одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль гидроксида натрия, гидроксида калия, гидроксида лития, гидроксида кальция, гидроксида магния, метиламина, диметиламина, триметиламина, пиперидина, морфолина или транс-(2-гидроксиэтил)амин.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, трифторуксусной кислоты, метансульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, гидроксида натрия, гидроксида калия, гидроксида лития, гидроксида кальция, гидроксида магния, метиламина, диметиламина, триметиламина, пиперидина, морфолина или транс-(2-гидроксиэтил)амин.

Дополнительный вариант осуществления предусматривает любой из вариантов осуществления, определенных в настоящем документе (например, вариант осуществления по п.1 формулы изобретения), при условии, что один или несколько конкретных примеров (например, один, два или три конкретных примера, или, в качестве альтернативы, один конкретный пример), выбранных из группы, состоящей из примеров 1(a), 1(b), 2(a), 2(b), 3(a), 3(b), 4(a), 4(b), 5(a), 5(b), 6(a), 6(b), 7(a), 7(b), 8(a), 8(b), 9, 10, 11(a), 11(b), 12(a), 12(b), 13, 14, 15, 16, 17 и 18, по отдельности исключены.

Далее приведены некоторые значения изменяемых групп в формуле (I). Такие значения можно применять в комбинации с любыми из определений, пунктов формулы изобретения (например, п.1 формулы изобретения) или вариантов осуществления, определенных в настоящем документе, для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Q может представлять собой пиридазин-3-ил.

Q может представлять собой 6-фторпиридазин-3-ил.

n может быть равно 0.

n может быть равно 1.

n может быть равно 2.

R¹ может представлять собой H.

R¹ может представлять собой H, n может быть равно 1, и R⁴ может быть в 3-м положении.

R¹ может представлять собой H, n может быть равно 1, и R⁴ может представлять собой 3-метил, 3-метокси-, 3-диформетокси-, 3-триформетокси- или 3-цианогруппу.

R¹ может представлять собой H, n может быть равно 1, и R⁴ может быть в 4-м положении.

R¹ может представлять собой H, n может быть равно 1, и R⁴ может представлять собой 4-фтор или 4-метил.

R¹ может представлять собой H, n может быть равно 2, одно расположение R⁴ может быть в 3-м положении, а другое расположение R⁴ может быть в 4-м положении.

R¹ может представлять собой H, n может быть равно 2, в одном случае R⁴ может представлять собой 3-триформетокси, а в другом случае R⁴ может представлять собой 4-фтор.

Каждый из R² и R³ независимо может представлять собой C₁-C₆ алкил.

Каждый из R² и R³ независимо может представлять собой метил.

R² и R³ вместе могут образовывать -(CH₂)₃-.

R¹ может представлять собой H.

R¹ и R² вместе могут образовывать -(CH₂)₂- и R³ может представлять собой -CH₃.

R⁴ может представлять собой H.

R⁴ может представлять собой галоген.

R⁴ может представлять собой фтор.

R⁴ может представлять собой -CH₃.

R⁴ может представлять собой -OCH₃.

R⁴ может представлять собой -OCHF₂.

R⁴ может представлять собой -OCF₃.

R⁴ может представлять собой -CN.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически

приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

каждый из R² и R³ независимо представляет собой C₁-C₆ алкил, или R² и R³ вместе образуют -(CH₂)₃-;

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n принимает значение 0, 1 или 2.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

каждый из R² и R³ независимо представляет собой C₁-C₆ алкил, или R² и R³ вместе образуют -(CH₂)₃-;

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n равно 1.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

каждый из R² и R³ независимо представляет собой C₁-C₆ алкил, или R² и R³ вместе образуют -(CH₂)₃-;

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n равно 1, где R⁴ находится в 3-м положении.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

каждый из R² и R³ независимо представляет собой C₁-C₆ алкил.

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n принимает значение 0, 1 или 2.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

каждый из R² и R³ независимо представляет собой C₁-C₆ алкил.

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n равно 1, где R⁴ находится в 3-м положении.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

R² и R³ вместе образуют -(CH₂)₃-.

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n принимает значение 0, 1 или 2.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ представляет собой H;

R² и R³ вместе образуют -(CH₂)₃-.

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n равно 1, где R⁴ находится в 3-м положении.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где

Q представляет собой пиридазин-3-ил или 6-фторпиридазин-3-ил;

R¹ и R² вместе образуют -(CH₂)₂-, и R³ представляет собой -CH₃;

R⁴ представляет собой галоген, -CH₃, -OCH₃, -OCHF₂, -OCF₃ или -CN; и

n принимает значение 0, 1 или 2.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из группы, состоящей из

- (2S)-2-(диметиламино)-2-фенил-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2R)-2-(диметиламино)-2-фенил-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2S)-2-(диметиламино)-2-(4-фторфенил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2R)-2-(диметиламино)-2-(4-фторфенил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2S)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2R)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2S)-2-(диметиламино)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;
- (2R)-2-(диметиламино)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;
- (2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2S)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;
- (2R)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;
- (1S)-2-метил-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоксамида;
- (1R)-2-метил-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоксамида;
- (2S)-2-(диметиламино)-2-(п-толил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;
- (2S)-2-(диметиламино)-2-(м-толил)-N-[5-[[3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида; и

(2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида.

В одном варианте осуществления предложены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из группы, состоящей из:

(2S)-2-(диметиламино)-2-фенил-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-2-(4-фторфенил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(1S)-2-метил-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоксамида;

(2S)-2-(диметиламино)-2-(п-толил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-2-(м-толил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида; и

(2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида.

Соединения и соли, описанные в настоящем описании, могут существовать в сольватированных формах и несольватированных формах. Например, сольватированная форма может представлять собой гидратированную форму, такую как полугидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат, или ее альтернативное количество. Настоящее изобретение охватывает все такие сольватированные и несольватированные формы соединений формулы (I).

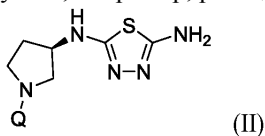
Атомы соединений и солей, описанных в настоящем описании, могут существовать в разных изотопных формах. Настоящее изобретение охватывает все изотопные формы соединений формулы (I), включая углерод ^{11}C или ^{13}C и водород ^1H , ^2H (дейтерий) или ^3H (тритий).

Соединения и соли, описанные в настоящем описании, могут существовать в виде смеси таутомеров. "Таутомеры" представляют собой структурные изомеры, которые находятся в состоянии равновесия в результате миграции атома водорода. Настоящее изобретение включает все таутомеры соединений формулы (I).

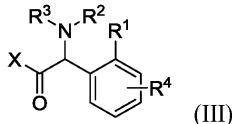
Соединения формулы (I) могут быть получены в разных диастереомерных формах. Настоящее изобретение включает все диастереомерные формы соединений формулы (I).

В одном варианте осуществления предусмотрены соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, которые представляют собой отдельный диастереомер, находящийся в диастереомерном избытке (%de), составляющем $\geq 95\%$, $\geq 98\%$ или $\geq 99\%$. В одном варианте осуществления отдельный диастереомер присутствует в диастереомерном избытке (%de), составляющем $\geq 99\%$.

Соединения формулы (I) можно получать, например, реакцией соединения формулы (II)



где Q является таким, как определено выше, с соединением формулы (III)



где R^1 , R^2 , R^3 и R^4 являются такими, как определено выше, и X представляет собой уходящую группу, такую как атом галогена (например, атом хлора) или гидроксигруппа. Реакцию удобно проводить в подходящем растворителе (например, N,N-диметилформамиде или N,N-диметилацетамиде) и в присутствии основания (например, диизопропилэтиламин) при подходящей температуре. Подходящие температуры включают, но не ограничиваются этим, комнатную температуру (от примерно 20°C до примерно 30°C), пониженную температуру (например, от примерно -77°C до примерно 0°C), или повышенную температуру, например примерно в пределах от 80 до 120°C . Когда X является гидроксильной группой, для образования амидной связи можно использовать подходящий агент сочетания (например, HATU). Поэтому соединения формулы (III) и их соли применимы в качестве промежуточных соединений при получении соединений формулы (I) и обеспечивают дополнительный вариант осуществления.

Соединения формулы (II) и формулы (III) могут быть получены посредством способов, аналогичных тем, что приведены в разделе "Примеры".

Подходящей солью соединения формулы (III) является соль присоединения основания. Соль присоединения основания соединения формулы (III) может быть образована посредством приведения в контакт соединения с подходящим неорганическим или органическим основанием при условиях, известных специалисту. Такие основания не обязательно образуют фармацевтически приемлемые соли. Соль присоединения основания может быть образована с применением, например, неорганического основания, такого как гидроксид щелочного металла (такого как гидроксид натрия, калия или лития) или гидроксид щелочно-земельного металла (такого как гидроксид кальция или гидроксид магния). Соль присоединения основания также может быть образована с применением органического основания, такого как метиламин, диметиламин, триметиламин, пиперидин, морфолин или трис-(2-гидроксиэтил)амин.

Поэтому в одном варианте осуществления предложены соединения формулы (III) или его соль, где соль представляет собой соль гидроксида натрия, гидроксида калия, гидроксида лития, гидроксида кальция, гидроксида магния, метиламина, диметиламина, триметиламина, пиперидина, морфолина или транс-(2-гидроксиэтил)амин.

Предполагается, что соединения, которые, как ожидается, ингибируют GLS1, т.е. соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли, могут быть применимы в терапии, например в лечении заболеваний или медицинских состояний, опосредованных, по меньшей мере частично, GLS1, в том числе рака.

Если упоминается "рак", то данный термин включает в себя как неметастатический рак, так и метастатический рак, так что лечение рака подразумевает обработку как первичных опухолей, так и метастазов опухоли.

В одном варианте осуществления рак представляет собой метастатический рак.

В одном варианте осуществления рак представляет собой неметастатический рак.

"Ингибирующая активность в отношении GLS1" относится к снижению активности GLS1 в виде непосредственного или опосредованного ответа на присутствие соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли относительно активности GLS1 при отсутствии соединения формулы (I).

или его фармацевтически приемлемой соли. Такое снижение активности может происходить за счет непосредственного взаимодействия соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли с GLS1 или за счет воздействия соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли на один или несколько других факторов, которые, в свою очередь, влияют на активность GLS1. Например, соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль могут снижать уровень GLS1 путем непосредственного связывания с GLS1, путем влияния (непосредственного или опосредованного) на другой фактор со снижением активности GLS1 или путем (непосредственного или опосредованного) снижения количества GLS1, присутствующего в клетке или организме.

Термин "терапия" предназначен для обозначения своего обычного значения, заключающегося в лечении заболевания или устранении или купировании лежащей в основе патологии. Термин "терапия" также включает "профилактику", если нет конкретных указаний об обратном. Термины "терапевтический" и "терапевтически" должны интерпретироваться соответствующим образом.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения формулы (I), описанного в любом из вариантов осуществления в настоящем документе, которое является эффективным для обеспечения терапии у субъекта. В случае рака терапевтически эффективное количество может вызывать любые изменения, наблюдаемые или измеряемые у субъекта, как описано выше в определении "терапии", "лечения" и "профилактики". Например, эффективное количество может уменьшать число раковых или опухолевых клеток; уменьшать общий размер опухоли; ингибировать или приостанавливать инфильтрацию опухолевых клеток в периферические органы, включая, например, мягкую ткань и кость; ингибировать и приостанавливать метастазирование опухолей; ингибировать и приостанавливать рост опухолей; ослаблять в некоторой степени один или несколько симптомов, ассоциированных с раком; снижать тяжесть заболевания и уменьшать смертность; улучшать качество жизни или обеспечивать комбинацию таких эффектов. Эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для снижения интенсивности симптомов заболевания, чувствительного к ингибированию активности GLS1. Для терапии рака эффективность *in-vivo* можно измерять, например, с помощью оценки продолжительности выживания, периода времени до прогрессирования заболевания (ТТР), значений частоты ответа (RR), продолжительности ответа и/или качества жизни. Как признано специалистами в данной области техники, эффективные количества могут изменяться в зависимости от пути введения, применения вспомогательного средства и совместного применения других средств. Например, если применяют комбинированную терапию, то количество соединения формулы (I) или фармацевтически приемлемой соли, описанных в настоящем описании, и количество другого(других) фармацевтически активного(активных) средства(средств) при объединении вместе эффективны для лечения целевого нарушения у пациента-животного. В данном контексте объединенные количества представляют собой "терапевтически эффективное количество", если при объединении их достаточно для снижения интенсивности симптомов заболевания, чувствительного к ингибированию активности GLS1, как описано выше. Как правило, такие количества могут быть определены специалистом в данной области техники, например, исходя из диапазона доз, описанного в настоящем описании для соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, и утвержденного(утвержденных) или иным образом опубликованного(опубликованных) диапазона(диапазонов) доз другого(других) фармацевтически активного(активных) соединения(соединений). Термин "профилактика" предназначен для обозначения своего обычного значения и включает первичную профилактику для предупреждения развития заболевания и вторичную профилактику, при которой заболевание уже развилось, и пациента временно или постоянно защищают от обострения или ухудшения состояния заболевания.

Термин "лечение" применяют как синоним к термину "терапия". Подобным образом термин "лечить" можно рассматривать в качестве применения терапии, где "терапия" определена в настоящем документе.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, включающая в себя соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает в себя соединение формулы (I) в виде свободного основания. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция включает в себя фармацевтически приемлемую соль соединения формулы (I).

В одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

В одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата для лечения рака.

В одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении заболевания, опосредованного GLS1. В одном варианте осуществления заболевание, опосредованное GLS1, представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой рак молочной железы (например, трижды негативный рак

молочной железы), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак поджелудочной железы, рак почек или гепатоцеллюлярный рак.

"Трижды негативный рак молочной железы" представляет собой любой тип рака молочной железы, при котором не экспрессируются или недостаточно экспрессируются гены рецептора эстрогена, рецептора прогестерона и Her2/neu.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата для лечения заболевания, опосредованного GLS1. В одном варианте осуществления заболевание, опосредованное GLS1, представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак поджелудочной железы, рак почек или гепатоцеллюлярный рак.

В одном варианте осуществления предусмотрено применение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата для лечения рака.

В одном варианте осуществления предусмотрен способ ингибирования GLS1, который включает введение соединения формулы (I).

В одном варианте осуществления предусмотрен способ лечения заболевания, при котором благоприятным является ингибирование GLS1 у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает введение теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

"Теплокровные животные" включают, например, людей.

В одном варианте осуществления предусмотрен способ лечения рака у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает введение теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких), рак поджелудочной железы, рак почек или гепатоцеллюлярный рак. Лечение рака, описанное в настоящем описании, может быть применимым в виде монотерапии или может включать, в дополнение к введению соединения формулы (I), традиционные хирургическое вмешательство, лучевую терапию или химиотерапию или комбинацию таких дополнительных средств терапии. Такие традиционные хирургическое вмешательство, лучевая терапия или химиотерапия могут применяться одновременно, последовательно или отдельно с лечением при помощи соединения формулы (I).

Поэтому в одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество для применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль и по меньшей мере одно дополнительное противоопухолевое вещество для применения в одновременном, раздельном или последовательном лечении рака.

В одном варианте осуществления предусмотрены соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении рака, при этом соединение формулы (I) вводят одновременно, раздельно или последовательно по меньшей мере с одним дополнительным противоопухолевым веществом. В одном варианте осуществления предусмотрен способ лечения рака у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает введение теплокровному животному соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного дополнительного противоопухолевого вещества, при этом количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного противоопухолевого вещества при совместном воздействии являются эффективными в обеспечении противоракового эффекта.

В одном варианте осуществления предусмотрен способ лечения рака у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, который включает введение теплокровному животному соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и одновременное, раздельное или последовательное введение по меньшей мере одного дополнительного противоопухолевого вещества теплокровному животному, где количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и дополнительного противоопухолевого вещества при совместном воздействии являются эффективными в обеспечении противоракового эффекта.

В любом варианте осуществления дополнительное противоопухолевое вещество представляет собой таксан. В одном варианте осуществления таксан представляет собой паклитаксел. В одном варианте осуществления таксан представляет собой доцетаксел.

В любом варианте осуществления дополнительное противоопухолевое вещество представляет собой терапевтическое средство на основе платины. В одном варианте осуществления терапевтическое средство на основе платины представляет собой цисплатин, оксалиплатин или карбоплатин.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления предусмотрен набор, содержащий:

а) соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль в первой стандартной лекарственной форме;

- b) второе противоопухолевое вещество во второй стандартной лекарственной форме;
- c) контейнер для размещения первой и второй стандартных лекарственных форм; и необязательно
- d) инструкции по применению.

Соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих один или несколько фармацевтически приемлемых разбавителей или носителей. Соответственно в одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

Композиции могут находиться в форме, подходящей для перорального применения (например, в виде таблеток, пастилок, твердых или мягких капсул, водных или масляных суспензий, эмульсий, диспергируемых порошков или гранул, сиропов или настоек), для местного применения (например, в виде кремов, мазей, гелей или водных или масляных растворов или суспензий), для введения путем ингаляции (например, в виде тонкодисперсного порошка или жидкого аэрозоля), для введения путем инсuffляции (например, в виде тонкодисперсного порошка) или для парентерального введения (например, в виде стерильного водного или масляного раствора для внутривенного, подкожного, внутримышечного введения доз), или в виде суппозитория. Композиции можно получать с помощью традиционных процедур с применением традиционных фармацевтических вспомогательных веществ. Таким образом композиции, предназначенные для перорального применения, могут содержать, например, один или несколько красителей, подсластителей, ароматизаторов и/или консервантов.

В одном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, для применения в терапии.

В одном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, для применения в лечении рака. В некоторых вариантах осуществления рак может представлять собой рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого), рак поджелудочной железы, рак почек или гепатоцеллюлярный рак.

Соединение формулы (I) будут обычно вводить теплокровному животному при стандартной дозе в интервале 5-5000 мг/м² площади поверхности тела животного, т.е. приблизительно 0,1-100 мг/кг, и данное количество обычно обеспечивает терапевтически эффективную дозу. Стандартная лекарственная форма, такая как таблетка или капсула, будет, как правило, содержать, например, 1-250 мг активного ингредиента. Суточная доза в обязательном порядке будет варьироваться в зависимости от получающего лечение субъекта, конкретного пути введения, каких-либо совместно вводимых терапевтических средств и тяжести болезни, подлежащей лечению. Поэтому практикующий врач, который проводит лечение какого-либо конкретного пациента, может определить оптимальную дозу.

Примеры

Различные варианты осуществления проиллюстрированы посредством нижеприведенных примеров. Настоящее изобретение не должно интерпретироваться ограниченными примерами. В ходе подготовки примеров в целом выполнялось следующее.

a) Операции осуществляли при температуре окружающей среды, т.е. в интервале примерно от 17 до 30°C и в атмосфере инертного газа, такого как азот, если не указано иное.

b) Выпаривания осуществляли путем ротационного выпаривания или с использованием оборудования Genevac in vacuo, а процедуры по выделению продукта реакции осуществляли после удаления остаточных твердых веществ путем фильтрации.

c) Очистки с помощью флэш-хроматографии проводили на автоматизированной системе Isco Combiflash Companion с применением предварительно заполненных диоксидом кремния колонок Grace Resolve и Isco Combiflash Rf (флэш-хроматография с обращенной фазой) с применением колонок RediSep Gold C18.

d) Выходы, при наличии, не обязательно были максимально достижимыми.

e) Структуры конечных продуктов формулы (I) подтверждали с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), измеряя величины химического сдвига ЯМР по дельта шкале. Спектры протонного магнитного резонанса определяли с использованием прибора Bruker Avance 700 (700 МГц), Bruker Avance 500 (500 МГц), Bruker 400 (400 МГц) или Bruker 300 (300 МГц); ¹⁹F ЯМР определяли при 282 МГц или 376 МГц; ¹³C ЯМР определяли при 75 МГц или 100 МГц; измерения проводили при температуре приблизительно 20-30°C, если не указано иное; использовали следующие сокращения: s, синглет; d, дублет; t, триплет; q, квартет; m, мультиплет; dd, дублет дублетов; ddd, дублет дублета дублетов; dt, дублет триплетов; bs, широкий сигнал.

f) Конечные продукты формулы (I) также были охарактеризованы с помощью масс-спектрометрии после жидкостной хроматографии (LCMS) с использованием системы ВЭЖХ на основе системы Waters 2790/95 LC с 2996 PDA и отдельным квадрупольным масс-спектрометром ZQ 2000 а.е.м. Используемые

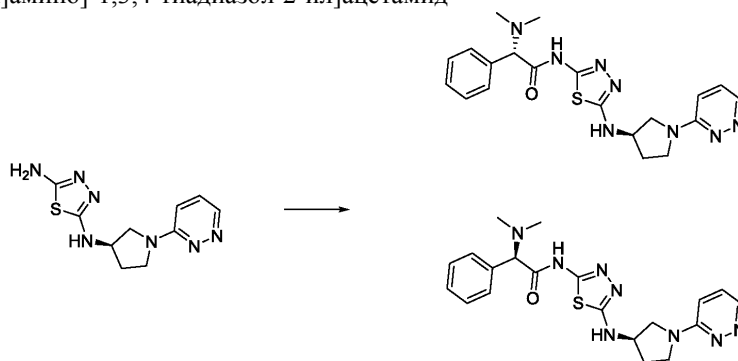
растворители представляли собой: А - вода, В - ацетонитрил, С - 50:50 ацетонитрил:вода 0,1% муравьиная кислота и D - 50:50 ацетонитрил:вода 0,1% гидроксид аммония. В колонку Phenomenex Gemini NX 50 × 2,1, 5 мкм, впрыскивали 5 мкл образца с расходом 1,1 мл/мин. Создавали градиент от 95% А до 95% В за 4,0 мин с постоянной инфузией С 5% (для кислотного анализа, D использовали для основного анализа). Поток поддерживали на уровне 95% В в течение 0,5 мин перед возвратом к исходным условиям. Данные получали в интервале от 150 до 850 а.е.м. в режиме определения положительных и отрицательных ионов на масс-спектрометре и в интервале 220-320 нм на PDA. LCMS также проводили в системе UPLC с использованием насоса Waters Acquity Binary с пробоотборником, PDA Acquity и масс-спектрометра SQD. Используемые растворители представляли собой: А1 = 0,1% муравьиная кислота (водн.), В1 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле, А2 = 0,1% гидроксид аммония (водн.) и В2 = 0,1% гидроксид аммония в ацетонитриле. Впрыскивали 1 мкл образца в колонку Waters BEH, 50 × 2,1, 1,7 мкм (при 40°C), с расходом 1 мл/мин. Создавали градиент от 97% А1 до 97% В1 за 1,30 мин перед удерживанием на протяжении 0,2 мин и возвращением к исходным условиям (замена А1 и В1 на А2 и В2 для основного анализа). Данные получали в интервале 150-1000 а.е.м. в режиме определения положительных и отрицательных ионов на масс-спектрометре и в интервале 245-320 нм на PDA.

г) Промежуточные соединения, как правило, полностью не характеризовали, а чистоту оценивали с помощью тонкослойной хроматографии, масс-спектрального, ВЭЖХ- и/или ЯМР-анализа.

h) Использовали следующие сокращения: ч - час(ы); к.т. - комнатная температура (~17-30°C); конц. - концентрированный; FCC - колоночная флэш-хроматография с применением диоксида кремния; AIBN - азобисизобутиронитрил; DCM - дихлорметан; DIPEA - диизопропилэтиламин; DMA - N,N-диметилацетамид; DMF - N,N-диметилформамид; DMSO - диметилсульфоксид; EDC - 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид; Et₂O - диэтиловый эфир; EtOAc - этилацетат; EtOH - этанол; HATU - 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридин-3-оксида гексафторфосфат; HOBT - гидроксibenзотриазол; K₂CO₃ - карбонат калия; MeOH - метанол; MeCN - ацетонитрил; MgSO₄ - безводный сульфат магния; Na₂SO₄ - безводный сульфат натрия; NBS - N-бромсукцинимид; TFA - трифторуксусная кислота; THF - тетрагидрофуран; насыщ. - насыщенный водный раствор.

В ряде приведенных ниже примеров описана диастереомерная пара соединений. Например, соединения примера 1(a) и примера 1(b) представляют собой диастереомерную пару соединений, образованную в виде смеси в продукте отдельной реакции и затем разделенную. В таких примерах любое назначение касательно стереохимии является не абсолютным. В качестве иллюстрации примеры 1(a) и 1(b) относятся к диастереомерам (2S,3R) и (2R,3R) названного соединения; однако не предполагается, что пример 1(a) окончательно задан как диастереомер (2S,3R), а пример 1(b) - как диастереомер (2R,3R).

Примеры 1(a) и 1(b). (2S)-2-(Диметиламино)-2-фенил-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид и (2R)-2-(диметиламино)-2-фенил-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид



HATU (866 мг, 2,28 ммоль) добавляли к гидрохлориду 2-(диметиламино)-2-фенил-уксусной кислоты (410 мг, 1,90 ммоль), N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 500 мг, 1,90 ммоль) и DIPEA (0,992 мл, 5,70 ммоль) в DMF (6 мл) при 0°C. Полученный раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли метанолом (5 мл) и пропускали через 20 г SCX картридж, элюируя метанолом для удаления отличающихся от основания примесей, а затем 3,5н. аммиачным раствором в метаноле с целью вымывания продукта. Содержащую продукт метанольно-аммиачную промывочную жидкость выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования от 0 до 9% (7 н NH₃/метанол) в дихлорметане). Фракции, содержащие продукт, выпаривали с получением неочищенного материала. Остаток разделяли между 2-метилтетрагидрофураном и водным солевым раствором, органический слой дважды промывали водным солевым раствором, а затем сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением продукта (350 мг, 43,4%) в виде смолы и смеси диастереоизомеров.

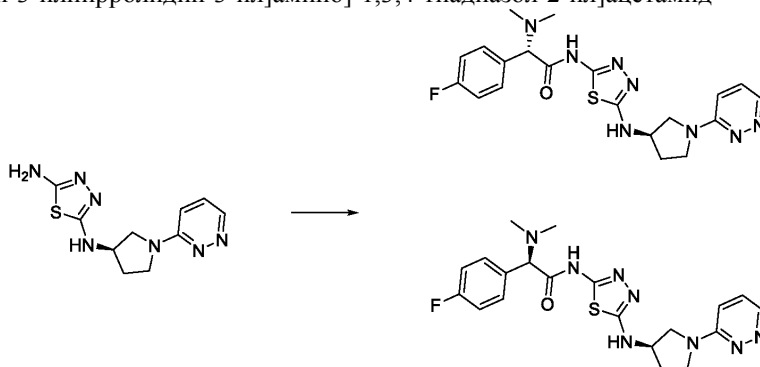
Смесь разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ (колонка C4, 20 мкм диоксид кремния, диаметром

4,6 мм, длиной 250 мм, гептан/EtOH-МеОН 60/40). Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 1(а) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 128 мг, 37%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 27°C) δ 2,09 - 2,09 (1H, m), 2,13 (6H, s), 2,21 - 2,33 (1H, m), 3,44 - 3,6 (3H, m), 3,73 (1H, dd), 4,06 (1H, s), 4,31 - 4,4 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,25 - 7,38 (4H, m), 7,45 (2H, dd), 7,64 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 12,13 (1H, s); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 425$.

Примера 1(б) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 137 мг, 39%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 27°C) δ 2 - 2,1 (1H, m), 2,13 (6H, s), 2,22 - 2,32 (1H, m), 3,43 - 3,6 (3H, m), 3,73 (1H, dd), 4,06 (1H, s), 4,31 - 4,41 (1H, m), 6,84 (1H, dd), 7,27 - 7,38 (4H, m), 7,45 (2H, d), 7,64 (1H, d), 8,46 (1H, dd), 12,14 (1H, s); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 425$.

Примеры 2(а) и 2(б). (2S)-2-(Диметиламино)-2-(4-фторфенил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид и (2R)-2-(диметиламино)-2-(4-фторфенил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид



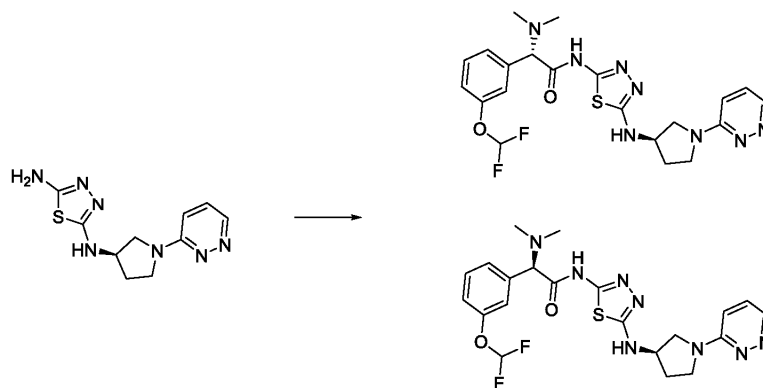
НАТУ (433 мг, 1,14 ммоль) добавляли к гидрохлориду 2-(диметиламино)-2-(4-фторфенил)уксусной кислоты (222 мг, 0,95 ммоль), N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 250 мг, 0,95 ммоль) и DIPEA (0,496 мл, 2,85 ммоль) в DMF (3 мл) при 0°C. Полученный раствор затем перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли метанолом (5 мл) и пропускали через 20 г SCX картридж, элюируя метанолом для удаления отличающихся от основания примесей, а затем 3,5 н аммиачным раствором в метаноле с целью вымывания продукта. Содержащую продукт метанольно-аммиачную промывочную жидкость выпаривали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния, градиент элюирования от 0 до 9% (7 и NH_3 /метанол) в дихлорметане. Фракции, содержащие продукт, выпаривали с получением продукта. Остаток разделяли между 2-метилтетрагидрофураном и водным солевым раствором, органический слой дважды промывали водным солевым раствором, а затем сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта в виде смеси диастереоизомеров.

Смесь разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ (Agilent 1100, колонка IB, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 4,6 мм, длиной 250 мм, гептан/EtOH-МеОН 60/40 в качестве элюэнта). Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 2(а) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 98 мг, 33%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 27°C) δ 2,01 - 2,1 (1H, m), 2,12 (6H, s), 2,21 - 2,34 (1H, m), 3,47 (1H, dd), 3,52 - 3,59 (2H, m), 3,73 (1H, dd), 4,07 (1H, s), 4,37 (1H, dq), 6,85 (1H, dd), 7,14 - 7,23 (2H, m), 7,31 (1H, dd), 7,44 - 7,51 (2H, m), 7,66 (1H, d), 8,46 (1H, dd), 12,18 (1H, s); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 443$.

Примера 2(б) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 100 мг, 33%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 27°C) δ 2 - 2,1 (1H, m), 2,12 (6H, s), 2,21 - 2,33 (1H, m), 3,46 - 3,58 (3H, m), 3,74 (1H, dd), 4,07 (1H, s), 4,31 - 4,41 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,15 - 7,22 (2H, m), 7,32 (1H, dd), 7,48 (2H, ddd), 7,66 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 12,17 (1H, s); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 443$.

Примеры 3(а) и 3(б). (2S)-2-[3-(Дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид и (2R)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид



НАТУ (416 мг, 1,09 ммоль) добавляли к N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамина (промежуточное соединение 1, 240 мг, 0,91 ммоль), 2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)уксусной кислоте (промежуточное соединение 9, 246 мг, 1,00 ммоль) и DIPEA (0,159 мл, 0,91 ммоль) в DMF (8 мл) при 21°C в атмосфере азота. Полученный раствор перемешивали при 21°C в течение 1 ч. Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии с применением колонки SCX. Требуемый продукт элюировали из колонки с применением 1M NH₃/MeOH и чистые фракции адсорбировали на диоксиде кремния.

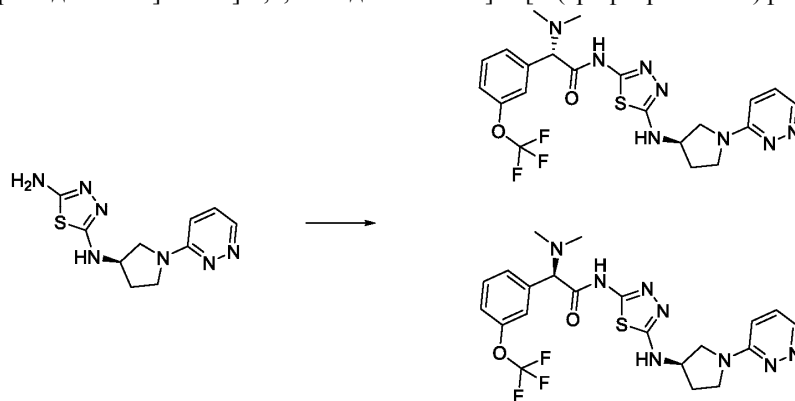
Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования от 0 до 7% MeOH в DCM). Чистые фракции выпаривали досуха с получением продукта в виде желтой смолы и смеси диастереоизомеров.

Смесь разделяли с помощью ВЭЖХ (Agilent 1100, колонка OJ, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 50 мм, длиной 250 мм, MeCN/MeOH 90/10 в качестве элюэнта). Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 3(a) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 50 мг, 11%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,08 (1H, m), 2,27 (1H, m), 2,49 (6H, s), 3,39 - 3,61 (3H, m), 3,75 (1H, m), 4,37 (1H, m), 6,95 (1H, d), 7,13-7,22 (1H, d), 7,29 (1H, s), 7,33 - 7,42 (4H, m), 7,48 (1H, d), 7,77 (1H, m), 8,48 (1H, d), 12,20 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 491.

Примера 3(b) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 57 мг, ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,08 (1H, m), 2,27 (1H, m), 2,49 (6H, s), 3,39 - 3,61 (3H, m), 3,75 (1H, m), 4,37 (1H, m), 6,95 (1H, d), 7,13-7,22 (1H, d), 7,29 (1H, s), 7,33 - 7,42 (4H, m), 7,48 (1H, d), 7,77 (1H, m), 8,48 (1H, d), 12,19 (s, 1H); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 491.

Примеры 4(a) и 4(b). (2S)-2-(Диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид и (2R)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид



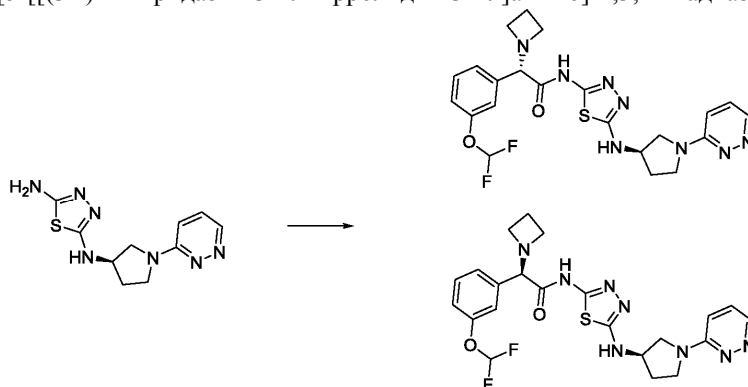
НАТУ (3,00 г, 7,88 ммоль) добавляли к N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамина (промежуточное соединение 1, 1,73 г, 6,57 ммоль), 2-(диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоте (промежуточное соединение 11, 2,248 г, 8,54 ммоль) и DIPEA (3,43 мл, 19,71 ммоль) в DMF (30 мл) при 21°C в атмосфере азота. Полученный раствор перемешивали при 60°C в течение 1 часа. Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии с применением колонки SCX. Требуемый продукт элюировали из колонки с применением 1M NH₃/MeOH и чистые фракции адсорбировали на диоксиде кремния. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования от 0 до 10% 1M NH₃/MeOH в DCM). Чистые фракции выпаривали досуха с получением коричневого твердого вещества в виде смеси диастереоизомеров. Смесь разделяли с помощью HPLC (колонка Chiral Technologies OD, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 100 мм, длиной 250 мм, смесь 50/50 гептан/EtOH в качестве элюентов, расход 450 мл/мин).

Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 4(а) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 250 мг, 7%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,78 - 1,87 (1H, m), 1,91 (6H, s), 2 - 2,13 (1H, m), 3,14 - 3,41 (3H, m), 3,51 (1H, m), 3,91 (1H, s), 4,12 (2H, m), 6,62 (1H, dd), 7,09 (2H, dd), 7,17 - 7,35 (3H, m), 7,40 (1H, d), 8,24 (1H, dd); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 509.

Примера 4(б) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 285 мг, 9%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,08 (1H, m), 2,27 (1H, m), 2,49 (6H, s), 3,39 - 3,61 (3H, m), 3,75 (1H, m), 4,37 (1H, m), 6,95 (1H, d), 7,13-7,22 (1H, d), 7,29 (1H, s), 7,33 - 7,42 (4H, m), 7,48 (1H, d), 7,77 (1H, m), 8,48 (1H, d); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 509.

Примеры 5 (а) и 5(б). (2S)-2-(Азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил] ацетамид и (2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид



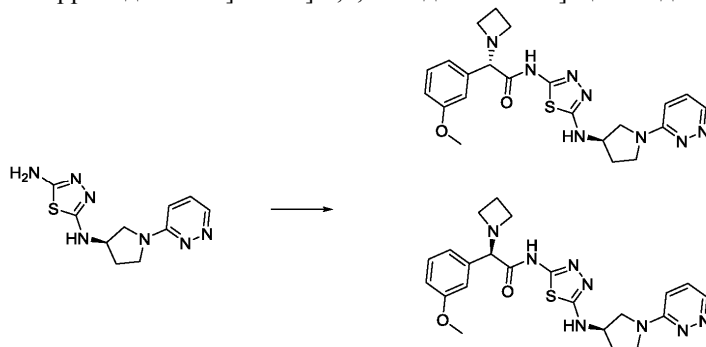
НATU (279 мг, 0,73 ммоль) добавляли к 2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]уксусной кислоте (промежуточное соединение 13, 145 мг, 0,56 ммоль), N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 148 мг, 0,56 ммоль) и DIPEA (0,295 мл, 1,69 ммоль) в N-метил-2-пирролидиноне (15 мл) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Этот раствор разбавляли метанолом (15 мл) и пропускали через картридж SCX-2, 20 г, промывая метанолом для удаления примесей, а затем 1н. раствором аммиака в метаноле с целью вымывания продукта. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растворяли в метаноле/дихлорметане и выпаривали на силикагель. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния, (градиент элюирования от 0 до 6% метанола в дихлорметане). Чистые фракции выпаривали досуха с получением продукта в виде смолы и смеси диастереоизомеров.

Смесь разделяли с помощью ВЭЖХ (колонка Phenomenex Lux IA, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 50 мм, длиной 250 мм, MeCN/MeOH 95/05 при 120 мл/мин). Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 5(а) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 91 мг, 37%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,97 - 2,08 (3H, m), 2,23 - 2,31 (1H, m), 3,07 - 3,19 (4H, m), 3,46 - 3,6 (3H, m), 3,75 (1H, dd), 4,23 (1H, s), 4,37 (1H, dt), 6,86 (1H, dd), 7,03 - 7,44 (6H, m), 7,63 (1H, d), 8,48 (1H, dd), 12,00 (1H, s); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 503.

Примера 5(б) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 43 мг, 17%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,97 - 2,11 (3H, m), 2,28 (1H, dt), 3,07 - 3,19 (4H, m), 3,48 (1H, dd), 3,52 - 3,6 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,23 (1H, s), 4,34 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,02 - 7,43 (6H, m), 7,63 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,98 (1H, s); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 503.

Примеры 6(а) и 6(б). (2S)-2-(Азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид и (2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид



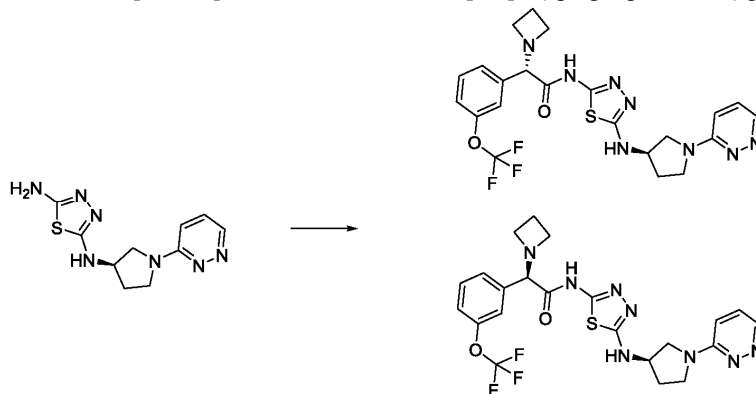
НАТУ (413 мг, 1,09 ммоль) добавляли к 2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)уксусной кислоте (промежуточное соединение 17, 185 мг, 0,84 ммоль), N-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 220 мг, 0,84 ммоль) и DIPEA (0,438 мл, 2,51 ммоль) в N-метил-2-пирролидиноне (15 мл) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Этот раствор разбавляли метанолом (15 мл) и пропускали через картридж SCX-2, 20 г, промывая метанолом для удаления примесей, а затем 1н. раствором аммиака в метаноле с целью вымывания продукта. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растворяли в метаноле/дихлорметане и выпаривали на силикагель. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния, (градиент элюирования от 0 до 12% метанола в дихлорметане). Чистые фракции выпаривали досуха с получением продукта в виде твердого вещества и смеси диастереоизомеров.

Смесь разделяли с помощью ВЭЖХ (колонка Phenomenex Lux III, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 50 мм, длиной 250 мм, элюэнт EtOH при 120 мл/мин). Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 6(a) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 137 мг, 39%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,95 - 2,11 (3H, m), 2,22 - 2,32 (1H, m), 3,11 (4H, dq), 3,44 - 3,59 (3H, m), 3,71 - 3,77 (4H, m), 4,14 (1H, s), 4,36 (1H, dt), 6,82 - 6,88 (2H, m), 7,03 (1H, d), 7,06 (1H, d), 7,24 (1H, t), 7,31 (1H, dd), 7,61 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,86 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 467.

Примера 6(b) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 67 мг, 19%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,95 - 2,09 (3H, m), 2,22 - 2,31 (1H, m), 3,04 - 3,17 (4H, m), 3,45 - 3,59 (3H, m), 3,71 - 3,78 (4H, m), 4,14 (1H, s), 4,33 - 4,4 (1H, m), 6,83 - 6,88 (2H, m), 7,03 (1H, d), 7,06 (1H, s), 7,25 (1H, t), 7,31 (1H, dd), 7,61 (1H, d), 8,47 (1H, d), 11,88 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 467.

Примеры 7(a) и 7(b). (2S)-2-(Азетидин-1-ил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид и (2R)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид



НАТУ (225 мг, 0,59 ммоль) добавляли к 2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоте (промежуточное соединение 20, 125 мг, 0,46 ммоль), N-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 120 мг, 0,46 ммоль) и DIPEA (0,239 мл, 1,37 ммоль) в N-метил-2-пирролидиноне (4 мл) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Этот раствор разбавляли метанолом (15 мл) и пропускали через картридж SCX-2, 20 г, промывая метанолом для удаления примесей, а затем 1н. раствором аммиака в метаноле с целью вымывания продукта. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт растворяли в метаноле/дихлорметане и выпаривали на силикагель. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния, (градиент элюирования от 0 до 7% метанола в дихлорметане). Чистые фракции выпаривали досуха с получением продукта в виде смолы и смеси диастереоизомеров.

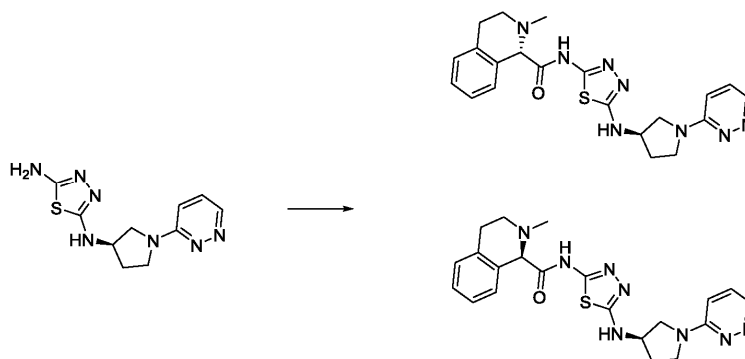
Смесь разделяли с помощью ВЭЖХ (колонка Chiral Technologies IA, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 50 мм, длиной 250 мм, смесь 90/10 MeCN/MeOH в качестве элюентов, расход 120 мл/мин). Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 7(a) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 72 мг, 38%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,95 - 2,09 (3H, m), 2,26 (1H, dt), 3,11 (4H, dq), 3,48 (1H, dd), 3,51 - 3,58 (2H, m), 3,74 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,36 (1H, dt), 6,85 (1H, dd), 7,28 - 7,34 (2H, m), 7,45 - 7,51 (3H, m), 7,64 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 12,09 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 521.

Примера 7(b) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 79 мг, 42%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,96 - 2,11 (3H, m), 2,23 - 2,32 (1H, m), 3,05 - 3,16 (4H, m), 3,47 (1H, dd), 3,51 - 3,59 (2H, m), 3,73 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,36 (1H, dq), 6,84 (1H, dd), 7,27 - 7,33 (2H, m), 7,44 - 7,5 (3H, m), 7,63 (1H, d), 8,46 (1H, dd), 12,07 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 521.

Примеры 8(a) и 8(b). (1S)-2-Метил-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиа-

диазол-2-ил]-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоксамида и (1R)-2-метил-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-ил-пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоксамида



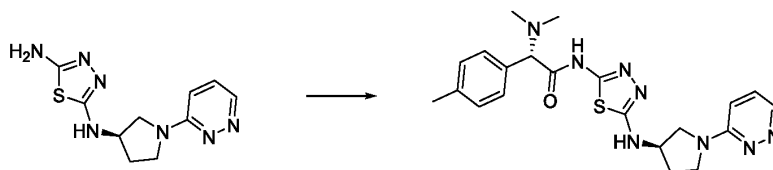
НАТУ (238 мг, 0,63 ммоль) добавляли к 2-метил-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоновой кислоте, HCl (промежуточное соединение 24, 110 мг, 0,48 ммоль), N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 127 мг, 0,48 ммоль) и DIPEA (0,295 мл, 1,69 ммоль) в N-метил-2-пирролидиноне (2 мл) и DMF (3 мл) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Этот раствор разбавляли метанолом (15 мл) и пропускали через картридж SCX-2, 20 г, промывая метанолом для удаления примесей, а затем 1н. раствором аммиака в метаноле с целью вымывания продукта. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования от 0 до 6% метанола в дихлорметане). Чистые фракции выпаривали досуха с получением продукта в виде смолы и смеси диастереоизомеров.

Смесь разделяли с помощью ВЭЖХ (колонка Phenomenex Lux C2, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 50 мм, длиной 250 мм, с использованием EtOH в качестве элюэнта с расходом 120 мл/мин). Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением следующего.

Примера 8(a) в качестве первого элюированного изомера (твердое вещество, 49 мг, 43%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,02 - 2,11 (1H, m), 2,23 - 2,31 (1H, m), 2,37 (3H, s), 2,54 - 2,61 (1H, m), 2,78 (1H, dt), 2,95 (1H, dt), 3,18 - 3,25 (1H, m), 3,47 - 3,59 (3H, m), 3,75 (1H, dd), 4,35 (1H, s), 4,36 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,11 - 7,19 (4H, m), 7,32 (1H, dd), 7,65 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,95 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 437.

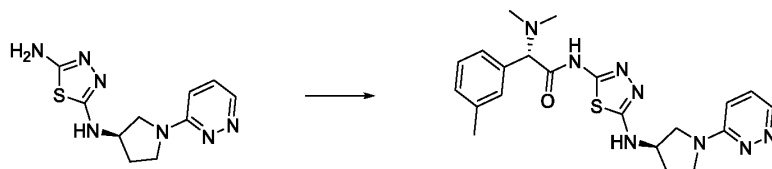
Примера 8(b) в качестве второго элюированного изомера (твердое вещество, 52 мг, 46%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,03 - 2,11 (1H, m), 2,23 - 2,32 (1H, m), 2,37 (3H, s), 2,54 - 2,62 (1H, m), 2,79 (1H, dt), 2,94 (1H, dt), 3,18 - 3,26 (1H, m), 3,42 - 3,59 (3H, m), 3,74 (1H, dd), 4,35 (1H, s), 4,37 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,11 - 7,19 (4H, m), 7,31 (1H, dd), 7,65 (1H, d), 8,47 (1H, dd), 11,97 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 437.

Пример 9. (2S)-2-(Диметиламино)-2-(4-метилфенил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил] ацетамид



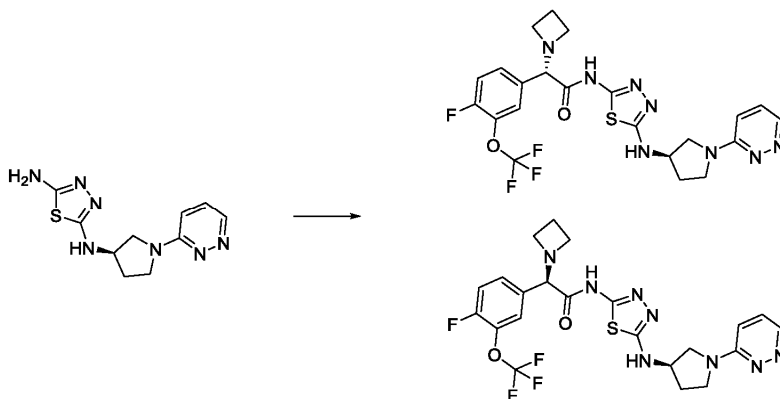
НАТУ (347 мг, 0,91 ммоль) добавляли к (2S)-2-(диметиламино)-2-(п-толил)уксусной кислоте (промежуточное соединение 26, 161 мг, 0,84 ммоль), N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 200 мг, 0,76 ммоль) и DIPEA (0,133 мл, 0,76 ммоль) в DMA (7 мл) при 21°C в атмосфере азота. Полученный раствор перемешивали при 0°C в течение 45 мин. Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии с применением колонки SCX. Требуемый продукт элюировали из колонки с применением 1M NH₃/MeOH и чистые фракции выпаривали досуха с получением неочищенного продукта в виде смолы. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования от 0 до 10% MeOH в DCM). Чистые фракции выпаривали досуха, растирали с DCM/простым эфиром и фильтровали с получением (2S)-2-(диметиламино)-2-(4-метилфенил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида (109 мг, 33%) в виде твердого вещества кремового цвета; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,25 (1H, m), 2,08 (1H, dt), 2,19 (6H, s), 2,24 - 2,36 (4H, m), 3,48 (1H, dd), 3,54 - 3,65 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,34 - 4,5 (1H, m), 6,86 (1H, dd), 7,18 (2H, d), 7,28 - 7,44 (3H, m), 7,66 (1H, d), 8,48 (1H, dd), 12,12 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 439.

Пример 10. (2S)-2-(Диметиламино)-2-(3-метилфенил)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид



НАТУ (416 мг, 1,09 ммоль) добавляли к (2S)-2-(диметиламино)-2-(м-толил)уксусной кислоте (промежуточное соединение 27, 194 мг, 1,00 ммоль), N'-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 240 мг, 0,91 ммоль) и DIPEA (0,159 мл, 0,91 ммоль) в DMF (12 мл) при 21°C в атмосфере азота. Полученный раствор перемешивали при 0°C в течение 30 мин. Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии с применением колонки SCX. Требуемый продукт элюировали из колонки с применением 1M NH₃/MeOH и чистые фракции выпаривали досуха с получением смолы. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования от 0 до 10% метанола в DCM). Чистые фракции выпаривали досуха, растирали с DCM/простым эфиром и фильтровали с получением (2S)-2-(диметиламино)-2-(м-толил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида (91 мг, 23%) в виде твердого вещества кремового цвета; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 1,25 (1H, m), 2,08 (1H, dq), 2,19 - 2,42 (10H, m), 3,49 (1H, dd), 3,57 (2H, td), 3,75 (1H, dd), 4,29 - 4,46 (1H, m), 6,88 (1H, dd), 7,19 (1H, s), 7,26 - 7,41 (4H, m), 7,71 (1H, s), 8,48 (1H, dd), 12,30 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 439.

Примеры 11 (a) и 11(b). (2S)-2-(Азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид и (2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид

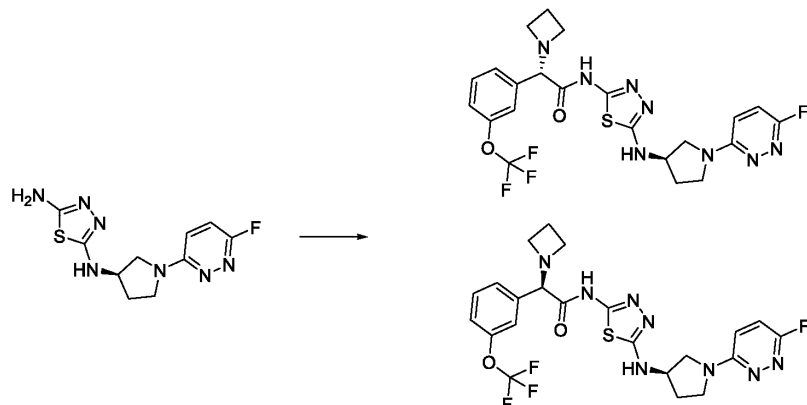


N2-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамин (промежуточное соединение 28, 0,09 г, 0,30 ммоль) растворяли в DMF (2 мл) в атмосфере N₂ при к.т. Добавляли [2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетил]оксилитий (промежуточное соединение 1, 0,09 г, 0,307 ммоль), а затем - DIPEA (0,08 мл, 0,46 ммоль). Смесь перемешивали в течение 5 мин перед добавлением НАТУ (139,9 мг, 0,36 ммоль), а затем - в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли, используя MeOH (1 мл), и пропускали через картридж SCX, 5 г, промывали MeOH, затем элюировали, используя 2M NH₃ в MeOH. Основную фракцию выпаривали и остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка SunFire C18, 5 мкм, 50 мм × 19 мм, расход 25 мл/мин). В качестве подвижной фазы применяли соотношения воды и MeCN, содержащего 0,1% муравьиной кислоты, с уменьшением полярности. Чистые фракции объединяли, выпаривали и абсорбировали на 1 г SCX картридж, который промывали MeOH и затем элюировали с помощью 2M NH₃ в MeOH с получением 2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида в виде грязно-белого твердого вещества (88 мг, 53%). Диастереомеры разделяли с помощью хиральной препаративной ВЭЖХ (колонка ChiralPak IA, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 50 мм, длиной 250 мм), MeCN/MeOH 90/10 при 120 мл/мин. Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением

примера 11(a) в качестве первого элюированного изомера (35,4 мг, 21%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) 1,97 - 2,1 (3H, m), 2,23 - 2,32 (1H, m), 3,06 - 3,17 (4H, m), 3,49 (1H, dd), 3,53 - 3,59 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,34 - 4,42 (1H, m), 6,86 (1H, d), 7,32 (1H, dd), 7,47 - 7,58 (2H, m), 7,64 (2H, dd), 8,48 (1H, d); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

Примера 11(b) в качестве второго элюированного изомера (26,9 мг, 16%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) 1,96 - 2,11 (3H, m), 2,23 - 2,34 (1H, m), 3,07 - 3,17 (4H, m), 3,48 (1H, dd), 3,53 - 3,6 (2H, m), 3,75 (1H, dd), 4,26 (1H, s), 4,33 - 4,42 (1H, m), 6,85 (1H, dd), 7,32 (1H, dd), 7,47 - 7,57 (2H, m), 7,64 (2H, dd), 8,48 (1H, dd); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

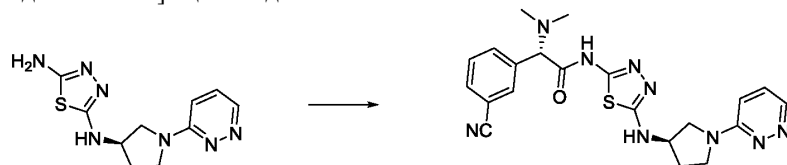
Примеры 12(a) и 12(b). (2S)-2-(Азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид и (2R)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид



N2-[(3R)-1-(6-Фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамин (промежуточное соединение 6, 0,11 г, 0,38 ммоль) и [2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетил]оксилитий (промежуточное соединение 21, 0,13 г, 0,46 ммоль) растворяли в DMF (2 мл) при к.т. в атмосфере N₂. Смесь перемешивали в течение 5 мин перед добавлением DIPEA (0,34 мл, 1,943 ммоль) и HATU (0,4 мл, 0,389 ммоль), а затем - при к.т. в течение 2 ч. Неочищенную смесь абсорбировали на колонку SCX 5 г, которую промывали MeOH и затем элюировали с помощью 2M NH₃ в MeOH. Основную фракцию выпаривали с получением оранжевой смолы. Основную фракцию выпаривали и остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка SunFire C18, 5 мкм, 50 мм × 19 мм, расход 25 мл/мин). В качестве подвижной фазы применяли соотношения воды и MeCN, содержащего 0,1% муравьиной кислоты, с уменьшением полярности. Чистые фракции объединяли, выпаривали и абсорбировали на 1 г SCX картридж, который промывали MeOH и затем элюировали с помощью 2M NH₃ в MeOH с получением 2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида в виде грязно-белого твердого вещества. Диастереомеры разделяли с помощью хиральной препаративной ВЭЖХ (колонка ChiralPak IC, 20 мкм диоксид кремния, диаметром 50 мм, длиной 250 мм), гептан/EtOAc 20/80 (+0,2% TEA) при 120 мл/мин. Фракции, содержащие требуемые соединения, выпаривали досуха с получением примера 12(a) в качестве первого элюированного изомера (28,60 мг, 13%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) 2,04 - 2,18 (3H, m), 2,34 (1H, dt), 3,20 (4H, dq), 3,54 (1H, dd), 3,58 - 3,67 (2H, m), 3,81 (1H, dd), 4,35 (1H, s), 4,4 - 4,48 (1H, m), 7,23 (1H, dd), 7,35 - 7,4 (1H, m), 7,42 (1H, dd), 7,53 - 7,55 (1H, m), 7,57 (2H, d), 7,71 (1H, d), 12,07 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

Примера 12(b) в качестве второго элюированного изомера (13,5 мг, 6%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) 1,96 - 2,1 (3H, m), 2,28 (1H, dt), 3,13 (4H, dq), 3,46 (1H, dd), 3,51 - 3,59 (2H, m), 3,74 (1H, dd), 4,28 (1H, s), 4,34 - 4,41 (1H, m), 7,16 (1H, dd), 7,29 - 7,32 (1H, m), 7,34 (1H, dd), 7,47 - 7,49 (1H, m), 7,50 (2H, d), 7,64 (1H, d), 12,00 (1H, s); масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 539.

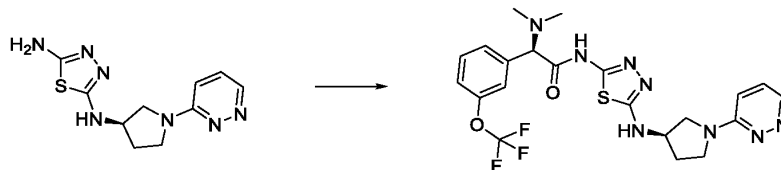
Пример 13. (2S)-2-(3-Цианофенил)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-ил]пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил] ацетамид



N2-[(3R)-1-пиридазин-3-ил]пирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамин (промежуточное соединение 1, 0,09 г, 0,30 ммоль) растворяли в DMF (2 мл) в атмосфере N₂ при к.т. Добавляли (2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)уксусную кислоту (промежуточное соединение 32, 0,06 г, 0,307 ммоль), а затем - DIPEA (0,08 мл, 0,46 ммоль). Смесь перемешивали в течение 5 мин перед добавлением HATU (139,9 мг, 0,368 ммоль) и затем перемешивали при к.т. в течение 90 мин. Реакционную смесь разбавляли, используя MeOH (1 мл) и пропускали через картридж SCX 5 г, промывали MeOH и затем элюировали с помощью 2M NH₃ в MeOH. Основную фракцию упаривали и очищали препаративной ВЭЖХ (колонка XBridge OBD C18, 5 мкм, 50 мм × 19 мм, расход 25 мл/мин, в качестве подвижной фазы использовали соотношения воды и MeCN, содержащего 0,3 мл/л NH₄OH, с понижающейся полярностью). Чистые фракции объединяли и выпаривали, получая (2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-ил]пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид в виде твердого вещества бежевого цвета (43 мг, 31%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,09 - 2,02 (1H, m), 2,14 (6H, d), 2,32 - 2,24 (1H, m), 3,60 - 3,43 (3H, m), 3,74 (1H, dd), 4,17 (1H, s), 4,38 (1H, q), 6,87 (1H, ddd), 7,33 (1H, ddd), 7,60 (1H, td), 7,71 (1H,

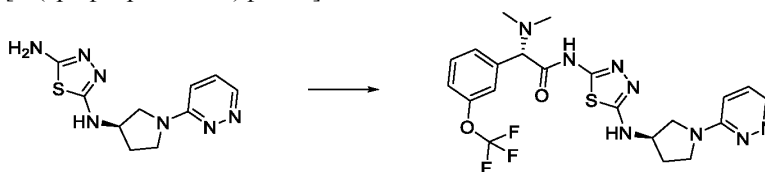
d), 7,80 (2H, ddq), 7,87 (1H, t), 8,48 (1H, dt), 12,30 (1H, s); масса/заряд: $ES^+ [M+H]^+$ 450.

Пример 14. (2R)-2-(Диметиламино)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид



DIPEA (0,199 мл, 1,14 ммоль) добавляли к N2-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 150 мг, 0,57 ммоль), (2R)-2-(диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоте (промежуточное соединение 38, 150 мг, 0,57 ммоль), EDC (218 мг, 1,14 ммоль) и НОВТ (87 мг, 0,57 ммоль) в DMF (4 мл) при 25°C. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 мкм диоксид кремния, 50 мм в диаметре, 150 мм в длину) с применением смесей воды и MeCN с уменьшающейся полярностью в качестве элюентов. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали досуха с получением (2R)-2-(диметиламино)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида (15 мг, 5%) в виде коричневого твердого вещества; 1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD , 30°C) δ 2,27-2,35 (1H, m), 2,44-2,56 (1H, m), 2,88 (s, 6H), 3,72-3,84 (m, 3H), 3,97-4,03 (m, 1H), 4,54-4,59 (m, 1H), 5,16 (s, 1H), 7,50-7,73 (m, 5H), 7,84-7,88 (m, 1H), 8,53 (s, 1H); масса/заряд: $ES^- [M-H]^-$ 507.

Пример 18. (2S)-2-(Диметиламино)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид



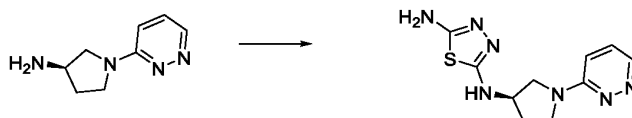
DIPEA (0,199 мл, 1,14 ммоль) добавляли к N2-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамину (промежуточное соединение 1, 150 мг, 0,57 ммоль), (2S)-2-(диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоте (промежуточное соединение 39, 150 мг, 0,57 ммоль), EDC (218 мг, 1,14 ммоль) и НОВТ (87 мг, 0,57 ммоль) в DMF (4 мл) при 25°C. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Неочищенный продукт очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (колонка Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 мкм диоксид кремния, 50 мм в диаметре, 150 мм в длину) с применением смесей воды и MeCN с уменьшающейся полярностью в качестве элюентов. Фракции, содержащие требуемое соединение, выпаривали досуха, получая (2S)-2-(диметиламино)-N-[5-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид (15 мг, 5%) в виде коричневого твердого вещества; 1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD , 30°C) δ 2,28-2,35 (1H, m), 2,45-2,59 (1H, m), 2,86 (s, 6H), 3,69-3,77 (1H, m), 3,77-3,84 (m, 2H), 3,95-4,01 (1H, m), 4,56-4,58 (1H, m), 5,12 (s, 1H), 7,49-7,69 (m, 5H), 7,79-7,84 (m, 1H), 8,51 (d, 1H); масса/заряд: $ES^- [M-H]^-$ 507.

Дополнительные примеры.

Соединения следующих примеров получали аналогично приведенным выше примерам

Пример №	Название	Данные MS
14	(2 <i>R</i>)-2-(диметиламино)- <i>N</i> -[[(3 <i>R</i>)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид	масса/заряд (ES ⁺), [M-H] ⁻ = 507
15	(2 <i>R</i>)-2-(диметиламино)-2-(4-метоксифенил)- <i>N</i> -[5-[[[(3 <i>R</i>)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид	масса/заряд (ES ⁺), [M+H] ⁺ = 455
16	(2 <i>S</i>)-2-(диметиламино)-2-(4-метоксифенил)- <i>N</i> -[5-[[[(3 <i>R</i>)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид	масса/заряд (ES ⁺), [M+H] ⁺ = 455
17	(2 <i>S</i>)-2-(диметиламино)-2-(<i>o</i> -толил)- <i>N</i> -[5-[[[(3 <i>R</i>)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамид	масса/заряд (ES ⁺), [M+H] ⁺ = 439
18	(2 <i>S</i>)-2-(диметиламино)- <i>N</i> -[5-[[[(3 <i>R</i>)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамид	масса/заряд (ES ⁺), [M-H] ⁻ = 507

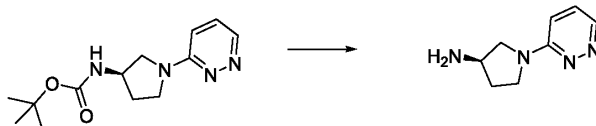
Промежуточное соединение 1. *N*'-[(3*R*)-1-Пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамин



В круглодонную колбу емкостью 1 л помещали раствор (3*R*)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-амин дигидрохлорида (промежуточное соединение 2, 10,5 г, 44,29 ммоль) в DMF (400 мл), 5-бром-1,3,4-тиадиазол-2-амин (7,94 г, 44,10 ммоль) и DIPEA (17,07 г, 132,08 ммоль). Раствор перемешивали в течение 4 ч при 80°C. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали с помощью повторной кристаллизации из этанола/EtOAc с получением *N*'-[(3*R*)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамина в виде светло-желтого твердого вещества (11 г, 94%). ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆, 30°C) δ 2,04 (1H, td), 2,22 - 2,31 (1H, m), 3,43 - 3,62 (3H, m), 3,72 (1H, dd), 4,28 (1H, dq), 6,27 (2H, s), 6,86 (1H, dd), 7,07 (1H, d), 7,33 (1H, dd), 8,48 (1H, dd). масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 264,28. Промежуточное соединение 1 также получали в крупных масштабах в соответствии со следующей альтернативной процедурой.

(*R*)-1-(Пиридазин-3-ил)пирролидин-3-амин (промежуточное соединение 3, форма свободного основания, 25,5 г, 150,63 ммоль) и 5-бром-1,3,4-тиадиазол-2-амин (29,8 г, 165,70 ммоль) с DIPEA (39,4 мл, 225,95 ммоль) взбалтывали как суспензию в MeOH (200 мл) при 45°C. Суспензию охлаждали до 20°C и выделяли твердое вещество вакуумной фильтрацией. 50 мл MeOH использовали для промывки осадка на фильтре методом вытеснения и затем высушивали осадок на протяжении ночи в вакуумной печи при 40°C. Промежуточное соединение 1 (32,9 г, 83%) получали в виде свободнотекущего бежевого порошка.

Промежуточное соединение 2. (3*R*)-1-Пиридазин-3-илпирролидин-3-амин дигидрохлорид



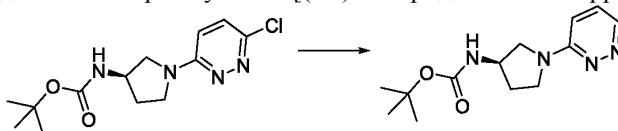
В круглодонную колбу емкостью 1 л помещали раствор трет-бутил-*N*-[(3*R*)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]карбамата (промежуточное соединение 4, 20 г, 75,66 ммоль) в диоксане (200 мл) и концентрированной HCl (100 мл). Раствор перемешивали в течение 30 мин при к.т. Полученную смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт повторно кристаллизовали из MeOH/EtOAc в соотношении 1:2. Это привело к образованию (3*R*)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-амин дигидрохлорида в виде грязно-белого твердого вещества (13,4 г, 75%). ¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-*d*₆, 26°C) δ 2,25 - 2,43 (2H, m), 3,66 - 3,74 (1H, m), 3,78 - 3,90 (3H, m), 4,02 - 4,10 (1H, m), 7,75 (1H, d), 7,94 (1H, dd), 8,66 (1H, d), 8,77-8,98 (3H, brn). масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 165.

Промежуточное соединение 3 (в форме свободного основания) также получали в соответствии со следующей процедурой:

трет-бутил-*N*-[(3*R*)-1-(6-хлорпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]карбамат (промежуточное соединение 5, 20 г, 107,38 ммоль) в пиридине (400 мл) смешивали с гидроксидом палладия на угле (Pearlman's

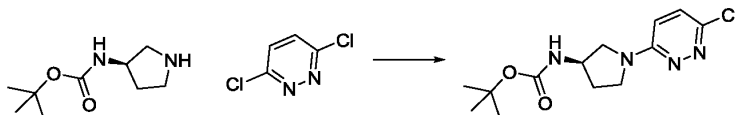
Catalyst, 27,5 г, 25,84 ммоль) и 1-метил-1,4-циклогексадиеном (31,0 мл, 276,13 ммоль) в MeOH (1375 мл). Реакционную смесь затем нагревали до 65°C в течение 90 мин. После того как наблюдали полное превращение, реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и удаляли катализатор путем фильтрации. 3М HCl в MeOH (184 мл, 552,27 ммоль) затем загружали в реакционную смесь и раствор нагревали до 65°C в течение 1 ч. После того как наблюдали полное превращение, реакционный раствор охлаждали до температуры окружающей среды и пропускали через колонки SCX 10 × 50 г, которые предварительно элюировали с помощью MeOH. Соединение высвобождали из SCX с применением 1М NH₃ в MeOH. Полученный раствор разбавляли толуолом (1 л) и концентрировали досуха путем ротационного выпаривания с получением свободнотекущего твердого вещества. (3R)-1-Пиридазин-3-илпирролидин-3-амин выделяли при концентрации 97% вес/вес в виде свободного основания.

Промежуточное соединение 4. Трет-бутил-N-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]карбамат



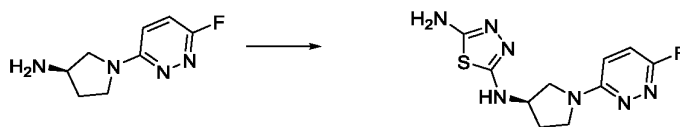
В круглодонную колбу емкостью 2 л помещали раствор трет-бутил-N-[(3R)-1-(6-хлорпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]карбамата (промежуточное соединение 5, 23 г, 76,98 ммоль) в MeOH (800 мл) и палладий на угле (2 г). Систему очищали и поддерживали с помощью газообразного водорода. Полученный раствор перемешивали в течение 4 ч при к.т. Твердые вещества отфильтровывали. Полученную смесь концентрировали под вакуумом с получением трет-бутил-N-[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]карбамата (20 г, 84%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃, 24°C) δ 1,44 (9H, s), 2,25 - 2,35 (2H, m), 3,48 - 3,56 (1H, m), 3,70 - 4,10 (3H, m), 4,35 - 4,42 (1H, m), 7,26 - 7,32 (1H, m), 7,70 - 7,75 (1H, m), 8,53 - 8,55 (1H, m). масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 265.

Промежуточное соединение 5. трет-Бутил-N-[(3R)-1-(6-хлорпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]карбамат



В круглодонную колбу емкостью 1 л помещали раствор трет-бутил-N-[(3R)-1-пирролидин-3-ил]карбамата (20 г, 107,38 ммоль) в пиридине (400 мл) и 3,6-дихлорпиридазине (16 г, 107,40 ммоль). Полученный раствор кипятили с обратным холодильником на протяжении ночи. Полученную смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью повторной кристаллизации из этанола/Et₂O в соотношении 1:3 с получением трет-бутил-N-[(3R)-1-(6-хлорпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]карбамата (23 г, 72%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, 30°C) δ 1,45 (9H, s), 2,02 (1H, dq), 2,31 (1H, td), 3,41 (1H, dd), 3,54 - 3,70 (2H, m), 3,78 (1H, dd), 4,37 (1H, s), 4,76 (1H, s), 6,61 (1H, d), 7,17 (1H, d). масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 299.

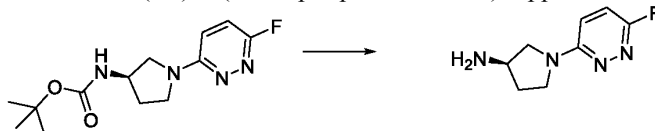
Промежуточное соединение 6. N2-[(3R)-1-(6-Фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамин



DIPEA (3,48 мл, 19,96 ммоль) добавляли к 5-бром-1,3,4-тиадиазол-2-амину (1,797 г, 9,98 ммоль) и (3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-амину (промежуточное соединение 7, 2 г, 10,98 ммоль) в безводном DMF (40 мл) при к.т.

Полученный раствор перемешивали при 80°C в течение 4 ч. Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии с применением колонки SCX. Требуемый продукт элюировали из колонки с применением 1М NH₃ в MeOH и чистые фракции выпаривали досуха с получением N2-[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]-1,3,4-тиадиазол-2,5-диамина (2,9 г, 103%) в виде коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆, 30°C) δ 1,90 - 2,12 (1H, m), 2,23 (1H, dtd), 3,42 (1H, dd), 3,47 - 3,61 (2H, m), 3,69 (1H, dd), 4,25 (1H, dq), 6,25 (2H, s), 7,04 (1H, d), 7,14 (1H, dd), 7,33 (1H, dd). масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 282.

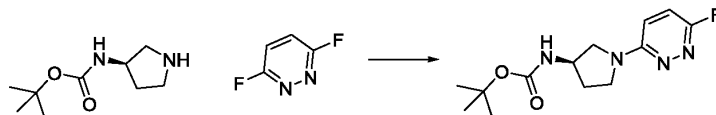
Промежуточное соединение 7. (3R)-1-(6-Фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-амин



трет-Бутил-N-[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]карбамат (промежуточное соединение 8, 6 г, 21,25 ммоль) добавляли к DCM (70 мл) и TFA (14,00 мл) при 25°C. Полученный раствор пере-

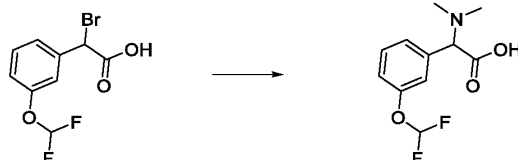
мешивали при 25°C в течение 4 ч. Неочищенный продукт очищали с помощью ионообменной хроматографии с применением колонки SCX. Требуемый продукт элюировали из колонки с применением 1M NH₃ в MeOH и чистые фракции выпаривали досуха с получением (3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-амин (2,0 г, 52%) в виде бледно-желтого смолистого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆, 30°C) δ 1,55 - 1,83 (1H, m), 1,98 - 2,13 (1H, m), 2,89 - 3,14 (1H, m), 3,29 - 3,43 (1H, m), 3,54 (3H, ddt), 7,06 (1H, dd), 7,30 (1H, dd). масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 183.

Промежуточное соединение 8. трет-Бутил-N-[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]карбамат



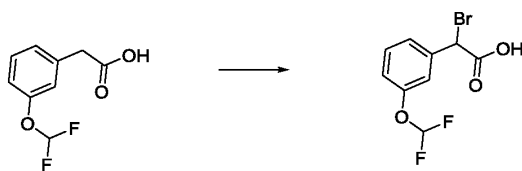
Смесь 3,6-дифторпиридазина (6,06 г, 52,21 ммоль), трет-бутил-N-[(3R)-пирролидин-3-ил]карбамата (9,72 г, 52,21 ммоль), DIPEA (22,80 мл, 130,53 ммоль) и н-бутанола (140 мл) перемешивали при 130°C в течение 10 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (750 мл) и дважды промывали водой (150 мл). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и выпаривали с получением неочищенного продукта. Затем его растворяли в DCM, а неочищенный продукт очищали с помощью FCC (SiO₂, 30-65% EtOAc в гептанах). Чистые фракции выпаривали досуха с получением трет-бутил-N-[(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]карбамата (15 г, 102%) в виде твердого вещества кремового цвета. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, 30°C) δ 1,46 (9H, s), 1,91 - 2,13 (1H, m), 2,32 (1H, dq), 3,40 (1H, dd), 3,56 - 3,72 (2H, m), 3,78 (1H, dd), 4,37 (1H, s), 4,70 (1H, s), 6,78 (1H, dd), 6,98 (1H, dd). масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 283.

Промежуточное соединение 9. 2-[3-(Дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)уксусная кислота



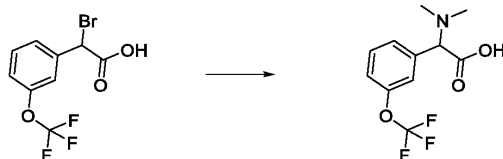
2M диметиламин в THF (0,623 мл, 1,25 ммоль) добавляли к 2-бром-2-(3-(дифторметокси)фенил)уксусной кислоте (промежуточное соединение 10, 350 мг, 1,25 ммоль) и DIPEA (0,665 мл, 3,74 ммоль) в MeCN (8 мл) при 21°C в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Реакционную смесь затем выпаривали с получением неочищенной 2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)уксусной кислоты в виде коричневой смолы, которую использовали в неочищенном виде в последующих стадиях; масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 246.

Промежуточное соединение 10. 2-Бром-2-(3-(дифторметокси)фенил)уксусная кислота



2-(3-(Дифторметокси)фенил)уксусную кислоту (263 мг, 1,30 ммоль) и NBS (255 мг, 1,43 ммоль) растворяли в хлороформе (10 мл) и нагревали при 80°C. К этому добавляли (E)-2,2'-(диазен-1,2-диил)бис(2-метилпропаннитрил) (10,68 мг, 0,07 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 3 часов. Затем добавляли дополнительное количество NBS (120 мг) и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником еще 1,5 ч. Реакционную смесь затем выдерживали при температуре окружающей среды в течение ночи. Добавляли дополнительное количество NBS (60 мг) и реакционную смесь нагревали при 80°C еще 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до к.т. и удаляли хлороформ при пониженном давлении, в остатке получали неочищенную 2-бром-2-(3-(дифторметокси)фенил)уксусную кислоту, которую использовали без очистки в последующих реакциях. Масса/заряд: ES⁺ [M-H]⁻ 279.

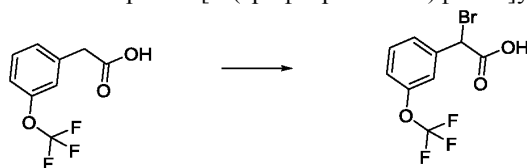
Промежуточное соединение 11. 2-(Диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусная кислота



2M Диметиламин в THF (7,94 мл, 15,88 ммоль) добавляли к 2-бром-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоте (промежуточное соединение 12, 4,75 г, 15,88 ммоль) и DIPEA (8,48 мл, 47,65 ммоль) в MeCN (75 мл) при 21°C с небольшим экзотермическим эффектом. Полученную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Реакционную смесь затем выпаривали с получением 2-(диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоты в виде коричневой смо-

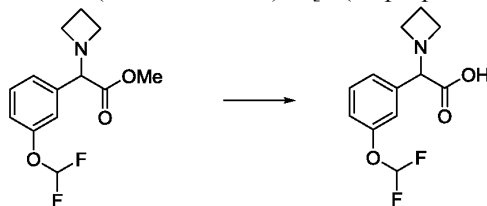
лы, которую использовали в неочищенном виде в последующей стадии. Масса/заряд: $ES^+ [M+H]^+$ 264.

Промежуточное соединение 12. 2-Бром-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусная кислота



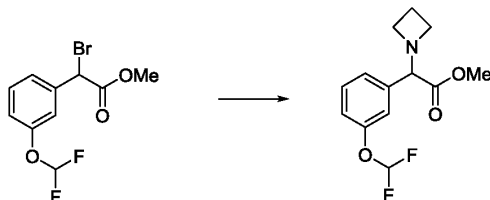
2-(3-(Трифторметокси)фенил)уксусную кислоту (3,5 г, 15,90 ммоль) и NBS (3,11 г, 17,49 ммоль) растворяли в хлороформе (100 мл) и нагревали при 80°C. К этому добавляли (Е)-2,2'-(диазен-1,2-диил)бис(2-метилпропаннитрил) (0,131 г, 0,79 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 6 ч. Затем реакционной смеси давали выстояться при температуре окружающей среды в течение выходных дней. Растворитель затем выпаривали, получая неочищенную 2-бром-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусную кислоту, которую затем использовали без дальнейшей очистки. Масса/заряд: $ES^+ [M+H]^+$ 297.

Промежуточное соединение 13. 2-(Азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]уксусная кислота



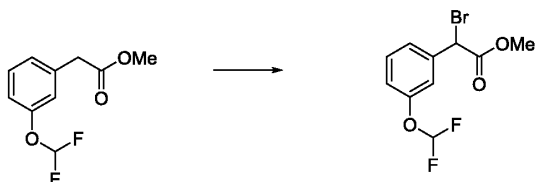
Раствор моногидрата гидроксида лития (96 мг, 2,29 ммоль) в воде (3 мл) добавляли к раствору метил-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетата (промежуточное соединение 14, 310 мг, 1,14 ммоль) в метаноле (6 мл) и смесь перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Кислотность реакционной смеси доводили до pH 4 добавлением 2М водной HCl. Раствор пропускали через картридж SCX-2, 20 г, элюируя метанолом, а затем 1н. раствором аммиака в метаноле с целью вымывания продукта. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением 2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]уксусной кислоты (290 мг, 99%) в виде смолы; 1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,18 (2H, p), 3,56 (2H, q), 3,75 (2H, q), 4,44 (1H, s), 7,12 (1H, dd), 7,17 (1H, s), 7,20 (1H, t), 7,23 (1H, d), 7,38 - 7,43 (1H, m); масса/заряд: $ES^+ [M+H]^+$ 258.

Промежуточное соединение 14. Метил-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетат



Раствор триэтиламина (263 мкл, 1,89 ммоль) и азетидина (98 мг, 1,72 ммоль) в MeCN (2 мл) по каплям прибавляли при 0°C к раствору метил-2-бром-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетата (промежуточное соединение 15, 507 мг, 1,72 ммоль) в MeCN (5 мл). Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, а затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток разделяли между водным солевым раствором и этилацетатом, органический слой сушили ($MgSO_4$), фильтровали и выпаривали при пониженном давлении, получая метил-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетат (310 мг, 67%) в виде жидкости; 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$, 30°C) δ 2,12 (2H, p), 3,17 (2H, q), 3,28 (2H, q), 3,68 (3H, s), 4,02 (1H, s), 6,52 (1H, t), 7,04 - 7,08 (1H, m), 7,20 (1H, d), 7,25 - 7,28 (1H, m), 7,33 (1H, t); масса/заряд: $ES^+ [M+H]^+$ 272.

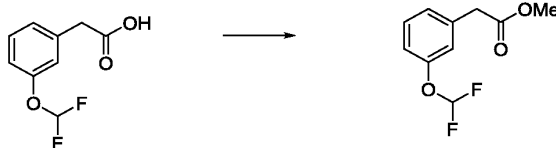
Промежуточное соединение 15. Метил-2-бром-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетат



Смесь метил-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетата (промежуточное соединение 16, 1,1 г, 5,09 ммоль) в NBS (0,951 г, 5,34 ммоль) и (Е)-2,2'-(диазен-1,2-диил)бис(2-метилпропаннитрила) (0,042 г, 0,25 ммоль) в четыреххлористом углероде (20 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. Твердое вещество отфильтровывали и отбрасывали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Очистку проводили с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования 0-5% этилацетата в гептане). Фракции, содержащие продукт, выпаривали при пониженном давлении с получением метил-2-бром-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетата

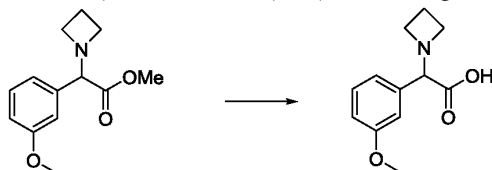
(0,830 г, 55%) в виде жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , 30°C) δ 3,80 (3H, s), 5,32 (1H, s), 6,52 (1H, t), 7,11 (1H, dt), 7,32 - 7,4 (3H, m); масса/заряд: GC EI M^+ 293,9701.

Промежуточное соединение 16. Метил-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетат



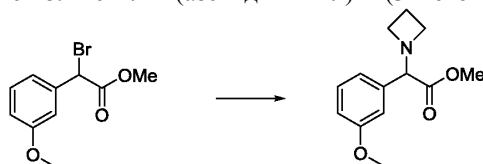
Раствор 2-(3-(дифторметокси)фенил)уксусной кислоты (1 г, 4,95 ммоль) и серной кислоты (10,87 мкл, 0,20 ммоль) в метаноле (30 мл) кипятили с обратным холодильником 2 ч, а затем охлаждали до комнатной температуры. Растворитель упаривали при пониженном давлении, а остаток разделяли между этилацетатом и водным бикарбонатом натрия. Органический слой сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением метил-2-(3-(дифторметокси)фенил)ацетата (1,1 г, 103%) в виде масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , 30°C) δ 3,63 (2H, s), 3,70 (3H, s), 6,50 (1H, t), 7,01 - 7,07 (2H, m), 7,11 - 7,15 (1H, m), 7,31 (1H, t). масса/заряд: GC EI M^+ 216,0593.

Промежуточное соединение 17. 2-(Азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)уксусная кислота



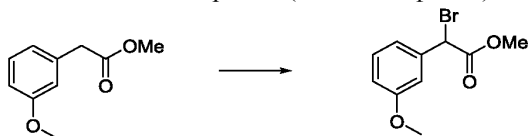
Раствор гидроксида лития (64,1 мг, 2,68 ммоль) в воде (3 мл) добавляли к раствору метил-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)ацетата (промежуточное соединение 18, 420 мг, 1,79 ммоль) в метаноле (6 мл) и смесь перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Кислотность реакционной смеси доводили до pH4 добавлением 2М водной HCl. Раствор пропускали через картридж SCX-2, 20 г, элюируя метанолом, а затем 1н. раствором аммиака в метаноле с целью вымывания продукта. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением 2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)уксусной кислоты (380 мг, 96%) в виде твердого вещества; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,14 - 2,24 (2H, m), 3,58 (2H, q), 3,74 (3H, s), 3,79 (2H, q), 4,40 (1H, s), 6,85 - 6,89 (1H, m), 6,91 - 6,95 (2H, m), 7,25 (1H, t); масса/заряд: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 222.

Промежуточное соединение 18. Метил-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)ацетат



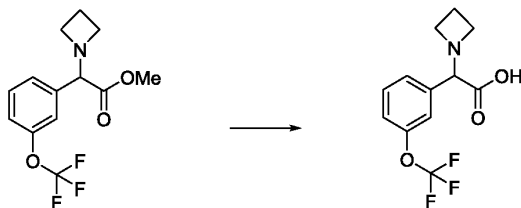
Раствор триэтиламина (284 мкл, 2,04 ммоль) и азетидина (106 мг, 1,85 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) по каплям прибавляли при 0°C к раствору метил-2-бром-2-(3-метоксифенил)ацетата (промежуточное соединение 19, 480 мг, 1,85 ммоль) в MeCN (5 мл). Смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре, а затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток разделяли между водным солевым раствором и этилацетатом, органический слой сушили (MgSO_4), фильтровали и выпаривали при пониженном давлении, получая метил-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)ацетат (420 мг, 96%) в виде жидкости; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , 30°C) δ 2,11 (2H, p), 3,16 (2H, q), 3,30 (2H, q), 3,67 (3H, s), 3,81 (3H, s), 3,99 (1H, s), 6,82 - 6,86 (1H, m), 6,96 - 7 (2H, m), 7,23 (1H, t); масса/заряд: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 236.

Промежуточное соединение 19. Метил-2-бром-2-(3-метоксифенил)ацетат



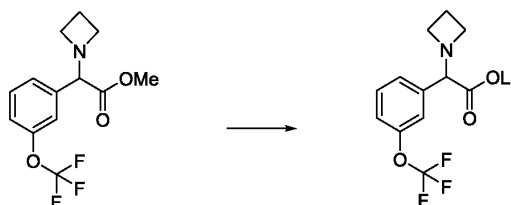
Смесь метил-2-(3-метоксифенил)ацетата (550 мг, 3,05 ммоль), NBS (570 мг, 3,20 ммоль) и (E)-2,2'-(диазен-1,2-диил)бис(2-метилпропаннитрила) (25,06 мг, 0,15 ммоль) в четыреххлористом углероде (15 мл) кипятили с обратным холодильником 4 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. Твердое вещество отфильтровывали и отбрасывали и растворитель выпаривали при пониженном давлении. Очистку проводили с помощью флэш-хроматографии на диоксиде кремния (градиент элюирования 0-10% этилацетата в гептане). Фракции, содержащие продукт, выпаривали при пониженном давлении с получением метил-2-бром-2-(3-метоксифенил)ацетата (490 мг, 62%) в виде жидкости. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , 30°C) δ 3,79 (3H, s), 3,82 (3H, s), 5,33 (1H, s), 6,88 (1H, ddd), 7,07 - 7,12 (2H, m), 7,23 - 7,29 (1H, m). масса/заряд: GC EI M^+ 257,9882.

Промежуточное соединение 20. 2-(Азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусная кислота



Раствор моногидрата гидроксида лития (116 мг, 2,77 ммоль) в воде (3 мл) добавляли к раствору метил-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетата (промежуточное соединение 22, 400 мг, 1,38 ммоль) в метаноле (6 мл) и смесь перемешивали 18 ч при комнатной температуре. Кислотность реакционной смеси затем доводили до pH 4 добавлением 2М водной HCl. Раствор пропускали через картридж SCX-2, 20 г, элюируя метанолом, а затем 1н. раствором аммиака в метаноле с целью вымывания продукта. Растворитель выпаривали при пониженном давлении до получения 2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоты (380 мг, 100%) в виде смолы. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,19 (2H, p), 3,5 - 3,6 (2H, m), 3,75 (2H, q), 4,49 (1H, s), 7,31 (1H, d), 7,35 (1H, s), 7,39 (1H, d), 7,50 (1H, t); масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 276.

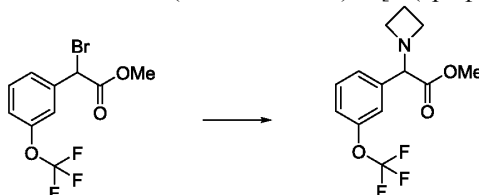
Промежуточное соединение 21. [2-(Азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетил]оксилитий



Метил-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетат (промежуточное соединение 22, 0,94 г, 3,25 ммоль) и моногидрат гидроксида лития (0,27 г, 6,5 ммоль) растворяли в смеси метанола (10 мл) и воды (5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при к.т. Реакционную смесь упаривали и сушили под вакуумом с получением [2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетил]оксилития в виде бледно-желтого твердого вещества (944 мг, 103%).

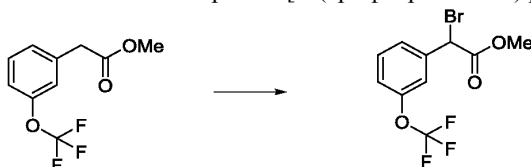
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 1,79 (p, $J = 6,9$ Гц, 2H) 2,87 (2H, q), 3,01 (2H, q), 3,52 (1H, s), 7,02 (1H, ddt), 7,30 - 7,20 (3H, m). масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 275.

Промежуточное соединение 22. Метил-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетат



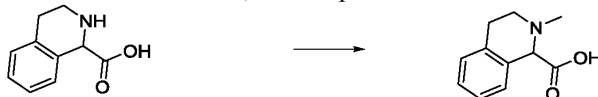
Раствор свежего азетидина (0,22 мл, 3,19 ммоль) и триэтиламина (0,49 мл, 3,51 ммоль) в MeCN (4 мл) по каплям прибавляли к метил-2-бром-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетату (промежуточное соединение 23, 1,0 г, 3,19 ммоль) в MeCN (10 мл), охлажденному на ледяной бане в атмосфере N_2 . Смеси давали нагреться до к.т. и перемешивали в течение 5 ч. Реакционную смесь выпаривали досуха и остаток разделяли между EtOAc и солевым раствором (по 75 мл каждого). Органические вещества сушили (MgSO_4) и выпаривали, получая метил-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетат в виде оранжевого масла (940 мг, 101%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,13 (2H, q), 3,17 (2H, td), 3,34 - 3,24 (2H, m), 3,69 (3H, s), 4,04 (1H, s), 7,16 (1H, m), 7,31 (1H, dq), 7,40 - 7,33 (2H, m). масса/заряд: $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 290.

Промежуточное соединение 23. Метил-2-бром-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетат



Смесь метил-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетата (3,6 г, 15,37 ммоль), N-бромсукцинимид (2,87 г, 16,14 ммоль) и AIBN (0,13 г, 0,76 ммоль) в четыреххлористом углеороде (50 мл) кипятили с обратным холодильником 3 ч. Давали охладиться до комнатной температуры и осадок удаляли фильтрацией на целите. Фильтрат выпаривали на диоксид кремния и очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии (SiO_2 , градиент элюирования от 100% циклогексана постепенно увеличивая до 10% этилацетата в циклогексане). Чистые фракции выпаривали, получая метил-2-бром-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетат в виде бледно-желтого масла (3,97 г, 82%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 3,81 (3H, s), 5,33 (1H, s), 7,22 (1H, ddq), 7,51 - 7,37 (3H, m).

Промежуточное соединение 24. 2-Метил-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-1-карбоновая кислота, HCl



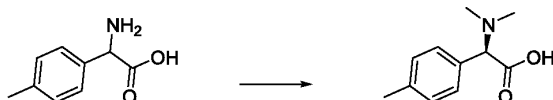
К суспензии 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-карбоновой кислоты (промежуточное соединение 25, 2,63 г, 14,84 ммоль) в MeOH (150 мл) добавляли уксусную кислоту (20 мл), хлористоводородную кислоту 6 н. (2,474 мл, 14,84 ммоль), а затем - палладий на угле 10% (350 мг, 3,29 ммоль) и формальдегид (1,506 г, 18,55 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода (из баллона) в течение 18 ч. Катализатор отфильтровывали и растворитель выпаривали при пониженном давлении, получая 2-метил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-карбоновую кислоту (3,15 г, 93%) в виде твердой гидрохлоридной соли; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO, 30°C) δ 2,89 (3H, s), 3,13 (2H, t), 3,42 - 3,49 (1H, m), 3,76 - 3,85 (1H, m), 5,33 (1H, s), 7,27 - 7,38 (3H, m), 7,41 - 7,45 (1H, m); масса/заряд: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 192.

Промежуточное соединение 25. 1,2,3,4-Тетрагидроизохинолин-1-карбоновая кислота



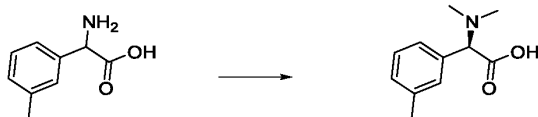
В стальной реактор объемом 300 мл загружали изохинолин-1-карбоновую кислоту (3 г, 17,32 ммоль), уксусную кислоту (100 мл) и оксид платины(IV) (0,2 г, 0,88 ммоль). Полученную смесь подвергали гидрогенизации при давлении 7 бар в течение 18 ч при перемешивании механической мешалкой. Смесь разбавляли MeOH (80 мл), фильтровали через целит и промывали, используя MeOH и уксусную кислоту. Фильтрат концентрировали до сухого состояния, получая светло-серое твердое вещество. Растиранием с MeOH получали 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-карбоновую кислоту (2,63 г, 86%) в виде светло-серого твердого вещества, которую использовали без дальнейшей очистки.

Промежуточное соединение 26. (2S)-2-(Диметиламино)-2-(4-метилфенил)уксусная кислота



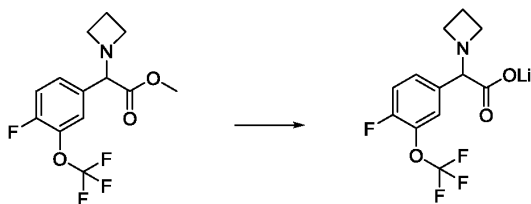
В круглодонную колбу объемом 1 л, которую продували и в которой затем поддерживали инертную атмосферу азота, помещали 2-амино-2-(п-толил)уксусную кислоту (36 г, 217,93 ммоль, 1,00 экв.), хлористый водород (120 мл, 1 н., 3,95 моль, 18,10 экв.), метанол (120 мл, 2,96 моль, 13,60 экв.), параформальдегид (37% в H_2O , 120 мл) и палладий на угле (36 г, 338,28 ммоль, 1,60 экв.). Полученный раствор перемешивали 48 ч при комнатной температуре в атмосфере водорода (из баллона). Твердые вещества отфильтровывали и фильтрат концентрировали под вакуумом. Полученный раствор разбавляли, используя 1500 мл метанола. Значение pH раствора довели до 6 с помощью MeONa. Твердые вещества отфильтровывали и полученный фильтрат концентрировали под вакуумом. Сырой продукт очищали препаративной SFC (колонка, CHIRALPAK AD-H SFC, 5 × 25 см, 5 мкм; подвижная фаза, CO_2 (55%), MEON (0,2% DEA)(45%); детектор, УФ 220 нм. Это приводило к получению (2S)-2-(диметиламино)-2-(п-толил)уксусной кислоты (10 г, 24%) в виде белого твердого вещества; ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD , 25°C) δ 2,32 (3H, s), 2,60 (6H, s), 7,19 - 7,21 (2H, d), 4,22 (1H, s), 7,37 - 7,40 (2H, d); масса/заряд: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 194.

Промежуточное соединение 27. (2S)-2-(Диметиламино)-2-(3-метилфенил)уксусная кислота



В круглодонную колбу объемом 1 л, которую продували и в которой затем поддерживали инертную атмосферу азота, помещали 2-амино-2-(4-метилфенил)уксусную кислоту (36 г, 217,93 ммоль, 1,00 экв.), хлористый водород (120 мл, 1 н., 2,60 моль, 12,00 экв.), метанол (120 мл, 2,96 моль, 13,60 экв.), параформальдегид (37% в H_2O , 120 мл) и палладий на угле (36 г, 338,28 ммоль, 1,60 экв.). Полученный раствор перемешивали 48 ч при комнатной температуре в атмосфере водорода (из баллона). Твердые вещества отфильтровывали и фильтрат концентрировали под вакуумом. Полученный раствор разбавляли метанолом (1500 мл). Значение pH раствора довели до 6 с помощью MeONa. Твердые вещества отфильтровывали и полученный фильтрат концентрировали под вакуумом. Сырой продукт очищали препаративной SFC (колонка, CHIRALPAK AD-H SFC, 5 × 25 см, 5 мкм; подвижная фаза, CO_2 (60%), MEON (0,2% DEA)(40%); детектор, УФ 220 нм. Это приводило к получению (2S)-2-(диметиламино)-2-(3-метилфенил)уксусной кислоты (10 г, 24%) в виде белого твердого вещества; ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD , 27°C) δ 2,37 (3H, s), 2,62 (6H, s), 4,20 (1H, s), 7,21 - 7,38 (4H, m); масса/заряд: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 194.

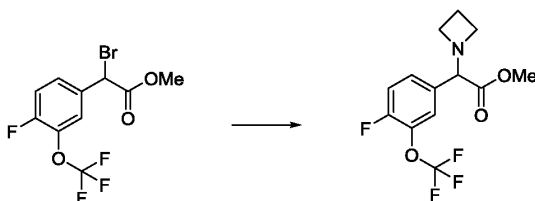
Промежуточное соединение 28. [2-(Азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетил]оксилитий



Метил-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)ацетат (промежуточное соединение 29, 0,76 г, 3,25 ммоль) и моногидрат гидроксида лития (0,1 г, 2,49 ммоль) растворяли в смеси метанола (5 мл) и воды (2 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при к.т., затем выпаривали при пониженном давлении и высушивали под вакуумом в течение выходных дней, при этом получали [2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетил]оксилитий в виде бледно-желтого твердого вещества (0,48 г, 97%).

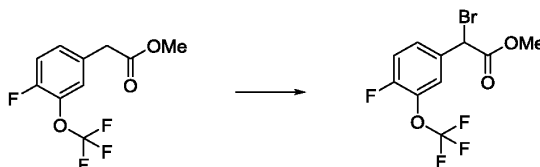
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 1,72 (2H, p), 2,80 (2H, q), 2,93 (2H, q), 3,44 (1H, s), 7,16 (1H, dd), 7,24 (1H, ddd), 7,34 (1H, dt). масса/заряд: ES^- $[\text{M}-\text{H}]^-$ 294.

Промежуточное соединение 29. Метил-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетат



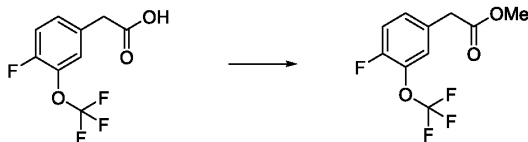
Раствор свежего азетидина (0,12 мл, 1,81 ммоль) и триэтиламина (0,28 мл, 1,99 ммоль) в MeCN (5 мл) по каплям прибавляли к метил-2-бром-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетату (промежуточное соединение 30, 0,6 г, 1,812 ммоль) в MeCN (12 мл), охлажденному на ледяной бане в атмосфере N_2 . Смеси давали нагреться до к.т. и перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь выпаривали досуха и остаток разделяли между EtOAc и солевым раствором (по 100 мл каждого). Органические вещества сушили (MgSO_4) и выпаривали, получая метил-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетат в виде желтой смолы (0,51 г, 93%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 2,14 (2H, q), 3,17 (2H, td), 3,27 (2H, td), 3,69 (3H, s), 4,00 (1H, s), 7,20 - 7,14 (1H, m), 7,35 (1H, dddd), 7,43 (1H, ddd). масса/заряд: ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение 30. Метил-2-бром-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетат



Метил-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетат (промежуточное соединение 31, 0,65 г, 2,578 ммоль) и N-бромсукцинимид (4,08 г, 22,919 ммоль) отвешивали в круглодонную колбу и добавляли 2,2-азобис(2-метилпропионитрил) (AIBN, 0,02 г, 0,129 ммоль) в четыреххлористом углероде (6 мл). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч и обеспечивали охлаждение до комнатной температуры. Осадок отфильтровывали, раствор обрабатывали с помощью диоксида кремния, выпаривали при пониженном давлении и очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии, элюируя с помощью 100% циклогексана с постепенным увеличением до 30% EtOAc в циклогексане. Соответствующие фракции выпаривали при пониженном давлении с получением метил-2-бром-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетата в виде бледно-желтого масла (1,1 г, 129%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , 25°C) δ 3,81 (3H, s), 5,29 (1H, s), 7,17 - 7,24 (1H, m), 7,46 - 7,52 (1H, m), 7,53 - 7,59 (1H, m).

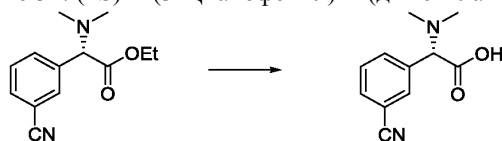
Промежуточное соединение 31. Метил-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетат



4-Фтор-3-(трифторметокси)фенилуксусную кислоту (1,0 г, 4,199 ммоль) суспендировали в метаноле (10 мл), обрабатывали с помощью серной кислоты (0,07 мл, 0,84 ммоль) и нагревали при 45°C в течение 2 часов. Обеспечивали охлаждение реакционной смеси до комнатной температуры и удаляли метанол при пониженном давлении. Остаток разбавляли солевым раствором (20 мл) и затем экстрагировали с помощью EtOAc (3 $\times$ 20 мл). Объединенные экстракты EtOAc промывали солевым раствором (30 мл), сушили над MgSO_4 , фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением метил-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]ацетата (0,65 г, 61%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 3,63 (3H,

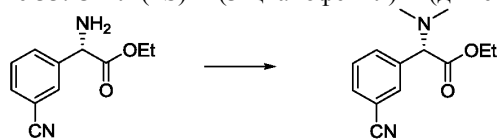
s), 3,78 (2H, s), 7,33 - 7,39 (1H, m), 7,42 - 7,53 (2H, m). масса/заряд: $ES^+ [M+H]^+$ 253.

Промежуточное соединение 32. (2S)-2-(3-Цианофенил)-2-(диметиламино)уксусная кислота



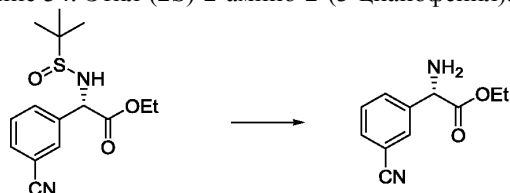
В 3-горлую круглодонную колбу объемом 500 мл помещали раствор этил-(2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)ацетата (промежуточное соединение 33, 18 г, 77,49 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (200 мл) и раствор LiOH (3,56 г, 148,66 ммоль, 2,00 экв.) в воде (100 мл). Полученный раствор перемешивали в течение 3 ч при 25°C. Полученный раствор экстрагировали дихлорметаном 2×100 мл и органические слои объединяли. Значение pH раствора доводили до 3-4 водным хлоридом водорода (1 моль/л). Полученную смесь концентрировали под вакуумом. Полученную смесь промывали ацетоном 2×100 мл. Это приводило к получению 15 г (95%) (2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)уксусной кислоты в виде белого твердого вещества. Н ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 2,46 (6H, s), 4,28 (1H, s), 7,61-7,58 (1H, t), 7,77-7,75 (1H, d), 7,86-7,81 (2H, t). масса/заряд: $ES^+ [M+H]^+$ 205.

Промежуточное соединение 33. Этил-(2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)ацетат



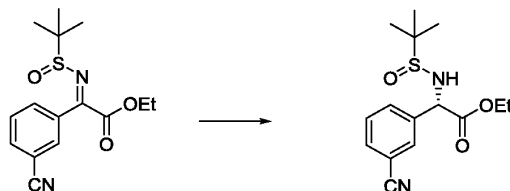
В 3-горлую круглодонную колбу объемом 1000 мл помещали раствор этил-(2S)-2-амино-2-(3-цианофенил)ацетата (промежуточное соединение 34, 20 г, 97,93 ммоль, 1,00 экв.) в метаноле (200 мл), раствор формальдегида (44,1 г, 1,47 моль, 6,00 экв.) в воде и NaBH₃CN (18,2 г, 289,62 ммоль, 3,00 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение ночи при 25°C. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем со смесью этилацетат/петролейный эфир (1/1). Это приводило к получению 18 г (79%) этил-(2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)ацетата в виде белого твердого вещества.

Промежуточное соединение 34. Этил-(2S)-2-амино-2-(3-цианофенил)ацетат



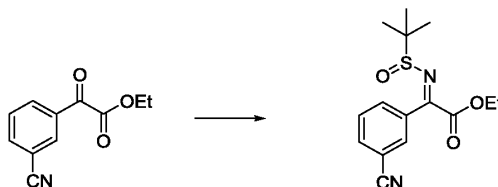
В 3-горлую круглодонную колбу объемом 1000 мл помещали раствор этил-(2S)-2-(3-цианофенил)-2-[(2-метилпропан-2-сульфинил)амино]ацетата (промежуточное соединение 35, 40,00 г, 129,70 ммоль, 1,00 экв.) в 1,4-диоксане (100 мл) и раствор хлористого водорода (г) в 1,4-диоксане (200 мл). Полученный раствор перемешивали в течение ночи при 25°C. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Полученную смесь промывали 2×100 мл, используя МТВЕ. Это приводило к получению 20 г (76%) этил-(2S)-2-амино-2-(3-цианофенил)ацетата в виде светло-желтого твердого вещества.

Промежуточное соединение 35. (2S)-2-(3-Цианофенил)-2-[(2-метилпропан-2-сульфинил)амино]ацетат



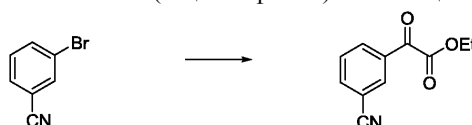
В 4-горлую круглодонную колбу объемом 2000 мл помещали раствор этил-(2Z)-2-(3-цианофенил)-2-[(S)-2-метилпропан-2-сульфинил]амино]ацетата (промежуточное соединение 36, 50 г, 163,20 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (1000 мл). После этого по каплям добавляли L-селектрид (196 мл, 917,61 ммоль, 1,20 экв.), перемешивая при -78°C. Полученный раствор перемешивали в течение 5 ч при -78°C. Реакцию затем гасили добавлением 500 мл водного NH₄Cl. Полученный раствор экстрагировали, используя 3×350 мл этилацетата и объединяли органические слои. Полученную смесь промывали 1×200 мл, используя солевой раствор. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. В результате получали 40 г (79%) этил-(2S)-2-(3-цианофенил)-2-[(2-метилпропан-2-сульфинил)амино]ацетата в виде желтого масла.

Промежуточное соединение 36. Этил-(2Z)-2-(3-цианофенил)-2-[(S)-2-метилпропан-2-сульфинил]амино]ацетат



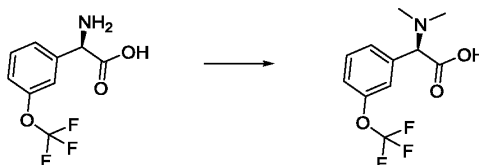
В 4-горлую круглодонную колбу объемом 3000 мл помещали раствор этил-2-(3-цианофенил)-2-оксоацетата (промежуточное соединение 37, 80 г, 393,71 ммоль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (800 мл), (S)-2-метилпропан-2-сульфинамид (52,5 г, 433,16 ммоль, 1,10 экв.) и тетраэтоксититан (134,7 г, 590,51 ммоль, 1,50 экв.). Полученный раствор перемешивали в течение ночи при 65°C. Реакцию затем гасили добавлением 200 мл NaCl.aq. Твердые вещества отфильтровывали. Полученный раствор экстрагировали, используя 3×250 мл этилацетата, и объединяли органические слои. Полученную смесь промывали 1×200 мл солевого раствора. Смесь высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Остаток наносили на колонку с силикагелем и элюировали смесью этилацетат/петролейный эфир (1/2). В результате получали 50 г (41%) этил-(2Z)-2-(3-цианофенил)-2-[[2-(S)-2-метилпропан-2-сульфинил]имино]ацетата в виде желтого масла.

Промежуточное соединение 37. Этил-2-(3-цианофенил)-2-оксоацетат



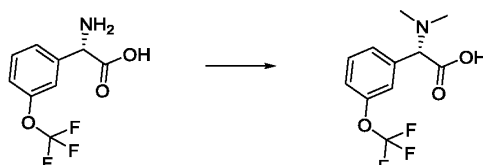
В 4-горлую круглодонную колбу объемом 5000 мл, которую продували и в которой затем поддерживали инертную атмосферу азота, помещали раствор 3-бромбензонитрила (200 г, 1,10 моль, 1,00 экв.) в тетрагидрофуране (1000 мл). Затем по каплям добавляли *i*-PrMgCl (663 мл, 5,38 моль, 1,20 экв), перемешивая при 0°C. Полученный раствор перемешивали в течение 2 ч при 0°C. К этому по каплям добавляли диэтилоксалат (193,6 г, 1,32 моль, 1,20 экв.), перемешивая при -40°C. Полученный раствор перемешивали в течение 1 ч при -40°C. Реакционную смесь затем гасили путем добавления 800 мл HCl. Полученную смесь концентрировали под вакуумом. Значение pH раствора доводили до 8-9 с помощью бикарбоната натрия. Полученный раствор экстрагировали, используя 3×500 мл этилацетата, и органические слои объединяли и сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Остаток наносили на колонку с силикагелем, элюируя смесью этилацетат/петролейный эфир (1/1). В результате получали 80 г (36%) этил-2-(3-цианофенил)-2-оксоацетата в виде желтого масла.

Промежуточное соединение 38. (2R)-2-(Диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусная кислота



(2R)-2-амино-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусную кислоту (1 г, 4,25 ммоль), формальдегид (1,277 г, 42,52 ммоль) и Pd-C (0,045 г, 0,43 ммоль) в MeOH (30 мл) и хлористоводородную кислоту (1н.) (2 мл) перемешивали в атмосфере водорода под давлением и при 40°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит. Твердое вещество промывали MeOH (20 мл). Фильтрат объединяли и выпаривали с получением (2S)-2-(диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоты (1 г, 89%) в виде белого твердого вещества; масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 264.

Промежуточное соединение 39. (2S)-2-(Диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусная кислота



(2S)-2-Амино-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусную кислоту (1 г, 4,25 ммоль), формальдегид (1,277 г, 42,52 ммоль) и Pd-C (0,045 г, 0,43 ммоль) в MeOH (30 мл) и хлористоводородную кислоту (1н.) (2 мл) перемешивали в атмосфере водорода под давлением и при 40°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали через целит. Твердое вещество промывали MeOH (20 мл). Фильтрат объединяли и выпаривали с получением (2R)-2-(диметиламино)-2-[3-(трифторметокси)фенил]уксусной кислоты (1 г, 89%) в виде белого твердого вещества; масса/заряд: ES⁺ [M+H]⁺ 264.

Биологические анализы.

Для измерения эффектов соединений, описанных в настоящем документе, проводили следующие анализы: а) анализ активности ферментов GLS; б) анализ активности клеток GLS; в) анализ пролиферации клеток GLS. При описании анализов, как правило, применяли следующее.

i) Использовали следующие сокращения: CO₂ - двуокись углерода; DMEM - модифицированная по способу Дульбекко среда Игла; DMSO - диметилсульфоксид; EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота; EGTA - этиленгликольтетрауксусная кислота; FCS - фетальная сыворотка телят; ч - час(ы); NBS - несвязывающая поверхность; SDS - додецилсульфат натрия; TRIS - трис(гидроксиметил)аминометан.

ii) Значения IC₅₀ рассчитывали, используя интеллектуальную аппроксимирующую модель (smart fitting model) в Genedata. Значение IC₅₀ представляло собой концентрацию тестируемого соединения, которая обеспечивала ингибирование биологической активности на 50%.

Анализ а): анализ активности ферментов GLS.

Сопряженный анализ с глутаматоксидазой/AmplexRed применяли для измерения способности соединений связываться с GLS1 и ингибировать его активность *in vitro*. Белок GLS с меткой 6His (аминокислоты 63-669), экспрессируемый у *E. coli*, очищали и хранили при -80°C в аликвотах. GLS1 разбавляли 2× до рабочей концентрации и инкубировали при комнатной температуре для обеспечения достижения тетрамерными/димерными формами устойчивого состояния. Измерения в ходе анализа проводили в буфере, содержащем 50 мМ TRIS, pH 7,8, 100 мМ NaPO₄, pH 7,8, 0,001% об./об. Tween20. Очищенный рекомбинантный белок GLS1 разбавляли буфером для анализа до 12 нМ и предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Тестируемые соединения готовили путем разбавления в 100% DMSO с получением подходящего диапазона доз для ответа по концентрации в 12 точках и соответствующий объем (2,5-60 нл) распределяли в 384-луночные планшеты для микроанализа (код продукта Greiner 784900) с применением акустического дозатора Labcyte Echo 555. Концентрацию DMSO поддерживали на уровне 2% с помощью доливания раствора DMSO. Затем в каждую лунку распределяли по 3 мкл разбавленного белка GLS1 (12 нМ), используя автоматический дозатор BioRaptr (Beckman-Coulter), и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 3 мкл 100 мМ глутамин, разбавленного буфером для анализа, и реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Реакцию затем останавливали путем добавления 45 мкМ 6-(2-бромэтил)-2,3-диметилхинолин-4-она, 75 мкМ Amplex Red, 0,375 единицы/мл пероксидазы хрена, 0,12 единицы/мл глутаматоксидазы в 100 мМ TRIS, pH 7,5. После 30 мин при комнатной температуре в темноте планшеты считывали на Perkin Elmer EnVision с использованием оптических фильтров 535/590 нм и анализировали исходные данные с использованием Genedata для получения значений IC₅₀. Также применяли артефактную версию анализа, при которой белок GLS с меткой 6His и глутамин заменяли на буфер для анализа для исключения неспецифических эффектов в отношении компонентов анализа.

Анализ б): анализ активности клеток GLS.

Соединения оценивали в отношении их способности ингибировать клеточную активность GLS с помощью применения сопряженного анализа PC3 с измерением уменьшения уровня клеточного глутамата. Тестируемые соединения готовили путем разбавления в 100% DMSO с получением подходящего диапазона доз для ответа по концентрации в 12 точках и соответствующий объем (5-120 нл) распределяли в 384-луночные планшеты для микроанализа (код продукта Corning 3712) с применением акустического дозатора Labcyte Echo 555. Концентрацию DMSO поддерживали на уровне 0,3% с помощью доливания раствора DMSO. Клетки PC3 выращивали в DMEM без фенола, 10% диализированной FCS, 2 мМ глутамине, и после диспергирования с помощью трипсинизации высевали по 5,6 × 10 клеток на лунку в 40 мкл питательной среды непосредственно в 384-луночные планшеты для анализа, содержащие распределенное соединение. После инкубирования в течение 6 ч при 37°C, 5% CO₂ питательную среду удаляли аспирацией и клетки лизировали в 15 мкл буфера, содержащего 10 мМ TRIS, pH 7,4, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 1 мМ NaF, 20 мМ Na₄P₂O₇, 2 мМ Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% глицерина, 0,1% SDS и 0,5% дезоксихолата. Затем 4 мкл лизата клеток переносили в 384-луночный планшет с NBS (код продукта Corning 3575) и добавляли 35 мкл 27,5 мкМ Amplex Red, 0,1375 ЕД/мл пероксидазы хрена, 0,044 ЕД/мл глутаматоксидазы, 100 мМ TRIS, pH 7,5. После 30 мин при комнатной температуре в темноте планшеты считывали на Perkin Elmer EnVision с использованием оптических фильтров 535/590 нм и анализировали исходные данные с использованием проприетарного программного обеспечения для получения значений IC₅₀.

Анализ в): анализ пролиферации клеток GLS.

Способность соединений ингибировать рост клеток измеряли с помощью анализа пролиферации клеток NCI-H1703 с применением 384-луночного планшета. Клетки NCI-H1703 выращивали в RPMI1640, не содержащей фенолового красного, 10% FCS и 2 мМ глутамин, высевали при плотности 750 клеток на лунку в 40 мкл питательной среды в 384-луночные планшеты для анализа с прозрачным дном (код продукта Corning 3712) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂. Тестируемые соединения готовили путем разбавления в 100% DMSO с получением подходящего диапазона доз для ответа по концентрации в 12 точках и соответствующий объем (5-120 нл) распределяли непосредственно в планшеты для анализа, содержащие высевные клетки. Концентрацию DMSO поддерживали на уровне

0,3% с помощью доливания раствора DMSO. Планшеты инкубировали в течение 5 дней при 37°C, 5% CO₂, добавляли Sytox Green и сапонин до конечной концентрации 2 мкМ и 0,25% соответственно и инкубировали в течение 6 ч перед анализом. Планшеты считывали на Asumen eX3 (TTP Labtech) с помощью набора фильтров FITC для возбуждения при 488 нм и для испускания (500-530 нм). Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью аппроксимации кривой по максимальному ингибированию роста в день ноль с помощью анализа с использованием программного обеспечения GeneData.

Результаты анализов а)-с) показаны в таблице.

Данные анализа

Соединение Пример №	Анализ а) ферментный IC ₅₀ мкМ	Анализ б) Среднее значение IC ₅₀ (мкМ) в отношении МОА клеток GLS	Анализ с) Среднее значение IC ₅₀ (мкМ) в отношении пролиферации
1(a)	1,72	0,0334	0,0686
1(b)	0,0826	0,00408	0,0547
2(a)	0,0746	0,00344	0,0896
2(b)	1,24	0,0128	0,0979
3(a)	0,261	0,0112	0,0127
3(b)	0,0524	0,000295	0,00825
4(a)	0,0564	0,000405	0,00841
4(b)	0,522	0,00191	0,00252
5(a)	0,981	0,022	0,0293
5(b)	0,0772	0,00192	0,0132
6(a)	0,981	0,022	0,0293
6(b)	0,944	0,0297	0,0808
7(a)	1,33	0,00861	0,00624
7(b)	0,102	0,000985	0,00245
8(a)	0,053	0,00191	0,00881
8(b)	0,194	0,0209	0,0851
9	0,132	0,00281	0,0448
10	0,0592	0,00212	0,0212
11(a)	0,952	0,0308-	0,0191
11(b)	0,132	0,00177-	0,0301
12(a)	2,51	0,0153	0,0116
12(b)	0,246	0,00141	0,0129
13	0,226	0,0113	0,0768
14	2,26	0,0102	0,00523
15	3,75	0,0222	0,152
16	0,198	0,00476	0,131
17	0,187	0,0107	0,163
18	0,182	0,0011	0,00351

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение выбрано из группы, состоящей из

(2S)-2-(диметиламино)-2-фенил-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-(диметиламино)-2-фенил-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-2-(4-фторфенил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-(диметиламино)-2-(4-фторфенил)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-R-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2R)-2-(диметиламино)-N-[5-[[[(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-

ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-[3-(дифторметокси)фенил]-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-(3-метоксифенил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(1S)-2-метил-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоксамида;

(1R)-2-метил-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-3,4-дигидро-1H-изохинолин-1-карбоксамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-2-[4-фтор-3-(трифторметокси)фенил]-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[3-(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2R)-2-(азетидин-1-ил)-N-[5-[[3-(3R)-1-(6-фторпиридазин-3-ил)пирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]-2-[3-(трифторметокси)фенил]ацетамида;

(2S)-2-(3-цианофенил)-2-(диметиламино)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-2-(3-метилфенил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-2-(4-метилфенил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2R)-2-(диметиламино)-2-(4-метоксифенил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида;

(2S)-2-(диметиламино)-2-(4-метоксифенил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида; и

(2S)-2-(диметиламино)-2-(о-толил)-N-[5-[[3-(3R)-1-пиридазин-3-илпирролидин-3-ил]амино]-1,3,4-тиадиазол-2-ил]ацетамида.

2. Фармацевтическая композиция для ингибирования глутаминазы 1 (GLS1), содержащая соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель.

3. Применение соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли в лечении заболевания, опосредованного GLS1.

4. Применение соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата для лечения заболевания, опосредованного GLS1.

5. Применение по п.3 или 4, где заболевание, опосредованное GLS1, представляет собой рак.

6. Применение по п.5, где рак представляет собой рак молочной железы, рак легких, рак поджелудочной железы, рак почек или гепатоцеллюлярный рак.

7. Способ лечения заболевания, опосредованного GLS1, у теплокровного животного, нуждающегося в таком лечении, включающий введение теплокровному животному терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

8. Способ по п.7, где заболевание, опосредованное GLS1, представляет собой рак.

9. Способ по п.8, где рак представляет собой рак молочной железы, рак легких, рак поджелудочной железы, рак почек или гепатоцеллюлярный рак.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2