

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038129**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.09

(21) Номер заявки
201892698

(22) Дата подачи заявки
2017.07.10

(51) Int. Cl. **C07D 403/12** (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРАЗОЛИЛАМИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА В КАЧЕСТВЕ
ИНГИБИТОРОВ JAK**

(31) 62/362,208

(32) 2016.07.14

(33) US

(43) 2019.06.28

(86) PCT/US2017/041388

(87) WO 2018/013486 2018.01.18

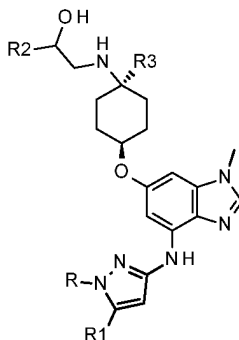
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Бастиян Джоли Энн, Клейтон Джошуа
Райан, Коатес Дэвид Эндрю, Солл
Дэниел Джон, Вудс Тимоти Эндрю
(US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,
Христофоров А.А., Осипенко Н.В.,
Глухарёва А.О., Костюшенкова М.Ю.
(RU)**

(56) WO-A1-2017023672
US-A1-2015203455

(57) В данном изобретении предложены соединения формулы, приведенной ниже



где R и R1-R3 представляют собой такие, как описано в данном документе, способы лечения пациентов от определенных типов аутоиммунных заболеваний и рака и способы получения предложенных соединений.

B1

038129

038129

B1

Данное изобретение относится к соединениям бензимидазола и их фармацевтически приемлемым солям, которые ингибируют Janus kinase 1 (JAK1), фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, способам использования указанных соединений для лечения определенных типов аутоиммунных заболеваний и рака и способам получения указанных соединений.

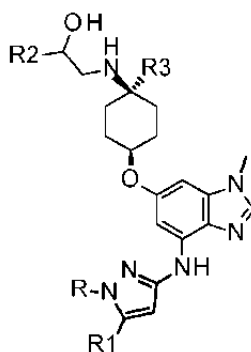
Семейство Janus kinases (JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2) представляют собой внутриклеточные белки тирозинкиназы, играющие существенную роль в иммунной функции, воспалении и гематопозе через преобразователь сигнала Janus kinase и активатор транскрипции (JAK-STAT) проводящих путей. В ответ на внеклеточные полипептиды, такие как цитокины типа I и типа II, Janus kinases регулируют фосфорилирование тирозина различными эффекторами и инициируют активацию каналов передачи по нисходящему потоку, индуцируя различные физиологические ответы. В частности, изоформа JAK1 играет ключевую роль в передаче сигналов интерферона I и II типов и вызывает сигналы от семейств рецепторов интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), гликопротеина 130 (gp130) и класса II. Таким образом, небольшое ингибирование молекулы JAK1 может вмешиваться в сигнальные пути, связанные с онкологией, воспалением и аутоиммунными заболеваниями. Ghoreschi K et al. Immunological Review 2009, 228, 273-287 и Zak M. et al. Med Chem. 2013, 56, 4764-4785.

Несмотря на недавние успехи агентов ингибитора JAK, все еще существует потребность в открытии и развитии ингибиторов, которые избирательно нацелены на одиночную изоформу JAK. Это может снизить риск нецелевого воздействия.

Соединения ингибиторы Janus kinase известны в литературных источниках. Например, US 2015/0203455 раскрывает некоторые соединения бензимидазола, которые являются ингибиторами JAK и которые рекламируются как полезные для лечения аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и пролиферативных заболеваний, среди прочего.

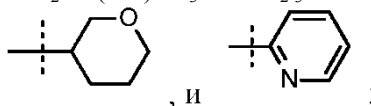
Остается необходимость предоставить альтернативные ингибиторы JAK1 для лечения аутоиммунных заболеваний, в частности, для иммунологических заболеваний, таких как артрит, ревматоидный артрит и диабетическая нефропатия. Кроме того, остается потребность в селективных ингибиторах JAK1. В данном изобретении предложены некоторые ингибиторы JAK1, которые могут удовлетворять одной или несколькими из указанных потребностей.

В данном изобретении предложено соединение формулы 1 или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



1

где R выбран из H, $-C_{1-3}$ алкила, $-CH_2CH(OH)CH_3$ или $-C_{2-3}$ алкил-O- CH_3 ,



, и ;

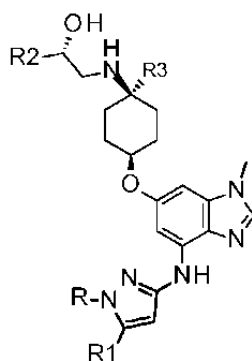
R1 выбран из H, $-CH_3$ и $-OCH_3$;

R2 представляет собой $-CHF_2$ или $-CF_3$,

R3 представляет собой H или $-CH_3$;

при условии, что, когда R2 представляет собой $-CF_3$ и R3 представляет собой H, либо R или R1 могут быть $-CH_3$, но не оба. Связывание, обозначенное как , указывает точку присоединения тетрагидропиранового кольца или пиридинового кольца к остальной части молекулы.

В данном изобретении предложено соединение формулы 2 или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой:

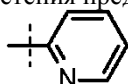


2



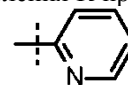
где R выбран из H, $-C_{1-3}$ алкила, $-CH_2CH(OH)CH_3$ или $-C_{2-3}$ алкил-O- CH_3 ,
 R1 выбран из H, $-CH_3$ и $-OCH_3$;
 R2 представляет собой $-CHF_2$ или $-CF_3$,
 R3 представляет собой H или $-CH_3$;
 при условии, что, когда R2 представляет собой $-CF_3$ и R3 представляет собой H, либо R или R1 могут быть $-CH_3$, но не оба.

В одной форме данного изобретения предлагается соединение согласно формуле 1 или 2, где



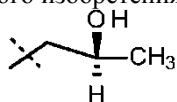
R выбран из $-CH_3$, $-CH_2CH_3$, и

или его фармацевтически приемлемая соль. В некоторых вариантах осуществления R представляет



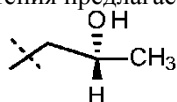
собой $-CH_3$, или $-CH_2CH_3$. В других вариантах осуществления R представляет собой

В другой форме данного изобретения предлагается соединение согласно формуле 1 или 2, где



R представляет собой

связь обозначенная как,  указывает на точку присоединения к остальной части молекулы. В другой форме данного изобретения предлагается соединение согласно формуле 1 или 2, где



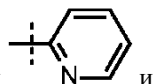
R представляет собой

В другой форме данного изобретения предлагается соединение согласно формуле 1 или 2, где

R1 выбран из H, $-CH_3$, и $-OCH_3$.

В некоторых вариантах осуществления R1 представляет собой H или $-CH_3$. В других вариантах осуществления R1 представляет собой $-OCH_3$.

В другой форме данного изобретения предлагается соединение согласно формуле 1 или 2, где R2 представляет собой $-CF_3$. В некоторых вариантах осуществления этой формы R представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$ и R1 представляет собой $-CH_3$ или $-OCH_3$. В других вариантах осуществления этой формы



R представляет собой

R1 представляет собой H.

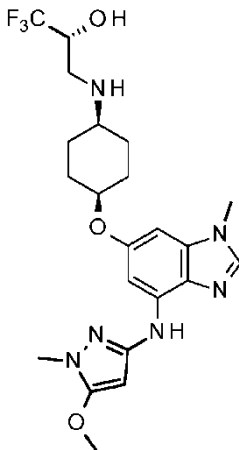
В другой форме данного изобретения предлагается соединению согласно формуле 1 или 2, где

R3 представляет собой $-CH_3$.

В некоторых вариантах осуществления R представляет собой H, R1 представляет собой H и R2 представляет собой CH_3 .

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается соединение формулы 3, которое представляет собой

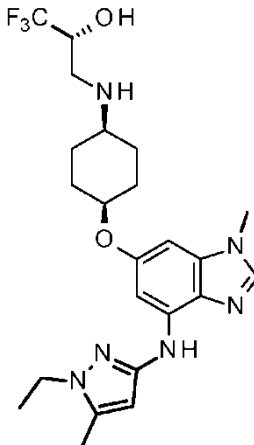
038129



3.

или его фармацевтически приемлемая соль.

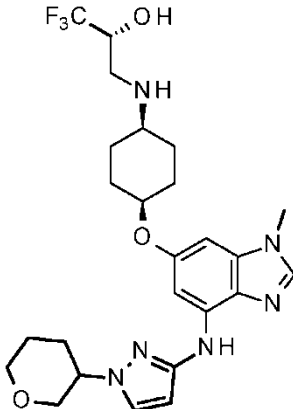
В другом варианте осуществления данного изобретения предлагается соединение формулы 4, которое представляет собой



4.

или его фармацевтически приемлемая соль.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения предлагается соединение формулы 5, которое представляет собой



5.

или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте осуществления данного изобретения предлагается соединение формулы 5А, которое представляет собой

CC(F)(F)F[C@H](O)CN[C@H]1CCCC[C@@H]1Oc2ccc3ncnc3c2Nc4c[nH]c4N5CCOCC5FC(F)(F)C[C@H](O)CN[C@H]1CCCC[C@H]1Oc2cc3ncnc3c(Nc4cc5cnc(Nc6cccnc6)n4)c2

15,5, 18,1, 18,3, 20,5 и $22,9 \pm 0,2^\circ$ при 2 тета, или 13,2, 15,5, 18,1, 18,3, 18,5, 20,5, 22,9 и $23,6, 23,7 \pm 0,2^\circ$ в 2 тета, или 13,2, 15,5, 18,1, 18,3, 18,5, 19,0, 20,5, 22,9, 23,6, 23,6, 23,7, 24,7 и $26,5 \pm 0,2^\circ$ при 2 тета.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения предлагается соединение формулы 6 в виде (2R)-1,1,1-трифтор-3-($\{ \text{цис-4-}[(1\text{-метил-4-}\{[1\text{-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил]амино}\}-1H\text{-бензимидазол-6-ил)окси}]\text{циклогексил}\}$ амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрата (1:1:1) в кристаллической форме, характеризующееся рентгеновской порошковой дифрактограммой, полученной из источника $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$), которая содержит пики при: 18,6, 19,1, 21,0 и $22,4 \pm 0,2^\circ$ при 2 тета, или 7,4, 11,0, 18,6, 19,1, 21,0, 21,9, 22,4 и $26,2 \pm 0,2^\circ$ в 2 тета, или 7,4, 11,0, 12,7, 16,8, 18,6, 19,1, 21,0, 21,9, 22,4 и $26,2, \pm 0,2^\circ$ при 2 тета.

В другой форме данного изобретения предлагается композиция, содержащая по существу чистый (2R)-1,1,1-трифтор-3-($\{ \text{цис-4-}[(1\text{-метил-4-}\{[1\text{-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил]амино}\}-1H\text{-бензимидазол-6-ил)окси}]\text{циклогексил}\}$ амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрат (1:1:1) в кристаллической форме. Предпочтительно композиция содержит более чем 80% (мас./мас.) (2R)-1,1,1-трифтор-3-($\{ \text{цис-4-}[(1\text{-метил-4-}\{[1\text{-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил]амино}\}-1H\text{-бензимидазол-6-ил)окси}]\text{циклогексил}\}$ амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрата (1:1:1) в кристаллической форме. Более предпочтительно более чем 90% (мас./мас.) (2R)-1,1,1-трифтор-3-($\{ \text{цис-4-}[(1\text{-метил-4-}\{[1\text{-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил]амино}\}-1H\text{-бензимидазол-6-ил)окси}]\text{циклогексил}\}$ амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрата (1:1:1) в кристаллической форме. Еще более предпочтительно более 95% (мас./мас.) (2R)-1,1,1-трифтор-3-($\{ \text{цис-4-}[(1\text{-метил-4-}\{[1\text{-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил]амино}\}-1H\text{-бензимидазол-6-ил)окси}]\text{циклогексил}\}$ амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрата (1:1:1) в кристаллической форме.

В другой форме данного изобретения предлагается фармацевтическая композиция, которая включает соединение согласно любой из формул 1-6 или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или наполнителя.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает соединение формул 1-6 в качестве нейтрального соединения или цвиттериона. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция включает соединение формул 1-6 в качестве фармацевтически приемлемой соли. В еще одном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает соединение формул 1-6 в виде соли лимонной кислоты. В другой форме данного изобретения предлагается способ лечения пациента, нуждающегося в лечении артрита, более предпочтительно ревматоидного артрита. Способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей соединение согласно с одной из формул 1-6 или его фармацевтически приемлемую соль.

В другой форме данного изобретения предлагается лечение пациента с диабетической нефропатией. Способ включает введение пациенту эффективного количества соединения согласно с одной из Формул 1-6 или его фармацевтически приемлемой соли.

В другой форме данного изобретения предлагается способ лечения пациента с диабетической нефропатией. Способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтического композиционного соединения, содержащего соединение согласно одной из формул 1-6 или его фармацевтически приемлемую соль.

В другой форме данного изобретения предлагается способу лечения пациента с воспалительным заболеванием кишечника. Способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтического композиционного соединения, содержащего соединение согласно одной из формул 1-6 или его фармацевтически приемлемую соль.

В другой форме данного изобретения предлагается способ лечения пациента, нуждающегося в лечении аутоиммунного состояния, опосредованного ингибированием JAK1. Лечение включает введение пациенту эффективного количества соединения формул 1-6 или его фармацевтически приемлемой соли.

Примеры состояний, опосредуемых ингибированием JAK1, и которые можно лечить согласно данному изобретению, включают

- диабетическую нефропатию;
- волчанку, более предпочтительно системную красную волчанку;
- Синдром Шегрена;
- воспалительное заболевание кишечника, более предпочтительно болезнь Крона и язвенный колит.

В другой форме данного изобретения предлагается способ лечения пациента, нуждающегося в лечении артрита. Способ включает введение нуждающемуся пациенту эффективного количества соединения согласно любой из формул 1-6 или его фармацевтически приемлемой соли. Более предпочтительные способы лечения артрита включают лечение пациента с ревматоидным артритом.

В другой форме данного изобретения предлагается способ лечения пациента, нуждающегося в лечении состояния, выбранного из диабетической нефропатии; волчанки, более предпочтительно системной красной волчанки; Синдрома Шегрена; и воспалительного заболевания кишечника, более предпочтительно, болезни Крона и язвенного колита. Способ включает введение пациенту эффективного количества соединения согласно любой из формул 1-6 или его фармацевтически приемлемой соли.

В другой форме данного изобретения предлагается способ лечения пациента, нуждающегося в лечении рака. Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения согласно любой из формул 1-6.

В другой форме данного изобретения предлагается соединение согласно любой из формул 1-6 для применения в терапии.

В одном варианте осуществления терапия, при которой соединение согласно любой из формул 1-6 может быть использовано, выбирается из терапии артрита, более предпочтительно ревматоидного артрита; диабетической нефропатии; волчанки, более предпочтительно системной красной волчанки; синдрома Шегрена; и воспалительного заболевания кишечника, более предпочтительно болезни Крона и язвенного колита.

В другой форме данного изобретения предлагается использование соединения согласно любой из формул 1-6 при производстве лекарственного средства.

В одном варианте осуществления лекарственное средство является полезным для лечения артрита. В другом варианте осуществления лекарственное средство является полезным для лечения ревматоидного артрита. В еще одном варианте осуществления лекарственное средство является полезным для лечения состояния, выбранного из диабетической нефропатии; волчанки, более предпочтительно системной красной волчанки; синдрома Шегрена; и воспалительного заболевания кишечника, более предпочтительно болезни Крона и язвенного колита. В еще одном варианте осуществления лекарственное средство является полезным для лечения диабетической нефропатии. В еще одном варианте осуществления лекарственное средство является полезным для лечения волчанки. В еще одном варианте осуществления лекарственное средство является полезным для лечения синдрома Шегрена. Еще в одном варианте осуществления лекарственное средство является полезным для лечения воспалительного заболевания кишечника.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли соединения по изобретению, которая считается приемлемой для клинического и/или ветеринарного использования. Примеры фармацевтически приемлемых солей и общие методики их получения можно найти в P. Stahl et al., *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, 2nd Revised Edition, Wiley-VCH, 2011 и S.M. Berge и др., "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, № 1, январь 1977.

Фармацевтические композиции по данному изобретению могут быть получены способами, известными в данной области, с использованием фармацевтически приемлемых добавок. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая добавка (добавки)" для фармацевтических композиций относится к одному или нескольким носителям, разбавителям и наполнителям, которые совместимы с другими добавками препарата и не являются вредными для пациента. Известны фармацевтические композиции и способы их получения, и примеры можно найти в Loyd, V., et al. eds. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей и наполнителей включают следующие: солевой раствор, воду, крахмал, сахара, маннит и производные диоксида кремния; связывающие агенты, такие как карбоксиметилцеллюлоза и другие производные целлюлозы, альгинаты, желатин и поливинилпирролидон; каолин и бентонит; полиэтиленгликоли.

Предпочтительные фармацевтические композиции могут быть составлены в виде таблетки, капсулы, раствора для перорального введения или раствора для инъекций. Таблетка, капсула или раствор могут включать соединение по данному изобретению в количестве, эффективном для лечения пациента, нуждающегося в лечении.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству, которое представляет собой дозу, которая эффективна для лечения расстройства, такого как артрит, аутоиммунное заболевание или рак. Лечащий врач или ветеринар, как специалист в данной области, может легко определить эффективное количество с использованием обычных методов и путем наблюдения результатов, полученных в аналогичных обстоятельствах. Можно считать оправданным ряд факторов для определения эффективного количества или дозы; факторы включают в себя, но не ограничиваясь ими, введение соединения или его соли; совместное введение других агентов, если они используются; вид пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; степень вовлеченности или тяжесть расстройства; ответ отдельного пациента; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранный режим дозирования; использование других сопутствующих лекарств; и другие соответствующие обстоятельства.

Используемый в данном документе термин "пациент" относится к млекопитающему, домашней птице или рыбе. Предпочтительные млекопитающие включают человека, спутника-млекопитающего, такого как собака или кошка, или домашнее животное, или скот, такой как корова, свинья, лошадь, овца и коза. Термин "по существу чистый" относится к композиции, которая представляет собой более чем 80% чистоты, более предпочтительно более чем 90% чистоты и еще более предпочтительно более чем 95% чистоты по массе в пересчете на массу основы.

Соединения по данному изобретению могут использоваться отдельно или в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Например, соединения по данному изобре-

тению могут быть объединены с агентами для лечения воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний. Примеры включают НПВП или ингибиторы СОХ-2, такие как ибупрофен, аспирин, ацетаминофен, целекоксиб, напроксен и кетопрофен; опиоды, такие как оксикодон и фентанил; метотрексат; и кортикостероиды, такие как гидрокортизон, преднизолон и преднизон.

Соединения также могут быть объединены с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, эффективными для лечения рака. Примеры включают цисплатин, карбоплатин, этопозид, гемцитабин, паклитаксел, винорелбин, топотекан, иринотекан, циклофосфамид, доксорубин, винкристин и метотрексат.

Приведенные в качестве примера соединения и дополнительный терапевтический агент(ы) можно вводить либо вместе через один и тот же путь доставки, и устройство, такое как одна таблетка, капсула или пилюля; или отдельно вводится либо одновременно в отдельных устройствах доставки, либо последовательно.

Химический раздел

Соединения согласно данному изобретению или их соли могут быть получены различными способами, некоторые из которых представлены в "Препаратах" и "Примерах", приведенных ниже. Продукт(ы) каждой стадии в представленных ниже процедурах может быть извлечен обычными способами, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрацию, растирание и кристаллизацию. Реагенты и исходные материалы общедоступны специалисту в данной области техники. В описанных ниже препаратах аминный заместитель может быть защищен для облегчения синтеза описанных в данном документе соединений.

Как используется в данном документе, следующие термины имеют указанные значения: "AcOH" относится к ледяной уксусной кислоте, "EC₅₀" относится к концентрации агента, который дает 50% отклика целевой активности по сравнению с заранее заданным положительным контрольным соединением (абсолютный EC₅₀); "EtOAc" относится к этилацетату; "ES/MS" относится к масс-спектропии с электрораспылением; "DCM" относится к дихлорметану; "DMF" относится к N,N-диметилформамиду; "DMSO" относится к диметилсульфоксиду; "GC-MS" относится к газовой хроматографии-масс-спектрометрии; "GFP" относится к зеленому флуоресцентному белку; "HEPES" относится к 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоте; "Hr" или "hrs" означает час(ы); "IC₅₀" относится к концентрации агента, который дает 50% максимального ингибирующего ответа для этого агента (относительная IC₅₀), или концентрации агента, который вызывает 50% ингибирование целевой активности по сравнению с контролем плацебо (абсолютный IC₅₀); "LC-MS" относится к жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии; "MeOH" относится к метанолу; "Min" означает минуты; "MS" относится к масс-спектропии; "MTBE" относится к метил-трет-бутиловому эфиру, "OAc" относится к ацетату или ацетат-аниону; "'QD" относится к "раз в день"; "RT или rt" относится к комнатной температуре; "STAT1" относится к преобразователю сигналов и активатору транскрипции 1; "ТГФ" относится к тетрагидрофурану, а "TR-FRET" относится к передаче энергии флуоресценции с временным разрешением.

В данной области известны различные аминоксидные функциональные группы, и включают в себя: карбаматы, такие как C₁₋₅алкилкарбамат, C₃₋₆циклоалкилкарбамат, предпочтительно трет-бутилкарбамат (BOC) или бензилкарбамат (CBZ); амиды, такие как C₁₋₃алкиламид, C₁₋₃галогеналкиламид, формамид или ацетамид, хлорацетамид, трифторидоацетамид; и бензиламины. Дополнительные примеры аминоксидных функциональных групп, способы получения защищенных аминных заместителей и способы снятия защиты с аминных заместителей можно найти в "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", 5th Ed., Wuts, P.G.M., Eds. John Wiley and Sons, 2014. Специалистам в данной области техники будет понятно, что могут быть использованы другие функциональные группы, которые могут быть легко преобразованы в аминоксидную группу. Такие функциональные группы, препараты и трансформации этих групп можно найти в книге "Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations" by Larock, R.C., Wiley VCH, 1999 и в "March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure" Smith, M.B., Wiley-Interscience, 7th Ed., 2013.

Препарат 1.

(2R)-2-(Трифторметил)оксиран.

Добавляли уксусную кислоту (0,89 мл, 0,052 экв.) к раствору (1S,2S)-(+)-1,2-циклогександиамино-N,N'-бис(3,5-ди-трет-бутилсалицилиден)кобальта (II) (0,90 г, 0,0050 экв.) в толуоле (16,65 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Удаляли растворитель в вакууме. Добавляли толуол (20 мл) и концентрировали в вакууме. Охлаждали до 0°C и добавляли 2-(трифторметил)оксиран (37,00 г, 330 ммоль, 80,0% эи, (2R) представляет собой основной энантиомер). Перемешивали в течение 5 мин и добавляли по каплям воду (0,80 мл, 0,15 экв.). Медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Подвергают вакуумной дистилляции при комнатной температуре и собирают указанное в заголовке соединения в охлажденной колбе в виде светло-желтого масла (28,10 г, 76%, 99,8% эи). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 2,92-2,94 (м, 1H), 2,98-3,01 (м, 1H), 3,41-3,46 (м, 1H).

Смешивали указанное в заголовке соединения (0,13 г, 1,16 ммоль) и MeOH (1,3 мл). Охлаждали до 0°C и добавляли триэтиламин (0,17 мл, 1,10 экв.) и тиофенол (0,12 мл, 1,05 экв.). Перемешивали смесь в

течение 30 мин. Контролируют реакцию ГХ-МС для образования 1,1,1-трифтор-3-фенилсульфанил-пропан-2-ола; $m/z=222$. Анализ продукта с помощью хиральной ГХ-МС показывает, что изомерная чистота продукта составляет 99,8% эи, (2S)-1,1,1-трифтор-3-фенилсульфанил-пропан-2-ол представляет собой основной энантиомер.

Препарат 2.

1-Бром-3,5-дифтор-2-нитробензол.

Добавляли по каплям азотную кислоту (дымящую, 20 мл) к раствору 1-бром-3,5-дифторбензола (35,00 мл, 304 ммоль) в серной кислоте (50 мл) при 0°C. Медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Выливают реакционную смесь в смесь льда и воды (600 мл). Медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Выливали реакционную смесь в смесь льда и воды (600 мл). Медленно нагревали до комнатной температуры. Добавляли EtOAc (200 мл) и гексаны (100 мл). Размешивали до полного растворения твердых веществ. Разделяли слои. Промывали органический слой насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого масла (57,37 г, 79%). ГХ-МС $m/z=(^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 237, 239 (M+H).

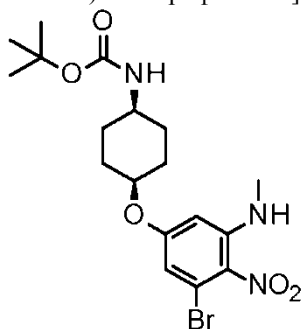
Препарат 3.

3-Бром-5-фтор-N-метил-2-нитроанилин.

Добавляли 2 М монометиламин в тетрагидрофуране (92 мл, 2,00 экв.) к раствору 1-бром-3,5-дифтор-2-нитробензола (21,90 г, 92 ммоль) в 1,4-диоксане (92 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Добавляли воду; затем экстрагировали EtOAc. Собирали органические экстракты и промывали насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Подвергали нормально- фазовой хроматографии, элюируя градиентом 20-40% ДХМ в гексанах с получением указанного в заголовке соединения в виде оранжевого твердого вещества (16,95 г, 74%). МС (ЭР) $m/z=(^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 249/251 (M+H).

Препарат 4.

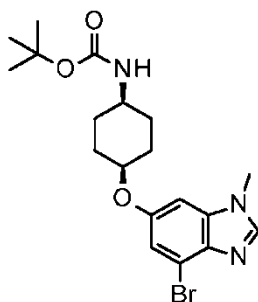
трет-Бутил {цис-4-[3-бром-5-(метиламино)-4-нитрофенокси]циклогексил} карбамат.



Смешивали 3-бром-5-фтор-N-метил-2-нитроанилин (75,04 г, 301 ммоль), трет-бутил (цис-4-гидроксициклогексил) карбамат (89,52 г, 1,38 экв.), бисульфат тетра (н-бутил) аммония (15,58 г, 0,15 экв.) в ДХМ (975 мл) и 5 М водный гидроксид натрия (241 мл). Перемешивали быстро при 37°C в атмосфере азота в течение пяти дней. Охлаждали до комнатной температуры. Разбавляли ДХМ (200 мл) и водой (400 мл). Разделяли слои. Экстрагировали водный слой ДХМ (3×100 мл). Промывали объединенные органические экстракты насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Подвергали нормально- фазовой хроматографии, элюируя градиентом 0-40% в гексанах с получением указанного в заголовке соединения в виде оранжевого твердого вещества (68,57 г, 51%). МС (ЭР) $m/z=(^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 442/444 (M+H).

Препарат 5.

трет-Бутил {цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил} карбамат.

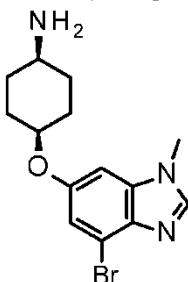


Смешивали трет-бутил {цис-4-[3-бром-5-(метиламино)-4-нитрофенокси]циклогексил} карбамат (76,92 г, 173 ммоль) и платину (5% на сульфидированном угле, 3,85 г) в тетрагидрофуране (923 мл) в Parag® реакторе. Перемешивали при комнатной температуре при H_2 (414 кПа) в течение трех дней. Филь-

тровали через диатомовую землю. Промывали диатомовую землю ТГФ. Добавляли триметилортоформиат (165 мл, 8,70 экв.) в объединенные ТГФ-фильтраты. Перемешивали в течение 22 ч при температуре 63°C. Концентрировали большую часть реакционной смеси в вакууме. Разбавляли водой (400 мл) и EtOAc (400 мл). Подщелачивали водным карбонатом натрия, чтобы довести pH до 9. Разделяли слои. Экстрагировали водный слой EtOAc (2×200 мл). Сушили объединенные органические экстракты над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрируют фильтрат под вакуумом. Разбавляли остаток метил-трет-бутиловым эфиром (400 мл) и обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут. Фильтровали, промывали метил-трет-бутиловым эфиром и сушили под вакуумом, получая указанное в заголовке соединение в виде светло-коричневого твердого вещества (52,02 г, 71%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 424/426 (M+H).

Препарат 6.

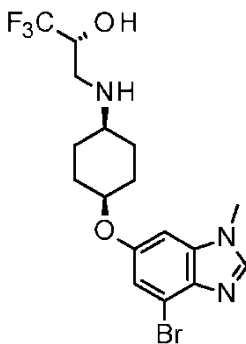
цис-4-[(4-Бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексанами́н.



Добавляли медленно трифторуксусную кислоту (666 мл) к раствору трет-бутил-цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}карбамата (222 г, 497 ммоль) в ДХМ (1110 мл) при 0°C. Медленно нагревали смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Концентрировали смесь в вакууме. Добавляли воду (250 мл) и подщелачивали 50%-ным водным раствором гидроксида натрия, чтобы довести pH до 10. Добавляли воду (250 мл). Экстрагировали 20% MeOH в ДХМ (1500 мл, затем 500 мл, затем 250 мл). Промывали объединенные органические экстракты 2 М водным раствором гидроксида натрия, сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали фильтрат, получая указанное в заголовке соединение в виде коричневого твердого вещества (155 г, 91%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 324/326 (M+H).

Препарат 7.

(2R)-3-({цис-4-[(4-Бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол.



Добавляли (2R)-2-(трифторметил)оксиран (73,29 г, 1,50 экв.) к раствору цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексанамина (150,4 г, 436 ммоль) в MeOH (1053 мл). Перемешивали в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь в вакууме с получением остатка. Подвергали нормально-фазовой хроматографии, элюируя градиенты 0-10% EtOH в ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в виде не совсем белого твердого вещества (98,10 г, 52%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 436/438 (M+H).

Препарат 8.

1-(3-Метоксипропил)-5-метил-3-нитро-1Н-пиразол.

Добавляли ацетонитрил (56 мл) к смеси 5-метил-3-нитро-1Н-пиразола (3,0 г, 22 ммоль), карбоната калия (6,2 г, 2,0 экв.) и 1-бром-3-метоксипропана (3,8 г, 1,1 экв.). Перемешивали при 65°C в течение ночи. Охлаждали до комнатной температуры. Добавляли EtOAc (~50 мл) и фильтровали. Концентрировали фильтрат в вакууме. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 35% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (3,3 г, 70%). МС (ЭР) $m/z = 200$ (M+H).

Препарат 9.

1-(3-Метоксипропил)-5-метил-1Н-пиразол-3-амин.

Добавляли палладий на древесном угле (5% (мас./мас.), 0,38 г) в 500 мл реактор Parag®. Продували реактор N₂ и добавляли EtOH (100 мл). Добавляли раствор 1-(3-метоксипропил)-5-метил-3-нитро-1Н-

пиразола (3,3 г, 17 ммоль) в EtOH (100 мл). Перемешивали при комнатной температуре под давлением H_2 (60 фунтов/кв.дюйм) в течение 2 ч. Фильтровали через диатомовую землю. Концентрировали фильтрат в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде оранжевого масла (2,7 г, 96%). МС (ЭР) $m/z=170$ (M+H).

Препарат 10.

1-(2-Метоксиэтил)-5-метил-3-нитро-1H-пиразол.

Добавляли ацетонитрил (35 мл) к смеси 5-метил-3-нитро-1H-пиразола (0,95 г, 7,1 ммоль), карбоната калия (2,0 г, 2,0 экв.) и 1-бром-2-метоксиэтана (2,0 мл, 3,0 экв.). Перемешивали при 75°C в течение 3 ч. Охлаждали до комнатной температуры. Добавляли диэтиловый эфир (~35 мл) и фильтровали. Промывали твердые частицы EtOAc (2×25 мл). Концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Очищают остаток нормально-фазовой хроматографией, элюируя градиентом 0-100% EtOAc в гексане, получая указанное в заголовке соединение в виде желтого масла (1,1 г, 64%). МС (ЭР) $m/z=186$ (M+H).

Препарат 11.

1-(2-Метоксиэтил)-5-метил-1H-пиразол-3-амин.

Добавляли палладий на древесном угле (10% (мас./мас.), 0,38 г) в колбу. Продували N_2 и добавляли EtOH (10 мл). Добавляли раствор 1-(2-метоксиэтил)-5-метил-3-нитро-1H-пиразола (0,86 г, 4,6 ммоль) в EtOH (40 мл). Перемешивали при комнатной температуре под H_2 (воздушный шар) в течение ночи. Фильтровали через диатомовую землю. Концентрировали фильтрат в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде коричневого масла (0,68 г, 84%). МС (ЭР) $m/z=156$ (M+H).

Препарат 12.

1-(5-Метил-3-нитро-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ол.

Добавляли ацетонитрил (75 мл) к смеси 5-метил-3-нитро-1H-пиразола (2,0 г, 15 ммоль), карбоната калия (4,1 г, 2,0 экв.) и 1-хлор-2-пропанола (3,8 мл, 3,0 экв.). Перемешивали при 85°C в течение ночи. Охлаждали до комнатной температуры. Фильтровали и промывали твердые вещества EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 50% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (2,0 г, 65%). МС (ЭР) $m/z=186$ (M+H).

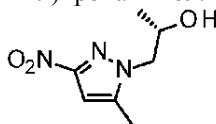
Препарат 13.

1-(3-амино-5-метил-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ол.

Добавляли палладий на древесном угле (10% (мас./мас.), 0,35 г) в колбу. Продували N_2 и добавляли EtOH (50 мл). Добавляли раствор 1-(5-метил-3-нитро-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ола (2,0 г, 11 ммоль) в EtOH (150 мл). Перемешивали при комнатной температуре под H_2 (баллон) в течение ночи. Фильтровали через диатомовую землю. Концентрировали фильтрат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде розового масла (1,2 г, 69%). МС (ЭР) $m/z=156$ (M+H).

Препарат 14.

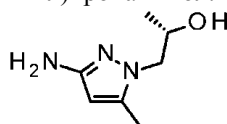
(2S)-1-(5-Метил-3-нитро-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ол.



Добавляли ацетонитрил (45 мл) к смеси 5-метил-3-нитро-1H-пиразола (1,2 г, 9,0 ммоль), карбоната калия (2,5 г, 2,0 экв.) и (S)-1-хлор-2-пропанола (0,98 г, 1,2 экв.). Перемешивали при 85°C в течение четырех дней. Охлаждают до комнатной температуры. Фильтровали для сбора твердого вещества и промывают твердое вещество EtOAc, затем отбрасывали твердое вещество. Собирали и концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Повергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 50% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (1,1 г, 67%). МС (ЭР) $m/z=186$ (M+H).

Препарат 15.

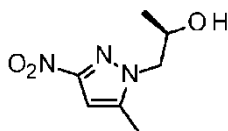
(2S)-1-(3-Амино-5-метил-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ол.



Добавляли палладий на древесном угле (10% (мас./мас.), 0,22 г) в колбу. Добавляли раствор (2S)-1-(5-метил-3-нитро-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ола (1,1 г, 6,0 ммоль) в EtOH (50 мл). Перемешивали при комнатной температуре под H_2 (баллон) в течение ночи. Фильтровали через диатомовую землю. Промывали твердые вещества MeOH. Концентрировали фильтрат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (0,89 г, 95%). МС (ЭС) $m/z=156$ (M+H).

Препарат 16.

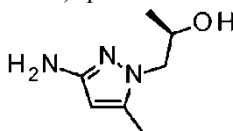
(2R)-1-(5-Метил-3-нитро-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ол.



Добавляли ацетонитрил (41 мл) к смеси 5-метил-3-нитро-1Н-пиразола (1,1 г, 8,2 ммоль), карбоната калия (2,3 г, 2,0 экв.) и (R)-1-хлор-2-пропанола (0,92 мл, 1,3 экв.). Перемешивали при 85°C в течение ночи. Охлаждали до комнатной температуры. Фильтровали и промывали твердые вещества EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 50% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (0,74 г, 48%). МС (ЭР) $m/z=186$ (M+H).

Препарат 17.

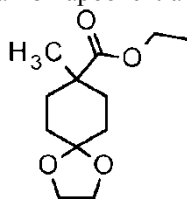
(2R)-1-(3-Амино-5-метил-1Н-пиразол-1-ил)пропан-2-ол.



Добавляли палладий на древесном угле (10% мас./мас., 0,15 г) в колбу. Добавляли раствор (2R)-1-(5-метил-3-нитро-1Н-пиразол-1-ил) пропан-2-ола (0,74 г, 4,0 ммоль) в EtOH (33 мл). Перемешивали при комнатной температуре под H₂ (баллон) в течение ночи. Фильтровали через диатомовую землю. Промывали твердые вещества MeOH. Концентрировали фильтрат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (0,58 г, 95%). МС (ЭР) $m/z=156$ (M+H).

Препарат 18.

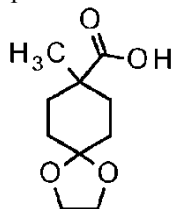
Этил-8-метил-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-карбоксилат.



Смешивали диизопропиламин (55 мл, 1,36 экв.) и 2-метилтетрагидрофуран (500 мл). Охлаждали до -20°C под N₂. Добавляли по каплям 2,5 М н-бутиллития в гексанах (150 мл, 1,30 экв.) в течение 10 мин, затем перемешивали раствор при -20°C в течение дополнительных 15 мин. Переносили раствор посредством канюли в течение 20 мин в раствор этил-1,4-диоксаспиро [4,5] декан-8-карбоксилата (50 мл, 287 ммоль) в 2-метилтетрагидрофуране (500 мл) при -40°C. Перемешивали раствор при -40°C в течение 10 мин. Добавляли по каплям раствор иодметана (30 мл, 1,68 экв.) в 2-метилтетрагидрофуране (60 мл) в течение 10 мин. Перемешивали при -40°C в течение 1 ч. Давали медленно нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония (150 мл). Разделяли слои. Экстрагировали водный слой метил-трет-бутиловым эфиром (50 мл). Сушили объединенные органические слои над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде желтого масла (63,3 г, 97%). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ; 1,16 (с, 3H), 1,20-1,25 (м, 3H), 1,42-1,66 (м, 6H), 2,07-2,14 (м, 2H), 3,91 (с, 4H), 4,08-4,15 (м, 2H).

Препарат 19.

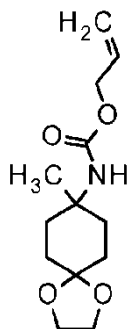
8-Метил-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-карбоновая кислота.



Смешивали этил-8-метил-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-карбоксилат (20 г, 88 ммоль), MeOH (100 мл) и 3 М гидроксид натрия в воде (140 мл). Нагревали реакционную смесь при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Концентрировали в вакууме и разбавляли водой (150 мл) и метил-трет-бутиловым эфиром (50 мл). Разделяли слои и отбрасывали органический слой. Подкисляли водный слой 3% (мас./мас.) водной соляной кислотой для доведения pH до 2. Экстрагировали метил-трет-бутиловым эфиром (3×100 мл). Сушили объединенные органические вещества над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде желтого маслянистого твердого вещества (12,6 г, 72%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ; 1,25 (с, 3H), 1,47-1,60 (м, 2H), 1,65-1,70 (м, 4H), 2,08-2,17 (м, 2H), 3,93 (с, 4H).

Препарат 20.

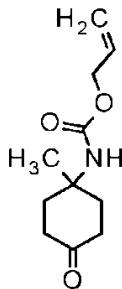
Проп-2-ен-1-ил(8-метил-1,4-диоксаспиро[4,5]дец-8-ил)карбамат.



Смешивали 8-метил-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-8-карбоновую кислоту (12 г, 60 ммоль) и ацетонитрил (200 мл). Добавляли триэтиламин (25,5 мл, 3,11 экв.) и дифенилфосфорилазид (15 мл, 1,18 экв.). Перемешивали при комнатной температуре под N_2 в течение 2 ч. Добавляли аллиловый спирт (25 мл, 6,25 экв.). Перемешивали реакционную смесь при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Концентрировали в вакууме и разбавляли водой (150 мл) и метил-трет-бутиловым эфиром (150 мл). Разделяли слои. Экстрагировали водный слой метил-трет-бутиловым эфиром (2×100 мл). Сушили объединенные органические вещества над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде коричневого масла (10,8 г, 71%). 1H -ЯМР ($CDCl_3$) δ : 1,34 (с, 3H), 1,57-1,69 (м, 6H), 1,98-2,11 (м, 2H), 3,92-3,93 (м, 4H), 4,48-4,66 (м, 3H), 5,16-5,32 (м, 2H), 5,82-5,99 (м, 1H).

Препарат 21.

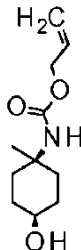
Проп-2-ен-1-ил(1-метил-4-оксоциклогексил)карбамат.



Смешивали проп-2-ен-1-ил (8-метил-1,4-диоксаспиро[4,5]дец-8-ил)карбамат (10,5 г, 41 ммоль), ацетон (30 мл) и воду (3 мл). Добавили 35% соляную кислоту (2,7 мл). Перемешивали в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь в вакууме для удаления ацетона. Разбавляли метил-трет-бутиловым эфиром (100 мл). Подщелачивают 6 М водным раствором карбоната калия, чтобы довести pH до 8. Разделяли слои. Экстрагировали водный слой метил-трет-бутиловым эфиром (2×20 мл). Сушили объединенные органические вещества над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали в вакууме с получением остатка. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя градиентом 20-100% метил-трет-бутилового эфира в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (6,0 г, 69%). 1H ЯМР ($CDCl_3$) δ : 1,44 (с, 3H), 1,76-1,88 (м, 2H), 2,24-2,51 (м, 6H), 4,54 (д, 2H), 4,78 (с, 1H), 5,20-5,35, 2H), 5,85-6,00 (м, 1H).

Препарат 22.

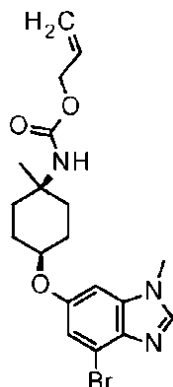
Проп-2-ен-1-ил(цис-4-гидрокси-1-метилциклогексил)карбамат.



Добавляли 0,1 М монокалийфосфатный буфер (pH 7, 500 мл), $MgSO_4$ (0,12 г), NADP (0,27 г) и кеторедуктазу-P1-B10 (0,32 г) в раствор проп-2-ен-1-ил (1-метил-4-оксоциклогексил)карбамата (32,8 г, 155 ммоль) в изопропанол (110 мл). Перемешивали при 35°C в течение 24 ч. Экстрагировали $EtOAc$. Сушили органические вещества над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде желтого масла (32,41 г, 98%). 1H -ЯМР ($CDCl_3$) δ : 1,18-1,50 (м, 7H), 1,57-1,88 (м, 3H), 1,98-2,14 (м, 2H), 3,55-3,65 (м, 1H), 4,46-4,66 (м, 3H), 5,17-5,32 (м, 2H), 5,83-5,96 (м, 1H). Известно, что протонный мультиплет при 3,55-3,65 м.д. находится в цис-конфигурации.

Препарат 23.

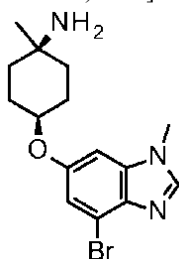
Проп-2-ен-1-ил{цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]-1-метилциклогексил} карбамат.



Добавляли 5 М водный гидроксид натрия (270 мл) и бисульфат тетра (н-бутил) аммония (7,50 г, 0,18 экв.) к раствору 3-бром-5-фтор-N-метил-2-нитроанилина (30,00 г, 120 ммоль) и проп-2-ен-1-ил (цис-4-гидрокси-1-метилциклогексил)карбамату (33,00 г, 1,28 экв.) в ДХМ (300 мл). Перемешивали смесь быстро при комнатной температуре в течение 24 ч. Добавляют гидросульфат тетрабутиламмония (7,50 г, 0,18 экв.). Быстро перемешивали в течение ночи. Разбавляли водой (20 мл). Разделяли слои. Экстрагировали водный слой ДХМ (2×150 мл). Промывали объединенные органические экстракты 5%-мас./мА водным раствором хлорида натрия (200 мл) и водой (200 мл); затем концентрируют органические экстракты в вакууме. Смешивали концентрированные органические экстракты и уксусную кислоту (650 мл). Добавляли триметилортоформиат (45 мл). Перемешивали при 90°C в течение 2,5 ч в атмосфере азота. Разбавляют EtOAc (500 мл). Фильтровали через слой диатомовой земли. Промывали слой с EtOAc. Концентрировали объединенные фильтраты в вакууме. Разбавляли 2 М водным дикалийфосфатом (60 мл) и 2-метилтетрагидрофураном (60 мл). Перемешивали в течение 20 мин, затем фильтровали через диатомовую землю. Разделяли слои. Экстрагировали водный слой 2-метилтетрагидрофураном (2×20 мл). Объединяли органические экстракты, промывали водой и концентрировали в вакууме. Разбавляли 1-метил-2-пирролидиноном (100 мл) и перемешивали с получением гомогенной смеси. По каплям добавляли смесь в воду (1200 мл) в течение 30 мин. Перемешивали в течение 30 мин, фильтровали для сбора твердого вещества и промывали твердое вещество водой. Растворяли твердое вещество в 2-метилтетрагидрофуране (250 мл) и концентрировали в вакууме. Разбавляли раствор изопропанолом (3×150 мл) и концентрировали в вакууме. Разбавляли раствор 2-метилтетрагидрофураном (10 мл) и концентрировали в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде маслянистого коричневого остатка (31,5 г, 74%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 422/424 (M+H).

Препарат 24.

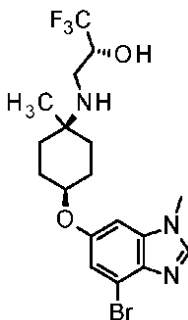
цис-4-[(4-Бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]-1-метилциклогексанамин.



Смешивали проп-2-ен-1-ил{цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]-1-метилциклогексил}карбамат (30 г, 71 ммоль), бис(дипенилиденацетон)палладий (0,50 г, 0,017 экв.), 1,4-бис(дифенилфосфино)бутан (0,50 г, 0,022 экв.) и тиосалициловую кислоту (15 г, 1,90 экв.) в 2-метилтетрагидрофуране (700 мл). Нагревали реакционную смесь при 50°C в течение 1 ч. Разбавляли водой (300 мл) и метил-трет-бутиловым эфиром (300 мл). Подкисляли 35%-ной соляной кислотой для доведения pH до 2. Разделяли слои и отбрасывали органический слой. Разбавляли водный слой EtOAc (20 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Разделяли слои и отбрасывали органический слой. Разбавляли водный слой ДХМ (150 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Разделяли слои и отбрасывали органический слой. Разбавляли водный слой гидроксидом натрия. Фильтровали; собирали твердое вещество; затем подвергали полученный твердый остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 5% 2 М насыщенный аммиак, аммонизированным MeOH в ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения (12,0 г, 50%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 338/340 (M+H).

Препарат 25.

(2R)-3-({цис-4-[(4-Бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]-1-метилциклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол.

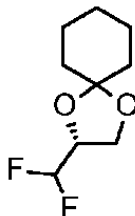


Смешивали цис-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]-1-метилциклогексанамина (11,6 г, 34 ммоль), (2R)-2-(трифторметил)оксиран (4,00 г, 1,05 экв.), EtOH (45 мл) и воду (45 мл) в стеклянном реакторе под давлением. Запечатывали и нагревали реакционную смесь при 90°C в течение 1 ч. Давали остыть до комнатной температуры. Добавляли (2R)-2-(трифторметил)оксиран (0,44 г, 0,12 экв.). Запечатывали и нагревали реакционную смесь при 90°C в течение 1 ч. Концентрировали в вакууме. Разбавляли водой (100 мл), метил-трет-бутиловым эфиром (20 мл) и EtOAc (20 мл). Подкисляли 35%-ной водной соляной кислотой, чтобы довести pH до 2 и перемешивали до полного растворения. Разделяли слои и отбрасывали органический слой. Разбавляли водный слой метил-трет-бутиловым эфиром (40 мл). Разделяли слои и отбрасывали органический слой. Подщелачивали водный слой 50% (мас./мас.) водным раствором гидроксида натрия, чтобы довести pH до 10. Экстрагировали водный слой EtOAc (2×50 мл). Объединяли органические экстракты и концентрировали в вакууме. Кристаллизовали твердое вещество из EtOAc (50 мл). Фильтровали для сбора твердого вещества, затем промывали полученное твердое вещество EtOAc, получая указанное в заголовке соединение в виде белого твердого вещества (6,3 г, 41%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 450/452 (M+H).

Концентрировали фильтрат из кристаллизационного маточного раствора для получения остатка. Остаток подвергали нормально-фазовой хроматографии, элюируя 5% 2 М аммонизированным MeOH в EtOAc, с получением дополнительного указанного в заголовке соединения в виде не совсем белого твердого вещества (3,3 г, 21%). МС (ЭР) $m/z = (^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br})$ 450/452 (M+H).

Препарат 26.

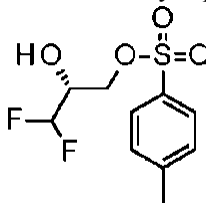
(2R)-2-(Дифторметил)-1,4-диоксаспиро[4,5]декан.



Растворили (3R)-1,4-диоксаспиро[4,5]декан-3-карбальдегид (15,98 г, 89,19 ммоль) в ДХМ (80 мл). Помещали под N₂ и охлаждали раствор до 0°C. Осторожно по каплям добавляли трифторид диэтиламиносульфура (15 мл, 1,2 экв.). Давали медленно нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Медленно выливали смесь в перемешиваемую смесь измельченного льда, насыщенного водным бикарбонатом натрия и ДХМ. Добавляли дикалийфосфат (5 г) и порционно карбонат калия, поддерживая pH ~7-8, пока не будет больше наблюдаться образования пузырьков. Перемешивали в течение 20 мин. Разделяли слои. Экстрагировали водный слой ДХМ (3 раза). Промывали объединенные органические экстракты 1 М водным бисульфитом натрия и насыщенным водным раствором хлорида натрия. Сушили органические вещества над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде масла янтарного цвета (17,37 г, 93%). ГХ-МС $m/z = 192$.

Препарат 27.

(2R)-3,3-Дифтор-2-гидроксипропил-4-метилбензолсульфонат.



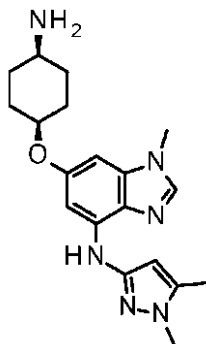
Растворили (2R)-2-(дифторметил)-1,4-диоксаспиро[4,5]декан (9,08 г, 47,2 ммоль) в MeOH (250 мл). Добавляли моногидрат p-толуолсульфоновой кислоты (0,70 г, 0,1 экв.). Перемешивали при комнатной температуре в течение одной недели. Добавляли бикарбонат натрия (0,60 г). Перемешивали в течение 1 ч. До-

бавляли силикагель и триметиламин (3 мл). Перемешивали в течение 10 мин. Концентрировали в вакууме и подвергали нормально- фазовой хроматографии, элюируя градиентом 15-100% EtOAc в гексанах, с получением (2R)-3,3-дифторпропан-1,2-диола в виде желтого масла (2,95 г).

Растворяли (2R)-3,3-дифторпропан-1,2-диол (2,0 г, 15,2 ммоль) в ДХМ (40 мл). Помещали под азот и охлаждали раствор до 0°C. Добавляли 2,6-лутидин (8,0 мл, 4,5 экв.). Добавляли порционно толуолсульфонилхлорид (3,0 г, 1,0 экв.). Дали медленно нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение двух дней. Охлаждали до -78°C и добавляли по каплям триметилсилилтрифторметансульфонат (1,5 мл, 0,5 экв.). Дают нагреться до 0°C в течение 40 мин. Добавляют по каплям триметилсилилтрифторметансульфонат (1,5 мл, 0,5 экв.). Перемешивали в течение 30 мин и гасили MeOH (5 мл). Разбавляли ДХМ и добавляли раствор фосфата натрия (4,9 г) в воде (75 мл). Доводили pH до ~3 с помощью 2 М водного раствора бисульфата калия. Разделяли слои. Экстрагировали водный слой диэтиловым эфиром. Высушивали органические экстракты над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме. Добавляли этиленгликоль (1 мл) и силикагель (~20 г). Концентрировали в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток нормально- фазовой хроматографии и, элюируя 20-100% В в градиенте А (А: гексаны, В: 6: 3: 1 гексаны: ДХМ: ТГФ) с получением указанного в заголовке соединения (1,37 г, 16%), ГХ-МС m/z=266.

Препарат 28.

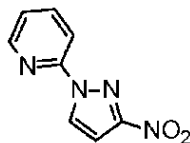
6-[(цис-4-Аминоциклогексил)окси]-N-(1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)-1-метил-1Н-бензимидазол-4-амин.



Смешивали цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексанамином (25,70 г, 79,27 ммоль), 1,5-диметил-1Н-пиразол-3-амин (9,08 г, 1,0 экв.), карбонат калия (28,48 г, 2,6 экв.), 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (8,60 г, 0,20 экв.), трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (3,63 г, 0,050 экв.) и уксусную кислоту (0,14 мл) в трет-бутиловом спирте (250 мл). Нагревали при температуре дефлегмации в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь в вакууме. Добавляли ДХМ и воду; разделяют слои. Сушили органические вещества над безводным сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Затирали из EtOAc и гексанов с получением рыжевато-коричневого твердого вещества. Очищали твердое вещество рыжевато-коричневого цвета нормально-фазовой хроматографией, элюируя гексанами, затем 5% MeOH в ДХМ, затем 20% 2 М аммонизированным MeOH в ДХМ с получением указанного в заголовке соединения в виде рыжевато-коричневого твердого вещества (21,71 г, 77%). МС (ЭР) m/z=355 (M+H).

Препарат 29.

2-(3-Нитро-1Н-пиразол-1-ил)пиридин.



В каждом из двух отдельных флаконов смешивали 3-нитро-1Н-пиразол (3,0 г, 27 ммоль), 2-фторпиридин (2,9 мл, 1,3 экв.) и триэтиламин (4,6 мл, 1,2 экв.) в 1-метил-2-пирролидиноне (20 мл). Запечатывали и перемешивали при 180°C в течение ночи. Охлаждали до комнатной температуры. Объединяли реакционные смеси и разбавляли водой. Фильтровали для сбора твердого вещества, промывали твердое вещество водой и сушили в вакууме, получая указанное в заголовке соединение (5,9 г, 58%). МС (ЭР) m/z=191 (M+H).

Препарат 30.

1-Пиридин-2-ил-1Н-пиразол-3-амин.

Добавляли палладий на древесном угле (10% (мас./мас), 1,9 г) в колбу. Продували N₂ и добавляли EtOH (200 мл). Добавляли 2-(3-нитро-1Н-пиразол-1-ил)пиридин (2,5 г, 13 ммоль). Перемешивали при комнатной температуре под H₂ (баллон) в течение ночи. Добавляли небольшое количество диатомовой земли и перемешивали в течение 5 мин. Фильтровали через слой диатомовой земли и промывали слой EtOH. Концентрировали фильтрат в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде коричне-

вого твердого вещества (1,8 г, 85%). МС (ЭР) $m/z=161$ (M+H).

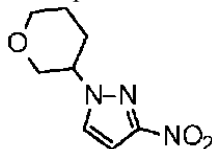
Препарат 31.

1-(метилсульфонил)-3-нитро-1H-пиразол.

Смешивали 3-нитро-1H-пиразол (3,0 г, 27 ммоль), метансульфонилхлорид (2,5 мл, 1,2 экв.) и триэтиламин (4,4 мл, 1,2 экв.) в ДХМ (20 мл). Перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Разбавляли ДХМ и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Разделяли слои. Промывали органический слой водой и рассолом. Сушили органический слой над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде коричневого твердого вещества (3,7 г, 73%). 1H ЯМР ($DMCO-d_6$) δ : 3,74 (с, 3H), 7,30 (д, $J=2,9$ Гц, 1H), 8,55 (д, $J=2,9$ Гц, 1H).

Препарат 32.

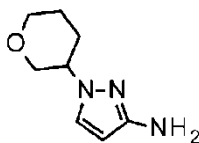
3-Нитро-1-тетрагидро-2H-пиран-3-ил-1H-пиразол.



Смешивали тетрагидропиран-3-ол (1,3 г, 13 ммоль), 1-(метилсульфонил)-3-нитро-1H-пиразол (2,4 г, 1,0 экв.) и карбонат цезия (4,8 г, 1,2 экв.) в ацетонитриле (40 мл). Перемешивали при 90°C в течение ночи. Концентрировали смесь в вакууме. Разбавляли EtOAc и фильтровали через слой диатомовой земли. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток С-18 обращенно-фазовой хроматографии, элюируя градиентом от 0 до 100% (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле) в (0,1% муравьиной кислоты в воде) с получением указанного в заголовке соединения (0,35 г, 14%). МС (ЭР) $m/z=198$ (M+H).

Препарат 33.

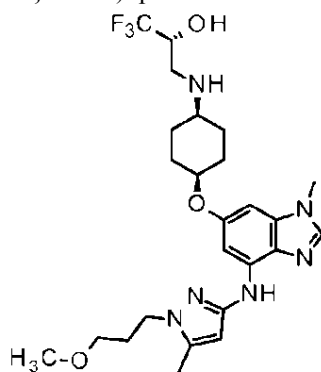
1-(Тетрагидро-2H-пиран-3-ил)-1H-пиразол-3-амин.



Добавляли палладий на древесном угле (10% (мас./мас.), 0,10 г) в колбу. Продували N_2 и добавляли EtOH (20 мл). Добавляли 3-нитро-1-тетрагидро-2H-пиран-3-ил-1H-пиразол (0,30 г, 1,5 ммоль). Перемешивали при комнатной температуре под H_2 (баллон) в течение 2 ч. Фильтровали через диатомовую землю и промывали EtOH. Концентрировали фильтрат в вакууме, получая указанное в заголовке соединение в виде твердого вещества серого цвета (0,24 г, 94%). МС (ЭР) $m/z=168$ (M+H).

Пример 1.

(2R)-1,1,1-трифтор-3-({цис-4-[(4-{[1-(3-метоксипропил)-5-метил-1H-пиразол-3-ил]амино}-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил} амино)пропан-2-ол.

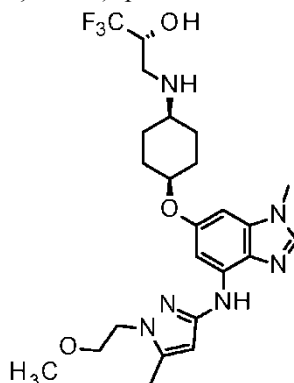


Смешивали (2R)-3-({цис-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил} амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (4,0 г, 9,2 ммоль), 1-(3-метоксипропил)-5-метил-1H-пиразол-3-амин (2,2 г, 1,4 экв.), карбонат калия (3,2 г, 2,5 экв.), 2-(ди-трет-бутилфосфино)-2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-1,1'-бифенил (0,92 г, 0,20 экв.), трис-(добензилиденацетон)дипалладий (0) (0,87 г, 0,10 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в трет-бутиловом спирте (46 мл). Нагревали при 90°C в течение ночи. Фильтровали через слой диатомовой земли и промывали слой EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 5% MeOH в ДХМ, с получением сырого продукта. Далее подвергают сырой продукт хроматографии с обращенной фазой, элюируя 15-60% В в градиенте А (А: 10 мМ бикарбонат аммония в MeOH, В: ацетонитрил). Концентрировали фракции, содержащие продукт, с удалением большей части ацетонитрила. Добавляли EtOAc и разделяли

слои. Промывали органический слой насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме. Далее подвергали продукт нормально-фазовой хроматографии, элюируя 5% MeOH в ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (2,4 г, 49%). МС (ЭР) $m/z=525$ (M+H).

Пример 2.

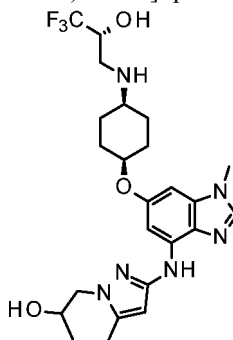
(2R)-1,1,1-Трифтор-3-($\{$ цис-4- $\{$ 4- $\{$ 1-(2-метоксиэтил)-5-метил-1H-пиразол-3-ил $\}$ амино $\}$ -1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси $\}$ циклогексил $\}$ амино $\}$ пропан-2-ол.



Смешивали (2R)-3-($\{$ цис-4- $\{$ (4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)-окси $\}$ циклогексил $\}$ амино $\}$ -1,1,1-трифторпропан-2-ол (1,4 г, 3,2 ммоль), 1-(2-метоксиэтил)-5-метил-1H-пиразол-3-амин (0,69 г, 1,4 экв.), карбонат калия (1,1 г, 2,6 экв.), 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (0,35 г, 0,20 экв.), трис-(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,15 г, 0,050 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в трет-бутиловом спирте (32 мл). Нагревали при температуре дефлегмации в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь в вакууме. Добавляли ДХМ и воду; разделяли слои. Фильтровали органический слой через материал ISOLUTE® HM-N, промывали ДХМ и EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 30-100% В в градиенте А (А: ДХМ, В: 15% 2 М аммонизированный MeOH в ДХМ) с получением указанного в заголовке соединения в виде не совсем белого твердого вещества (0,91 г, 56%). МС (ЭР) $m/z=511$ (M+H).

Пример 3.

(2R)-1,1,1-Трифтор-3-($\{$ цис-4- $\{$ 4- $\{$ 1-(2-гидроксипропил)-5-метил-1H-пиразол-3-ил $\}$ амино $\}$ -1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси $\}$ циклогексил $\}$ амино $\}$ пропан-2-ол.



Смешивали (2R)-3-($\{$ цис-4- $\{$ (4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси $\}$ циклогексил $\}$ амино $\}$ -1,1,1-трифторпропан-2-ол (0,35 г, 0,80 ммоль), 1-(3-амино-5-метил-1H-пиразол-1-ил)пропан-2-ол (0,14 г, 1,1 экв.), карбонат калия (0,28 г, 2,5 экв.), 2-(ди-трет-бутилфосфино)-2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-1,1'-бифенил (0,12 г, 0,30 экв.), трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,055 г, 0,075 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в трет-бутиловом спирте (5,3 мл). Нагревали при 100°C в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь в вакууме с получением остатка. Подвергали остаток хроматографии с обращенной фазой C-18, элюируя градиентом 0-80% ацетонитрила в (10 mM бикарбоната аммония в метаноле). Концентрировали фракции, содержащие продукт (в виде смеси изомеров) в вакууме с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (0,29 г, 71%). МС (ЭР) $m/z=511$ (M+H).

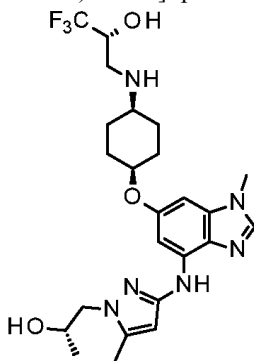
Разделяли изомеры в смеси, используя следующие условия хиральной хроматографии, чтобы получить:

первый элюирующий энантиомер 1 (0,12 г, 99% эи); МС (ЭР) $m/z=511$ (M+H), 75%/25% CO₂/изопропанол, 5 мл/мин, 4,6×150 мм, Chiralpak AD-H;

второй элюирующий энантиомер 2 (0,11 г, 97% эи); МС (ЭР) $m/z=511$ (M+H), 75%/25% CO₂/изопропанол, 5 мл/мин, 4,6×150 мм, Chiralpak AD-H.

Пример 4.

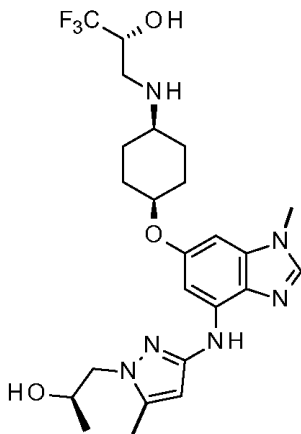
(2R)-1,1,1-Трифтор-3-[(цис-4-{[4-(1-[(2S)-2-гидроксипропил]-5-метил-1Н-пиразол-3-ил}амино)-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил]окси}циклогексил)амино]пропан-2-ол.



Смешивали (2R)-3-({цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (0,40 г, 0,92 ммоль), (2S)-1-(3-амино-5-метил-1Н-пиразол-1-ил) пропан-2-ол (0,17 г, 1,2 экв.), карбонат калия (0,33 г, 2,6 экв.), 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (0,099 г, 0,20 экв.), трис-(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,042 г, 0,050 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в трет-бутиловом спирте (10 мл). Укупоривали с помощью обжимного колпачка. Нагревали смесь в микроволновом реакторе при 140°C в течение 60 мин. Концентрировали реакционную смесь в вакууме. Добавляли ДХМ и воду; разделяли слои. Фильтровали органический слой через материал ISOLUTE® HM-N, промывали материал ДХМ и EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Затирали остаток с помощью EtOAc/гексанов с получением указанного в заголовке соединения (0,44 г, 95%). МС (ЭР) $m/z=511$ (M+H).

Пример 5.

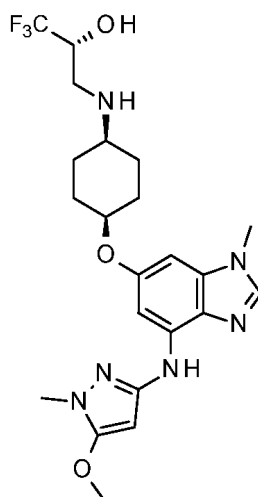
(2R)-1,1,1-Трифтор-3-[(цис-4-{[4-(1-[(2R)-2-гидроксипропил]-5-метил-1Н-пиразол-3-ил}амино)-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил]окси}циклогексил)амино]пропан-2-ол.



Смешивали (2R)-3-({цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (0,15 г, 0,34 ммоль), (2R)-1-(3-амино-5-метил-1Н-пиразол-1-ил)пропан-2-ол (0,064 г, 1,2 экв.), карбоната калия (0,12 г, 2,6 экв.), 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (0,037 г, 0,20 экв.), трис-(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,016 г, 0,050 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в трет-бутиловом спирте (10 мл). Укупоривали с помощью обжимного колпачка. Нагревали смесь в микроволновом реакторе при 140°C в течение 60 мин. Концентрировали смесь в вакууме, чтобы получить остаток. Добавляли ДХМ и воду в остаток и разделяли слои. Фильтровали органический слой через материал ISOLUTE® HM-N; промывали материал ДХМ и EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме. Затирали остаток с помощью EtOAc/гексанов с получением указанного в заголовке соединения в виде рыжевато-коричневого твердого вещества (0,11 г, 62%). МС (ЭР) $m/z=511$ (M+H).

Пример 6.

(2R)-1,1,1-Трифтор-3-{[цис-4-({4-[(5-метокси-1-метил-1Н-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}пропан-2-ол.

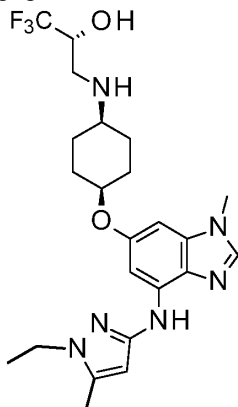


Добавляли 2-метилбутан-2-ол (120 мл) к смеси (2R)-3-((4-((4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси)циклогексил)амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (10 г, 22,9 ммоль), 5-метокси-1-метилпиразол-3-амин (3,6 г, 28,8 ммоль), трис-(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (1,8 г, 2 ммоль), ди-трет-бутил(2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-[1,1'-бифенил]-2-ил)фосфин (1,3 г, 2,4 ммоль) и карбонат калия (9 г, 65 ммоль). Перемешивали смесь путем барботирования газа N_2 через смесь и затем добавляли уксусную кислоту (118 мкл, 2 ммоль). Нагревали и перемешивали смесь под N_2 при $100^\circ C$ в течение 20 ч. Охлаждали до комнатной температуры; выпаривали растворитель; затем добавляли EtOAc (100 мл), воду (50 мл) и древесный уголь (1 г). Перемешивали смесь в течение 15 мин и фильтровали смесь через диатомовую землю. Собирали фильтрат и отделяли органический слой. Добавляли воду (100 мл) и концентрированную соляную кислоту, чтобы довести pH до 2. Добавляли древесный уголь (1,5 г), перемешивали смесь 30 мин и фильтровали смесь через диатомовую землю. Переносили фильтрат в сепараторную воронку и отделяли водный слой. Добавляли концентрированный раствор гидроксида аммония поверх водного слоя, чтобы довести pH до 10, чтобы получить твердое бледно-кремового цвета. Подвергали твердое вещество хроматографии на твердом носителе с силикагелем, элюируя смесью метилена хлорида и MeOH (95:5). Собирали нужные фракции и выпаривали растворитель, получая указанное в заголовке соединение в виде бледно-кремового материала (6,5 г, 13 ммоль) с выходом 64%.

Кристаллизовали указанное в заголовке соединение из циклопентилметилового эфира (45 мл) с получением (2R)-1,1,1-трифтор-3-[[4-[7-[(5-метокси-1-метилпиразол-3-ил)амино]-3-метилбензимидазол-5-ил]оксициклогексил]амино]пропан-2-ола (3,2 г, 6,5 ммоль). Перемешивали смесь при $22^\circ C$ в течение 18 ч. Выпаривали растворитель и сушили твердое вещество белого цвета до постоянной массы, получая указанное в заголовке соединение в виде белого твердого вещества (3,2 г, 6,4 ммоль) с выходом 99%. МС (m/z): 483,2 ($M+H$). 1H ЯМР (300,16 МГц, $CDCl_3$): 8,13 (с, 1H), 7,90 (с, 1H), 7,46 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 6,46 (д, $J=1,9$ Гц, 1H), 4,45 (с, 1H), 3,83 (с, 3H), 3,73 (с, 3H), 3,47 (с, 3H), 2,75-2,67 (м, 2H), 1,99-1,91 (м, 2H), 1,67-1,54 (м, 7H).

Пример 7.

(2R)-3-((4-((4-((Этил-5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино)-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси)циклогексил)амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол.



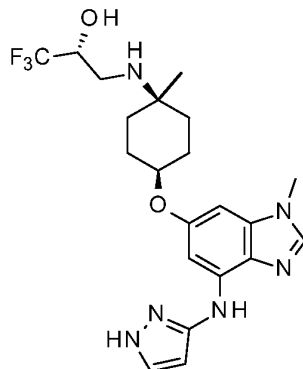
Смешивали (2R)-3-((4-((4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси)циклогексил)амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (1,36 г, 3,12 ммоль), 1-этил-5-метил-1H-пиразол-3-амин (0,78 г, 2,0 экв.), карбонат калия (1,12 г, 2,6 экв.), 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (0,34 г, 0,20 экв.), трис-(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (0,14 г, 0,050 экв.) и уксусную ки-

слоту (0,01 мл) в трет-бутиловом спирте (30 мл). Нагревали при температуре дефлегмации в течение ночи. Концентрировали реакционную смесь в вакууме.

Добавляли ДХМ и воду; разделяли слои. Фильтровали органический слой через материал ISO-LUTE® НМ-N, промывали ДХМ. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Затирали остаток в EtOAc и гексанах с получением указанного в заголовке соединения (1,40 г, 94%). МС (ЭР) $m/z=481$ (M+H).

Пример 8.

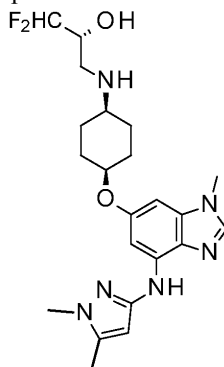
(2R)-1,1,1-Трифтор-3-[(цис-1-метил-4-{[1-метил-4-(1H-пиразол-3-иламино)-1H-бензимидазол-6-ил]окси}циклогексил)амино]пропан-2-ол.



Смешивали (2R)-3-({цис-4-[(4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси]-1-метилциклогексил}амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (0,91 г, 2,02 ммоль), 3-аминопиразол (0,29 г, 1,70 экв.), карбонат калия (0,73 г, 2,6 экв.), 2-(дициклогексилфосфино)-3,6-диметокси-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил (0,22 г, 0,20 экв.), трис (дибензилиденацетон) дипалладий (0) (0,093 г, 0,050 экв.) и уксусную кислоту (0,01 мл) в трет-бутиловом спирте (20 мл). Кипятили смесь в течение ночи. Концентрировали смесь в вакууме. Добавляли ДХМ и воду; разделяли слои. Фильтровали органический слой через материал ISO-LUTE® НМ-N, промывая ДХМ. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 50-100% В в градиенте А (А: метил-трет-бутиловый эфир, В: 15% 7 М аммонизированный MeOH в ДХМ) с получением указанного в заголовке соединения (0,67 г, 74%). МС (ЭР) $m/z=453$ (M+H).

Пример 9.

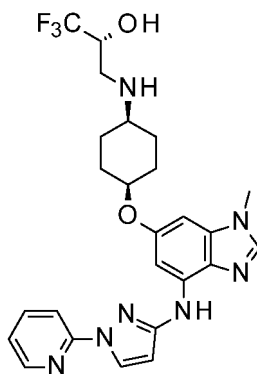
(2R)-3-{[цис-4-({4-[(1,5-Диметил-1H-пиразол-3-ил)амино]-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил}окси)циклогексил]амино}-1,1-дифторпропан-2-ол.



Смешивали (2R)-3,3-дифтор-2-гидроксипропил-4-метилбензолсульфонат (0,38 г, 1,31 ммоль) и 6-[(цис-4-аминоциклогексил)окси]-N-(1,5-диметил-1H-пиразол-3-ил)-1-метил-1H-бензимидазол-4-амин (0,61 г, 1,30 экв.) в ацетонитриле (3 мл) и 2-пропанол (3 мл). Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (0,50 мл, 2,0 экв.) и иодид натрия (0,015 г, 0,1 экв.). Нагревали при 65°C в течение ночи. Добавляли (2R)-3,3-дифтор-2-гидроксипропил-4-метилбензолсульфонат (0,065 г, 0,22 ммоль) и нагревали при 65°C в течение ночи. Фильтровали через диатомовую землю. Промывали твердые частицы EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме. Подвергали хроматографии с обращенной фазой, элюируя 0-90% ацетонитрилом в градиенте воды. Концентрировали фракции, содержащие продукт, в вакууме, с получением указанного в заголовке соединения в виде не совсем белого твердого вещества (0,40 г, 67%). МС (ЭР) $m/z=449$ (M+H).

Пример 10.

(2R)-1,1,1-Трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{[1-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил]амино}-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)пропан-2-ол.



Смешивали (2R)-3-((4-((4-бром-1-метил-1H-бензимидазол-6-ил)окси)циклогексил)амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (1,8 г, 4,1 ммоль), 1-пиридин-2-ил-1H-пиразол-3-амин (0,86 г, 1,3 экв.), карбонат калия (1,7 г, 2,9 экв.), 2-(ди-трет-бутилфосфино)-2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-1,1'-бифенил (0,83 г, 0,41 экв.), трис-(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,38 г, 0,10 экв.) и уксусную кислоту (0,03 мл) в трет-бутиловом спирте (22 мл). Нагревали смесь при 90°C в течение 3 ч. Охлаждали смесь до комнатной температуры. Фильтровали через слой диатомовой земли и промывали слой EtOAc. Концентрировали фильтрат в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 0-10% MeOH в градиенте ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (1,34 г, 63%). МС (ЭС) m/z = 516 (M+H).

Кристаллический материал свободного основания может быть получен путем растворения твердого материала, который получают, по существу, как описано выше, в 2-бутаноне (100 мас.%), Затем нагревали полученную смесь до 65°C. Оставляли смесь остывать до 20°C и добавляли гептан (100 мас.%), чтобы вызвать осаждение. Собирают полученное твердое вещество и промывают гептаном, сушат на воздухе в течение 15 мин, затем сушат в печи при 40°C в течение ночи, получая указанное в заголовке соединение в виде безводного кристаллического свободного основания с выходом 62%.

Рентгеновская порошковая дифракция примера 10

РПД-диаграммы кристаллических твердых веществ получены на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavour, оснащенном источником $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54060 \text{ \AA}$) и детектором Vantes, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканируют от 4 до 40° в 2θ с размером шага $0,0087^\circ$ в 2θ и скоростью сканирования 0,5 секунды/шаг, и с щелью расходимости 0,6 мм, с фиксированной анти-рассеивающей щелью 5,28 мм и щелью детекторов 9,5 мм. Сухой порошок упаковывают на кварцевый держатель образца и создавали гладкую поверхность с помощью предметного стекла. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности дифракционных пиков могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами как морфология и структура кристалла. При наличии эффектов предпочтительной ориентации интенсивности пиков варьируются, но положения характеристических пиков полиморфной формы остаются неизменными. См., например, The U.S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015. Кроме того, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы угловые положения пика могут незначительно варьироваться. Например, положения пиков могут смещаться вследствие колебаний температуры или влажности, при которых анализируют образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае вариабельность положения пика $\pm 0,2$ в 2θ будет учитывать указанные возможные отклонения, не препятствуя однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть сделано на основании любой уникальной комбинации характеристических пиков (в единицах 2θ), как правило, более выраженных пиков. Дифрактограммы кристаллической формы, записанные при температуре и относительной влажности окружающей среды, корректировали по стандартным пикам NIST 675 при 8,85 и 26,77 °2-тета.

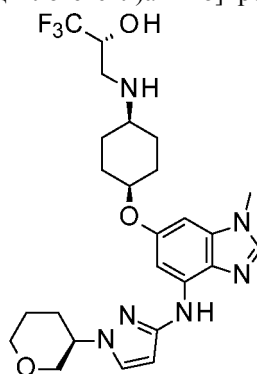
Таким образом, приготовленный образец соединения свободного основания примера 10 характеризуется РПД дифрактограммой с использованием излучения $\text{CuK}\alpha$, как имеющий дифракционные пики (значения 2-тета), как описано в табл. 1 ниже. В частности, диаграмма содержит пик при 20,5 в комбинации с одним или несколькими пиками, выбранными из группы, состоящей из 15,5, 18,1, 18,3, 18,5, 22,9 и 23,6 с допуском для углов дифракции $0,2^\circ$.

Таблица 1 Пики рентгеновской порошковой дифракции для примера 10

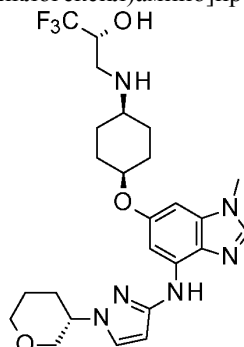
Пик	Угол 2 тета	% интенсивность
1	11.3	21%
2	13.2	37%
3	14.8	22%
4	15.5	63%
5	16.3	19%
6	18.1	63%
7	18.3	75%
8	18.5	56%
9	19.0	30%
10	19.3	27%
11	20.5	100%
12	20.8	19%
13	22.3	16%
14	22.9	86%
15	23.3	30%
16	23.6	49%
17	23.7	45%
18	24.7	36%
19	25.5	28%
20	26.5	33%
21	28.3	19%
22	31.0	17%

Пример 11А и 11В.

(2R)-1,1,1-Трифтор-3-[(цис-4-{[1-метил-4-(1-[(3R)-тетрагидро-2Н-пиран-3-ил]-1Н-пиразол-3-ил}амино)-1Н-бензимидазол-6-ил]окси} циклогексил)амино]пропан-2-ол.



(2R)-1,1,1-Трифтор-3-[(цис-4-{[1-метил-4-(1-[(3S)-тетрагидро-2Н-пиран-3-ил]-1Н-пиразол-3-ил}амино)-1Н-бензимидазол-6-ил]окси} циклогексил)амино]пропан-2-ол.

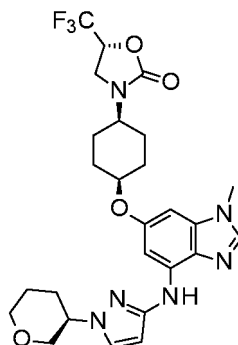


Сначала подготовили соединения в виде рацемической смеси. Смешивали (2R)-3-({цис-4-[(4-бром-1-метил-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил)амино)-1,1,1-трифторпропан-2-ол (0,62 г, 1,2 экв.), 1-(тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1Н-пиразол-3-амин (0,20 г, 1,2 ммоль), карбонат калия (0,42 г, 2,5 экв.), 2-(дитрет-бутилфосфино)-2',4',6'-триизопропил-3,6-диметокси-1,1'-бифенил (0,18 г, 0,30 экв.), трис-

(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (0,085 г, 0,075 экв.) и уксусную кислоту (0,02 мл) в трет-бутиловом спирте (6 мл). Нагревали при 100°C в течение 7 ч. Давали реакционной смеси охладиться до комнатной температуры. Концентрировали реакционную смесь в вакууме. Разбавляли EtOAc. Фильтровали через слой диатомовой земли и промывали слой EtOAc. Добавляли насыщенный водный раствор бикарбоната натрия в фильтрат. Разделяли слои. Промывали органический слой водой и рассолом. Сушили органический слой над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали фильтрат в вакууме с получением остатка. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 0-30% MeOH в градиенте ДХМ с получением указанного в заголовке соединения (0,31 г, 49%). МС (ЭР) m/z=523 (M+H).

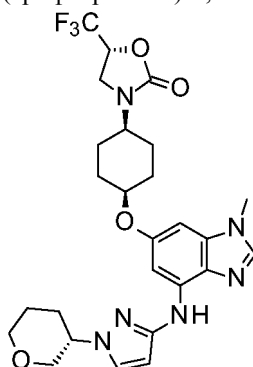
Разделяли изомеры путем первоначального приготовления производного 5-(трифторметил)оксазолидин-2-она:

(5R)-3-(цис-4-{[1-Метил-4-(1-[(3R)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил]-1Н-пиразол-3-ил]амино)-1Н-бензимидазол-6-ил]окси} циклогексил)-5-(трифторметил)-1,3-оксазолидин-2-она,



и

(5R)-3-(цис-4-{[1-Метил-4-(1-[(3S)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил]-1Н-пиразол-3-ил]амино)-1Н-бензимидазол-6-ил]окси} циклогексил)-5-(трифторметил)-1,3-оксазолидин-2-она



Смешивали (2R)-1,1,1-трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{[1-(тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино}-1Н-бензимидазол-6-ил]окси}циклогексил)амино)пропан-2-ол (0,25 г, 0,42 ммоль), 1,1'-карбонилдидиимидазол (0,14 г, 2,0 экв.) и 4-диметиламинопиридин (0,011 г, 0,21 экв.) в ДХМ (2 мл).

Перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней. Концентрировали в вакууме, чтобы получить остаток. Подвергали остаток нормально-фазовой хроматографии, элюируя 0-20% MeOH в градиенте ДХМ, с получением рацемической смеси (5R)-3-(цис-4-{[1-метил-4-(1-[(тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино)-1Н-бензимидазол-6-ил]окси} циклогексил)-5-(трифторметил)-1,3-оксазолидин-2-она. Разделяли изомеры с помощью хиральной хроматографии с использованием 60%/40% CO₂/изопропанола, 5 мл/мин, 4,6×150 мм, Lux Amylose-2.

Изомер 1 (0,10 г, 99% эи). Время удерживания 2,98 мин. МС (ЭР) m/z=549 (M+H).

Изомер 2 (0,10 г, 99% эи). Время удерживания 4,83 мин. МС (ЭР) m/z=549 (M+H).

Изомер 1.

(2R)-1,1,1-Трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{[1-(тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино}-1Н-бензимидазол-6-ил]окси}циклогексил)амино)пропан-2-ол.

Смешивали (5R)-3-(цис-4-{[1-метил-4-(1-[(тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино)-1Н-бензимидазол-6-ил]окси} циклогексил)-5-(трифторметил)-1,3-оксазолидин-2-он (изомер 1) (0,080 г, 0,15 ммоль) и триметилсиланолат калия (0,041 г, 2,0 экв.) в ТГФ (2 мл). Перемешивали при 65°C в течение 3 дней. Добавляли триметилсиланолат калия (0,018 г, 1,0 экв.). Перемешивали при 65°C в течение ночи. Давали остыть до комнатной температуры. Разбавляли несколькими каплями воды и концентрировали в вакууме. Подвергали хроматографии с обращенной фазой C-18 с использованием 0-100% ацетонитрила в (10 mM бикарбонате аммония в метаноле) с получением указанного в заголовке соединения (0,055 г, 72%). МС (ЭР) m/z=523 (M+H).

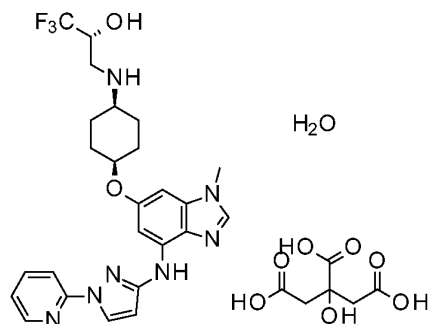
Изомер 2.

(2R)-1,1,1-Трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{[1-(тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино}-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил} амино)пропан-2-ол.

Смешивали (5R)-3-(цис-4-{[1-метил-4-{[1-(тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино}-1Н-бензимидазол-6-ил]окси} циклогексил)-5-(трифтометил)-1,3-оксазолидин-2-он (изомер 2) (0,080 г, 0,15 ммоль) и триметилсиланолат калия (0,040 г, 2,0 экв.) в ТГФ (2 мл). Перемешивали при 65°C в течение 3 дней. Добавляли триметилсиланолат калия (0,018 г, 1,0 экв.). Перемешивали при 65°C в течение ночи. Давали остыть до комнатной температуры. Разбавляли несколькими каплями воды и концентрировали в вакууме. Подвергали хроматографии с обращенной фазой C-18 с использованием ацетонитрила 0-100% в (10 mM бикарбонат аммония в метаноле) с получением указанного в заголовке соединения (0,058 г, 76%). МС (ЭР) $m/z=523$ (M+H).

Пример 12.

(2R)-1,1,1-Трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{[1-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино}-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил} амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрат (1:1:1).



Прибавляли 1,23 г (2R)-1,1,1-трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{[1-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино}-1Н-бензимидазол-6-ил)окси] циклогексил} амино)пропан-2-ола к 10 мл 88% ацетона при перемешивании при 1000 об/мин при 70°C с получением белой суспензии. Прибавляли по каплям 510 мг лимонной кислоты. Белая суспензия превращалась в прозрачный желтоватый раствор. Прекращали нагревание и перемешивание. В течение следующего часа медленно образовывалось желтое твердое вещество. Выделяли светло-желтое твердое вещество вакуумной фильтрацией. Высушивали образец на фильтре под воздушным потоком в течение 20 мин, чтобы получить указанное в заголовке соединение. (1,62 г, 93,6%).

Рентгеновская порошковая дифракция примера 12

РПД-диаграммы кристаллических твердых веществ получены на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavour, оснащенном источником $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54060$ Å) и детектором Vantec, работающим при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали от 4 до 40° в 2θ с размером шага 0,0087° в 2θ и скоростью сканирования 0,5 секунды/шаг, и с щелью расходимости 0,6 мм, с неподвижной антирассеивающей щелью 5,28 мм и щелью детекторов 9,5 мм. Сухой порошок упаковывали на кварцевый держатель образца и создавали гладкую поверхность с помощью предметного стекла. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности дифракционных пиков могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами как морфология и структура кристалла. При наличии эффектов предпочтительной ориентации интенсивности пиков варьируются, но положения характеристических пиков полиморфной формы остаются неизменными. См., например, The U.S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35 Chapter Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD) Official May 1, 2015. Кроме того, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой заданной кристаллической формы угловые положения пиков могут незначительно варьироваться. Например, положения пиков могут смещаться вследствие колебаний температуры или влажности, при которых анализируют образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае вариативность положения пика $\pm 0,2$ в 2θ будет учитывать указанные возможные отклонения, не препятствуя однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть сделано на основании любой уникальной комбинации характеристических пиков (в единицах 2θ), как правило, более выраженных пиков. Дифрактограммы кристаллической формы, записанные при температуре и относительной влажности окружающей среды, корректировали по стандартным пикам в NIST 675 при 8,85 и 26,77 градусах 2-тета.

РПД-образец (2R)-1,1,1-трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{[1-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино}-1Н-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил} амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрата (1: 1: 1) характеризовали диаграммой РПД, используя излучения $\text{CuK}\alpha$, как имеющий пики дифракции (значения 2-тета), описанные в табл. 2 ниже, и, в частности, имеющий пики

при 17,9 в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 26,1, 26,6 и 22,7; с допуском для углов дифракции 0,2°.

Таблица 2. Рентгеновские порошковые дифракционные пики кристаллического (2R)-1,1,1-трифтор-3-($\{$ цис-4-[(1-метил-4- $\{$ [1-(пиридин-2-ил)-1Н-пиразол-3-ил]амино $\}$ -1Н-бензимидазол-6-ил]окси $\}$ циклогексил $\}$ амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрата (1:1:1)

Пик	Уол (°2-тета) $\pm$ 0.2°	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	4.7	8%
2	9.5	40%
3	10.0	30%
4	11.2	29%
5	17.2	45%
6	17.9	100%
7	18.7	36%
8	22.7	52%
9	26.1	100%
10	26.6	63%

Биологический раздел

Анализ ферментов JAK1, JAK2 и JAK3 in vitro

Для определения способности исследуемых соединений ингибировать активность киназ JAK1, JAK2 и JAK3 использовали анализ JAK LanthaScreen™ Kinase Assay (Invitrogen). В указанных форматах анализа TR-FRET используют антитело, меченное изотопом тербия с большим периодом полураспада, в качестве донорных частиц и GFP-STAT1 в качестве акцепторных частиц. Для контролирования активности киназы JAK использовали отношение TR-FRET, где увеличение фосфорилирования GFP-STAT1 приводит к повышению отношения TR-FRET. Реакцию киназы проводили, используя 12,5 мкл реакционные объемы на мелком черном 384-луночном планшете Proxiplate. Для получения конечных реакционных условий добавляли реагенты: 50 мкл HEPES с pH, 1,76 мМ Triton X-100, АТФ (20,0 мкМ для ферментных анализов JAK1 и JAK3 или 5 мкМ для ферментных анализов JAK2), 10,0 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТК и 0,01% Brij-35, 0,05 мМ GFP-STAT1, 14 нМ фермента JAK1 для ферментных анализов JAK1, 1,0 нМ для ферментных анализов JAK2 или 2,5 нМ для ферментных анализов JAK3 и 4% ДМСО, и использовали серийные разбавления исследуемых соединений (разбавленные 1:3 от 20.000 до 1 нМ). После добавления АТФ/GFP-STAT1 центрифугировали аналитические планшеты в течение 1 мин при скорости 1000 об/мин). Оставляли планшеты инкубироваться при комнатной температуре в течение 60 мин, а затем добавляли 12,5 мкл останавливающего буфера, содержащего 20 мМ ЭДТК, 2 нМ меченного тербием антитела против фосфорилированных сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (фосфорилированная аминокислота тирозин 701), (Тб-анти-pSTAT1) [pTyr701], 0,67 мМ трис(гидроксиметил)аминоэтана гидрохлорида (Trizma®) с pH 7,5, 0,02% NaN₃ и 0,01% нонилфенилполиэтиленгликоля (Nonidet® P40). Инкубировали при комнатной температуре в течение 90 мин и считывали на планшетриде EnVision с фильтром длины волны возбуждения 340 нм и фильтрами длины волны излучения 520 и 495 нм. Определяли отношение по длине волны излучения для GFP-STAT1, которую измеряли при 520 нм, относительно излучения при 495 нм для (Тб-анти-pSTAT1) [pTyr701]. Для каждого соединения определяли значение IC₅₀, используя данные процентного ингибирования, которые рассчитывали по данным реакции относительно контрольных образцов на планшете (активный фермент относительно фермента, ингибированного тофациитинибом в концентрации 2,0 мМ). Для аппроксимации данных процентного ингибирования при десяти концентрациях соединения к четырехпараметрическому логистическому уравнению использовали ACTIVITYBASE 4.0.

Следуя протоколу, по существу, как описано выше, испытывали соединения примеров, приведенных в данном документе. Соединения примеров демонстрировали IC₅₀ для JAK1 менее 8 нМ и являются селективными ингибиторами JAK1 над JAK2 или JAK3 in vitro.

Соединения примеров 1 и 6-10 демонстрировали активность, указанную в табл. 3.

Таблица 3

Пример №.	JAK1 IC ₅₀ (нМ)	JAK2 IC ₅₀ (нМ)	JAK3 IC ₅₀ (нМ)
1	3.25±0.99 (n=3)	1200±550 (n=3)	3720±1300 (n=3)
6	5.25±1.11 (n=5)	768±220 (n=5)	2540±510 (n=5)
7	5.43±0.93 (n=3)	901±99 (n=3)	6160±2020 (n=3)
8	1.91±0.75 (n=4)	239±150 (n=4)	1170±470 (n=4)
9	5.35±0.23 (n=5)	767±39 (n=5)	2140±720 (n=5)
10	1.49±0.49 (n=3)	220±120 (n=3)	660±180 (n=3)

Данные показывают, что соединения примеров представляют собой ингибиторы фермента JAK1 и селективны к JAK1 над JAK2 и JAK3 *in vitro*.

Клеточный анализ p-STAT3(p-Tyr705)-IL6-TF-1-JAK1

по протоколу AlphaScreen SureFire Protocol

Клеточный анализ JAK1, описанный ниже, использовали для определения эффективности исследуемых соединений в отношении JAK1 в клетках.

Подготовка клеток: TF-1 клетки в DMEM среде с 0,5% 26400 (FBS) и 1X пенициллина/стрептомицина при 37°C. Помещали 100К клеток на лунку в 96 -луночные BD черные планшеты с чистым дном. Выдерживали планшеты при комнатной температуре в течение 30-60 мин, затем инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Подсчитывали клетки с помощью счетчика Vi-Cell, используя клеточную суспензию с концентрацией 100 клеток/мл, и помещали 100 мкл на лунку в планшеты Beckman Dickinson Biocoat (Catalog # 354640).

Приготовление и обработка тестируемых соединений: получали серийные разбавления соединений 1:3 в ДМСО и дополнительно разбавляли в указанной среде. Исследовали соединения в диапазоне 10 точек концентрации от 20000 до 1 нМ. Добавляли разбавленное соединение в соответствующие клеточные планшеты. Инкубировали планшеты при 37°C в течение 20 мин. В соответствующие клеточные планшеты добавляли раствор IL6 в конечной концентрации 30 нг/мл и продолжали инкубировать при 37°C в течение 30 мин. Удаляли среду и добавляли 50 мкл 1х лизисного буфера в каждую лунку.

Обнаружение pSTAT3. Последовательно выполняли следующие шаги: получали акцепторную смесь (активирующий буфер/реакционный буфер/акцепторные гранулы); переносили 4 мкл лизата из 96-луночных планшето в 384-луночные планшеты Proxiplate; добавляли 5 мкл акцепторной смеси в 384-луночный планшет(ы) и закрывали планшеты алюминиевой крышкой; встряхивали 1-2 мин на встряхивателе для планшетов; инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 2 ч при осторожном встряхивании; получали донорную смесь (донорные гранулы в буфере для разбавления); добавляли 2 мкл донорной смеси в аналитические планшеты; закрывали планшеты алюминиевой крышкой; встряхивали 1-2 мин на встряхивателе для планшетов; инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при осторожном встряхивании; считывали планшеты с помощью Envision; протокол AlphaScreen Surefire 384.

По существу, как описано выше, соединения примеров 1, 2 и 6 были испытаны и проявляли следующую активность, как показано в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Пример №.	IC ₅₀ (нМ)
1	0.154±0.023 (n=2)
2	0.275±0.102 (n=3)
6	0.168±0.090 (n=4)

Данные в табл. 4 показывают, что соединения примеров 1, 2 и 6 ингибируют фермент JAK1 в клеточном анализе, что подтверждает, что соединения примеров также ингибируют фермент JAK1 в клетке.

Анализы цельной крови человека: определение pSTAT3 (JAK1) и pSTAT5 (JAK2) в лимфоцитах и моноцитах.

Анализы цельной крови человека (HWP) разрабатывали и валидировали для определения селективности исследуемых соединений в отношении JAK1 и JAK2. Разбавляли исследуемые соединения (1:3) в 100% ДМСО с получением 10 точек, а затем в PBS+0,1% BSA. Тофацитиниб использовали в качестве эталонного соединения в каждом планшете, а также максимальный сигнал (стимулированные лунки) и минимальный сигнал (отсутствие стимулированных лунок) для нормирования данных. Получали пул HWP от 4 различных здоровых доноров. Получали пул HWP от 4 различных здоровых доноров. Помещали кровь в 96-луночный планшет с помощью Tecan Evo 96w и инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 1 ч при комнатной температуре. По истечении указанного времени инкубации стимулировали HWP, используя IL6 (206-IL, R&D System) и GM-CSF (PHC2015, Life Technologies), в течение следующих 15 мин. Добавляли краситель для определения жизнеспособности (65-0865, eBioscience)

(1:1000) с помощью Tescan Evo 96w (5xmix).

Окончательные концентрации в анализе были следующими: 100 мкМ соединений, 50 мкМ тофаци-тиниба, 0,1 мкг/мл IL6, 0,038 мкг/мл GM-CSF и 1% ДМСО. Лизировали и фиксировали HWB с помощью лизисного/фиксирующего буфера (558049, Becton Dickinson), добавляя 900 мкл лизисного буфера с помощью Tescan Evo 96w (смешивали 10х при высокой скорости). Инкубировали HWB на бане при 37°C в течение 10 мин. Инкубировали HWB на бане при 37°C в течение 10 мин. Центрифугировали HWB при 500G в течение 8 мин и отбрасывали надосадочный раствор. Добавляли холодный метанол с помощью Tescan Evo 96w для повышения проницаемости клеток. Инкубировали клетки крови на льду в течение 30 мин. После этого промывают клетки 2х с использованием буфера для окрашивания (554656, Becton Dickinson), отжимают при 3000 об/мин, 2 мин, отбрасывают супернатант и добавляют следующие анти-тела: Anti-Human CD4 PE, 1:100 (12-0048, eBioscience), Anti-Human CD33 eFluor® 450, 1:50 (48-0337, eBioscience), Phospho-STAT5 (Tyr694) (C71E5) Rabbit mAb, 1:100 (Alexa Fluor® 488 Conjugate)(3939, Cell Signaling) and Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP™ Rabbit mAb 1:200, (Alexa Fluor® 647 Conjugate)(4324, Cell Signaling) Инкубировали антитела в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре, затем промывали клетки 2х и читали на цитометре Macsquant (Miltenyi Biotec). Отбирали данные по CD4⁺ (лимфоциты) и CD4Low CD33Hi (моноциты), чтобы измерить интенсивность флуоресценции из клеток, экспрессирующих pSTAT3 и pSTAT5 соответственно. Анализировали данные с помощью FlowJo v 10, а затем нормализуют медиану флуоресценции против максимального и минимального сигналов для определения IC_{50S}. Для построения кривых зависимости ответа от дозы использовали программу Graph Pad Prism 5™.

Следуя протоколу, по существу, как описано выше, испытывали соединения примеров в данном документе. Соединения примеров проявляют большую селективность для JAK1 над JAK 2. Активность для соединений примеров 6-10 приведена в табл. 5.

Таблица 5

Пример №.	JAK1 IC ₅₀ (μM)	JAK2 IC ₅₀ (μM)
6	3.65±0.79 (n=7)	20.3±6.3(n=6)
7	4.17±1.87 (n=6)	18.6±6.1(n=5)
8	3.13±1.1 (n=6)	9.63±2.52(n=6)
9	4.53±2.09 (n=7)	16.9±4.5(n=6)
10	1.29±0.64 (n=3)	6.86±2.13(n=3)

Данные, приведенные в табл. 5, показывают, что соединения примеров более эффективны для JAK1 над JAK2 в анализе цельной крови человека.

РК/PD анализ крыс. Самцов крыс Wistar, 265-285 г (Charles River) использовали для перорального введения через желудочный зонд. Дозировка для животных составляла (оральный желудочный зонд) 1,82 мл/кг (0,5 мл на 275 г). Состав готовили в 1% растворе носителя ГЭЦ, содержащем 0,25% Tween 80 и 0,05% антивспенивателя с 1,1 мол. экв. метансульфоновой кислоты для in situ образования соли. Состав готовили один раз в неделю и хранили при 4°C. В разные моменты времени получали цельную кровь крысы через теновое кровотоечение хвоста в Multivette 600 мкл EDTA трубки для сбора крови (cat# 151671100PK100, Sarstedt Inc) и использовали для анализа ex vivo JAK1 и JAK2. Вносили аликвоты 100 мкл крови от каждой крысы в 96-луночную круглодонную тарелку. Стимулировали цельную кровь рекомбинантным IL-6 (100 нг/мл и рекомбинантной мышшиной GM-CSF (cat# 415-ML, lot# R & D) в течение 12 мин при комнатной температуре. После стимуляции цитокинов добавили цельную кровь в Lyse/fix (cat # 558049, lot #, BD) в стойку minitube; хорошо перемешивали 5х. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Крутили миниатюрную стойку при 600 г в течение 4 мин. Удаляли с 12-канальным коллектором. Переносили содержимое миниатюрной стойки на 96-луночные круглодонковые пластины. Осаждали путем центрифугирования со скоростью 3000 об/мин в течение 1 мин клетки и отбросили супернатант. Смешивали клетки в лунке с 100 мкл охлажденного льдом MeOH и инкубировали на льду в течение 30 мин. Добавили 150 мкл PBS+2% FCS в каждую лунку и осадили путем центрифугирования со скоростью 3000 об/мин, в течение 2 мин. Промывали клетки с 2х 250 мкл PBS + 2% FCS. Для клеточной поверхности и внутриклеточного окрашивания смешивали все антитела и добавляли в каждую лунку и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в темноте. Антитела, используемые для окрашивания, следующие: pSTAT3, Alexa Fluor 647 (cat# 4324s, lot, Cell Signaling); pSTAT5, Alexa Fluor 488 (cat# 3939s, lot#, Cell Signaling), anti-rat CD4, V450 (cat# 561579, lot#, BD); anti-rat CD11b, Percp eFluor710 (cat# 12-0110-82, lot#, eBioscience) После окрашивания клеток с Abs промывали планшеты дважды с PBS + 2% FCS и, наконец, повторно суспендировать в том же 150 мкл растворе. Оценивали жизнеспособность клеток по Viability Dye 780 (cat# 65-0865-14, lot #, eBioscience). Выполнили анализ цитометрии с помощью FORTRESSA.

В соответствии с протоколом, по существу, как описано выше, соединения примеров 4 и 6-10 были

протестированы, а данные приведены в табл. 6.

Таблица 6. Активность *ex vivo* JAK1 и JAK2 в цельной крови крысы (% ингибирования при 30 μ г по сравнению с обработкой транспортного средства как 100% ингибирование)

Пример №.	JAK1 ингибирование 2 часа после введения дозы (%)	JAK2 ингибирование 2 часа после введения дозы (%)	JAK1 ингибирование 7 часов после введения дозы (%)	JAK2 ингибирование 7 часов после введения дозы (%)
4	72.0	22.9	22.3	20.1
6	83.5	17.7	75.4	17.4
7	70.7	10.7	61.0	3.40

Эти данные подтверждают активность соединений примеров и то, что они более эффективны для JAK1 над JAK2 у крыс *in vivo*.

Модель коллаген-индуцированного артрита (КИА) у крыс

В данном протоколе используются крысы Льюиса (масса 150-175 г) от Charles River. В день 0 анестезируют крыс изофлураном. На 1-й день иммунизируют нутрикожно коллагеновой эмульсией в двух участках нижней поясничной области над основанием хвоста. Объем дозы составляет минимум 0,4 мл на место инъекции. На 8-й день обезболивают крыс изофлураном и иммунизируют внутривенно коллагеновой эмульсией в двух местах на нижней поясничной области над основанием хвоста. Регистрируют крыс в группах лечения на 12-й день, основываясь на воспалении (покраснение и/или отек) на задних лапах. Рандомизируют животных для фазы лечения, основываясь на значениях измерения голеностопного сустава и массы тела, используя инструмент распределения рандомизации. Фиксируют отечность лодыжки на дни 1, 8 и 11, и затем три раза в неделю после регистрации до и включая день вскрытия. Соединения вводились перорально один раз в день, начиная с 12-го дня (после рандомизации) и по 25 день. Соединения примеров 6 и 7 были оценены в протоколе по существу, как описано выше. Результаты приведены в табл. 7 ниже.

Таблица 7. Ингибирование отечности лапы крысы (% ингибирования по сравнению с наивной крысой как 100% ингибирование)

Пример №.	% ингибирования при 30 мг/кг	% ингибирования при 10 мг/кг	% ингибирования при 3 мг/кг
6	79	47	12
7	73	69	0

Данные в табл. 7 показывают, что соединения примеров 6 и 7 демонстрируют чувствительное к дозе ингибирование отечности лапы у крыс и подтверждают, что соединения примеров могут быть эффективными при лечении артрита.

Модель адьювант-индуцированного артрита (АИА) у крыс

Влияние соединений на воспаление полиартрита и эрозию кости голеностопного сустава можно оценить в модели адьювант-индуцированного артрита (АИА) крыс. Для исследования используют самцов крыс Льюиса со средней массой тела 185 г. Вызывают артрит путем внутривенной инъекции 100 μ л адьювант-суспензированной масляной эмульсии иммунизации в основание хвоста. Рандомизируют животных, основываясь на средней толщине лапы и массе тела на 10-й день в исследовательских группах с 8 крысами в каждой группе. Подготавливают соединения в 1% НЕС/0,25% Р80/0,05% АФ в очищенной воде и вводят дозу ежедневно через пероральный зонд, начиная с 11 дня после иммунизации в течение 14 дней. Определяют толщину лапы измерением кронциркулем на обеих лодыжках. Оценивают групповые различия, используя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, а затем апостериорный критерий Даннетта для многократных сравнений с контрольной средой. Соединение примера 10 оценивают в протоколе по существу, как описано выше. Результаты приведены в табл. 8 ниже.

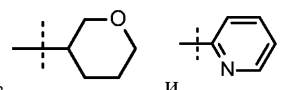
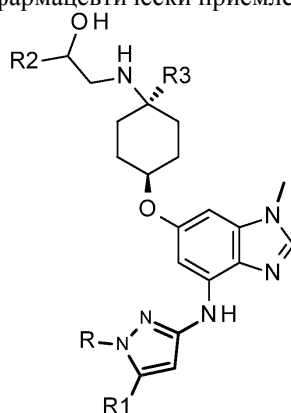
Таблица 8. Ингибирование отежности лапы и потери минеральной плотности костной ткани (МПКТ) (% ингибирования по сравнению с наивной крысой как 100% ингибирование) в модели АИА крысы

Пример №.10 доза	% ингибирования отежности лапы	% ингибирования потери МПКТ в лапе
3 мг/кг	26	39
10 мг/кг	63	81
30 мг/кг	73	84

Данные в табл. 8 показывают, что соединение примера 10 демонстрирует чувствительное к дозе ингибирование отежности лапы у крыс и служит подтверждением того, что соединение примера может быть эффективным при лечении артрита.

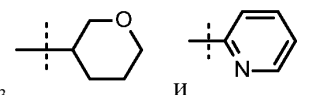
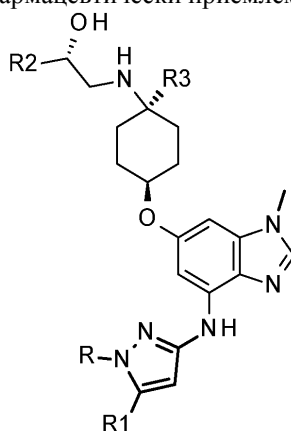
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы или его фармацевтически приемлемая соль



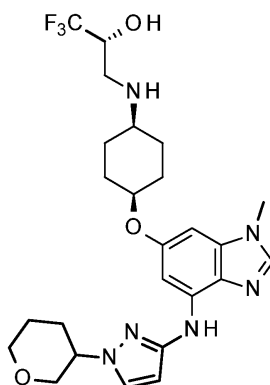
где R выбран из H, -C₁₋₃алкила, -CH₂CH(OH)CH₃, -C₂₋₃алкил-O-CH₃,
R1 выбран из H, -CH₃ и -OCH₃;
R2 представляет собой -CHF₂ или -CF₃;
R3 представляет собой H или -CH₃;
при условии, если R2 представляет собой -CF₃ и R3 представляет собой H, либо R, либо R1 могут быть -CH₃, но не оба.

2. Соединение формулы или его фармацевтически приемлемая соль



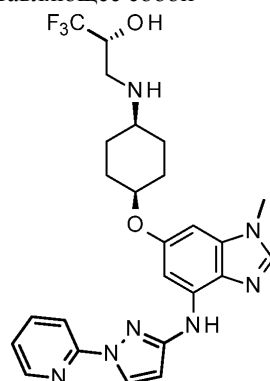
где

R выбран из H, -C₁₋₃алкила, -CH₂CH(OH)CH₃, -C₂₋₃алкил-O-CH₃,
R1 выбран из H, -CH₃ и -OCH₃;
R2 представляет собой -CHF₂ или -CF₃ и



или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Соединение по п.1 или 2, представляющее собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

13. Соединение, которое представляет собой гидрат (2R)-1,1,1-трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{{1-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил}амино}-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилата.

14. Соединение, которое представляет собой (2R)-1,1,1-трифтор-3-{{цис-4-[(1-метил-4-{{1-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил}амино}-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)пропан-2-ол в кристаллической форме, характеризующееся рентгеновской порошковой дифрактограммой, полученной с использованием источника $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$), которая содержит пики при 15.5, 18.1, 18.3, 20.5 и 22.9 $\pm 0.2^\circ$ при 2 тета.

15. Соединение по п.14, где дифрактограмма содержит пики при 13.2, 15.5, 18.1, 18.3, 18.5, 20.5, 22.9 и 23.6, 23.7 $\pm 0.2^\circ$ при 2 тета.

16. Соединение по п.14, где дифрактограмма содержит пики при 13.2, 15.5, 18.1, 18.3, 18.5, 19.0, 20.5, 22.9, 23.6, 23.7, 24.7 и 26.5 $\pm 0.2^\circ$ при 2 тета.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая более чем 80% мас./мас. соединения, которое представляет собой (2R)-1,1,1-трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{{1-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил}амино}-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрат в кристаллической форме.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая более чем 90% мас./мас. соединения, которое представляет собой (2R)-1,1,1-трифтор-3-({цис-4-[(1-метил-4-{{1-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-3-ил}амино}-1H-бензимидазол-6-ил)окси]циклогексил}амино)пропан-2-ол-2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат гидрат в кристаллической форме.

20. Способ лечения артрита у пациента, причем способ включает введение пациенту эффективного количества соединения по любому из пп.1-16 или его фармацевтически приемлемой соли

21. Применение соединения по любому из пп.1-16 для лечения артрита.

22. Применение соединения по любому из пп.1-16 для производства лекарственного средства для лечения артрита.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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