

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190302** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.10

(22) Дата подачи заявки
2019.08.29

(51) Int. Cl. **A61K 31/4439** (2006.01)
C07D 213/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)

(54) СОЕДИНЕНИЯ 2,6-ДИАМИНОПИРИДИНА

(31) **62/726,520**

(32) **2018.09.04**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/048788**

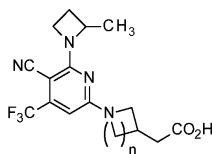
(87) **WO 2020/051058 2020.03.12**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Дурхам Тимоти Барретт (US)

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

(57) В настоящем изобретении предложено соединение формулы I



или его фармацевтически приемлемая соль и применение соединений формулы I для лечения метаболических состояний, таких как сахарный диабет 2 типа, сердечная недостаточность, диабетическая болезнь почек и неалкогольный стеатогепатит.

202190302

A1

A1

202190302

СОЕДИНЕНИЯ 2,6-ДИАМИНОПИРИДИНА

Настоящее изобретение относится к новым соединениям-ингибиторам кетогексокиназы (КНК), к фармацевтическим композициям, содержащим эти соединения, и к применению соединений для лечения некоторых метаболических состояний, таких как сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа), сердечная недостаточность, диабетическая болезнь почек и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).

Метаболический синдром обычно определяется как совокупность состояний, которые отражают чрезмерное питание и малоподвижный образ жизни, и его проявления включают СД 2 типа, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), ожирение, дислипидемию, сердечную недостаточность и заболевания почек.

СД 2 типа характеризуется относительной недостаточностью инсулина, вызванной дисфункцией β -клеток поджелудочной железы и инсулинорезистентностью органов-мишеней. На его долю приходится более 90% пациентов, страдающих диабетом, и он приводит к микрососудистым и макрососудистым осложнениям, которые вызывают у пациентов тяжелые психологические и физические страдания и обеспечивают высокую нагрузку на системы здравоохранения (Davies, M.J., *et al.*; *Lancet*, 389, 2239-2251, 2017).

Сердечная недостаточность представляет собой синдром, вызванный структурными или функциональными аномалиями сердца, которые приводят к повышению внутрисердечного давления или снижению сердечного выброса в состоянии покоя или во время стресса. Сердечная недостаточность является основной и растущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире (Teerlink, J.R., *et al.*; *Lancet*, 390, 1981-1995, 2017).

Диабетическая болезнь почек развивается почти у половины пациентов с СД 2 типа и является основной причиной хронической болезни почек во всем мире. Метаболические изменения, связанные с диабетом, приводят к клубочковой гиперfiltrации, прогрессирующей альбуминурии, снижению скорости клубочковой фильтрации и, в конечном итоге, к терминальной стадии почечной недостаточности (Alicic, R.Z., *et al.*; *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 2032-2045, 2017).

НАЖБП представляет собой спектр заболеваний печени, которые могут приводить к прогрессирующему НАСГ, фиброзу и, в конечном итоге, гепатоцеллюлярной карциноме и печеночной недостаточности. Предполагается, что в следующие 20 лет НАЖБП станет основной причиной заболеваемости и смертности, связанной с печенью, а также основным показанием для трансплантации печени (Bertot, L.C., *et al.*; *Int. J. Mol. Sci.*, 17(5), 774, 2016).

КНК, также называемая фруктокиназой, является ограничивающим скорость ферментом, участвующим в метаболизме фруктозы. Он катализирует фосфорилирование фруктозы до фруктозо-1-фосфата (F1P), вызывая сопутствующее истощение клеточного уровня АТФ. В отличие от глюкозы, в метаболизме фруктозы отсутствует ингибирование по типу обратной связи, и он запускает накопление последующих промежуточных продуктов, участвующих, например, в липогенезе, глюконеогенезе и окислительном фосфорилировании (Hannou, S.A., *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 128(2), 544-555, 2018). Это имеет негативные последствия для метаболизма, которые связаны с рядом серьезных метаболических нарушений.

КНК существует в двух альтернативно сплайсированных изоформах, состоящих из КНК-С и КНК-А, различающихся экзоном 3. КНК-С экспрессируется в основном в печени, почках и кишечнике, тогда как КНК-А встречается повсеместно. Мыши, дефицитные по обеим изоформам, полностью защищены от возникновения метаболического синдрома, индуцированного фруктозой. Однако неблагоприятные метаболические эффекты усугубляются у мышей, лишенных только КНК-А (Ishimoto T, *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(11), 4320-4325, 2012).

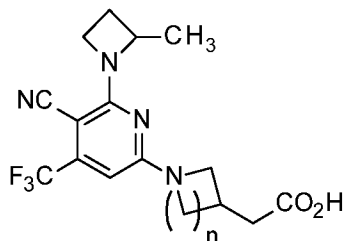
В нескольких эпидемиологических и экспериментальных исследованиях сообщалось, что повышенное потребление фруктозы, а точнее увеличение метаболизма фруктозы, может играть важную роль в развитии метаболического синдрома, в частности, в развитии СД 2 типа (Softic *et al.*; *J. Clin. Invest.*, 127(11), 4059-4074, 2017), сердечной недостаточности (Mirtschink, P., *et al.*; *Eur. Heart J.*, 39, 2497-2505, 2018), диабетической болезни почек (Cirillo, P., *et al.*; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20, 545-553, 2009) и НАЖБП/НАСГ (Vos, M.B., *et al.*; *Hepatology*, 57, 2525-2531, 2013). Ожидается, что целевое ингибирование КНК ограничит метаболизм фруктозы и обеспечит эффективные варианты лечения ряда метаболических нарушений.

В US 2017/0183328 A1 описаны замещенные 3-азабицикло[3.1.0]гексаны в качестве ингибиторов КНК.

Существует потребность в альтернативных способах лечения метаболического синдрома и связанных с ним показаний, включая СД 2 типа, сердечную недостаточность, диабетическую болезнь почек и НАСГ. В частности, существует потребность в соединениях, обладающих ингибирующей активностью в отношении КНК, для обеспечения вариантов лечения данных заболеваний. Кроме того, существует потребность в сильнодействующих ингибиторах КНК, обладающих свойствами, которые важны для терапевтического применения у людей, такими как биодоступность при пероральном применении и период

полувыведения, достаточный для поддержки ежедневного дозирования, или ограниченный профиль межлекарственного взаимодействия.

Соответственно, в настоящем изобретении предложено соединение Формулы I:



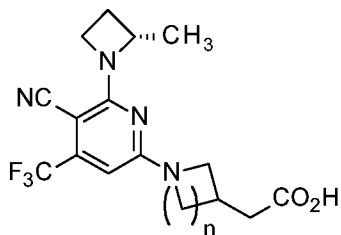
Формула I

где n составляет 1 или 2;

или его фармацевтически приемлемая соль.

Формула I включает все их индивидуальные энантиомеры и диастереомеры, а также смеси энантиомеров и рацематы.

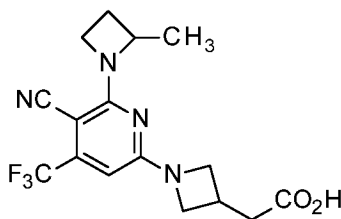
В конкретном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы:



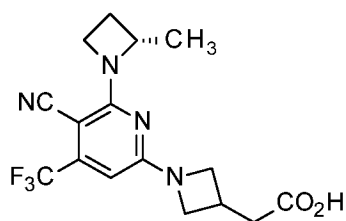
или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации n составляет 1. В данном варианте реализации

соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы:

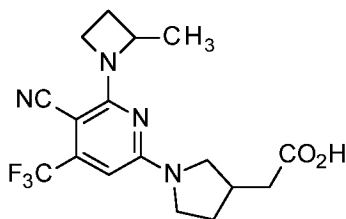


или его фармацевтически приемлемую соль. В предпочтительном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы:



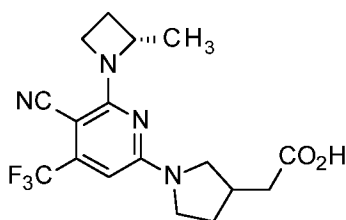
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации n составляет 2. В данном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы:

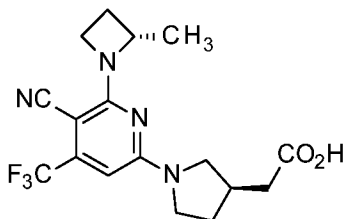


5

или его фармацевтически приемлемую соль. В предпочтительном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы:



10 или его фармацевтически приемлемую соль. В другом предпочтительном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы:



15 или его фармацевтически приемлемую соль. В данном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложен способ лечения СД 2 типа у пациента, нуждающегося в таком лечении, который включает введение пациенту эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации способ включает введение 2-
5 [(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложен способ лечения сердечной недостаточности у пациента, нуждающегося в таком лечении, который включает введение пациенту эффективного количества соединения Формулы I или его
10 фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации способ включает введение 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил] пирролидин-3-ил] уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложен способ лечения диабетической болезни почек у пациента, нуждающегося в таком лечении, который
15 включает введение пациенту эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации способ включает введение 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил] пирролидин-3-ил] уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложен способ
20 лечения НАСГ у пациента, нуждающегося в таком лечении, который включает введение пациенту эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации способ включает введение 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил] пирролидин-3-ил] уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложен способ
25 лечения хронической болезни почек у пациента, нуждающегося в таком лечении, который включает введение пациенту эффективного количества соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации способ включает введение 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил] пирролидин-3-ил] уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.
30

В одном варианте реализации в настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из метаболического синдрома, НАЖБП, ожирения, осложнений диабета, например, диабетической ретинопатии,

сердечно-сосудистого заболевания, ишемической болезни сердца и дислипидемии, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации способ включает введение 2-[(3R)-1-[5-циано-6-
 5 [(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил] пирролидин-3-ил] уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

Более того, в одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение Формулы I
 10 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении СД 2 типа. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении сердечной недостаточности. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении диабетической болезни
 15 почек. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении НАСГ. В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложено соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении хронической болезни почек. В одном варианте реализации в настоящем изобретении также
 20 предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении метаболического синдрома, НАЖБП, ожирения, осложнений диабета, например диабетической ретинопатии, сердечно-сосудистого заболевания, ишемической болезни сердца или дислипидемии. В предпочтительном варианте реализации соединение формулы I в терапевтических применениях, указанных выше, представляет собой 2-[(3R)-1-
 25 [5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил] пирролидин-3-ил] уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

Более того, в одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено применение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения СД 2 типа. В одном варианте реализации в
 30 настоящем изобретении предложено применение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения сердечной недостаточности. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено применение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли

для получения лекарственного средства для лечения диабетической болезни почек. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено применение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения НАСГ. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено применение соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения хронической болезни почек. В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложено применение соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения метаболического синдрома, НАЖБП, ожирения, осложнений диабета, например, диабетической ретинопатии, сердечно-сосудистого заболевания, ишемической болезни сердца или дислипидемии. В предпочтительном варианте реализации соединение формулы I представляет собой 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил] пирролидин-3-ил] уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение Формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. В одном варианте реализации в настоящем изобретении дополнительно предложен способ получения фармацевтической композиции, содержащей смесь соединения Формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

Применяемый в настоящем 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 млекопитающему. Предпочтительно пациентом является человек.

Применяемый в настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству или дозе соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, подлежащего диагностике или лечению.

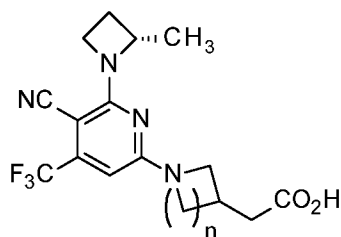
Эффективное количество может установить специалист в данной области техники, используя известные технологии и наблюдая результаты, полученные при аналогичных

обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента, рассматривается множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: вид пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или расстройство; степень вовлеченности или тяжесть заболевания или расстройства; реакцию отдельного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого лекарственного средства; выбранную схему введения; применение сопутствующих лекарственных средств; и другие имеющие отношение обстоятельства. Соединения по настоящему изобретению эффективны при суточной дозировке, которая находится в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 15 мг/кг массы тела.

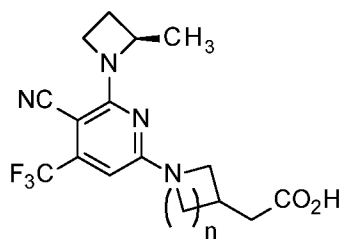
Соединения согласно настоящему изобретению составляют в фармацевтические композиции, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения. Предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их приготовления хорошо известны в данной области (см., например, Remington, J. P., “*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*”, L.V. Allen, Editor, 22^e изд., Pharmaceutical Press, 2012).

Соединения Формулы I или их фармацевтически приемлемые соли особенно подходят для способов лечения согласно настоящему изобретению, но некоторые конфигурации являются предпочтительными. В следующем списке соединений настоящего изобретения описаны такие конфигурации. Следует понимать, что эти предпочтения применимы к соединениям согласно настоящему изобретению, а также к способам лечения, терапевтическому применению и фармацевтическим композициям.

Соединения согласно настоящему изобретению включают:



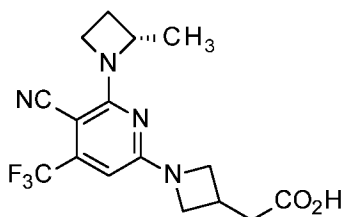
Формула Ia



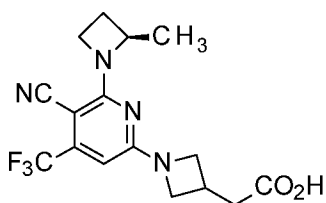
Формула Ib

и их фармацевтически приемлемые соли.

Дополнительные соединения согласно настоящему изобретению включают:



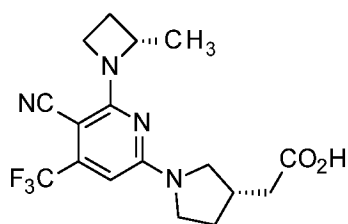
Формула Ia



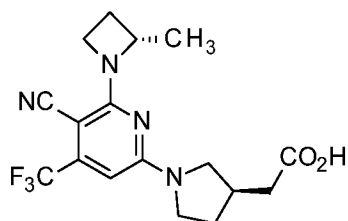
Формула Ib

и их фармацевтически приемлемые соли.

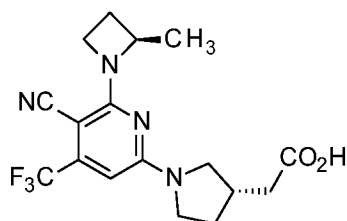
Дополнительные соединения согласно настоящему изобретению включают:



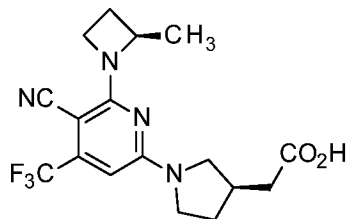
Формула IIIa'



Формула IIIa''



Формула IIIb'



Формула IIIb''

5 и их фармацевтически приемлемые соли.

Хотя настоящее изобретение охватывает все индивидуальные энантиомеры и диастереомеры, а также их смеси, включая рацематы, соединения формулы Ia, формулы IIa и IIIa'' и их фармацевтически приемлемые соли являются особенно предпочтительными.

Отдельные энантиомеры могут быть отделены или разделены специалистом в данной области в любой удобный момент синтеза соединений согласно настоящему изобретению такими способами, как методики селективной кристаллизации, хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, *et al.*, "*Enantiomers, Racemates, and Resolutions*", John Wiley and Sons, Inc., 1981, и E.L. Eliel and S.H. Wilen, "*Stereochemistry of Organic Compounds*", Wiley-Interscience, 1994), или сверхкритическая жидкостная хроматография (SFC) (см., например, T. A. Berger, "*Supercritical Fluid Chromatography Primer*," Agilent Technologies, July 2015).

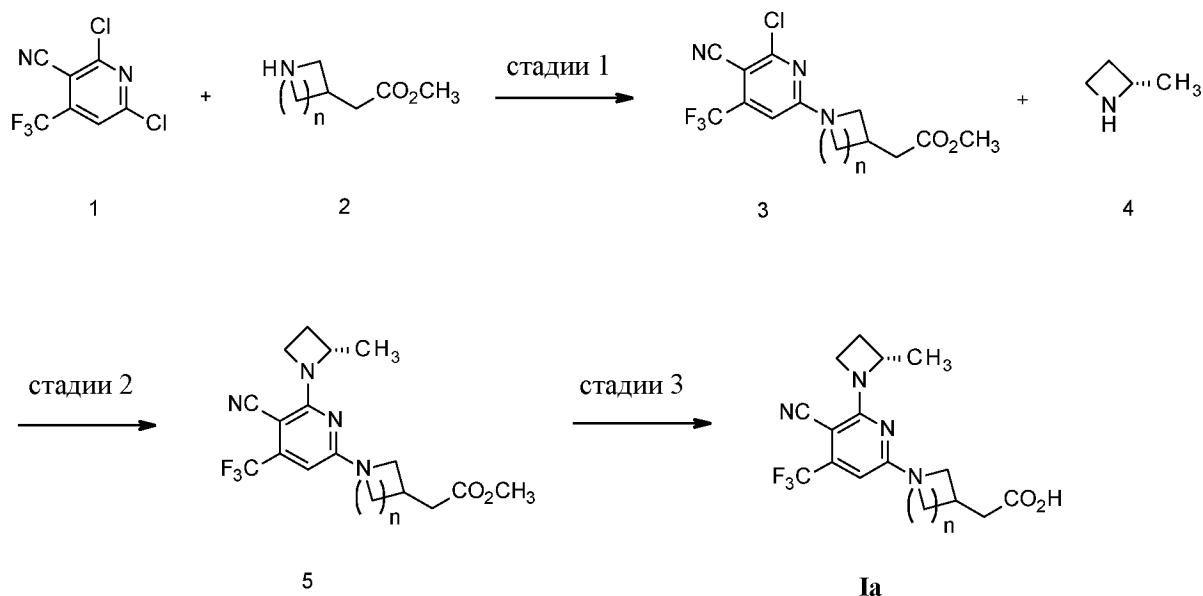
Фармацевтически приемлемую соль соединений согласно настоящему изобретению можно получить, например, с помощью реакции между подходящей нейтральной формой соединения согласно настоящему изобретению и подходящей фармацевтически приемлемой кислотой или основанием, в подходящем растворителе, при стандартных условиях, известных в данной области техники (см. например, Bastin, R.J., *et al.*; *Org. Process. Res. Dev.*, 4, 427-435, 2000 and Berge, S.M., *et al.*; *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19, 1977).

Соединения согласно настоящему 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. Продукты каждой стадии на приведенных ниже схемах можно выделять традиционными способами, хорошо

известными в данной области техники, включая экстракцию, упаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. На следующих схемах все заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее. Реагенты и исходные вещества общедоступны специалистам в данной области техники. Не ограничивая
 5 объем изобретения, следующие схемы, способы получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации изобретения. Дополнительно, специалисту в данной области техники понятно, что соединение Формулы I может быть получено с применением исходного материала или промежуточного соединения с соответствующей необходимой
 10 стереохимической конфигурацией, которое может быть получено специалистом в данной области техники.

Некоторые сокращения определены следующим образом: «ABT» относится к 1-аминобензотриазолу; «ACN» относится к ацетонитрилу; «BCA» относится к бычьему сывороточному альбумину; «CAS#» относится к реестровому номеру реферативной службы; «ДХМ» относится к хлористому метилу или дихлорметану; «DIPEA» относится к
 15 диизопропилэтиламину; «DMEM» относится к среде Игла, модифицированной Дульбекко; «ДМСО» относится к диметилсульфоксиду; «ELSD» относится к испарительному детектору рассеяния света; «ЭР/МС» относится к масс-спектрометрии с электрораспылением; «EtOAc» относится к этилацетату; «EtOH» относится к этанолу или этиловому спирту; «ФБС» относится к фетальной бычьей сыворотке; «ч» относится к часу или часам; «ВЭЖХ»
 20 относится к высокоэффективной жидкостной хроматографии; «Me» относится к метилу; «MeOH» относится к метанолу; «MTBE» относится к метил-*трет*-бутиловому эфиру; «мин» относится к минуте или минутам; «m/z» относится к отношению массы к заряду; «ФБР» относится к фосфатно-буферному раствору; «Ph» относится к фенилу; «КДК» относится к круглодонной колбе; «КТ» относится к комнатной температуре; «SCX» относится к
 25 селективному катионному обмену; «SFC» относится к сверхкритической жидкостной хроматографии; «ТГФ» относится к тетрагидрофурану.

Схема 1



На схеме 1 показано общее получение соединений формулы I. На стадии 1 3-циано-2,6-дихлор-4-(трифторметил) пиридин (1) и циклический амин (2) взаимодействуют в присутствии основания, такого как NaHCO_3 или DIPEA, в EtOH или MeOH с образованием аминопиридина (3). В качестве альтернативы, реакционным растворителем для данной стадии может быть ДХМ. На стадии 2 соединение 3 взаимодействует с 2-метилазетидином (4) при повышенной температуре и в присутствии основания, такого как NaHCO_3 или DIPEA, в EtOH или MeOH с получением диаминопиридина (5). В качестве альтернативы, реакционным растворителем для данной стадии может быть ТГФ. На стадии 3 сложноэфирный фрагмент подвергают гидролизу с применением основания, такого как NaOH или LiOH, в MeOH или ТГФ при повышенной температуре с получением соединения формулы Ia. В качестве альтернативы данная стадия может быть выполнена с применением тех же реагентов в микроволновом реакторе.

Получение и Примеры

Следующие способы получения и примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение и демонстрируют типовые способы синтеза соединения согласно настоящему изобретению. Реагенты и исходные материалы легко доступны специалистам в данной области техники или могут быть легко синтезированы ими. Следует понимать, что указанные способы получения и примеры приведены для иллюстрации, а не ограничения, и

что специалистами в данной области техники могут быть осуществлены различные модификации.

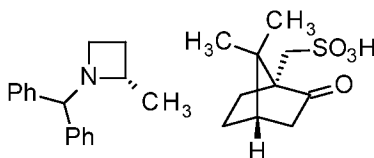
ЖХ-ИЭР/МС проводили на системе для жидкостной хроматографии AGILENT® HP1100. Измерения масс-спектрометрии с электрораспылением (записанные в

положительном и/или отрицательном режиме) проводили на квадрупольном масс-спектрометре с масс-селективным детектором, подключенном к системе ВЭЖХ, которая может быть оснащена ELSD или нет. Условия ЖХ-МС (низкое значение pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,0 × 50 мм 3,0 мкм, 110 Å; градиент: 5-95% В в течение 1,5 мин, а затем 95% В в течение 0,5 мин; температура колонки: 50 °С +/- 10 °С; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем впрыска 1 мкл; растворитель А: деионизированная вода с 0,1% НСООН; растворитель В: АСН с 0,1% муравьиной кислоты; длина волны 200-400 нм и 212-216 нм. Если ВЭЖХ оснащена ELSD, настройки являются следующими: температура испарителя 45 °С, температура распылителя 40 °С и расход газа 1,6 ст.л/мин.

Альтернативные условия ЖХ-МС (высокий pH): колонка: колонка Waters xBridge® C18 2,1 × 50 мм, 3,5 мкм; градиент: 5-95% В за 1,5 мин, затем 95% В за 0,50 мин; температура колонки: 50 °С +/- 10 °С; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем впрыска 1 мкл; растворитель А: 10 мМ NH₄HCO₃, pH 9; растворитель В: АСН; длина волны: 200-400 нм и 212-216 нм; при наличии ELSD: температура испарителя 45 °С, температура распылителя 40 °С и расход газа 1,60 ст.л/мин.

Получение 1

Соль (2S)-1-бензгидрил-2-метилазетидин [(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксо-норборнан-1-ил] метансульфоновой кислоты



Трехгорлую круглодонную колбу на 2000 мл соединяли с капельной воронкой, впускным отверстием для азота и переходником для термометра. Сосуд продували азотом и добавляли (3R)-бутан-1,3-диол (25 г, 277,4 ммоль), DIPEA (127 мл, 731 ммоль) и АСН (556 мл). Остужали до -30 °С. Добавляли ангидрид трифторметансульфоновой кислоты (101 мл, 601 ммоль) по каплям в течение 3 часов так, чтобы внутренняя температура поддерживалась от -35 до -30 °С. После завершения добавления перемешивали в течение 10 минут при

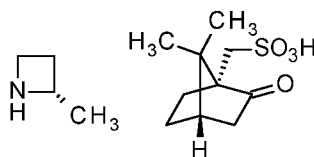
температуре от -35 до -30 °С. Добавляли ангидрид трифторметансульфоновой кислоты (1,9 мл, 11 ммоль) по каплям в течение 5 минут так, чтобы внутренняя температура поддерживалась от -35 до -30 °С. После завершения добавления перемешивали в течение 10 минут при температуре от -35 до -30 °С. Добавляли DIPEA (127 мл, 731 ммоль) по каплям в течение 15 минут так, чтобы внутренняя температура поддерживалась от -35 до -30 °С. После завершения добавления перемешивали в течение 10 минут при температуре от -35 до -30 °С.

В отдельной колбе в атмосфере азота растворяли аминодифенилметан (48,0 мл, 270 ммоль) в ACN (49 мл, 935 ммоль), и полученный раствор переносили в капельную воронку. Раствор амина по каплям добавляли к холодному трифлату в течение 40 минут, чтобы внутренняя температура поддерживалась в пределах от -20 до -35 °С. После завершения добавления перемешивали в течение 30 мин при температуре от -35 до -30 °С. Реакционную смесь переносили на водяную баню и позволяли ей медленно нагреться в течение 30 мин. Баню убрали, и позволяли реакционной смеси нагреться до комнатной температуры в течение 30 мин. Сосуд переносили в колбонагреватель, и реакционную смесь нагревали до 45 °С в течение 30 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь выливали в 1200 мл воды и экстрагировали толуолом (400 мл x 3). Экстракты объединяли, промывали водой, насыщ. водн. раствором NaCl, сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Материал сушили под вакуумом в течение ночи. Остаток растворяли в ДХМ (400 мл). Готовили подушку из диоксида кремния на воронке со спеченным слоем и уравнивали ее смесью гептан/EtOAc 1:1. Загружали раствор продукта на подушку из диоксида кремния и промывали с применением 1600 мл смеси гептан/EtOAc 1:1. Фильтрат концентрировали для получения красного масла. Масло растворяли в MeOH (250 мл), и колбу помещали на водяную баню (~10 °С). Частями добавляли L(-)-камфорсульфоновую кислоту (61,6 г, 265 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 20 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 15 минут, и затем концентрировали на роторном испарителе до получения коричневой пены. Пену сушили на вакуумном насосе в течение 2 ч. Пену растворяли в 130 мл ДХМ. Капельную воронку присоединяли к колбе. С помощью воронки медленно добавляли 1100 мл EtOAc к перемешиваемому раствору. Полученную смесь переносили в химический стакан на 4000 мл и перемешивали на воздухе в течение ночи. Стакан охлаждали на ледяной бане в течение 10 мин. Осадок собирали в воронку со спеченным слоем вакуумной фильтрацией, промывая минимальным количеством ледяного EtOAc. Твердое вещество сушили на спеченном слое в течение 2 часов. Полученное белое твердое вещество растворяли в минимальном количестве

ДХМ, переносили в химический стакан на 2000 мл и затем медленно разбавляли посредством EtOAc, пока прозрачный раствор не становился мутным. Суспензию перемешивали в течение 4 ч на открытом воздухе. Твердые вещества собирали фильтрованием под вакуумом с применением воронки со спеченным слоем и сушили на спеченном слое в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (111,8 г, 238,06 ммоль, выход 86%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, d_6 -ДМСО): 10,54-10,47 (m, 1H), 7,61 (d, $J = 7,3$ Гц, 5H), 7,47-7,37 (m, 7H), 5,85 (d, $J = 10,3$ Гц, 1H), 4,68-4,61 (m, 1H), 3,91-3,83 (m, 2H), 3,37 (s, 8H), 2,99 (d, $J = 14,6$ Гц, 1H), 2,77-2,68 (m, 1H), 2,51-2,44 (m, 4H), 2,30-2,16 (m, 2H), 1,91-1,81 (m, 2H), 1,42-1,28 (m, 3H), 1,08 (s, 3H), 1,01 (d, $J = 6,6$ Гц, 3H), 0,77 (s, 4H); >98% ee [ВЭЖХ: Chiralcel OJ (10 см x 4,6 мм, 5 мкм), 5 мл/мин, 40 °C изократический 10% EtOH (0,2% $i\text{PrNH}_2$)/CO₂].

Получение 2

Соль [(1R,4S)-7,7-Диметил-2-оксо-норборнан-1-ил] метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия



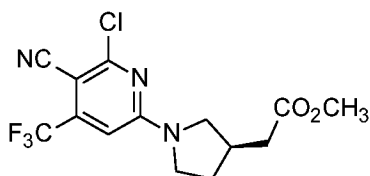
В сосуд Парра объемом 2250 мл добавляли 20% масс. $\text{Pd}(\text{OH})_2$ на угле (6,62 г). Бутылку продували азотом, и добавляли 250 мл MeOH. К полученной суспензии медленно добавляли соль (2S)-1-бензгидрил-2-метилазетидин[(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксо-норборнан-1-ил]метансульфоновой кислоты (111 г, 236 ммоль), растворенную в 250 мл MeOH. Сосуд закупоривали. Продуvalи азотом, затем водородом, и повышали давление до 60 PSI. Энергично встряхивали реакционный сосуд в смесительном аппарате Парра в течение 15 ч при комнатной температуре. Сосуд продували азотом, и затем фильтровали реакционную смесь через слой целита, промывая MeOH. Фильтрат концентрировали с получением белого твердого вещества, и сушили под вакуумом. Твердое вещество суспендировали в 780 мл смеси МТВЕ/EtOAc 1:1, и смесь нагревали до 65 °C в течение 20 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Твердые вещества собирали посредством фильтрации. Твердые вещества суспендировали в 380 мл МТВЕ и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Белое твердое вещество собирали посредством фильтрации с получением указанного в заголовке соединения (41,5 г,

136,78 ммоль, выход 58%). ^1H ЯМР (400 МГц, d_6 -ДМСО): 8,68-8,55 (m, 1H), 4,51-4,42 (m, 1H), 3,91-3,75 (m, 1H), 3,36 (s, 3H), 2,91 (d, $J = 14,6$ Гц, 1H), 2,69-2,61 (m, 1H), 2,52-2,46 (m, 2H), 2,28-2,22 (m, 1H), 2,17-2,10 (m, 1H), 1,96 (t, $J = 4,5$ Гц, 1H), 1,89-1,79 (m, 1H), 1,43 (d, $J = 6,7$ Гц, 2H), 1,36-1,26 (m, 1H), 1,05 (s, 2H), 0,75 (s, 2H).

5

Получение 3

Метил 2-[(3R)-1-[6-хлор-5-циано-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]ацетат

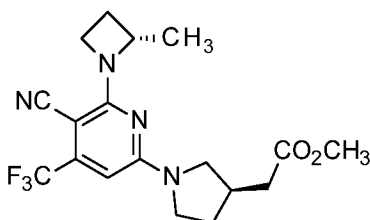


В круглодонную колбу добавляли 3-циано-2,6-дихлор-4-(трифторметил)пиридин (123 ммоль, 29,6 г) и EtOH (230 мл). Смесь охлаждали до 0°C . Добавляли NaHCO_3 (368 ммоль, 31 г), после которого добавляли раствор гидрохлорида метил (R)-пирролидин-3-ацетата (23 г, 123 ммоль) в EtOH (230 мл). Полученной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры в течение ночи. Реакционную смесь упаривали досуха на роторном испарителе. Добавляли воду (200 мл) и экстрагировали посредством МТВЕ (2 x 200 мл). Экстракты объединяли и упаривали досуха. Очищали хроматографией на силикагеле с применением гексана/МТВЕ (градиент от 20 до 70%), с получением указанного в заголовке соединения (34,7 г, 99,89 ммоль, выход 81%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 348,0, 350,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20

Получение 4

Метил 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]ацетат



В круглодонную колбу добавляли метил 2-[(3R)-1-[6-хлор-5-циано-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]ацетат (25,5 г, 73,3 ммоль), соль [(1R, 4S)-7,7-диметил-2-оксо-норборнан-1-ил] метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия (88,0 ммоль, 26,7 г), MeOH (255

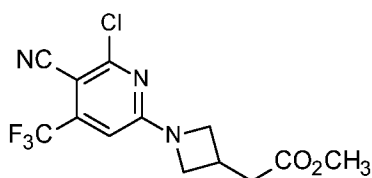
25

мл), и NaHCO_3 (220 ммоль, 18,5 г). Смесь перемешивали при 65 °С в течение 16 ч. Добавляли соль [(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксо-норборнан-1-ил]метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия (22,0 ммоль, 6,68 г) и NaHCO_3 (147 ммоль, 12,3 г), и продолжали перемешивание в течение 32 часов. Растворитель удаляли на роторном испарителе. К остатку добавляли воду (300 мл) и экстрагировали посредством МТВЕ (2 x 200 мл). Экстракты объединяли и сушили над безводным MgSO_4 , фильтровали через силикагель и концентрировали досуха с получением указанного в заголовке соединения (28,0 г, 73,2 ммоль, выход 99%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 383,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10

Получение 5

Метил 2-[1-[6-хлор-5-циано-4-(трифторметил)-2-пиридил]азетидин-3-ил]ацетат



15

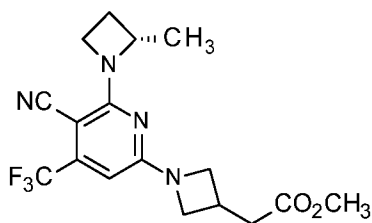
К раствору 3-циано- 2,6-дихлор-4-(трифторметил)пиридина (500 мг, 2,03 ммоль) в EtOH (15 мл) добавляли NaHCO_3 (0,549 г, 6,51 ммоль) и соль метил 2-(азетидин-3-ил) ацетат трифторуксусной кислоты (0,494 г, 2,03 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли насыщенным водным раствором NaCl (30 мл). Смесь экстрагировали посредством EtOAc (20 мл x 3). Экстракты объединяли и промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, проводя элюирование посредством EtOAc в петролейном эфире (градиент 0-30%), с получением указанного в заголовке соединения (470 мг, 1,41 ммоль, выход 66%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z) = 333,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20

Получение 6

25

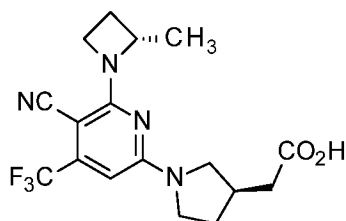
Метил 2-[1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]азетидин-3-ил]ацетат



К раствору метил 2-[1-[6-хлор-5-циано-4-(трифторметил)-2-пиридил]азетидин-3-ил]ацетата (200 мг, 0,569 ммоль) в EtOH (6 мл) добавляли NaHCO₃ (0,173 г, 2,05 ммоль) и соль [(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксо-норборнан-1-ил]метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия (0,194 г, 0,626 ммоль). Смесь нагревали до 80 °С в течение 16 ч. Смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (40 мл x 3). Экстракты объединяли и промывали насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0%-10%, EtOAc в петролейном эфире) с получением указанного в заголовке соединения (176 мг, 0,46 ммоль, выход 77%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 383,1 [M+H]⁺.

Пример 1

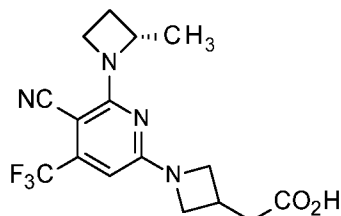
2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]уксусная кислота



В круглодонную колбу добавляли метил 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]ацетат (26,5 г, 69,3 ммоль), MeOH (265 мл), и 2 М водн. раствор NaOH (416 ммоль, 208 мл). Смесь перемешивали при 60 °С в течение 3 ч. Охлаждали до комнатной температуры, и MeOH удаляли на роторном испарителе. Водную фазу подкисляли до pH 3-4 с помощью концентрированного водного раствора HCl. Промывали посредством EtOAc (400 мл). Органический слой промывали водой (200 мл), сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали досуха с получением указанного в заголовке соединения (22,5 г, 61,11 ммоль, выход 88%) в форме белой пены. ЭР/МС (m/z): 369,2 [M+H]⁺.

Пример 2

2-[1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]азетидин-3-ил]уксусная кислота



- 5 К смеси метил 2-[1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]азетидин-3-ил]ацетата (176 мг, 0,478 ммоль) в ТГФ (5,00 мл) и воды (1,00 мл) добавляли LiOH (0,04 г, 0,955 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Разбавляли посредством EtOAc (4 мл), и водный слой экстрагировали посредством EtOAc (2 мл x 3). Органические экстракты объединяли и
- 10 промывали насыщенным водным раствором NaCl (3 мл x 2), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (128 мг, 0,36 ммоль, выход 78%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z) 354,9 [M+H]⁺.

Методы анализа

15 Анализ активности фермента КНК для КНК-С человека и КНК-А человека

- Собственная активность соединений может быть измерена с помощью ферментативного анализа, которым определяют продукцию F1P. Соединения готовили в ДМСО и тестировали с применением 10-точечной кривой концентрации, с получением 3-кратных серийных разведений соединений в 96-луночном планшете в диапазоне от 20 мкМ
- 20 до 1,02 нМ. Фермент готовили в буфере для анализа [50 mM 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота (HEPES), 10 mM хлорид калия, 100 mM хлорид магния, 2 mM трис(2-карбоксиэтил) фосфин (ТСЕР), 0,01 % n-октилглюкозида] и инкубировали с соединениями при комнатной температуре в течение 15 мин. Реакцию проводили в объемах 100 мкл, содержащих концентрации субстрата фруктозы (250 мкМ для анализа КНК-С и 1,25
- 25 мМ для анализа КНК-А) и АТФ (150 мкМ для обеих изоформ); которые дополнительно инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем реакцию останавливали добавлением стоп-буфера; состоящего из 0,2% муравьиной кислоты и 1 мкг/мл внутреннего стандарта ¹³C₆-фруктозо-6-фосфата (¹³C₆-F6P). Планшеты хранили при -20 °C до анализа RapidFire MS.

Анализ RapidFire MS для количественного определения F1P:

Автоматическая экстракционная система Agilent 300 RapidFire (Agilent, Санта-Клара, Калифорния) с тремя четвертичными насосами для ВЭЖХ соединена с трехквадрупольным масс-спектрометром Agilent 6495 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния),
 5 оборудованным источником ионизации электрораспылением (ИЭР). Система RapidFire Mass Spec оснащена многоразовым картриджем RapidFire C18 (тип C) для твердофазной экстракции (SPE) (G9205A).

Растворитель А, применяемый для загрузки и промывки образца, представляет собой 6 мМ октиламин (Acros Organics 129495000), доведенный до pH 5,0 с помощью уксусной
 10 кислоты. Растворитель В, применяемый для элюирования образца, представляет собой 20% воды в ACN, содержащем 0,1% муравьиной кислоты. Образцы последовательно анализировали посредством отбора 10 мкл на заборную петлю под вакуумом непосредственно из многолуночных планшетов. 10 мкл образца загружали в картридж C18 и промывали с применением растворителя А при скорости потока 1,25 мл/мин в течение 5000
 15 мс. Удерживаемый аналит элюировали в масс-спектрометр с применением растворителя В при скорости потока 1,25 мл/мин в течение 5000 мс. Систему повторно уравнивали с применением растворителя А при скорости потока 1,25 мл/мин. в течение 2000 мс.

Трехквадрупольный масс-спектрометр оснащен источником ИЭР, и аналиты контролировали с помощью мониторинга выбранной реакции (SRM) в отрицательном
 20 режиме [М-Н]⁻. F1P контролировали при m/z 259,02/96,9, и ¹³C₆-фруктоза-6-фосфат контролировали при m/z 264,99/97. Значения отношения площадей для F1P рассчитывали с применением ¹³C₆-фруктоза-6-фосфата в качестве внутреннего стандарта.

Соединения примеров 1 и 2 тестировали, как описано выше:

25

Таблица 1

Номер примера	hKHK-C IC ₅₀ (нМ)	hKHK-A IC ₅₀ (нМ)
1	9	19
2	27	37

Данные результаты демонстрируют, что соединения примеров 1 и 2 ингибируют ферментативную активность как КНК-С, так и КНК-А.

Анализ клеточной активности КНК

- Эффективность можно измерить с помощью клеточного анализа ингибирования превращения фруктозы в F1P клеточной КНК. Клетки HepG2 высевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток в среде для выращивания [среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, 10% инактивированная нагреванием фетальная бычья сыворотка (НФБС), 1 × пенициллин/стрептомицин] и оставляли для прикрепления в течение ночи в инкубаторе при 37 °С. Среду для выращивания промывали и заменяли аналитической средой, состоящей из среды Gibco OptiMEM 1 с пониженным содержанием сыворотки, 0,1% казеина, 8,33 мМ D-фруктозы-¹³C₆ и соединения в концентрациях от 100 мкМ до 0,0051 мкМ (10-точечная кривая концентрации). Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 3 ч, после чего среду для анализа откачивали из лунок для клеток. Затем к клеткам добавляли останавливающий раствор, состоящий из 80% метанола, 2 мМ ацетата аммония и 50 нг/мл фруктозо-6-фосфата-¹³C₆. Планшеты хранили при -20 °С до анализа RapidFire MS (описанного выше).
- Соединения примеров 1 и 2 тестировали, как описано выше:

Таблица 2

Номер примера	HepG2 IC ₅₀
1	127
2	316

- Данные результаты демонстрируют, что соединения примеров 1 и 2 ингибируют метаболизм фруктозы до F1P.

- Жидкостной хроматографический метод с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) для проведения фармакокинетических анализов: Образцы экстрагировали с помощью осаждения белка путем добавления 180 мкл MeOH:ACN (1:1, об./об.), содержащего внутренний стандарт, и 25 мкл (образцы грызунов) или 50 мкл (образцы не грызунов) плазмы. Затем образцы разбавляли смесью MeOH:вода (1:1, об./об.) для получения концентраций в пределах диапазона стандартной кривой. Разбавленные образцы анализировали с помощью ЖХ-МС/МС с применением тройного квадрупольного масс-спектрометра Sciex API 4000 (Applied Biosystems/MDS; Foster City, CA), оборудованного интерфейсом TurboIonSpray, и работающего в режиме положительных

ионов. Анализируемые вещества разделяли хроматографически с применением колонки Javelin Thermo Betasil C18 5 мкм 20 x 2,1 мм (образцы грызунов) или колонки Advantage ECHIELON C18 4 мкм 20 мм x 2,1 мм (образцы не грызунов). Условия ЖХ представляли собой следующие: вода/1 М бикарбонат аммония (2000:10, об./об.) (Подвижная фаза А) и

5 МеОН/1 М бикарбонат аммония, (2000:10, об./об.) (Подвижная фаза В).

Фармакокинетика у мышей

Фармакокинетические свойства *in vivo* и участие переносчика OATP1A/1B в фармакокинетике в Примере 1 продемонстрированы на мышах FVB дикого типа и мышах с

10 выключенным геном OATP1A/1B (Taconic # 10707) (натошак; n = 4/генотип). Пример 1 вводили однократно внутривенно (IV; 1 мг/кг; объем 1 мл/кг) в носителя. Кровь собирали у каждого животного через 0, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после введения дозы. Печень, селезенку и поджелудочную железу собирали, взвешивали и перфузировали через 24

15 часа после введения дозы. Концентрации в плазме и ткани Примера 1 определяли способом ЖХ-МС/МС, как описано выше.

У мышей FVB пример 1 имел период полураспада 5,43 часа, средний клиренс 6,91 мл/час/кг, объем распределения 2,74 л/кг, со средним коэффициентом распределения несвязанной формы в печени ($K_{руи}$) 67,5. У мышей с выключенным геном OATP1A/1B пример 1 имеет период полувыведения 9,36 часа, средний клиренс 1,34 мл/час/кг, объем

20 распределения 0,986 л/кг, со средним коэффициентом распределения несвязанной формы в печени ($K_{руи}$) 24,2. Эти данные показывают, что OATP участвует в захвате печенью соединения примера 1 у мышей и что участие этого переносчика влияет на клиренс.

Фармакокинетика у собак

25 Фармакокинетические свойства примера 1 *in vivo* продемонстрированы на собаках породы бигль (после кормления, n = 3-4). Пример 1 вводили однократно перорально (РО; 3 мг/кг; объем 2 мл/кг) или внутривенно (IV; 1 мг/кг; объем 1 мл/кг) в носителя. Кровь

отбирали у каждого животного при 0, 0,03 (только IV группа), 0,08 (IV), 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32 (IV), 48 (IV) и 72 (IV) ч после введения дозы. Концентрации в плазме для примера

30 1 определяли методом ЖХ-МС/МС, как описано выше.

Для пероральных доз средний период полувыведения из примера 1 составлял 6,9 часа, и биодоступность составляла ~93%. Для внутривенных доз средний период полувыведения примера 1 составлял 7,4 часа, и средний клиренс составлял 2,52 мл/час/кг при низком объеме

распределения (1,33 л/кг). Эти данные показывают, что пример 1 имеет низкий общий клиренс, низкий объем распределения и высокую биодоступность при пероральном введении собакам.

5 Характеристика основных путей выведения *in vivo* продемонстрирована с помощью канюлированных желчных протоков (BDC) собак породы бигль (после кормления; n = 3). Пример 1 вводили однократно внутривенно (IV; 1 мг/кг; объем 1 мл/кг) в носителя. Кровь собирали у каждого животного через 0, 0,033, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 и 72 часа после введения дозы. Желчь собирали у каждого животного через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 32, 48 и 72 часа после введения дозы. Мочу собирали через 12, 24, 48 и 72 часа, и кал
10 собирали через 24, 48 и 72 часа после введения дозы. Концентрации в плазме, желчи, моче и кале из Примера 1 определяли методом ЖХ-МС/МС, как описано выше.

Средний период полувыведения примера 1 составлял 2,9 часа, и средний клиренс составлял 4,69 мл/час/кг при низком объеме распределения (0,546 л/кг). Уровни примера 1 в моче являются незначительными, и ~10% введенной внутривенной дозы выводится с
15 желчью. Эти данные показывают, что пример 1 выводится через почки и желчь в незначительном количестве. В целом, период полувыведения у собак с канюлированными желчными протоками, 2,9 часа, быстрее, чем период полувыведения, определенный у интактных собак, 7,4 часа, что свидетельствует о энтерогепатической рециркуляции.

20 Фармакокинетика у яванских макак

Фармакокинетические свойства примера 1 *in vivo* продемонстрированы на яванских макаках. Соединения вводили однократно (перорально; 10 мг/кг; объем 5 мл/кг) в носителя. Кровь собирали у каждого животного через 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48 и 72 ч после введения дозы. Концентрации в плазме для примера 1 определяли методом ЖХ-МС/МС, как
25 описано выше.

Средний период полувыведения примера 1 составлял 15,3 часа. Эти данные показывают, что пример 1 является биодоступным при пероральном введении и медленно выводится у обезьян.

30 Внутренний клиренс в гепатоцитах человека (-/+ АВТ)

Данный способ предназначен для определения метаболического клиренса *in vitro* по истощению субстрата в гепатоцитах. Инкубирование в присутствии и в отсутствие АВТ, ингибитора фермента ран-СYP450, применяли для оценки роли в метаболизме,

опосредованном CYP. Криоконсервированные гепатоциты человека размораживали при 37 °С, центрифугировали и восстанавливали в поддерживающей среде для гепатоцитов до плотности 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В предварительно нагретый 96-луночный планшет добавляли 196 мкл суспензии гепатоцитов в каждую лунку. Клетки предварительно инкубировали с АВТ и без него следующим образом: для предварительного инкубирования с АВТ добавляли 2 мкл 100 мМ раствора АВТ (2 мкл среды без АВТ добавляли к контрольным образцам), и планшет инкубировали при 37 °С в течение 30 мин при постоянном встряхивании (~600 об/мин). После этого добавляли 2 мкл 30 мкМ исходного раствора исследуемого вещества, и через 0, 15, 30, 60, 120, 240 мин отбирали аликвоты по 20 мкл и гасили путем переноса в АСН, содержащий внутренний стандарт. После центрифугирования при 4000 об/мин в течение 30 мин концентрацию супернатанта определяли с помощью ЖХ-МС/МС. Клиренс рассчитывали по наклону % оставшегося соединения с течением времени.

Клиренс примера 1 ингибируется АВТ на ~12% в гепатоцитах человека, что позволяет предположить ограниченное участие ферментов CYP в печеночном клиренсе примера 1.

Ингибирование OATP1B1 и OATP1B3

Клетки OATP1B1, OATP1B3 и векторный контроль (VC) выращивали в 5% CO₂ при 37 °С во влажной атмосфере в среде DMEM с добавлением 10% ФБС, 50 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл бластицидина. Клетки высевали в 24-луночные планшеты BioCoat Poly-D-Lysine. Клетки обрабатывали 5 мМ бутирата натрия в среде DMEM с добавками за 24 ч до эксперимента. Клеточные культуры дважды промывали предварительно нагретым ФБР перед экспериментом. После отмывки все типы клеток инкубировали в течение 30 минут при 37 °С в 200 мкл буфера, буфера с изменяющейся концентрацией тестируемого вещества или с подходящим ингибитором положительного контроля. На основе предварительных данных тестировали концентрации от 0,025 до 12,5 мкМ для OATP1B1 и от 0,20 до 100 мкМ для OATP1B3 (номинальные). В начале предварительного инкубирования удаляли 50 мкл буфера для определения концентраций исследуемых веществ в лунках с помощью ЖХ-МС/МС. По истечении прединкубационного периода буфер удаляли. Эксперименты начинали с добавления 200 мкл раствора субстрата (всего 400 нМ розувастатина, включая 1,4 нМ меченного тритием розувастатина). Инкубирование проводили с ингибитором и без него. Ингибитор положительного контроля, применяемый для каждой клеточной линии, представлял собой 50 мкМ рифамицина SV. Эксперименты проводили в течение 1 мин при 37 °С, при которой реакцию останавливали, и промывали добавлением 1000 мкл ледяного

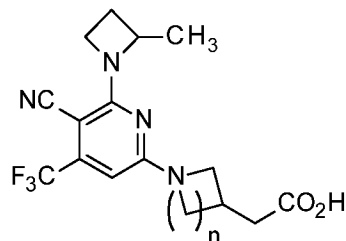
ФБР на лунку. Затем содержимое каждой лунки откачивали, и их дважды промывали ледяным ФБР. Клетки в каждой лунке лизировали в 400 мкл 1% Triton X 100 в ФБР (по объему). Образцы отбирали из каждой лунки из планшетов для подсчета радиоактивности, и концентрацию белка в каждой лунке определяли методом с бицинхониновой кислотой.

- 5 Значения IC_{50} определяли путем подбора данных с помощью GraphPad Prism. Перед установкой номинальные концентрации преобразовали в измеренные.

Пример 1 ингибировал ОАТР1В1 сильнее, чем ОАТР1В3, со значениями IC_{50} 0,12 и 5,5 мкМ, соответственно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы:



Формула I,

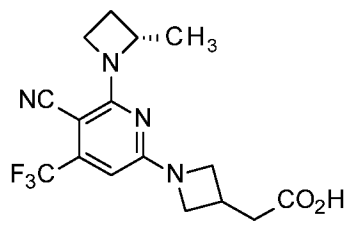
где n составляет 1 или 2;

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что n составляет 1, или его

фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п. 2, отличающееся тем, что соединение представляет собой:

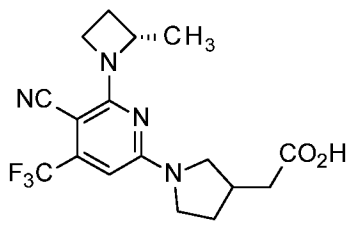


или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что n составляет 2, или его

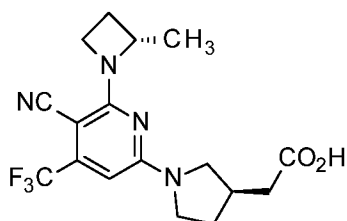
фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по п. 4, отличающееся тем, что соединение представляет собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Соединение по п. 5, отличающееся тем, что соединение представляет собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

5

7. Способ лечения диабета 2 типа у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6, или его фармацевтически приемлемой соли.

- 10 8. Способ лечения сердечной недостаточности у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6, или его фармацевтически приемлемой соли.

- 15 9. Способ лечения диабетической болезни почек у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6, или его фармацевтически приемлемой соли.

- 20 10. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп. 1-6, или его фармацевтически приемлемой соли.

11. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-6 для применения в терапии.

- 25 12. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-6 для применения в лечении диабета 2 типа.

13. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-6 для применения в лечении сердечной недостаточности.

14. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-6 для применения в лечении диабетической болезни почек.

5 15. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп. 1-6 для применения в лечении неалкогольного стеатогепатита.

10 16. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп. 1-6 с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

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