

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 038368

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.17

(21) Номер заявки
201991515

(22) Дата подачи заявки
2018.01.19

(51) Int. Cl. C07D 417/14 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

(54) N-[4-ФТОР-5-[[[(2S,4S)-2-МЕТИЛ-4-[(5-МЕТИЛ-1,2,4-ОКСАДИАЗОЛ-3-ИЛ)МЕТОКСИ]-1-ПИПЕРИДИЛ]МЕТИЛ]ТИАЗОЛ-2-ИЛ]АЦЕТАМИД В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА OGA

(31) 62/451,137

(32) 2017.01.27

(33) US

(43) 2020.01.31

(86) PCT/US2018/014331

(87) WO 2018/140299 2018.08.02

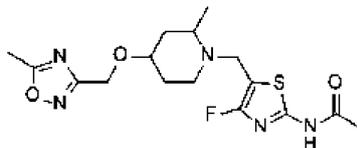
(56) WO-A1-2014159234

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

(72) Изобретатель:
Дрейфус Николас Жак Франсуа,
Линдсэй-Скотт Питер Джеймс (US)

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

(57) В изобретении предложено соединение формулы I



ФОРМУЛА I

или его фармацевтически приемлемая соль и применение соединений формулы I для лечения нейродегенеративных заболеваний и расстройств, а именно болезни Альцгеймера.

B1

038368

038368

B1

Изобретение относится к новым соединениям 5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ила, к фармацевтическим композициям, содержащим соединения, к способам применения соединений для лечения физиологических расстройств и к промежуточным соединениям и способам, подходящим для синтеза соединений.

Изобретение относится к области лечения болезни Альцгеймера, прогрессирующего надъядерного паралича (ПНП) и других заболеваний и расстройств, связанных с тау-опосредованной нейродегенерацией, известных под общим названием тауопатии.

Болезнь Альцгеймера представляет собой разрушительное нейродегенеративное расстройство, которое поражает миллионы пациентов во всем мире. Принимая во внимание одобренные в настоящее время на рынке препараты, которые дают пациенту только временные, симптоматические преимущества, существует значительная неудовлетворенная необходимость в лечении болезни Альцгеймера.

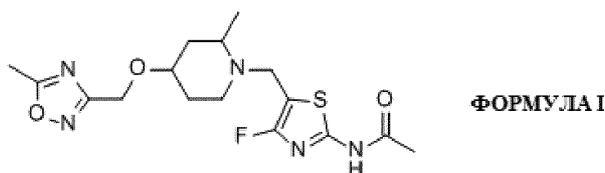
Олигомеризация белка тау, ассоциированного с микротрубочками, в нитевидные структуры, а именно спаренные спиральные нити (ССН) и прямые или скрученные нити, которая приводит к образованию нейрофибриллярных клубков (НФК) и нейропиллярных нитей (НН), является одной из определяющих патологических особенностей болезни Альцгеймера и других видов тауопатии. Было обнаружено, что количество НФК в мозге людей, страдающих болезнью Альцгеймера, тесно коррелирует с тяжестью заболевания, предполагая, что тау играет ключевую роль в нейрональной дисфункции и нейродегенерации (Nelson et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 71 (5), 362-381 (2012)). Было показано, что патология тау коррелирует с длительностью заболевания при ПНП; у пациентов с более агрессивным течением заболевания роль тау большая, чем у пациентов с более медленным прогрессированием (Williams et al., *Brain*, 130, 1566-76 (2007)).

Недавние исследования (Yuzwa et al., *Nat. Chem. Biol.*, 4 (8), 483-490 (2008)) подтверждают терапевтический потенциал ингибиторов O-GlcNAcase (OGA) для ограничения гиперфосфорилирования тау и агрегации в патологический тау для лечения болезни Альцгеймера и связанных с этим нейродегенеративных расстройств, опосредованных тау. В частности, ингибитор OGA Thiamet-G был связан с замедлением потери моторных нейронов в мышинной модели JNPL3 тау (Yuzwa et al., *Nat. Chem. Biol.*, 8, 393-399 (2012)) и с уменьшением патологии тау и дистрофии нейритов в мышинной модели Tg4510 тау (Graham et al., *Neuropharmacology*, 79, 307-313 (2014)). Соответственно, ингибиторы OGA признаны действенным терапевтическим подходом для уменьшения накопления гиперфосфорилированных патологических форм тау, а именно НФК и НН.

Патент США № 9120781 раскрывает производные гексагидробензооксазола и гексагидробензотиазола, которые обладают ингибирующей активностью по отношению к OGA и, дополнительно, раскрыты как подходящие для лечения заболеваний и расстройств, связанных с дефицитом или сверхэкспрессией OGA, и/или накоплением или дефицитом 2-ацетиамидо-2-деокси-5β-D-глюкопиранозида (O-GlcNAc). Дополнительно, патент США 2016/0031871 раскрывает определенные ингибиторы гликозидазы для лечения болезни Альцгеймера.

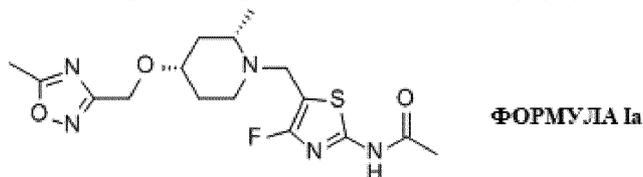
Ингибиторы OGA, которые являются проникающими в мозг, желательны для обеспечения лечения тау-опосредованных расстройств нейродегенерации, а именно болезни Альцгеймера и ПНП. В данном изобретении предложены определенные новые соединения, которые являются ингибиторами OGA.

Соответственно, в данном изобретении предложено соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемая соль.

Дополнительно, в данном изобретении предложено соединение формулы Ia



или его фармацевтически приемлемая соль.

В данном изобретении также предложен способ лечения болезни Альцгеймера у пациента, нуждающегося в таком лечении, который включает введение пациенту эффективного количества соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли.

В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения прогрессирования умеренного когнитивного нарушения в болезнь Альцгеймера у пациента, нуждающегося в таком лечении, который включает введение пациенту эффективного количества соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли.

В данном изобретении также предложен способ лечения прогрессирующего надъядерного паралича у пациента, нуждающегося в таком лечении, который включает введение пациенту эффективного количества соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли. В данном изобретении также предложен способ лечения тау-опосредованного нейродегенеративного расстройства у пациента, который включает введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительно, в данном изобретении предложено соединение формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в терапии, в частности для применения при лечении болезни Альцгеймера или для предотвращения прогрессирования умеренного когнитивного нарушения в болезнь Альцгеймера. Дополнительно, в данном изобретении предложено соединение формулы I или Ia, или его фармацевтически приемлемая соль, для применения при лечении прогрессирующего надъядерного паралича. В данном изобретении также предложено соединение формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемая соль, для применения при лечении тау-опосредованных нейродегенеративных расстройств.

Дополнительно, в данном изобретении предложено применение соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли, для изготовления лекарственного средства для лечения болезни Альцгеймера или для предотвращения прогрессирования умеренного когнитивного нарушения в болезнь Альцгеймера. Дополнительно, в данном изобретении предложено применение соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли, для изготовления лекарственного средства для лечения прогрессирующего надъядерного паралича. В данном изобретении также предложено применение соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли, для изготовления лекарственного средства для лечения тау-опосредованного нейродегенеративного расстройства.

В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемую соль, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. В данном изобретении дополнительно предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий введение соединения формул I или Ia, или его фармацевтически приемлемой соли, в один или более из фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ. Данное изобретение также охватывает новейшие промежуточные соединения и способы синтеза соединений формул I или Ia.

Умеренное когнитивное расстройство было определено как потенциальная продромальная фаза деменции, связанной с болезнью Альцгеймера, на основании клинических проявлений и прогрессирования у пациентов, проявляющих в течение времени от умеренного когнитивного расстройства до деменции Альцгеймера. Термин "предотвращение прогрессирования умеренного когнитивного расстройства в болезнь Альцгеймера" включает сдерживание, замедление, остановку или обратное развитие прогрессирования умеренного когнитивного расстройства в болезнь Альцгеймера у пациента.

Применяемый в данном документе термин "лечение" или "лечить" включает сдерживание, замедление, остановку или обратное развитие прогрессирования или тяжести существующего симптома или расстройства.

Применяемый в данном документе термин "пациент" относится к человеку.

Применяемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству или дозе соединения по изобретению, или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению.

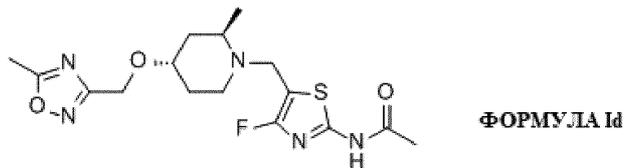
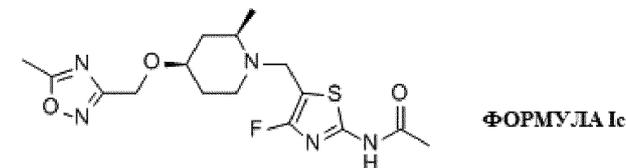
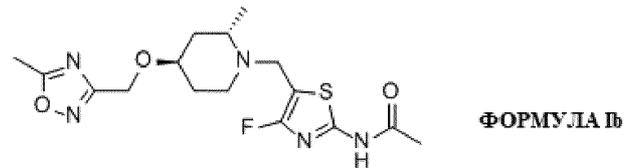
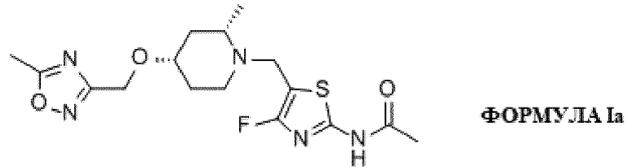
Эффективное количество может без труда установить специалист в данной области техники, используя известные технологии и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента рассматривается множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: особь пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или расстройство; степень, вовлеченность или тяжесть заболевания или расстройства; реакция отдельного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранная схема введения; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие имеющие отношение обстоятельства.

Соединения по данному изобретению, как правило, эффективны в широком интервале доз. Например, суточные дозы, как правило, находятся в диапазоне от около 0,1 до около 15 мг/кг массы тела. В некоторых случаях более целесообразными являются дозы ниже нижнего предела вышеуказанного диапазона, а в других случаях можно использовать еще более высокие дозы при приемлемых побочных эффектах и, следовательно, вышеуказанный диапазон доз никоим образом не предназначен для ограничения объема данного изобретения.

Соединения по данному изобретению составляют предпочтительно в фармацевтические композиции, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения, включая оральный и трансдермальный способы. Наиболее предпочтительно, данные композиции предназначены для орального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их приготовления хорошо известны в данной области (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012).

Соединения формул I и Ia, или их фармацевтически приемлемые соли, особенно полезны в способах лечения по изобретению, но некоторые конфигурации являются предпочтительными. Следующие параграфы описывают такие предпочтительные конфигурации. Понятно, что эти предпочтения применимы как к способам лечения, так и к соединениям по изобретению.

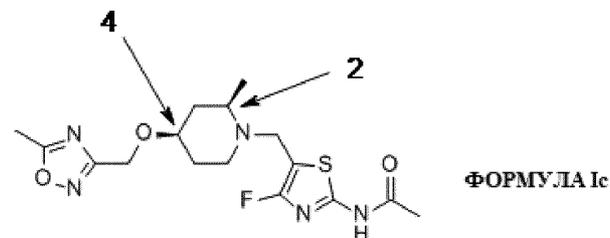
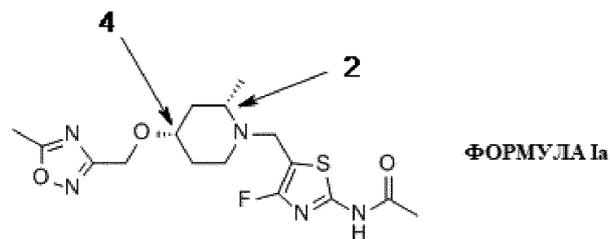
Соединения по данному изобретению включают



и их фармацевтически приемлемые соли.

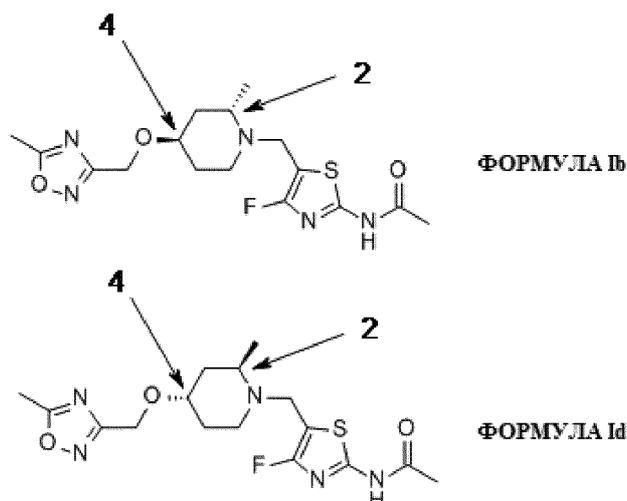
Соединение формулы I, где метальные и кислородные заместители в пиперидиновом кольце находятся в *цис*- или *транс*-конфигурации, или его фармацевтически приемлемая соль, включены в объем изобретения, причем *цис*-конфигурация является предпочтительной. Например, специалист в данной области поймет, что метил в положении 2 находится в *цис*-конфигурации относительно кислорода в положении 4, как изображено на схеме А ниже.

Схема А



Дополнительно, специалист в данной области поймет, что метил в положении 2 находится в *транс*-конфигурации относительно кислорода в положении 4, как изображено на схеме В ниже.

Схема В



Более предпочтительными являются соединения, в которых хиральный центр в положении 2 пиперидинового кольца находится в S-конфигурации. Хотя данное изобретение охватывает все отдельные энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров указанных соединений, включая рацемические смеси, соединения с абсолютной конфигурацией, определенные ниже, являются особенно предпочтительными: N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида и его фармацевтически приемлемые соли; и N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида являются особенно предпочтительными.

Кристаллическая форма N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида является особенно предпочтительной. Кристаллическая форма N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида, которая характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифрактометрии при угле дифракции 2θ 12,1° в сочетании с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 15,3, 21,6, 22,2, 22,7, 23,5, 24,3 и 26,8°, с допуском на углы дифракции 0,2°, является еще более предпочтительной.

Отдельные изомеры, энантиомеры и диастереомеры могут быть отделены или разделены специалистом в данной области в любой удобный момент синтеза соединений по изобретению такими способами, как методики селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994).

Фармацевтически приемлемая соль соединений по изобретению образуется, например, с помощью реакции между подходящим свободным основанием соединения по изобретению и подходящей фармацевтически приемлемой кислотой, в подходящем растворителе, при стандартных условиях, известных в данной области техники. Образование таких солей хорошо известно и изучено в данной области техники. См., например, Gould P.L. "Salt selection for basic drugs," International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin R.J. et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities", Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); and Berge S.M. et al. "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977).

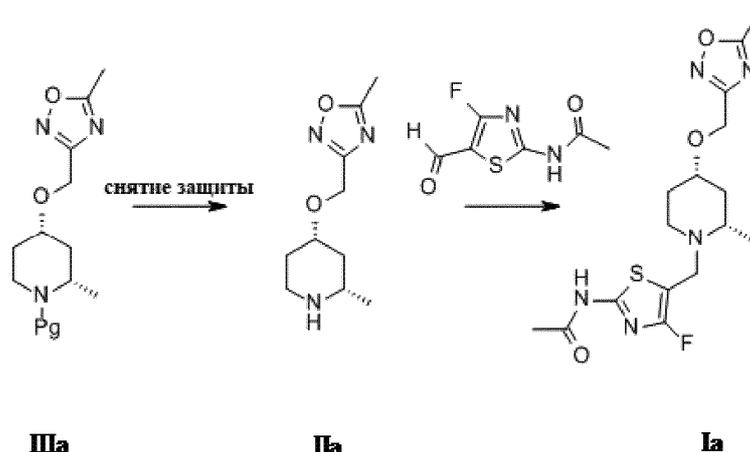
Соединения по данному изобретению или их соли получают с помощью множества методик, известных специалистам в данной области техники, некоторые из которых представлены ниже на схемах, в способах получения и примерах. Специалисту в данной области техники понятно, что конкретные этапы синтеза для каждого из описанных способов можно комбинировать различным образом или использовать совместно с этапами из других схем для получения соединений по изобретению или их солей. Продукты каждого этапа на приведенных ниже схемах выделяют традиционными способами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание в порошок и кристаллизацию. На схемах, приведенных ниже, все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее. Реагенты и исходные вещества общедоступны специалистам в данной области техники. Не ограничивая объем изобретения, следующие схемы, способы получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации изобретения. Дополнительно, специалисту в данной области техники понятно, что соединения формул Ia, Ib, Ic и Id могут быть получены с использованием исходного материала с соответствующей стереохимической конфигурацией, который может быть получен специалистом в данной области. Например, на приведенных ниже схемах используются исходные материалы с конфигурацией, по существу, соответствующей формуле Ia.

В общем, соединение формулы Ia получают из соединения формулы II (схема 1). Конкретнее, со-

единение формулы IIa восстанавливают алкилированием N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамидом в присутствии подходящего восстановителя, а именно триацетоксиборгидрида натрия, в подходящем растворителе, чтобы получить соединение формулы Ia в подходящем растворителе, а именно этилацетате. N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид получают способами, известными в области химии, а также способами, предложенными в следующих способах получения и примерах.

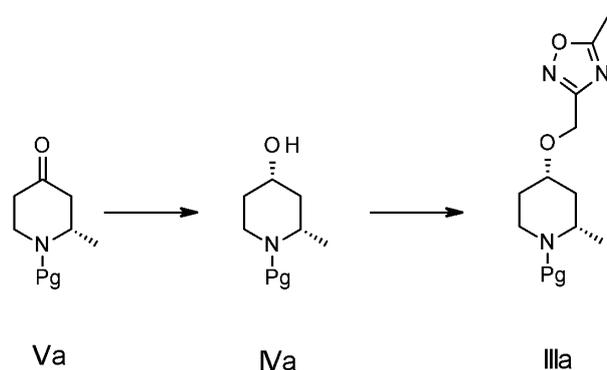
Соединение формулы IIa получают из соединения формулы IIIa, где Pg представляет собой подходящую защитную группу амина. Конкретнее, соединение формулы IIa, где Pg представляет собой трет-бутилкарбоксилат (t-BOC), реагирует с кислотой, а именно соляной кислотой или трифторуксусной кислотой в подходящем растворителе, а именно диоксане или дихлорметане, с получением соединения Формулы IIa. Подходящие защитные группы амина известны в области химии и включают t-BOC и Cbz, а также группы, рассмотренные в T.W. Green, P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Wiley-Interscience, New York, 1999.

Схема 1

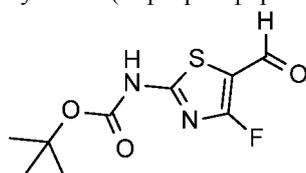


Соединение формулы IIIa, где Pg представляет собой подходящую защитную группу амина, получают из соединения формулы IVa (схема 2). Конкретнее, соединение формулы IVa, где Pg представляет собой трет-бутилкарбоксилат, реагирует с 3-(хлорметил)-5-метил-1,2,4-оксадиазолом в присутствии основания, а именно трет-бутоксидом натрия, с получением соединения формулы IIIa. Реакция традиционно проводится в растворителе, а именно ацетонитриле или диметилформамиде. Соединение формулы IVa, где Pg представляет собой трет-бутилкарбоксилат, получают преимущественно так, как описано в WO 2004/094380 A1. Конкретнее, соединение формулы Va реагирует с восстановителем, а именно три(втор-бутил)боргидридом лития, в растворителе, а именно тетрагидрофуране, с получением соединения формулы IVa, где Pg представляет собой трет-бутилкарбоксилат. Соединение формулы Va, где Pg представляет собой подходящую защитную группу амина, получают способами, известными в области химии, в том числе описанными в WO 2004/094380 A1.

Схема 2



Способ получения 1. Синтез трет-бутил-N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)карбамата

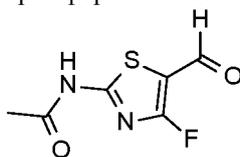


Фторид цезия (227 г, 1480 ммоль) при комнатной температуре добавляют в раствор трет-бутил-N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)карбамата (38,8 г, 148 ммоль; для получения трет-бутил-N-(4-хлор-5-фор-

милтиазол-2-ил)карбамата, см., например, N. Masuda и др., *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 6171-6182 (2004)) в ДМСО (776 мл). Реакционную смесь перемешивают в термостате, установленном на 145°C с внутренней температурой 133°C в течение 48 ч, затем смесь охлаждают на ледяной бане. В смесь добавляют насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (500 мл), рассол (500 мл) и этилацетат (500 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 10 мин, затем фильтруют сквозь диатомовую землю и промывают этилацетатом (500 мл). Фильтрат переносят в делительную воронку, и слои разделяют, затем водный слой экстрагируют этилацетатом (1 л). Смесь органических слоев промывают рассолом (1 л), затем слой рассола экстрагируют этилацетатом (300 мл). Смесь органических слоев сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка. Остаток пропускают сквозь слой силикагеля (330 г), элюируя 5%-ным этилацетатом в дихлорметане (1,5 л), и фильтрат концентрируют для получения остатка (24,2 г).

Остаток (32,7 г смесь полученных остатков, 133 ммоль) растворяют в изопропанол (303 мл), фильтруют и затем очищают с помощью СФХ (сверхкритическая флюидная хроматография), используя колонну IC (производное полисахарида целлюлозы: трис(3,5-дихлорфенилкарбамат, 30×250 мм, 5 мк) с 10% ИПС (без добавки) при скорости 180 мл/мин с 3-мл впрыскиваниями. Фракции, содержащие продукт, концентрируют для получения указанного в заголовке соединения (16,1 г, MS (m/z): 247,0 (M+H)).

Способ получения 2. Синтез N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (способ А)



Бромид цинка (91,9 г, 408 ммоль) одной порцией при комнатной температуре добавляют в смесь трет-бутил-N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)карбамата (33,5 г, 136 ммоль) и дихлорметана (503 мл), которая находится в сосуде с рубашкой. Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при внутренней температуре 37°C, затем температуру рубашки устанавливают на -10°C и по каплям добавляют тетрагидрофуран (111 мл) в течение более 15 мин, поддерживая внутреннюю температуру ниже 6°C. Затем температуру рубашки устанавливают на -30°C и по каплям добавляют пиридин (110 мл, 1360 ммоль) в течение более 5 мин, поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C. Температуру рубашки устанавливают на 0°C и в течение более 5 мин по каплям добавляют уксусный ангидрид (116 мл, 1220 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в течение ночи при внутренней температуре 37°C, затем охлаждают до комнатной температуры и пропускают сквозь тонкий слой диатомовой земли, элюируя тетрагидрофураном (500 мл). Фильтрат переносят в колбу и смесь концентрируют для получения остатка, который концентрируют из толуола (50 мл). В остаток добавляют раствор моногидрата лимонной кислоты (57,2 г, 272 ммоль) в воде (400 мл) и 2-метилтетрагидрофуран (400 мл) и смесь перемешивают при 40°C в течение 5 мин, затем пропускают сквозь тонкий слой диатомовой земли, элюируя 2-метилтетрагидрофураном (100 мл). Фильтрат переносят в делительную воронку и слои разделяются. Водный слой экстрагируют 2-метилтетрагидрофураном (2×250 мл), а смесь органических слоев разбавляют водой (500 мл). В смесь по порциям в течение более 5 мин при перемешивании добавляют твердый бикарбонат натрия, пока не прекратится выделение газа. Смесь переносят в делительную воронку и слои разделяют, затем водный слой экстрагируют 2-метилтетрагидрофураном (200 мл и 100 мл). Смесь органических слоев сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка, который разбавляют 2-метилтетрагидрофураном (100 мл), и смесь пропускают сквозь тонкий слой силикагеля (250 г), элюируя 2-метилтетрагидрофураном (2,5 л). Фильтрат концентрируют для получения остатка, который диспергируют в смеси 1:1 дихлорметана и гептана (202 мл). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин и затем фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40°C в течение 2 ч для получения указанного в заголовке соединения (18,0 г, 70%). MS (m/z): 189,0 (M+H).

Альтернативный способ синтеза N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (способ В).

Дихлорметан (1325 г, 15,6 моль) добавляют в 2-амино-4-хлортиазол-5-карбальдегид (100 г, 0,61 моль) и пиридин (194,6 г, 2,46 моль) и охлаждают до 0-5°C. По каплям добавляют уксусный ангидрид (188,4 г, 1,85 моль), поддерживая температуру 0-5°C. После завершения добавления температуру доводят до 20-25°C и совершают перемешивание в течение 41 ч. Концентрируют при пониженном давлении с последующим добавлением 35%-ной водной HCl (200 мл) и воды (1,5 л), поддерживая температуру ниже 40°C. Охлаждают до 20-25°C и перемешивают в течение 18 ч. Смесь фильтруют и собранное твердое вещество промывают водой. Твердые вещества сушат при 60-65°C в течение 24 ч для получения N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (75 г, 0,4 моль).

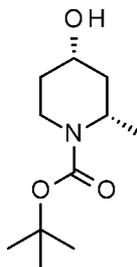
В инертной атмосфере сульфолан (1000 мл) добавляют в N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (50 г, 0,244 моль, непосредственно полученный выше), хлорид тетраметиламмония (107,1 г, 0,977 моль) и фторид цезия (370,6 г, 2,44 ммоль). Нагревают до 130°C и перемешивают в течение 23 ч. Анализ ВЭЖХ показывает 75%-ное превращение с выходом *in situ* 45% указанного в заголовке соединения.

Альтернативный способ синтеза N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (способ С).

2-пропанол (150 мл) добавляют в тетрагидрат фторида тетраметиламмония (10,2 г, 109,0 ммоль) и для удаления воды смесь концентрируют в 2-3 раза в вакууме с внутренней температурой, поддерживаемой при 70°C. Добавляют 2-пропанол (200 мл) и смесь концентрируют в 2-3 раза в вакууме. Повторяют еще два раза. Добавляют ДМФ (200 мл) и концентрируют во 2-3 раза в вакууме. Добавляют ТГФ (200 мл) и концентрируют в 2-3 раза.

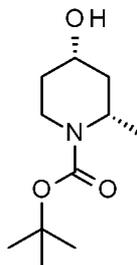
Повторяют еще два раза. Загружают N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (1,22 г, 5,96 ммоль, полученный выше в способе В) и ДМФ (12 мл). Нагревают до 110°C и перемешивают в течение 12 ч. Реакционную смесь охлаждают до 25°C. Добавляют 2-метилтетрагидрофуран (40 мл) и воду (40 мл). Слои разделяют и водный слой экстрагируют 2-метилтетрагидрофураном (40 мл). Слои разделяют и смесь органических слоев промывают водой (20 мл). Слои разделяют и органический слой концентрируют. Добавляют этилацетат (20 мл) и воду (5 мл). Слои разделяют и органический слой концентрируют для удаления растворителя. Добавляют этилацетат (2 мл) и гептан (2 мл) и фильтруют. Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 55°C в течение 18 ч для получения указанного в заголовке соединения в виде 93%-ной смеси с N-(4-хлор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамидом.

Способ получения 3. Синтез трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата



В колбу добавляют трет-бутил-(2S)-2-метил-4-оксопиперидин-1-карбоксилат (50 г, 234,44 ммоль) и тетрагидрофуран (500 мл). Смесь охлаждают до -65°C в атмосфере азота и по каплям, в течение 45 мин, добавляют три(втор-бутил)боргидрид лития (304,77 мл, 304,77 ммоль; 1M в тетрагидрофуране), поддерживая внутреннюю температуру ниже -60°C. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, затем охлаждают до -30°C. В реакционную смесь добавляют смесь воды (25,34 мл) и тетрагидрофурана (100,16 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже -20°C. По каплям в течение 1 ч добавляют водный раствор пероксида водорода (118,88 мл, 1,17 моль, 30% мас./мас.) в воде (126,70 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10°C. В смесь добавляют водный раствор хлористого водорода (46,89 мл, 234,44 ммоль, 5M) и метил-трет-бутиловый эфир (1,00 л) и смесь нагревают до комнатной температуры. Слои разделяют и органическую фазу перемешивают с раствором метабисульфита натрия (222,84 г, 1,17 моль) в воде (500 мл) в течение 10 мин при комнатной температуре. Слои разделяют и органическую фазу сушат над сульфатом магния и концентрируют. Остаток очищают флэш-хроматографией (0-50% метил-трет-бутиловый эфир/изогексан, силикагель) и содержащие продукт фракции объединяют и концентрируют для получения указанного в заголовке соединения (40,4 г, 78%). ES/MS (m/e) 238 (M+Na).

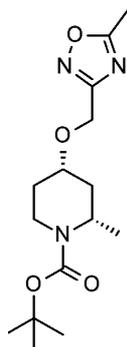
Альтернативный способ синтеза трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата



В эмалированный реактор, содержащий деионизированную воду (460 л) и дигидрофосфат калия (6,5 кг, 0,41 экв.), при 20°C загружают ДМСО (27,4 кг, 1,0 об.) и D-(+)-моногидрат глюкозы (28,9 кг, 1,25 экв.). Внутреннюю температуру доводят до 30°C, а pH реакции доводят до 6,9 путем добавления водного гидроксида натрия (8%, 15 л, 0,28 экв.). В реактор загружают трет-бутил-(2S)-2-метил-4-оксопиперидин-1-карбоксилат (24,9 кг, 1,0 экв. (99,1% э.и.)), и смесь перемешивают при 30°C в течение 15 мин. Через открытое отверстие непосредственно в реакционную смесь загружают средство для кетовосстановления (KRED-130, 250 г, 1% мас./мас.), глюкозодегидрогеназу (GDH-101, 250 г, 1% мас./мас.) и натриевую соль НАДФ (63 г, 0,25% мас./мас.). Смесь выдерживают при температуре 30°C и pH 7,0±0,2 посредством добавления 8%-ного водного NaHCO₃. После перемешивания в течение 16,5 ч (99,5%-ное превращение) в реакционную смесь загружают Celite™ (12,5 кг, 50% мас./мас.) и толуол (125 л, 5 об.). После перемешивания в течение 30 мин при 30°C смесь переносят в другой реактор емкостью 2000 л через встроенный

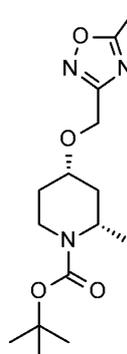
GAF-фильтр (4 носка) в течение 1 ч. Смеси дают отстояться 30 мин без перемешивания, слои разделяют, и водный слой экстрагируют из экстракта толуолом (2×125 л). Смеси органических слоев фильтруют (встроенный GAF-фильтр), и смесь с толуолом промывают водным раствором хлорида натрия (25%, 125 л, 5 об.) при 25°C. Полученный раствор в толуоле подвергают азеотропной сушке (частичный вакуум, внутренняя температура <60°C) до 0,10% мас./мас. воды и охлаждают до 20°C. Смесь отфильтровывают из реактора через патронный фильтр в чистые бочки под положительным давлением азота. Затем реакционную смесь переносят из бочек в 500-л эмалированный сосуд и концентрируют в вакууме (<60°C) до целевого остаточного объема 56 л (2,25 об.). При 40°C загружают н-гептан (169 кг, 10 об.) и смесь посыпают 25 г трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата. Полученный густой шлам разбавляют дополнительным количеством н-гептана (25 л, 1 об.) и охлаждают до 16°C в течение 4 ч. Продукт выделяют центрифугированием, промывают н-гептаном (25 л на одно вращение; необходимо 4 вращения), получая 20,3 кг (81%; >99,9% э.и.) после сушки в течение 11 ч в полочной сушилке при 30°C. ES/MS (m/e) 238 (M+Na).

Способ получения 4. Синтез трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата



3-(Хлорметил)-5-метил-1,2,4-оксадиазол (43,5 г, 301 ммоль) при комнатной температуре добавляют в раствор трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата (29,5 г, 137 ммоль) в ацетонитриле (590 мл). Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане и порциями в течение 10 мин добавляют трет-бутоксид натрия (54,3 г, 548 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10°C. Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане при внутренней температуре 5°C в течение 9 ч, затем медленно нагревают до комнатной температуры и перемешивают в течение ночи. Реакционную смесь охлаждают на ледяной бане и добавляют насыщенный водный раствор хлорида аммония (200 мл) в течение 5 мин, поддерживая внутреннюю температуру в течение добавления ниже 10°C. Затем смесь разбавляют водой (100 мл) и нагревают до комнатной температуры. Смесь экстрагируют метил-трет-бутиловым эфиром (2×300 мл) и смесь органических слоев промывают рассолом (300 мл). Смесь органических слоев сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка. Остаток быстро пропускают сквозь слой силикагеля (300 г), элюируя метил-трет-бутиловым эфиром (1 л), и фильтрат концентрируют для получения указанного в заголовке соединения (46,5 г, 109%). MS m/z 334,0 (M+Na).

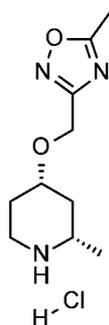
Альтернативный способ синтеза трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата



В раствор трет-бутил-(2S,4S)-4-гидрокси-2-метилпиперидин-1-карбоксилата (0,25 г, 1,16 ммоль) и 3-(хлорметил)-5-метил-1,2,4-оксадиазола (0,308 г, 2,32 ммоль) в N,N-диметилформамиде (3 мл) в атмосфере азота при 0°C порциями добавляют трет-бутоксид натрия (0,35 г, 3,5 ммоль) в течение 5 мин. Реакционную смесь перемешивают при кт в течение 10 мин, затем при 40°C в течение 12 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, затем гасят водой (10 мл). Слои разделяют и водную фазу экстрагируют метил-трет-бутиловым эфиром (2×10 мл). Смесь органических экстрактов промывают вод-

ным раствором хлорида лития (5%), сушат над сульфатом магния, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении для получения указанного в заголовке соединения (0,49 г, 0,7 ммоль, выход 81%, чистота 60%) в виде маслянистой жидкости коричневого цвета. MS m/z 334.0 (M+Na).

Способ получения 5. Синтез гидрохлорида 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола

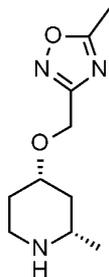


Колбу, содержащую трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилат (4,03 г, 12,9 ммоль), устанавливают на ледяную баню. В эту колбу по каплям в течение 5 мин при перемешивании добавляют 4М раствор соляной кислоты в 1,4-диоксане (25,9 мл, 104 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру в течение добавления ниже 20°C. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч, затем концентрируют для получения указанного в заголовке соединения (3,56 г, выход 92%, исходя из чистоты 83%, измеренной ¹H-ЯМР). MS (m/z): 212,0 (M+H).

Альтернативный способ синтеза гидрохлорида 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола.

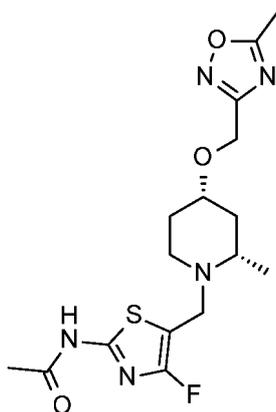
Метанол (50 мл) добавляют в трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилат (12,9 г, 0,041 моль). Смесь охлаждают до 0°C. В охлажденную смесь по каплям добавляют 4М раствор соляной кислоты в метаноле (80 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 20°C. Затем реакцию смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 18 ч. Затем смесь концентрируют для удаления растворителя. Добавляют ацетон (10 мл) и смесь перемешивают в течение 20 мин. Добавляют тетрагидрофуран (40 мл) и смесь перемешивают в течение 3 ч. Твердые вещества собирают фильтрованием в атмосфере азота и отфильтрованный твердый осадок промывают тетрагидрофураном. Затем отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 45°C в течение 2 ч для получения указанного в заголовке соединения с чистотой 90%. Повторная кристаллизация с применением ацетона повышает чистоту указанного в заголовке соединения до 95%.

Способ получения 6. Синтез 5-метил-3-[[[(2S,4S)-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола



В раствор трет-бутил-(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]пиперидин-1-карбоксилата (0,49 г, 1,6 ммоль) в дихлорметане (10 мл) в атмосфере азота добавляют трифторуксусную кислоту (1,8 мл, 23 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч. Смесь концентрируют при пониженном давлении для получения маслянистой жидкости желтого цвета. Остаток растворяют в метаноле (5 мл) и выливают на катионообменной картридж, элюируют метанолом (2×10 мл), затем 2М раствором аммиака в метаноле (10 мл). Фильтрат концентрируют при пониженном давлении для получения указанного в заголовке соединения (0,3 г, 1,4 ммоль, 91%). MS (m/z): 212,0 (M+H).

Пример 1. Синтез N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида



N-(4-Фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамид (28,3 г, 150 ммоль) при комнатной температуре добавляют в гидроклорид 5-метил-3-[[2S,4S]-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола (48,7 г, 185 ммоль, чистота 94%) в этилацетате (707 мл). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре и по каплям, в течение более 1 мин, добавляют N,N-диизопропилэтиламин (34,1 мл, 195 ммоль), затем одной порцией добавляют триацетоксиборгидрид натрия (98,5 г, 451 ммоль). Реакционную смесь перемешивают в термостате на 31°C в течение ночи с внутренней температурой 30°C, затем охлаждают на ледяной бане до внутренней температуры 5°C. В смесь добавляют 2М водный раствор соляной кислоты (226 мл) в течение 15 мин, поддерживая внутреннюю температуру ниже 10°C. В смесь добавляют воду (250 мл) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 мин. Слои разделяют и органический слой экстрагируют смесью 2М водного раствора соляной кислоты (28 мл) в воде (50 мл). Первый водный слой перемешивают на ледяной бане и в течение 10 мин по каплям добавляют 50%-ный водный раствор гидроксида натрия (25,7 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10°C. Смесь разбавляют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (100 мл), затем перемешивают при комнатной температуре в течение 10 мин и затем экстрагируют этилацетатом (3×400 мл). Смесь органических слоев сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка. Второй водный слой после экстракции водной соляной кислотой разбавляют 2-метилтетрагидрофураном (200 мл) и смесь пропускают сквозь тонкий слой диатомовой земли. Фильтрат переносят в делительную воронку, и слои разделяются. Водный слой перемешивают на ледяной бане и в течение 5 мин по каплям добавляют 50%-ный водный раствор гидроксида натрия (3,15 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 10°C. Смесь разбавляют насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (10 мл), затем перемешивают при комнатной температуре в течение 5 мин и затем экстрагируют этилацетатом (3×40 мл) и 10%-ным изопропанолом в этилацетате (100 мл). Смесь органических слоев сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют для получения остатка, который объединяют с остатком после первой части обработки. Объединенный остаток пропускают сквозь слой силикагеля (350 г), элюируя этилацетатом (3,5 л), и фильтрат концентрируют для получения остатка (45,8 г).

Остаток (47,5 г объединенных партий, 123,9 ммоль) очищают флэш-хроматографией, элюируя 50-100%-ным этилацетатом в гептане. Фракции, содержащие продукт, концентрируют до остатка, который диспергируют в смеси 1:1 метил-трет-бутилового эфира и гептана (448 мл). Смесь перемешивают в термостате на 46°C в течение 30 мин при внутренней температуре 45°C, затем охлаждают до комнатной температуры в течение 2 ч при перемешивании. Смесь фильтруют, промывая твердое вещество смесью 1:1 метил-трет-бутилового эфира и гептана (30 мл). Отфильтрованное твердое вещество сушат в вакууме при 40°C в течение ночи для получения указанного в заголовке соединения (28,5 г). МС (m/z): 384,0 (M+H). $[\alpha]_D^{20} = +33,4^\circ$ (C = 0,26, метанол).

Альтернативный способ синтеза N-[4-фтор-5-[[2S,4S]-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида.

В раствор N-(4-фтор-5-формилтиазол-2-ил)ацетамида (0,05 г, 0,28 ммоль) и 5-метил-3-[[2S,4S]-2-метил-4-пиперидил]оксиметил]-1,2,4-оксадиазола (0,04 г, 0,19 ммоль) в дихлорметане (10 мл) в атмосфере азота добавляют N,N-диизопропилэтиламин (0,1 мл, 0,57 ммоль) и триацетоксиборгидрид натрия (0,12 г, 0,57 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Реакционную смесь выливают в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (10 мл). Слои разделяют и водную фазу экстрагируют дихлорметаном (2×10 мл). Смесь органических экстрактов сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют при пониженном давлении для получения маслянистой жидкости оранжевого цвета.

Остаток растворяют в метаноле (до общего объема 9,8 мл), фильтруют и очищают с помощью препаративной ВЭЖХ (Phenomenex Gemini-NX 10 микрон 50×150 мм C-18) (CH₃CN и вода с 10 мМ бикарбоната аммония, доведенные до pH 9 гидроксидом аммония, от 15 до 100% CH₃CN в течение 10 мин при 110 мл/мин) (1 впрыскивание) (271/204 нм) для получения указанного в заголовке соединения (0,02 г,

0,05 ммоль, 28%). MS (m/z): 384,2 (M+H).

Пример 1А. Кристаллический N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид.

Неочищенный N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид (29,9 г) в течение 30 мин диспергируют в 448 мл 50%-ного метил-трет-бутилового эфира в гептане при 46°C. Смесь перемешивают и охлаждают до 19°C в течение 2 ч, после чего фильтруют, а затем промывают 30 мл 50%-ного метил-трет-бутилового эфира в гептане для получения указанного в заголовке соединения (28,5 г, выход 95%).

Рентгеновская порошковая дифрактометрия (РПД) примера 1А.

Рентгенограммы кристаллических твердых веществ получены на порошковом рентгеновском дифрактометре Bruker D4 Endeavour, оснащенном источником CuK α ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$) и детектором Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали при 2 θ от 4 до 40°, с размером шага 2 θ 0,0087°, со скоростью сканирования 0,5 с/шаг, с щелью 0,6 мм, с неподвижной отсеивающей решеткой 5,28 мм и щелью детектора 9,5 мм. Сухой порошок упаковывается в кварцевую кювету, и гладкую поверхность получают 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. Если присутствует влияние предпочтительной ориентации, интенсивности пиков изменяются, но характерные положения пиков полиморфа остаются неизменными (см., например The U. S. Pharmacopeia 38 - National Formulary 35, Chapter 941, Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD), Official, May 1, 2015). Дополнительно, в области кристаллографии также хорошо известно, что для любой данной формы кристалла угловые положения пиков могут незначительно изменяться. Например, положения пиков смещаются из-за изменения температуры или влажности, при которой анализируется образец, смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае изменчивость положения пика в $\pm 0,2 \text{ } 2\theta$ учитывает эти потенциальные изменения, не мешая однозначной идентификации указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы сделано на основе любой уникальной комбинации отличительных пиков (в единицах $^{\circ} 2\theta$), как правило, более выступающих пиков. Дифрактограммы кристаллической формы, записанные при температуре и относительной влажности окружающей среды, откорректированы по стандартным пикам NIST 675 при 8,85 и 26,77° 2 θ .

Приготовленный образец кристаллического N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида характеризуется рентгеновской дифрактограммой при использовании излучения CuK α , имеющей дифракционные пики (значения 2 θ), описанные в таблице ниже. В частности, дифрактограмма имеет пик при 12,1° в сочетании с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 15,3, 21,6, 22,2, 22,7, 23,5, 24,3 и 26,8° с допуском на углы дифракции 0,2°.

Пики на рентгеновской порошковой дифрактограмме кристаллического N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамида, пример 1А

Пик	Угол (2-тета $^{\circ}$)+/-0,2 $^{\circ}$	Относительная интенсивность (% от наиболее интенсивного пика)
1	7,7	9
2	10,1	9
3	12,1	100
4	15,3	50
5	18,3	11
6	19,3	13
7	21,6	16
8	22,2	16
9	22,7	16
10	23,5	30
11	24,3	35
12	26,8	27

Анализ фермента OGA человека *in vitro*.

Генерирование белков OGA.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерную человеческую O-GlcNAc- β -N-ацетилглюкозаминидазу (NM_012215), встраивают в вектор pFastBac1 (Invitrogen) с помощью N-концевой полигистидиновой (HIS) метки. Генерирование бакуловируса осуществляется в соответствии с протоколом Bac-to-Bac системы экспрессии бакуловируса (Invitrogen). Клетки Sf9 инфицированы при

$1,5 \times 10^6$ клеток/мл с использованием 10 мл вируса P1 на литр культуры и инкубируются при 28°C в течение 48 ч. Клетки центрифугируют, промывают ФБС и осадок хранят при -80°C.

Описанный выше белок OGA (His-OGA) очищают следующим образом: 4 л клеток лизируют в течение 45 мин при 4°C в 200 мл буфера, содержащего 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% глицерина, 10 mM имидазола, 1 mM дитиотреитола (ДТТ), 0,1% Triton™ X-100, 4 таблетки ингибиторов протеазы (полностью свободные от ЭДТК, Roche). Затем данный клеточный лизат центрифугируют в течение 40 мин при 16500 об/мин при 4°C и надосадочную жидкость инкубируют с 6 мл Ni-НТУ смолы (никель-нитрилтриуксусной кислоты) в течение 2 ч при 4°C.

Затем смолу помещают в колонну и промывают 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10% глицерина, 10 mM имидазола, 0,1% Triton™ X-100, 1 mM ДТТ, а затем 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM имидазола, 10% глицерина, 1 mM ДТТ. Белки элюируют с помощью 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 300 mM имидазола, 10% глицерина, 1 mM ДТТ. Смесь фракций, содержащих His-OGA, концентрируют до 6 мл и загружают в Superdex75 (16/60). Белок элюируют с помощью 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% глицерина, 2 mM ДТТ. Фракции, содержащие His-OGA, объединяют и концентрацию белка измеряют с помощью КАБ (колориметрический анализ Брэдфорда).

Анализ фермента OGA.

Фермент OGA катализирует удаление O-GlcNAc из нуклеоцитоплазматических белков. Для измерения этой активности флуоресцеинового ди-N-ацетил-β-N-ацетил-D-глюкозаминид (FD-GlcNAc, Kim, Eun Ju; Kang, Dae Ook; Love, Dona C.; Hanover, John A. Carbohydrate Research (2006), 341(8), 971-982) применяется в качестве субстрата с конечной концентрацией 10 мкМ (в формате 96-луночного анализа) или 6,7 мкМ (в формате 384-луночного анализа). Этот флуорогенный субстрат становится флуоресцентным при расщеплении с помощью OGA, так что активность фермента измеряют по увеличению флуоресценции, обнаруженной при 535 нм (возбуждение при 485 нм).

Буфер для анализа готовят до конечной концентрации 50 mM H_2NaPO_3 - HNa_2PO_3 , 0,01% бычьего сывороточного альбумина и 0,01% Triton™ X-100 в воде при pH 7. Конечная концентрация фермента составляет 3 нМ (в формате 96-луночного анализа) или 3,24 нМ (в формате 384-луночного анализа). Оба формата анализа дают практически эквивалентные результаты.

Испытуемые соединения разводят в чистом диметилсульфоксиде (ДМСО), используя концентрационные кривые из десяти точек. Максимальная концентрация соединения в реакционной смеси составляет 30 мкМ. Соединения с подходящей концентрацией предварительно инкубируют с ферментом OGA в течение 30 мин, после чего реакцию инициируют посредством добавления субстрата. Реакцию оставляют протекать в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем, не останавливая реакцию, считают флуоресценцию. Значения IC_{50} рассчитываются путем построения графика нормализованных данных в зависимости от логарифма соединения и аппроксимации данных с использованием логистического уравнения с четырьмя параметрами.

Соединение по примеру 1 испытывают практически так же, как описано выше, и оно имеет IC_{50} 2,36 нМ±0,786 (n=8). Эти данные демонстрируют, что соединение по примеру 1 ингибирует активность фермента OGA *in vitro*.

Анализ цельных клеток для измерения ингибирования активности фермента OGA.

Выращивание клеток.

Используя стандартные условия, известные в данной области техники, клетки TRex-293, модифицированные для индуцибельной экспрессии формы P301S-1N4R белка тау, ассоциированного с микротрубочками, генерируют и поддерживают в ростовой среде, состоящей из DMEM с высоким содержанием глюкозы (Sigma# D5796), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, не содержащей тетрациклина (ФБС, Sigma F2442), 20 mM ГЭПЭС, 5 мкг/мл бластицидина (Life Technologies# A11139-03) и 200 мкг/мл зеоцина (Life Technologies# R250-01). Для экспериментов клетки высевают в питательной среде при 10000-14000 клеток на лунке в 384-луночном планшете Corning Biocoat (356663), покрытом поли-D-лизинном, и инкубируют 20-24 ч в клеточном инкубаторе при 37°C/5% CO₂. Эксперименты выполняются без стимулирования экспрессии тау.

Обработка соединений.

Испытуемые соединения последовательно разводят 1/3 в чистом ДМСО, используя 10-точечные концентрационные кривые, и дополнительно разводят в ростовой среде. Спустя 20-24 ч после посева клетки обрабатывают испытуемым соединением в ростовой среде; максимальная концентрация соединения составляет 15 мкМ (0,15% ДМСО). Максимальное ингибирование определяют путем параллельных измерений 15 мкМ Thiamet G, а минимальное ингибирование определяют путем параллельных измерений обработки 0,15% ДМСО. Клетки возвращают в инкубатор при 37°C/5% CO₂ на 20-24 ч. Для каждого планшета соединения испытывают в двух экземплярах.

Иммуноокрашивание.

Спустя 20-24 ч обработки соединением среду удаляют из планшета для анализа, в каждую лунку добавляют 25 мкл 3,7%-ного раствора формальдегида (Sigma # F1635) в DPBS (Sigma #D8537) и инкубируют в течение 30 мин. Затем клетки один раз промывают DPBS, а затем пермеабелизируют в 0,1% Tri-

ton™ X-100 (Sigma# T9284). Спустя 30 мин клетки дважды промывают DPBS, а затем в каждую лунку добавляют блокирующий раствор (1% BSA/DPBS/0,1% Triton™ X-100) и инкубируют в течение 60 мин. Блокирующий раствор удаляют, в клетки добавляют 0,40-0,33 мкг/мл раствора антитела O-GlcNAc Protein (клон RL2, Thermo, MA1072) в блокирующем растворе и оставляют отстаиваться на ночь при 2-8°C. На следующий день клетки дважды промывают DPBS и в каждую лунку добавляют вторичное антитело, козий антимышинный IgG Alexa Fluor 488 (Life Technologies # A11001), в концентрации 2 мкг/мл и оставляют отстаиваться при комнатной температуре в течение 90 мин. Вторичное антитело удаляют, клетки дважды промывают DPBS и в каждую лунку добавляют раствор ДАПИ (Sigma #D9564) и РНКазы (Sigma, R6513) в DPBS в концентрации 1 и 50 мкг/мл соответственно. Планшет герметизируют, инкубируют в течение одного часа и анализируют на Acumen eX3 hci (GTP Labtech). Все описанные выше этапы инкубации и промывания выполняются при комнатной температуре, за исключением первичного антитела.

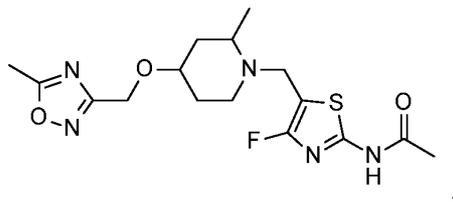
Анализ и результаты.

Планшеты анализируют на приборе Acumen eX3 с использованием возбуждающих лазеров на 488 и 405 нм и двух эмиссионных фильтров FL2 (500-530 нм) и FL1 (420-490 нм). Фильтр FL2 представляет собой сигнал, соответствующий антителу к белку O-GlcNAc (клон RL2), а фильтр FL1 представляет собой сигнал, соответствующий ядрам клетки (ДАПИ). Для анализа данных применяется отношение Общий FL2/Общий FL1 (общая флуоресценция каждой лунки без выбора объекта или популяции). Данные нормализованы к максимальному ингибированию, соответствующему обработке 15 мкМ Thiamet G, и минимальному ингибированию, достигаемому с помощью обработки 0,15% ДМСО. Данные аппроксимированы с помощью приложения нелинейной аппроксимации кривых по точкам (логистическое уравнение с 4 параметрами), и значения IC₅₀ рассчитываются и выводятся на экран.

Соединение по примеру 1 испытывают практически так же, как описано выше, и оно имеет IC₅₀ 21,9 нМ±7,3 (n=5). Эти данные демонстрируют, что соединение по примеру 1 ингибирует активность фермента OGA в клеточном анализе.

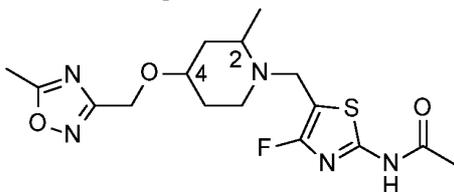
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что метил в положении 2 находится в цис-конфигурации относительно кислорода в положении 4 в пиперидиновом кольце



или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1 или 2, отличающееся тем, что соединение представляет собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид, или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по п.3, представляющее собой N-[4-фтор-5-[[[(2S,4S)-2-метил-4-[(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)метокси]-1-пиперидил]метил]тиазол-2-ил]ацетамид.

5. Соединение по п.4, отличающееся тем, что соединение является кристаллическим.

6. Соединение по п.5, отличающееся тем, что характеризуется пиком на спектре рентгеновской порошковой дифракции при угле дифракции 2θ 12,1° в сочетании с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 15,3, 21,6, 22,2, 22,7, 23,5, 24,3 и 26,8°, с допуском на углы дифракции 0,2°.

7. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому одному из пп.1-6 для лечения болезни Альцгеймера.

8. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому одному из пп.1-6 для лечения прогрессирования умеренного когнитивного нарушения в болезнь Альцгеймера.

9. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому одному из пп.1-6 для лечения прогрессирующего надъядерного паралича.

10. Фармацевтическая композиция для лечения болезни Альцгеймера, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по любому одному из пп.1-6 с одним или более фармацевтически

приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

11. Способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому одному из пп.1-6 с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

