

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191521 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.09.10

(22) Дата подачи заявки
2019.12.20

(51) Int. Cl. C07J 9/00 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
C07J 43/00 (2006.01)
C07J 31/00 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07J 51/00 (2006.01)
C07J 71/00 (2006.01)
C07J 11/00 (2006.01)

(54) 2-ФТОРИРОВАННЫЕ ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 1820887.6

(32) 2018.12.20

(33) GB

(86) PCT/GB2019/053665

(87) WO 2020/128514 2020.06.25

(71) Заявитель:
ЭнЗедПи ЮКей ЛИМИТЕД;
ДЭ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
САУТГЕМПТОН (GB)

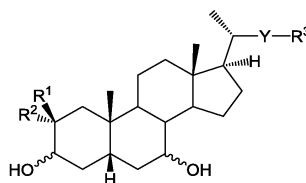
(72) Изобретатель:

Уэймаут-Уилсон Александер Чарльз,
Линкло Бруно Ян Пол, Пэкер
Джемма, Уоттс Джозеф, Мортибойз
Хизер, Бэндманн Оливер, Хэстингз
Кристофер (GB)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) 2-Фторированные желчекислотные соединения общей формулы (I)



(I),

где по меньшей мере один из R^1 и R^2 представляет собой F, а другой выбран из H и F, и где R^3 является таким, как здесь определено; полезные в лечении и предупреждении нейродегенеративных расстройств, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

A1

202191521

202191521

A1

PCT/GB2019/053665

МПК: C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07J 43/00 (2006.01)

C07J 51/00 (2006.01)

C07J 31/00 (2006.01)

C07J 71/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

C07J 11/00 (2006.01)

2-ФТОРИРОВАННЫЕ ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Настоящее изобретение относится к новым соединениям, которые применяют в лечении нейродегенеративных расстройств. В частности, изобретение относится к производным желчных кислот, к фармацевтическим композициям, содержащим их, способам их получения и к применению этих соединений в лечении или предупреждении нейродегенеративных расстройств.

Нейродегенеративные заболевания представляют собой группу расстройств центральной нервной системы и включают болезнь Паркинсона, легкие когнитивные нарушения, деменцию (включая болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви), болезнь Гентингтона и боковой амиотрофический склероз (болезнь двигательных нейронов). Заболеваемость нейродегенеративными заболеваниями увеличивается с возрастом, и поэтому такие состояния становятся растущей проблемой в обществах, где средний возраст населения увеличивается. В настоящее время не существует лекарства от любого из этих заболеваний, хотя имеются некоторые лекарственные средства, которые облегчают симптомы болезни Паркинсона, а также некоторые виды когнитивных нарушений и деменции.

Симптомами болезни Паркинсона являются тремор покоя, брадикинезия и ригидность, и эти симптомы вызваны нейродегенерацией и потерей дофаминергических нейронов. Имеется множество доказательств, указывающих на то, что существует сильная связь между митохондриальной дисфункцией и болезнью Паркинсона. В тканях пациентов с болезнью Паркинсона был обнаружен умеренный дефицит активности НАДН-дегидрогеназы (комплекс I) в цепи переноса электронов митохондрий, а ряд белков, связанных с семейной формой болезни Паркинсона, являются либо митохондриальными белками, либо ассоциированы с митохондриями.

Болезнь Альцгеймера приводит к прогрессирующим когнитивным нарушениям и характеризуется наличием внеклеточных нейритических бляшек и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков. Считают, что митохондриальная дисфункция приводит к

отложению β -амилоидных белков, которые являются основным компонентом нейритических бляшек, и к образованию нейрофибриллярных клубков.

Болезнь Гентингтона является наследственным прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием и характеризуется двигательными нарушениями, изменениями личности и снижением когнитивных функций. Патология болезни Гентингтона свидетельствует о связи с митохондриальной дисфункцией.

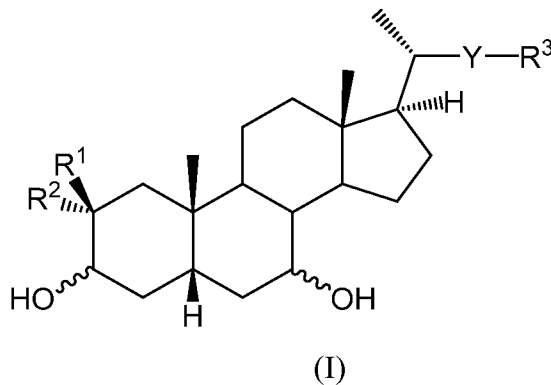
Также считают, что боковой амиотрофический склероз связан с митохондриальной дисфункцией. Это заболевание поражает двигательные нейроны центральной нервной системы, что приводит к мышечной слабости, атрофии и смерти в течение 2-3 лет после постановки диагноза.

Были предприняты попытки обнаружить соединения, которые позволяют лечить нейродегенеративные расстройства, и было разработано несколько соединений, мишенью которых являются митохондрии. Например, известно, что желчные кислоты, такие как UDCA (урсодезоксихолевая кислота), оказывают положительное воздействие на митохондриальную дисфункцию в тканях некоторых пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, в частности в тканях пациентов с болезнью Паркинсона с мутантным геном паркина (*parkin*) (Mortiboys et al, "Ursocholanolic acid rescues mitochondrial function in common forms of familial Parkinson's disease", *Brain*, **136**(10), 3038-3050 (2013)) и пациентами с болезнью Паркинсона с мутацией LRRK2^{G2019S} (Mortiboys et al, *Neurology*, **85**, 846-852 (2015)). Кроме того, известно, что желчные кислоты, такие как UDCA, оказывают положительное воздействие на фибробласты пациентов, страдающих как спорадической формой болезни Альцгеймера, так и семейной формой болезни Альцгеймера вследствие мутаций в гене PSEN1 (пресенилин) (Bell et al, "Ursodeoxycholic Acid Improves Mitochondrial Function and Redistributes Drp1 in Fibroblasts from Patients with either Sporadic or Familial Alzheimer's Disease." *Journal of Molecular Biology*, pii: S0022-2836(18)30987-2. 2018).

В WO 2014/036379, WO 2015/061421 и WO 2016/145216 сообщается, что желчные кислоты могут быть использованы в лечении нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона и боковой амиотрофический склероз. WO 2015/061421 относится к дейтерированным желчным кислотам, а WO 2016/145216 к фторированным желчным кислотам, особенно желчным кислотам, фторированным в 3- и/или 7-положениях.

Авторы настоящего изобретения при таком положении дел обнаружили, что некоторые фторированные желчные кислоты обладают превосходными свойствами восстановления митохондрий и особенно эффективны при лечении нейродегенеративных расстройств.

В настоящем изобретении предложено соединение общей формулы (I):



где

один из R^1 и R^2 представляет собой F, а другой из R^1 и R^2 представляет собой H или F;

Y представляет собой связь или C_{1-20} алкиленовую, C_{2-20} алкениленовую или C_{2-20} алкиниленовую линкерную группу;

R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $S(O)_2R^{12}$, $OS(O)_2R^{12}$, $S(O)_2OR^{12}$, $OS(O)_2OR^{12}$, $S(O)_2NR^{12}R^{13}$, $C(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $NHC(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $OP(O)(OR^{12})_2$, $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$ или $C(O)NR^{12}C(O)CH_2NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$;

каждый R^{12} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена, OR^{10} , $NR^{10}R^{11}$, R^{16} и арила;

каждый R^{10} и R^{11} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил;

R^{13} представляет собой H, C_{1-6} алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена и арила; или 3-8-членное карбоциклическое кольцо или гетероциклическое кольцо, где указанное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо возможно замещено одним или более чем одним заместителем, выбранным из $=O$ и R^{16} ; или фенил или 5-6-членное гетероарильное кольцо, где указанный фенил или гетероарильное кольцо возможно замещено заместителем R^{16} ; или

когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$ или $S(O)_2NR^{12}R^{13}$, R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 3-8-членное гетероциклическое

кольцо, которое возможно содержит один или более чем один дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S; и возможно замещено одним или более чем одним заместителем, выбранным из $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, C_{1-6} -алкила, группы $\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1-6}$ -алкил, $\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $=\text{O}$ и $=\text{N}-\text{OH}$; и возможно конденсировано с фенильной группой, которая не замещена или замещена одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена и нитро;

n равен 1, 2 или 3;

каждый R^{15} независимо представляет собой H или C_{1-6} -алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена, фенила и 5- или 6-членного гетероарила; 3-8-членную циклоалкильную группу; или группу R^{14} , где R^{14} представляет собой боковую цепь аминокислоты; или

когда n равен 2 или 3, две группы R^{15} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, и возможно с присутствующим между ними атомом углерода, могут объединяться с образованием $-(\text{CH}_2)_p-$, так что группа $[\text{CH}(\text{R}^{15})]_n$ представляет собой 3-8-членное карбоциклическое кольцо;

p равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

R^{16} выбран из $\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, группы $\text{S}(\text{O})_2(\text{C}_{1-6}\text{алкил})$, $\text{OS}(\text{O})_2\text{OH}$ и $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$;

или его фармацевтически приемлемая соль или его изотопная модификация.

Соединения общей формулы (I) применяют для лечения нейродегенеративных расстройств центральной нервной системы, включая болезнь Паркинсона, деменцию и боковой амиотрофический склероз.

Подробное описание изобретения

В настоящем описании, за исключением случаев, когда контекст требует иного из-за точно выраженной формулировки или необходимого значения, слово «содержит» или такие варианты, как «включает» или «содержащий», использованы во включающем смысле, то есть для указания наличия заявленных особенностей, но не исключения наличия или добавления дополнительных признаков в различных воплощениях изобретения.

Все публикации, включая патенты и заявки на патенты, процитированные в этом описании, но не ограничиваясь ими, включены здесь посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация была конкретно и отдельно указана для включения здесь посредством ссылки, как если бы она была полностью изложена.

В настоящей заявке термин «C₁₋₂₀алкил» относится к линейной или разветвленной, полностью насыщенной углеводородной группе, имеющей от 1 до 20 атомов углерода. Термин включает метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *втор*-бутил и *трет*-бутил. Другие алкильные группы, например C₁₋₁₂алкил, C₁₋₁₀алкил, C₁₋₈алкил, C₁₋₆алкил, C₁₋₅алкил, C₁₋₄алкил, C₁₋₃алкил или C₁₋₂алкил, являются такими, как определено выше, но содержат другое количество атомов углерода.

Термин «C₂₋₂₀алкенил» относится к линейной или разветвленной углеводородной группе, имеющей от 2 до 20 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Примеры алкенильных групп включают -CH=CH₂, -CH=CH(CH₃), -CH₂CH=CH₂, -CH=CHCH₃, -CH₂CH₂CH=CH₂, -CH₂CH=CH(CH₃)- и -CH₂CH=CH(CH₂CH₃). Другие алкенильные группы, например C₂₋₁₂алкенил, C₂₋₁₀алкенил, C₂₋₈алкенил, C₂₋₆алкенил, C₂₋₅алкенил, C₂₋₄алкенил или C₂₋₃алкенил, являются такими, как определено выше, но содержат другое количество атомов углерода.

Термин «C₂₋₂₀алкинил» относится к линейной или разветвленной углеводородной группе, имеющей от 2 до 20 атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Примеры алкинильных групп включают -C≡CH, -CH₂C≡CH, -C≡C-CH₃, -CH₂CH₂C≡CH, -CH₂C≡CCH₃ и -CH₂C≡C-CH₂CH₃. Другие алкинильные группы, например C₂₋₁₂алкинил, C₂₋₁₀алкинил, C₂₋₈алкинил, C₂₋₆алкинил, C₂₋₅алкинил, C₂₋₄алкинил или C₂₋₃алкинил, являются такими, как определено выше, но содержат другое количество атомов углерода.

Термин «алкилен» относится к прямой или разветвленной, полностью насыщенной углеводородной цепи. Подходящий алкилен представляет собой C₁₋₂₀алкилен, C₁₋₁₂алкилен, C₁₋₁₀алкилен, C₁₋₈алкилен, C₁₋₆алкилен, C₁₋₅алкилен, C₁₋₄алкилен, C₁₋₃алкилен или C₁₋₂алкилен. Примеры алкиленовых групп включают -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH(CH₃)-CH₂-, -CH₂CH(CH₃)-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH(CH₂CH₃)- и -CH₂CH(CH₂CH₃)CH₂-.

Термин «алкенилен» относится к прямой или разветвленной углеводородной цепи, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Соответственно алкенилен представляет собой C₂₋₂₀алкенилен, C₂₋₁₂алкенилен, C₂₋₁₀алкенилен, C₂₋₈алкенилен, C₂₋₆алкенилен, C₂₋₅алкенилен, C₂₋₄алкенилен или

С₂-3алкенилен. Примеры алкениленовых групп включают -CH=CH-, -CH=C(CH₃)-, -CH₂CH=CH-, -CH=CHCH₂-, -CH₂CH₂CH=CH-, -CH₂CH=C(CH₃)- и -CH₂CH=C(CH₂CH₃)-.

Термин «алкинилен» относится к прямой или разветвленной углеводородной цепи, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Соответственно алкенилен представляет собой С₂-20алкинилен, С₂-12алкинилен, С₂-10алкинилен, С₂-8алкинилен, С₂-6алкинилен, С₂-5алкинилен, С₂-4алкинилен или С₂-3алкинилен. Примеры алкиниленовых групп включают -C≡C-, -CH₂C≡C-, -C≡C-CH₂-, -CH₂CH₂C≡C-, -CH₂C≡CCH₂- и -CH₂C≡C-CH₂CH₂-.

Термины «арил» и «ароматический» относятся к циклической группе с ароматическим характером, имеющей от 6 до 14 кольцевых атомов углерода (если не оговорено особо, например от 6 до 10 кольцевых атомов углерода) и содержащей до трех колец. Если арильная группа содержит более одного кольца, не все кольца должны быть ароматическими по характеру. Примеры включают фенил, нафтил и антраценил, а также частично насыщенные системы, такие как тетрагидронафтил (например 1,2,3,4-тетрагидронафтил), инданил и инденил.

Термины «гетероарил» и «гетероароматический» относятся к циклической группе с ароматическим характером, имеющей от 5 до 14 кольцевых атомов (если не оговорено особо, например от 5 до 10 кольцевых атомов), содержащей по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S, и содержащей до трех колец. Если гетероарильная группа содержит более одного кольца, не все кольца должны быть ароматическими по характеру. Примеры включают пиридин, пиримидин, пиррол, тиофен, фуран, тиазол, оксазол, конденсированные системы, такие как индол, бензимидазол и бензотиофен; и частично насыщенные системы, такие как индолин и дигидробензофуран.

Термины «карбоциклический» и «карбоциклил» относятся к неароматической углеводородной кольцевой системе, содержащей от 3 до 10 кольцевых атомов углерода (если не оговорено особо), которая может являться конденсированной или мостиковой кольцевой системой и которая возможно содержит одну или более чем одну углерод-углеродную двойную связь. Примеры включают циклоалкильные группы, такие как циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил; и циклоалкенильные группы, такие как циклогексенил и циклогептенил; и мостиковые группы, такие как адамантил. Более предпочтительно, карбоциклильная группа

представляет собой моноциклическое полностью насыщенное (циклоалкильное) кольцо.

Термины «гетероциклический» и «гетероциклил» относятся к неароматической кольцевой системе, содержащей от 3 до 10 кольцевых атомов углерода (если не оговорено особо) и по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S, и которая может являться конденсированной или мостиковой кольцевой системой, и которая может быть полностью насыщенной или может содержать одну или более чем одну углерод-углеродную или углерод-азотную двойную связь. Примеры включают пиперидинил, морфолинил, тиоморфолинил, тиазолидинил, тетрагидротиофенил и тетрагидротиопиранил. Более предпочтительно гетероциклильная группа представляет собой полностью насыщенное моноциклическое кольцо.

Термин «галоген» относится к фтору, хлору, брому или йоду и к группам фтора, хлора, брома или йода.

Термин «C₁₋₆галогеналкил» относится к линейной или разветвленной алкильной группе, как определено выше, имеющей от 1 до 6 атомов углерода и замещенной одним или более чем одним атомом галогена, вплоть до пергалогенового замещения. Примеры включают трифторметил, хлорэтил и 1,1-дифторэтил. Другие галогеналкильные группы, например C₁₋₅галогеналкил, C₁₋₄галогеналкил, C₁₋₃галогеналкил или C₁₋₂галогеналкил, являются такими, как определено выше, но содержат другое количество атомов углерода.

Термин «боковая цепь аминокислоты» относится к боковой цепи природной аминокислоты, которая может представлять собой D-аминокислоту или L-аминокислоту, но более подходящей является D-аминокислота. Примеры природных аминокислот включают глицин, пролин, цистеин, аргинин, гистидин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, треонин, аспарагин, глутамин, аланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, тирозин и триптофан.

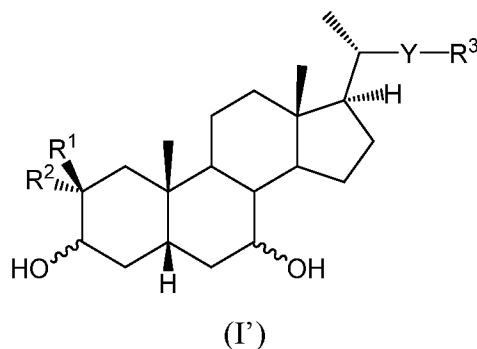
Термин «боковая цепь» относится к группировке $-Y-R^3$. В UDCA $-YR^3$ представляет собой $-CH_2CH_2-C(O)OH$, а ссылки на модифицированную боковую цепь относятся к группировкам $-YR^3$, отличным от этого.

Ссылки на заместитель «= O» относятся к атому кислорода, связанному двойной связью с соседним атомом, который обычно является атомом углерода или серы и который может представлять собой кольцевой атом. Примеры группировок, включающих заместитель «= O», включают $-C(O)-$, $-S(O)-$ и $-S(O)_2-$.

Соответствующие фармацевтически приемлемые соли соединений общей формулы (I) включают соли присоединения оснований, такие как соли натрия, калия, кальция, алюминия, цинка, магния и других металлов, а также холин, диэтаноламин, этаноламин, этилдиамин, меглумин и другие хорошо известные соли присоединения оснований, которые представлены в Paulekuhn *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6665-6672 (включен здесь посредством ссылки) и/или известны специалистам в данной области техники.

Термин «изотопная модификация» относится к меченым изотопами соединениям, которые идентичны соединениям, представленным формулой (I), за исключением того факта, что один или более чем один атом заменен атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, чаще всего встречающихся в природе, или в которых доля атома, имеющего атомную массу или массовое число, редко встречающегося в природе, была увеличена (причем последний метод называется «изотопным обогащением»). Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора, йода и хлора, такие как ^2H (дейтерий), ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{123}I or ^{125}I (e.g. ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{123}I или ^{125}I), которые могут представлять собой природные или не встречающиеся в природе изотопы.

В некоторых случаях соединение общей формулы (I) может представлять собой соединение формулы (I'):



где

один из R^1 и R^2 представляет собой F, а другой из R^1 и R^2 представляет собой H или F;

Y представляет собой связь или C_{1-20} алкиленовую, C_{2-20} алкениленовую или C_{2-20} алкиниленовую линкерную группу;

R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $S(O)_2R^{12}$, $OS(O)_2R^{12}$, $S(O)_2OR^{12}$, $OS(O)_2OR^{12}$, $S(O)_2NR^{12}R^{13}$, $C(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $NHC(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $OP(O)(OR^{12})_2$, $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$ или $C(O)NR^{12}C(O)CH_2NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$;

каждый R^{12} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой;

R^{13} представляет собой H, C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой, или 5- или 6-членное карбоциклическое кольцо, возможно замещенное заместителем R^{16} ; или

R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо, возможно содержащее дополнительный атом азота, возможно замещенное одним или более чем одним заместителем, выбранным из групп $CH_2C(O)OH$, $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $=O$ и $=N-OH$, и возможно конденсированное с фенильной группой, которая не замещена или замещена одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена и нитро;

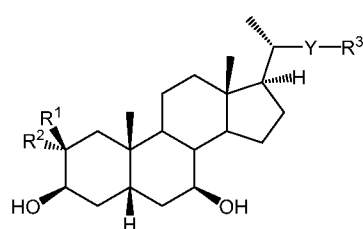
каждый R^{15} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой, или группу R^{14} , где R^{14} представляет собой боковую цепь аминокислоты;

n равен 1, 2 или 3;

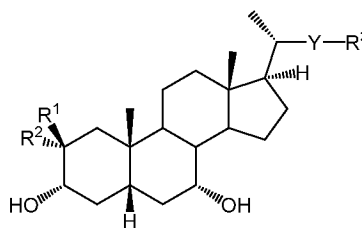
R^{16} выбран из $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $OS(O)_2OH$ и $P(O)(OH)_2$;

или его фармацевтически приемлемую соль или изотопную модификацию.

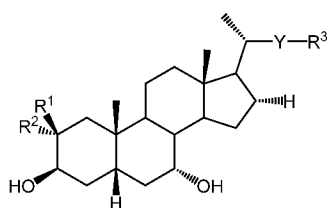
Соединение общей формулы (I) может представлять собой соединение общей формулы (IA), (IB), (IC) или (ID):



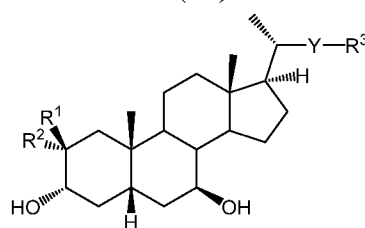
(IA)



(IB)



(IC)



(ID)

где R^1 , R^2 , Y и R^3 являются такими, как определено выше для общей формулы (I).

Некоторые особенно подходящие соединения по изобретению представляют собой соединения общей формулы (IA).

Другие подходящие соединения по изобретению представляют собой соединения общей формулы (IB).

Другие подходящие соединения по изобретению представляют собой соединения общей формулы (IC).

Другие подходящие соединения по изобретению представляют собой соединения общей формулы (ID).

В некоторых подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID) R^1 и R^2 оба представляют собой F.

В других подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), R^1 представляет собой F, а R^2 представляет собой H.

В других подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), R^1 представляет собой H, а R^2 представляет собой F.

Соединения, в которых R^1 и R^2 оба представляют собой F, являются особенно подходящими.

В соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), Y соответственно представляет собой связь, либо C_{1-15} алкиленовый линкер, либо C_{2-15} алкениленовый линкер. Предпочтительно, Y представляет собой связь, либо C_{1-12} , C_{1-10} , C_{1-8} , C_{1-6} , C_{1-4} , C_{1-3} или C_{1-2} алкиленовый линкер, либо C_{2-12} , C_{2-10} , C_{2-8} , C_{2-6} , C_{2-4} , C_{2-3} или C_2 алкениленовый линкер, и является незамещенным или замещенным ОН-группой.

В некоторых подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID) Y представляет собой связь, либо C_1 -залкиленовую, либо C_2 -залкениленовую линкерную группу. Соответственно, Y представляет собой C_1 -залкилен либо C_2 -залкенилен.

Предпочтительно, Y представляет собой связь или C_1 -залкиленовую линкерную группу. Более предпочтительно, Y представляет собой C_1 -залкиленовую линкерную группу.

Примеры особенно подходящих линкеров Y включают связь, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH(OH)-CH_2-$, $-CH=CH-$ или $-CH=C(CH_3)-$, в особенности связь, $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$,

-CH=CH- или -CH=C(CH₃)-, особенно -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH=CH- или -CH=C(CH₃)-, и особенно -CH₂CH₂-.

Как обсуждалось выше, в соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID) R³ представляет собой C(O)OR¹², C(O)NR¹²R¹³, S(O)₂R¹², OS(O)₂R¹², S(O)₂OR¹², OS(O)₂OR¹², S(O)₂NR¹²R¹³, C(O)NR¹²S(O)₂R¹³, NHC(O)NR¹²S(O)₂R¹³, OP(O)(OR¹²)₂, C(O)NR¹²[CH(R¹⁵)]_nR¹⁶ или C(O)NR¹²C(O)CH₂NR¹²[CH(R¹⁵)]_nR¹⁶.

В некоторых случаях в соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID) R³ предпочтительно представляет собой C(O)OR¹², OS(O)₂R¹², OS(O)₂OR¹², S(O)₂NR¹²R¹³, C(O)NR¹²S(O)₂R¹³, NR¹²C(O)NR¹²S(O)₂R¹³ or C(O)NR¹²[CH(R¹⁵)]_nR¹⁶; где R¹², R¹³, R¹⁵, n и R¹⁶ являются такими, как определено выше.

В этом случае более подходящими соединениями являются те, в которых R³ представляет собой C(O)OR¹², C(O)NR¹²CH(R¹⁴)C(O)OH или C(O)NR¹²CH(R¹⁵)CH(R¹⁵)S(O)₂OH, где R¹² и R¹⁴ являются такими, как определено выше, и R¹⁵ представляет собой H или C₁-алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой.

В других более подходящих соединениях R³ представляет собой C(O)OR¹², (C(O)N(R¹²)(R¹³)) или C(O)NR¹²[CH(R¹⁵)]_nR¹⁶; где R¹², R¹³, R¹⁵, R¹⁶ и n являются такими, как определено выше.

В соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), R¹² соответственно представляет собой H, C₁-алкил, который может быть незамещенным или замещенным, как описано выше, предпочтительно H, бензил или C₁-алкил, возможно замещенный R¹⁶ или N(R¹⁰)(R¹¹), особенно H, или метил, или этил, возможно замещенный R¹⁶ или N(R¹⁰)(R¹¹).

В некоторых соединениях, в которых R³ представляет собой C(O)NR¹²S(O)₂R¹³, NHC(O)NR¹²S(O)₂R¹³, C(O)NR¹²[CH(R¹⁵)]_nR¹⁶ или C(O)NR¹²C(O)CH₂NR¹²[CH(R¹⁵)]_nR¹⁶, R¹² предпочтительно представляет собой H, метил или этил, особенно H или метил.

В соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), R¹³, когда он присутствует, соответственно представляет собой 5- или 6-членный карбоцикл или гетероцикл, возможно замещенный R¹⁶ или =O, где заместители =O могут быть присоединены к кольцевому атому C или S; или фенил, возможно замещенный R¹⁶.

Альтернативно, в некоторых подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R³ представляет собой C(O)NR¹²R¹³ или S(O)₂NR¹²R¹³, R¹² и R¹³ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, могут образовывать 5- или 6-

членное гетероциклическое кольцо, возможно замещенное одним или более чем одним заместителем, выбранным из R^{16} и $=O$, и возможно содержащее один или более чем один дополнительный гетероатом, выбранный из O, N и S.

В соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), R^{16} , когда он присутствует, предпочтительно представляет собой $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $S(O)_2(C_{1-6}алкил)$ или $OS(O)_2OH$, особенно $C(O)OH$ или $S(O)_2OH$.

Когда R^{16} представляет собой $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $OS(O)_2OH$ или $P(O)(OH)_2$, соединение общей формулы (I), (IA), (IB), (IC) или (ID) может находиться в форме соли. Подходящими солями являются такие, как обсуждалось выше, но особенно подходят соли металлов, например соли натрия и калия, особенно соли натрия.

В некоторых подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$ или $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, где:

когда R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, каждый R^{12} независимо представляет собой H или $C_{1-6}алкил$, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена, OR^{10} , $NR^{10}R^{11}$, R^{16} и арила;

каждый R^{10} и R^{11} независимо представляет собой H или $C_{1-6}алкил$; или

когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$:

каждый R^{12} представляет собой H или $C_{1-6}алкил$, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена, OR^{10} и $NR^{10}R^{11}$;

каждый R^{10} и R^{11} независимо представляет собой H или $C_{1-6}алкил$; и

R^{13} представляет собой 1,1-тетрагидротиопиран-диоксид или 1,1-тетрагидротиофен-диоксид; или

R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5- или 6-членное кольцо, содержащее группировку SO_2 или замещенное $C(O)OH$; или

когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, R^{12} представляет собой H или метил, R^{15} представляет собой H, и либо

R^{16} представляет собой $C(O)OH$, и n равен 1; либо

R^{16} представляет собой $S(O)_2OH$, $S(O)_2(C_{1-6}алкил)$ или $OS(O)_2OH$; и n равен 2 или 3.

или его фармацевтически приемлемой соли или изотопной модификации.

В некоторых особенно подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID) R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$.

Соответственно, в этих соединениях R^{12} представляет собой H, или метил или этил, возможно замещенный R^{16} , и предпочтительно R^{12} представляет собой H, CH_2R^{16} или $-CH_2CH_2R^{16}$, где R^{16} является таким, как определено выше, но в особенности представляет собой $S(O)_2OH$. Более предпочтительно, R^{12} представляет собой H.

Особенно подходящими соединениями этого вида являются те, в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$, и их соли, как обсуждалось выше, например соли металлов, такие как соли натрия и калия, особенно соли натрия.

В соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), где R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, и R^{12} представляет собой H или C_1 -алкил (например метил или этил), замещенный R^{16} , где R^{16} представляет собой $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $OS(O)_2OH$ или $P(O)(OH)_2$, соединение может находиться в форме соли. Подходящими солями являются такие, как обсуждалось выше, но особенно подходят соли металлов, например соли натрия и калия, особенно соли натрия.

В других особенно подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID) R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$ и их солях, как обсуждалось выше, например солях металлов, такие как соли натрия и калия, особенно соли натрия.

В таких соединениях R^{12} предпочтительно представляет собой H, метил или метил, замещенный R^{16} , например $-CH_2C(O)OH$. В некоторых соединениях такого вида R^{12} представляет собой H; в других соединениях такого вида R^{12} представляет собой метил; в других соединениях такого вида R^{12} представляет собой $-CH_2R^{16}$. В этом случае R^{15} соответственно представляет собой H, и n соответственно равен 1, так что R^3 представляет собой $C(O)N(CH_2R^{16})_2$, а две группы R^{16} могут быть одинаковыми или различными, но предпочтительно являются одинаковыми и представляют собой, например $C(O)OH$.

Когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, это может быть группа $C(O)NR^{12}CH(R^{14})C(O)OH$ или группа $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, где R^{12} представляет собой H или C_1 -алкил, предпочтительно H или C_1 -алкил, особенно H или метил; n равен 2 или 3; каждый R^{15} представляет собой H или C_1 -алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой, предпочтительно H или C_1 -алкил и более предпочтительно H; и R^{16} представляет собой $S(O)_2OH$, $S(O)_2(C_1\text{-алкил})$ или $OS(O)_2OH$, особенно $S(O)_2OH$, $S(O)_2(\text{метил})$ или $OS(O)_2OH$, особенно $S(O)_2OH$.

Когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{14})C(O)OH$, R^{14} представляет собой, в частности, боковую цепь аминокислоты, выбранной из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина, то есть R^{14} представляет собой H, CH_3 , $CH(CH_3)_2$ или $CH(CH_3)(C_2H_5)$. Предпочтительно, R^{14} представляет собой H. Особенно подходящими группировками R^{12} являются такие, как определено выше. Когда R^{12} представляет собой H, и R^{14} представляет собой H, R^3 представляет собой конъюгат с глицином; а когда R^{12} представляет собой метил, а R^{14} представляет собой H, R^3 представляет собой конъюгат с *N*-метилглицином. Предпочтительно, R^{12} представляет собой H, а R^3 представляет собой конъюгат с глицином.

Когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, это может быть группа $C(O)NR^{12}CH(R^{15})CH(R^{15})S(O)_2OH$, где R^{14} представляет собой боковую цепь аминокислоты, и R^{15} представляет собой H или C_1 -алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой. Соединение может находиться в форме соли, как обсуждалось выше, например солей металлов, таких как соли натрия и калия, особенно соли натрия.

Когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{15})CH(R^{15})S(O)_2OH$, каждый R^{15} соответственно представляет собой H или C_1 -алкил. Предпочтительно, обе группировки R^{15} представляют собой H. Особенно подходящими группировками R^{12} являются такие, как определено выше, но в особенно подходящих соединениях R^{12} представляет собой H или метил. Когда R^{12} представляет собой H, и обе группировки R^{15} представляют собой H, R^3 представляет собой конъюгат с таурином. Когда R^{12} представляет собой метил, а обе группировки R^{15} представляют собой H, R^3 представляет собой конъюгат с *N*-метилтаурином.

В некоторых подходящих соединениях, в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, каждый R^{15} независимо представляет собой H или C_1 -алкил, возможно замещенный, как указано выше. Предпочтительно R^{15} представляет собой H или незамещенный C_1 -алкил, более предпочтительно H, метил или этил и особенно H.

Альтернативно, в соединениях, где R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, и n равно 2 или 3, две группы R^{15} могут объединяться с атомами углерода, к которым они присоединены, и возможно с находящимся между ними атомом углерода, если он присутствует, с образованием карбоциклического кольца, как указано выше. Предпочтительно, две группы R^{15} находятся на смежных

атомах углерода. Образованное таким образом карбоциклическое кольцо представляет собой 5-7-членное кольцо, например 6-членное кольцо.

В других особенно подходящих соединениях общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID) R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$

В некоторых подходящих соединениях этого вида R^{12} представляет собой H или C_{1-4} алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, например одним заместителем, выбранным из R^{16} и $NR^{10}R^{11}$, где R^{16} , R^{10} и R^{11} являются такими, как определено выше. R^{10} и R^{11} могут быть одинаковыми или различными и предпочтительно выбраны из H и C_{1-4} алкила, особенно C_1 -алкила. Более подходящими группами R^{16} являются такие, как определено выше.

В особенно подходящих соединениях, в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$, R^{12} представляет собой H или C_1 -алкил, замещенный одним заместителем R^{16} . Более подходящими группами R^{16} являются такие, как определено выше, и соединение может присутствовать в форме соли, как обсуждалось выше, например соли металла, такой как соль натрия или калия, особенно соли натрия.

Когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$, R^{13} соответственно представляет собой фенил или 5-7-членную циклоалкильную или гетероциклическую группу, любая из которых возможно может быть замещена одним заместителем R^{16} , и где циклоалкильные и гетероциклические группы могут быть замещены одним или более чем одним заместителем = O.

Более предпочтительно циклоалкильная группа представляет собой незамещенный циклопентил, циклогексил или циклогептил.

Более предпочтительно, гетероциклическая группа представляет собой 5- или 6-членную серосодержащую группу, такую как тетрагидротиофен и тетрагидропиран, или их оксиды, такие как 1,1-диоксотетрагидротиофен и 1,1-диоксотетрагидропиран.

В других подходящих соединениях, в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$, каждый R^{12} представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена, OR^{10} и $NR^{10}R^{11}$;

каждый R^{10} и R^{11} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил; и

R^{13} представляет собой диоксид 1,1-тетрагидропирана или диоксид 1,1-тетрагидротиофена; или

R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5- или 6-членное кольцо, содержащее группировку SO_2 или замещенное $C(O)OH$.

В этих соединениях R^{12} предпочтительно представляет собой H, и R^{13} представляет собой кольцо диоксида 1,1-тетрагидротиопирана. Альтернативно, R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 6-членное кольцо, содержащее группировку SO_2 , особенно кольцо диоксида тиоморфолина, или пиперидин, замещенный $C(O)OH$.

Особенно предпочтительные группы R^3 включают $C(O)OH$, $C(O)NHCH_2C(O)OH$, $C(O)N(CH_3)CH_2C(O)OH$, $C(O)NHCH_2CH_2S(O)_2OH$ и $C(O)N(CH_3)CH_2CH_2S(O)_2OH$, особенно $C(O)OH$, $C(O)NHCH_2C(O)OH$, $C(O)NHCH_2CH_2S(O)_2OH$ и $C(O)N(CH_3)CH_2CH_2S(O)_2OH$.

В одном воплощении соединение формулы (I) выбрано из группы, состоящей из:

- 2β-фторхенодезоксихолевой кислоты (соединение 1);
- 2β-фтор-3β,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 2);
- 2α-фтор-3β,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 3);
- 2α-фтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 4);
- 2α-фтор-3α,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 5);
- 2α-фтор-3α,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 6);
- 2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 7);
- 2,2-дифтор-3α,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 8);
- 2,2-дифтор-3α,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 9);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-этилсульфоновой кислоты (соединение 10);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-пропионовой кислоты (соединение 11);
- N*-(метил),*N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-уксусной кислоты (соединение 12);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-*транс*-2-циклогексанкарбоновой кислоты (соединение 13);
- 1-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-оил)-пиперидин-3-карбоновой кислоты (соединение 14);
- 3-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-4-тиазолидин-карбоновой кислоты (соединение 15);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-оил)-морфолина (соединение 16);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-метилкарбоновой кислоты (соединение 17)

N-(карбоксиметил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоуксусной кислоты (соединение 18);

N-(метил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-этилсульфоновой кислоты (соединение 19);

3-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-амино-пропансульфоновой кислоты (соединение 20);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-метансульфоновой кислоты (соединение 21);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтилсерной кислоты (соединение 22);

O-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-гидроксиэтилсульфоновой кислоты (соединение 23);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-анилин-2-сульфоновой кислоты (соединение 24);

N-(циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-пропансульфоновой кислоты (соединение 25);

N-(циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-амино-этансульфоновой кислоты (соединение 26);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтилметилсульфона (соединение 27);

N-(этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-тетрагидротиофен-диоксида (соединение 28);

N-(2-(диизопропиламино)этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-тетрагидротиофен-диоксида (соединение 29);

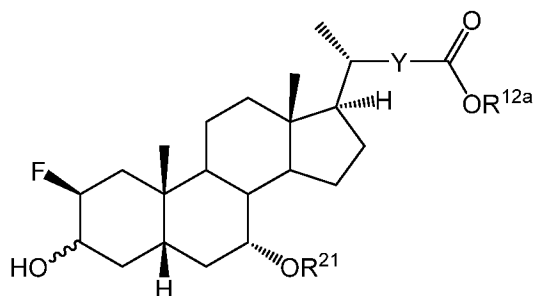
N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-тиоморфолин-диоксида (соединение 30);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-3-иламина (соединение 31); и

их фармацевтически приемлемых солей (когда это целесообразно), особенно солей металлов, таких как соли натрия и калия, особенно соли натрия или (для соединения 18) динатриевая соль.

Способы получения соединений общей формулы (I) описаны ниже. Эти способы составляют дополнительный аспект изобретения.

Соединения общих формул (IB) и (IC), в которых R^1 представляет собой F, а R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$, где R^{12a} представляет собой C_1 -алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой, могут быть получены из соединений общей формулы (II):

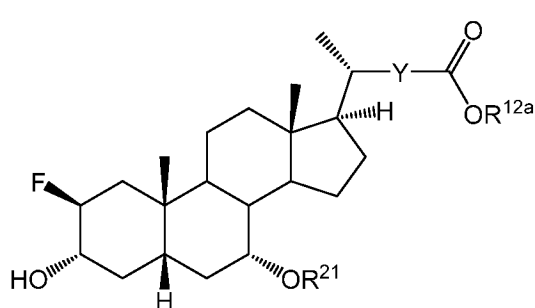


(II),

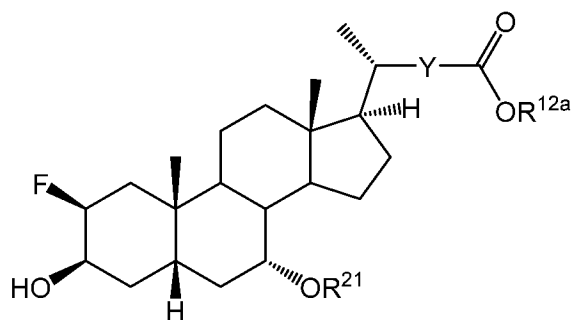
где Y и R^3 являются такими, как определено для общей формулы (I); R^{12a} представляет собой C_1 -алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой; и R^{21} представляет собой защитную группу OH, чувствительную к кислотам; посредством обработки кислотой, например соляной кислотой, как описано в общем способе L ниже.

Подходящие чувствительные к кислотам защитные группы R^{21} включают простые алкиловые эфиры, например метоксиметил.

Соединения общей формулы (II) могут быть образованы в виде смеси изомеров общих формул (IIB) и (IIC):



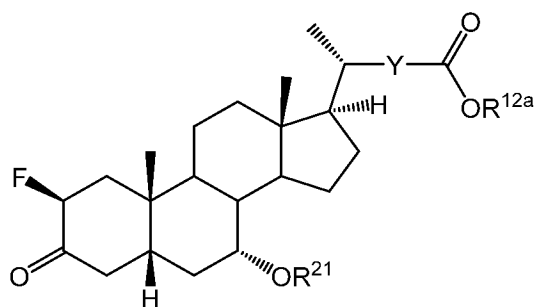
(IIB)



(IIC)

где Y и R^3 являются такими, как определено для общей формулы (I), а R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II);

посредством восстановления соединения общей формулы (III):



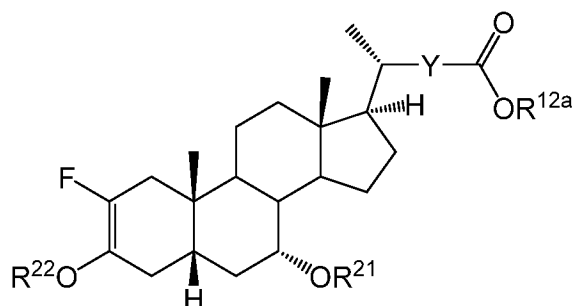
(III)

где Y и R³ являются такими, как определено для общей формулы (I), а R^{12a} и R²¹ являются такими, как определено для общей формулы (II).

Удаление защитных групп R²¹ из соединений общих формул (IIВ) и (IIС), как описано выше, приводит к получению соединений общих формул (IВ) и (IС) соответственно.

Подходящие восстановители для восстановления соединений общей формулы (III) включают гидриды, например борогидрид натрия. Восстановление может быть проведено в органическом растворителе, таком как тетрагидрофуран, при температуре примерно от 15 до 25°C, предпочтительно при комнатной температуре.

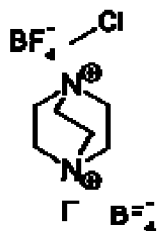
Соединения общей формулы (III) могут быть получены из соединений общей формулы (IV):



(IV)

где Y и R³ являются такими, как определено для общей формулы (I); R^{12a} и R²¹ являются такими, как определено для общей формулы (II); и R²² представляет собой защитную группу OH;

посредством фторирования при использовании агента, такого как Selectfluor[®], (бис(тетрафторборат) 1-хлорметил-4-фтор-1,4-дiazониабицикло[2.2.2]октана), который имеет структуру:

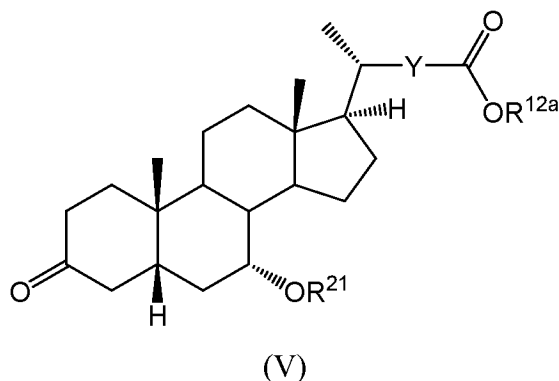


При использовании Selectfluor® взаимодействие обычно проводят при температуре от 15 до 25°C, обычно при комнатной температуре, в полярном органическом растворителе, таком как ацетонитрил.

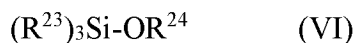
Подходящие защитные группы R^{22} включают силильные защитные группы $\text{Si}(R^{23})_3$, где каждый R^{23} независимо представляет собой C_1 -алкил или фенил.

Примеры групп R^{22} включают триметилсилил (TMS), триэтилсилил (TES), трифенилсилил (TPS), триизопропилсилил (TIPS), тексилдиметилсилил (TDS), *трет*-бутилдифенилсилил (TBDPS), *трет*-бутилдиметилсилил (TBDMS или TBS), ди-*трет*-бутилметилсилил (DTBMS), диэтилизопропилсилил (DEIPS) и диметилизопропилсилил (DMIPS), в частности TMS, TES, TIPS, TBDMS и TBDPS.

Соединения общей формулы (IV) могут быть получены из соединений общей формулы (V):



где Y и R^3 являются такими, как определено для общей формулы (I); R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II); посредством взаимодействия с соединением общей формулы (VI):



где каждый R^{23} независимо является таким, как определено выше, и R^{24} представляет собой уходящую группу, такую как трифторметансульфонат (трифлат), толуолсульфонил (тозил) или метансульфонил (мезил).

Взаимодействие обычно проводят в щелочных условиях, например в присутствии слабого основания, такого как триэтиламин, при температуре примерно от 15 до 25°C, предпочтительно при комнатной температуре.

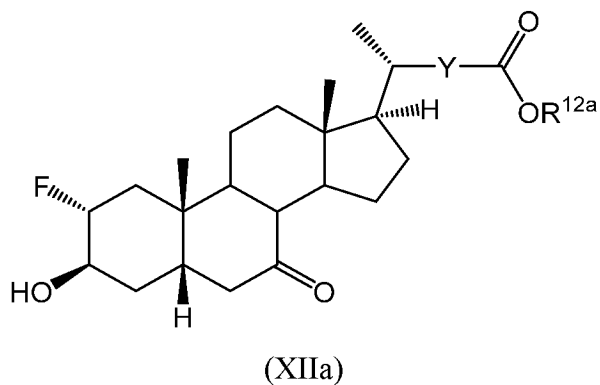
Соединения общей формулы (V) могут быть получены из хенодезоксихолевой кислоты посредством этерификации карбоновой кислоты при взаимодействии со спиртом $R^{12a}OH$, например, как описано в общем способе А ниже, с последующей защитой группы 7-ОН, посредством взаимодействия с соединением общей формулы (VII):



где R^{21} является таким, как определено для общей формулы (II), и X представляет собой уходящую группу, обычно галоген, например хлор; например, как описано в общем способе К ниже. За этим может последовать окисление группы 3-ОН, как описано в общем способе М ниже.

Соединения общей формулы (I), в которых R^2 представляет собой F, и Y представляет собой $C(O)OR^{12a}$, где R^{12a} является таким, как определено выше, могут быть получены, как указано ниже.

Соединения общих формул (IA) и (IC), в которых R^2 представляет собой F, и R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$, могут быть получены посредством восстановления соединений общей формулы (XIIa):



где Y является таким, как определено для общей формулы (I), и R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II).

Соответственно, восстановление проводят при использовании гидрида, например борогидрид натрия, в присутствии хлорида церия(III). Взаимодействие обычно проводят при температуре примерно от 15 до 25°C, предпочтительно при комнатной температуре.

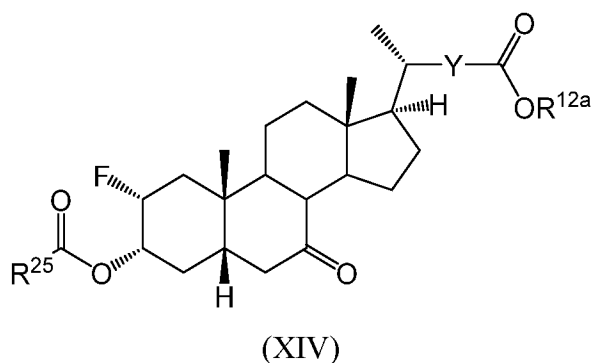
Полученный продукт представляет собой смесь соединений общей формулы (IA) и общей формулы (IC), которые можно разделить обычными способами, например посредством хроматографии.

Соединение общей формулы (XIIa) также может быть использовано для получения соединений общих формул (IB) и (ID), в которых R^2 представляет собой F, и R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$. В этом случае соединение общей формулы (XIIa) может быть подвергнуто взаимодействию с карбоновой кислотой общей формулы (XIII):



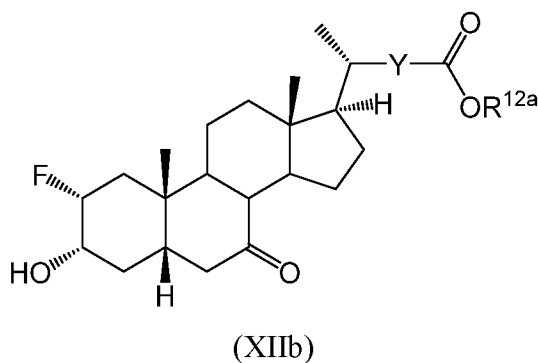
где R^{25} представляет собой C_{1-6} алкил или бензил, но более предпочтительно бензил;

в присутствии трифенилфосфина и диэтилазодикарбоксилата (DEAD) с использованием реакции Мицунобу с получением соединения общей формулы (XIV):



где Y является таким, как определено для общей формулы (I); R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II), и R^{25} является таким, как определено для общей формулы (XIII).

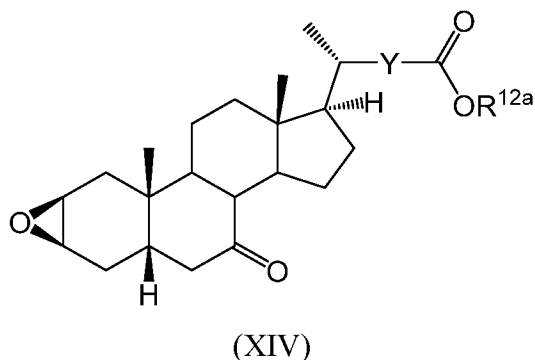
Соединение общей формулы (XIV) может быть гидролизовано при использовании слабого основания, такого как карбонат калия, с получением соединения общей формулы (XIIb):



где Y является таким, как определено для общей формулы (I), и R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II).

Соединение общей формулы (XIIb) может быть затем восстановлено с получением смеси соединений общей формулы (IB) и общей формулы (ID) при использовании условий, описанных выше для восстановления соединения общей формулы (XIIa).

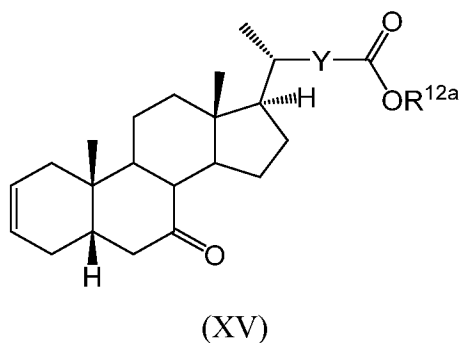
Соединение общей формулы (XIIa) может быть получено из соединения общей формулы (XIV):



где Y является таким, как определено для общей формулы (I), и R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II);
посредством взаимодействия с комплексом фтороводород-пиридин ($HF \cdot \text{пиридин}$).

Соответственно, взаимодействие проводят в безводном органическом растворителе, таком как дихлорметан (DCM).

Соединение общей формулы (XIV) может быть получено посредством эпексидирования соединения общей формулы (XV):

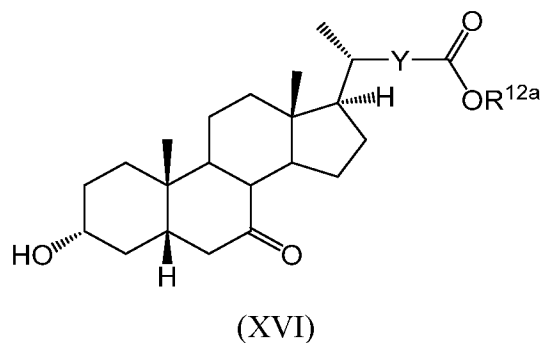


где Y является таким, как определено для общей формулы (I), и R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II).

Подходящим окислителем является *мета*-хлорпербензойная кислота (mCPBA), а взаимодействие может быть проведено в органическом растворителе, таком как DCM,

и при температуре примерно от 15 до 25°C, предпочтительно при комнатной температуре.

Соединение общей формулы (XV) может быть получено из соединения общей формулы (XVI):

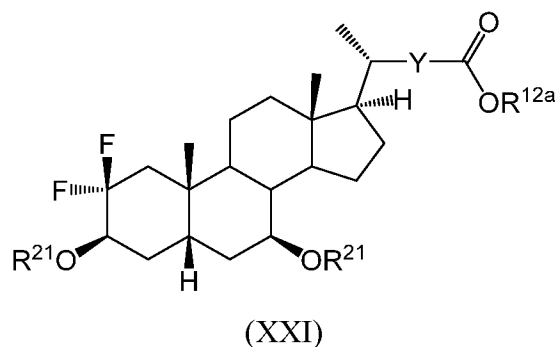


где Y является таким, как определено для общей формулы (I), и R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II); посредством реакции элиминирования.

Ангидрид трифторметансульфоновой кислоты (трифлатный ангидрид) представляет собой пример соответствующим образом активированной уходящей группы, которая может быть использована в комбинации с основанием, таким как диметиламинопиридин (DMAP). Взаимодействие может быть проведено при температуре примерно от 5 до 20°C, предпочтительно от 10 до 15°C.

Соединения общей формулы (XVI) могут быть получены из 7-кето-листохоловой кислоты посредством этерификации, как описано в общем способе А ниже. 7-Кето-листохоловая кислота имеется в продаже.

Соединения общей формулы (IA), в которых R¹ и R² представляют собой фтор, и R³ представляет собой C(O)OR^{12a}, где R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II), могут быть получены из соединений общей формулы (XXI):

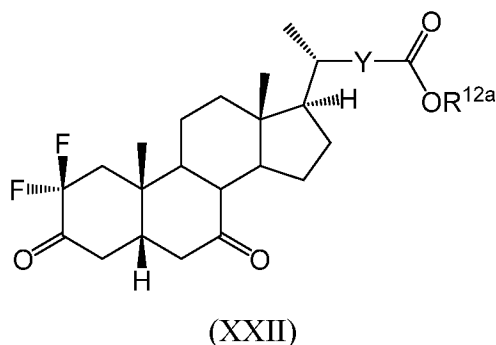


где Y является таким, как определено для общей формулы (I), а R^{12a} и R²¹ являются такими, как определено для общей формулы (II);

посредством взаимодействия с кислотой, например соляной кислотой, как описано в общем способе L ниже.

Соединения общей формулы (IA) могут быть превращены в соединения общих формул (IB) и (ID) при использовании следующей методики.

Соединение общей формулы (IA) могут быть подвергнуты окислению с получением соединения общей формулы (XXII):

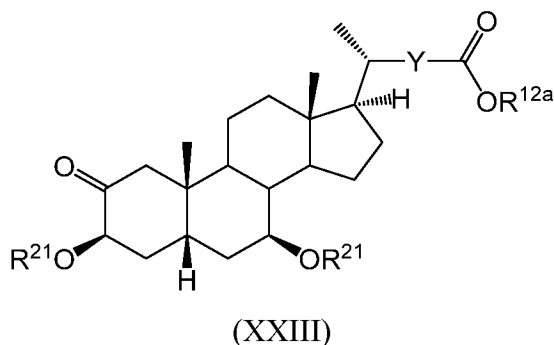


где Y является таким, как определено для общей формулы (I), а R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II).

Подходящие окислители для этой методики включают периодиан Десса-Мартина, а условия реакции для нее являются такими, как описано ниже в общем способе M.

Дикетон общей формулы (XXII) может быть затем восстановлен с получением смеси соединений общих формул (IB) и (ID). Подходящие восстановители для этой методики включают гидрид, например борогидрид натрия, в присутствии хлорида церия(III), как описано в общем способе B ниже. Соединения общих формул (IB) и (ID) могут быть разделены обычными способами, например посредством хроматографических способов.

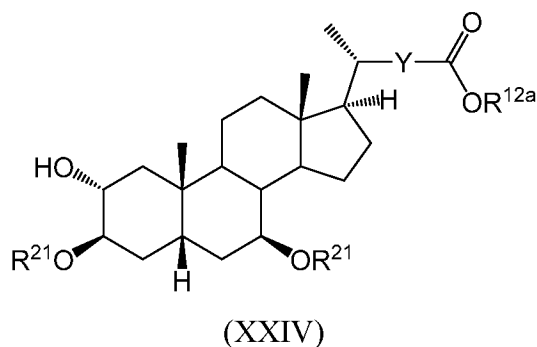
Соединения общей формулы (XXI) могут быть получены посредством фторирования соединений общей формулы (XXIII):



где Y является таким, как определено для общей формулы (I), а R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II).

Подходящие фторирующие агенты для этого взаимодействия включают трифторид *N,N*-диэтиламиносеры (DAST). Взаимодействие с DAST может происходить в органическом растворителе, например дихлорметане, при температуре примерно от 15 до 25°C, обычно при комнатной температуре.

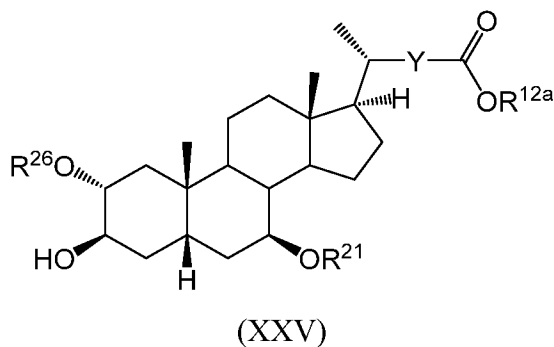
Соединения общей формулы (XXIII) могут быть получены посредством окисления соединений общей формулы (XXIV):



где Y является таким, как определено для общей формулы (I), а R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II).

Подходящие окислители включают периодинан Десса-Мартина, как описано в общем способе М ниже.

Соединения общей формулы (XXIV) могут быть получены посредством взаимодействия соединения общей формулы (XXV):



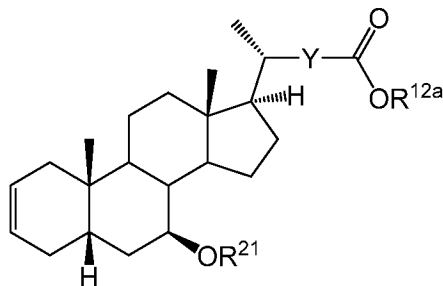
где Y является таким, как определено для общей формулы (I); R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II); и R^{26} представляет собой чувствительную к основаниям защитную группу; с соединением общей формулы (VII), как описано выше, с последующим взаимодействием с основанием для удаления защитной группы R^{26} .

Примеры защитных групп R^{26} включают ацильные группы $R^{25}C(O)-$, где R^{25} является таким, как определено выше для общей формулы (XIII).

Взаимодействие соединения общей формулы (XXV) с соединением общей формулы (VII) может быть проведено при использовании методики по общему способу К ниже.

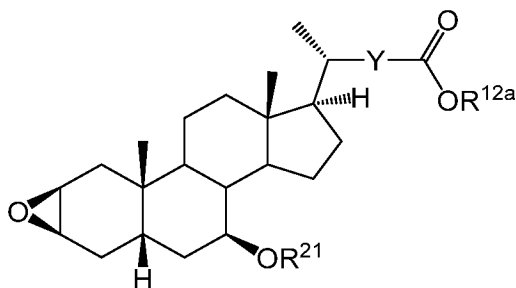
Защитная группа R^{26} может быть удалена с помощью основания, такого как алкоголят, например алкоголят натрия или калия, обычно алкоголят натрия, например метилат натрия или этилат натрия. Снятие защиты соответствующим образом проводят в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, при температуре примерно от 15 до 25°C, обычно при комнатной температуре.

Соединение общей формулы (XXV) может быть получено из соединения общей формулы (XXVI):



(XXVI)

где Y является таким, как определено для общей формулы (I); R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II); посредством эпексидирования с получением соединения общей формулы (XXVIa):



(XXVIa)

где Y является таким, как определено для общей формулы (I); R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II); с последующим раскрытием кольца посредством взаимодействия с соединением общей формулы (XXVII):

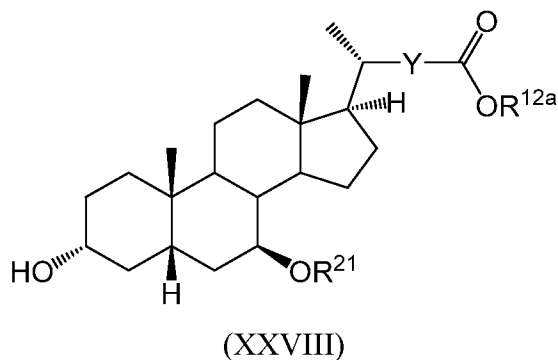


где R^{26} является таким, как определено выше для общей формулы (XXV).

Подходящим окислителем является *мета*-хлорпербензойная кислота (*m*-CPBA), и взаимодействие может быть проведено в органическом растворителе, таком как DCM, и при температуре примерно от 15 до 25°C, предпочтительно при комнатной температуре. В результате взаимодействия образуется неразделимая смесь $\Delta^{2\beta,3\beta}$ -эпоксида (XXVIa) и $\Delta^{3\beta,4\beta}$ -эпоксида. При обработке смеси соединением общей формулы (XXVII) соединение общей формулы (XXVIa) вступает в реакцию с образованием требуемого продукта.

В реакции раскрытия кольца, когда защитная группа R^{26} представляет собой ацильную группу $R^{25}C(O)-$, соединение формулы (XXVII) представляет собой соединение общей формулы (XIII), как определено выше. Взаимодействие соединения общей формулы (XXVIa) с соединением общей формулы (XIII) может происходить при повышенной температуре, например примерно от 40 до 60°C, обычно при примерно 50°C.

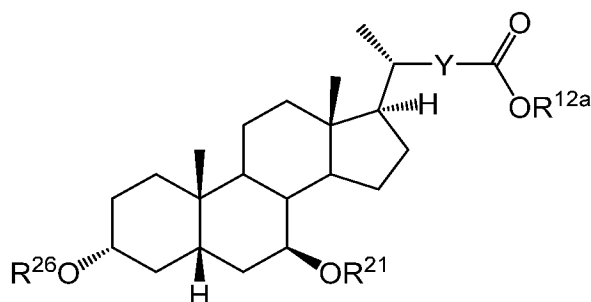
Соединение общей формулы (XXVI) может быть получено из соединения общей формулы (XXVIII):



где Y является таким, как определено для общей формулы (I); R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II); посредством реакции элиминирования.

Ангидрид трифторметансульфоновой кислоты (трифлатный ангидрид) представляет собой пример соответствующим образом активированной уходящей группы, которая может быть использована в комбинации с основанием, таким как лутидин. Взаимодействие может быть проведено при температуре примерно от 5 до 20°C, предпочтительно от 10 до 15°C.

Соединение общей формулы (XXVIII) может быть получено из соединения общей формулы (XXIX):



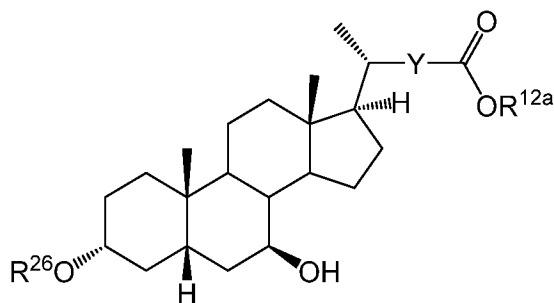
(XXIX)

где Y является таким, как определено для общей формулы (I); R^{12a} и R^{21} являются такими, как определено для общей формулы (II); и R^{26} является таким, как определено для общей формулы (XXV); посредством взаимодействия с соединением общей формулы (XXVII), как определено выше.

Соответственно, соединение общей формулы (XXVII) представляет собой карбоновую кислоту общей формулы (XIII), так что R^{26} представляет собой ацильную группу формулы $R^{25}C(O)-$.

Взаимодействие может происходить в спиртовом растворителе, таком как метанол или этанол, при температуре примерно от 15 до 25°C, обычно при комнатной температуре.

Соединение общей формулы (XXIX) может быть получено из соединения общей формулы (XXX):

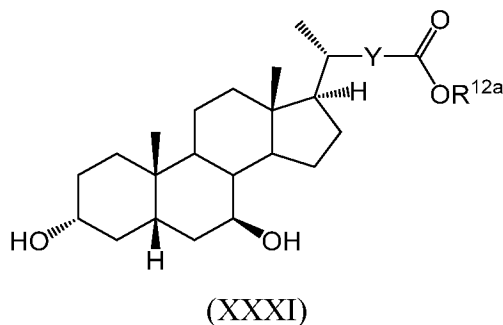


(XXX)

где Y является таким, как определено для общей формулы (I); R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II); и R^{26} является таким, как определено для общей формулы (XXV);

посредством взаимодействия с соединением общей формулы (VII). Подходящими условиями реакции являются такие, как описано в общем способе К ниже.

Соединение общей формулы (XXX) может быть получено из соединения общей формулы (XXXI):



где R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II); посредством взаимодействия с соединением общей формулы (XXVII) или еще чаще с соединением общей формулы (XXXII):



где R^{26} является таким, как определено для общей формулы (XXV).

Когда R^{26} представляет собой ацильную группу R^{25} , реагент общей формулы (XXXIII) представляет собой ангидрид карбоновой кислоты.

Соединение общей формулы (XXXI) представляет собой сложный эфир UDCA, который может быть получен из UDCA посредством взаимодействия со спиртом $R^{12a}OH$, например, как описано в общем способе А.

Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$, где R^{12a} представляет собой C_1 -алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой, могут быть превращены в другие соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID).

Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$, могут быть получены посредством гидролиза эквивалентного соединения, в котором R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$. Гидролиз может быть кислотным или щелочным гидролизом. Щелочной гидролиз часто является более подходящим и может быть проведен, например при использовании гидроксида щелочного металла, такого как гидроксид лития, натрия или калия, еще чаще гидроксида лития. Щелочной гидролиз описан в общем способе С ниже.

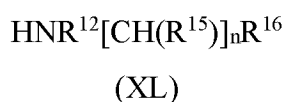
Соединения общей формулы (I), в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$, могут быть получены из карбоновой кислоты посредством взаимодействия с амином формулы $H-NR^{12}R^{13}$, где R^{12} и R^{13} являются такими, как определено выше для общей формулы (I); в подходящем растворителе при нагревании. Соответственно, реакцию проводят в присутствии агента сочетания и в щелочных условиях, например в присутствии амина, такого как диизопропилэтиламин (DIPEA) или триэтиламин (TEA), и в органическом растворителе, таком как DMF, как описано в общем способе Q ниже.

Подходящие агенты сочетания включают известные агенты сочетания пептидов, такие как гексафторфосфат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (HBTU), тетрафторборат O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (TBTU), гексафторфосфат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (HATU), тетрафторборат O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония (TATU), гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония (BOP), гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония (PyBOP), карбодиимиды, такие как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDCI), и триазолы, такие как 1-гидрокси-7-азабензотриазол (HOAt) или гидроксибензотриазол (HOBt); и хлорформиаты, такие как изобутилхлорформиат.

Амины формулы $H-NR^{12}R^{13}$ известны и легко доступны или могут быть получены посредством способов, известных специалистам в данной области техники.

Соединения общей формулы (I), в которых R^7 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$ или $OS(O)_2OR^{12}$, также могут быть получены посредством способов, аналогичных способам, описанным Festa *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 8477-8495 (включено здесь посредством ссылки).

Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, могут быть получены из соединений общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$, посредством взаимодействия с соединением общей формулы (XL):

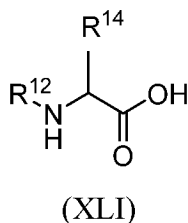


где R^{12} , R^{15} , n и R^{16} являются такими, как определено выше;

в присутствии агента сочетания и в щелочных условиях, например в присутствии амина, такого как диизопропилэтиламин (DIPEA) или триэтиламин (TEA),

и в органическом растворителе, таком как DMF, как описано в общем способе Q ниже. Подходящие агенты сочетания являются такими, как описано выше.

Например, соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{14})C(O)OH$, могут быть получены из соединений общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$, посредством взаимодействия с аминокислотой общей формулы (XLI):

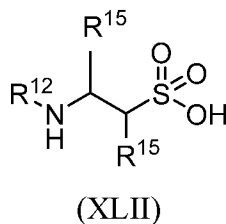


где R^{12} и R^{14} являются такими, как определено выше;

в присутствии агента сочетания и в щелочных условиях, например в присутствии амина, такого как диизопропилэтиламин (DIPEA) или триэтиламин (TEA), и в органическом растворителе, таком как DMF, как описано в общем способе Q ниже. Подходящие агенты сочетания являются такими, как описано выше, причем HATU является особенно подходящим.

Соответственно, в соединении общей формулы (XLI), R^{12} представляет собой H или метил, и R^{14} представляет собой H.

Аналогично, соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{15})CH(R^{15})S(O)_2OH$, могут быть получены из соединений общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$, посредством взаимодействия с соединением общей формулы (XLII):



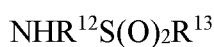
где R^{12} и R^{15} являются такими, как определено выше;

в присутствии агента сочетания и в щелочных условиях, например в присутствии амина, такого как диизопропилэтиламин (DIPEA) или триэтиламин (TEA), и в органическом растворителе, таком как DMF, как описано в общем способе Q ниже. Подходящие агенты сочетания являются такими, как описано выше, причем HATU и изобутилхлорформиат являются особенно подходящими.

Соответственно, в соединении общей формулы (XLII), R^{12} представляет собой H или метил, и каждый R^{15} представляет собой H.

Аминокислоты общей формулы (XLI) и таурин и его производные общей формулы (XLII) широко известны и легко доступны или могут быть синтезированы посредством способов, известных в данной области техники.

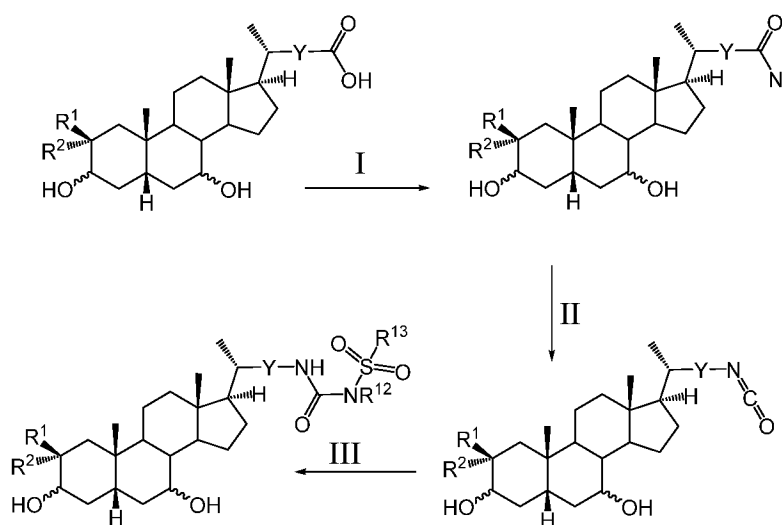
Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$, могут быть превращены в соединения, в которых R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, где R^{13} является таким, как определено выше, посредством взаимодействия с соединением формулы:



где R^{12} и R^{13} являются такими, как определено выше, в присутствии агента сочетания и в щелочных условиях, например в присутствии амина, такого как диизопропилэтиламин (DIPEA) или триэтиламин (TEA), и в органическом растворителе, таком как DMF, как описано в общем способе Q ниже. Подходящие агенты сочетания являются такими, как описано выше, причем 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDCI) является особенно подходящим.

Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $NHC(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, могут быть получены из соединений общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$, посредством способа, который показан на схеме 1:

Схема 1



I дифенилфосфилазид/триэтиламин

II нагревание

III $R^{13}SO_2NHR^{12}$

Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $S(O)_2OR^{12}$, могут быть синтезированы из соединений общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OH$. Соединение, в котором R^3 представляет собой $C(O)OH$, может быть сначала подвергнуто взаимодействию с C_1 -алканоил- или бензоилхлоридом, или с C_1 -алкановым ангидридом для защиты любых OH -групп. Защищенное соединение может затем быть подвергнуто взаимодействию с восстановителем, таким как гидрид, предпочтительно алюмогидрид лития или борогидрид натрия, чтобы восстановить карбоксильную группу до OH . Спиртовая группа может быть заменена галогеном, например бромом или йодом, например при использовании способа трифенилфосфин/имидазол/галоген, описанного Classon *et al.*, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 6126-6130 (включено здесь посредством ссылки). Галогенированное соединение может затем быть подвергнуто взаимодействию с сульфитом натрия в спиртовом растворителе с получением соединения с заместителем $SO_3^- Na^+$.

Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $OS(O)_2OR^{12}$, могут быть получены посредством защиты OH -групп соединений общих формул (I), (IA), (IB), (IC) или (ID), в которых R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, при использовании любой подходящей защитной группы; восстановления карбоновой кислоты или сложного эфира с получением спирта и проведения его взаимодействия с хлорсульфоновой кислотой в присутствии основания, такого как триэтиламин, с получением защищенной триэтиламиновой соли соединения, в котором R^3 представляет собой $OS(O)_2OR^{12}$. Защитные группы могут быть удалены с использованием щелочного гидролиза.

Взаимодействие спирта с сульфонилхлоридом дает соединение общей формулы (I), (IA), (IB), (IC) или (ID), в котором R^3 представляет собой $OS(O)_2R^{12}$.

Соединения общих формул (I), (IA), (IB), (IC) и (ID), в которых R^3 представляет собой $S(O)_2R^{12}$, могут быть получены из спирта посредством взаимодействия с реагентом Лавессона с последующим окислением полученного продукта.

Неожиданно было показано, что соединения по настоящему изобретению способны восстанавливать функцию митохондрий и могут проникать через гематоэнцефалический барьер. Поэтому, их используют при лечении нейродегенеративных расстройств, включая болезнь Паркинсона, легкие когнитивные нарушения, деменцию (включая болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию и

деменцию с тельцами Леви), болезнь Гентингтона и боковой амиотрофический склероз (болезнь двигательных нейронов).

Соединения по настоящему изобретению неожиданно активны по сравнению с желчными кислотами с несколько отличающимися замещениями по кольцам А и В.

В дополнительном аспекте изобретения предложено соединение общей формулы (I) для применения в медицине.

Также предложено соединение общей формулы (I) для применения в лечении или предупреждении нейродегенеративного расстройства.

Согласно изобретению также предложено применение соединения общей формулы (I) при получении агента для лечения или предупреждения нейродегенеративного расстройства.

Согласно изобретению также предложен способ лечения или предупреждения нейродегенеративного расстройства, и этот способ включает введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения общей формулы (I).

Примеры нейродегенеративных расстройств включают болезнь Паркинсона, легкие когнитивные нарушения, деменцию (включая болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви), болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз (болезнь двигательных нейронов), прогрессирующий надъядерный паралич и болезнь Вильсона. Расстройства, которые особенно подходят для лечения соединениями по настоящему изобретению, включают болезнь Паркинсона, легкие когнитивные нарушения, деменцию (включая болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви), болезнь Гентингтона и боковой амиотрофический склероз, и особенно болезнь Паркинсона, легкие когнитивные нарушения и деменцию (включая болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви).

Соединения общей формулы (IA) и (ID) особенно эффективны при лечении или предупреждении болезни Паркинсона, особенно соединения общей формулы (IA) и (ID), в которой R^1 и R^2 представляют собой F.

Примеры особенно подходящих соединений для применения в лечении болезни Паркинсона включают соединение общей формулы (IA), которое представляет собой 2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (соединение 7) и соединение общей формулы (ID), которое представляет собой 2,2-дифтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -

холановую кислоту (соединение 9). 2,2- Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холановая кислота (соединение 7) является особенно подходящей.

Соединения общей формулы (IB) являются особенно эффективными при лечении или предупреждении деменции, например болезни Альцгеймера. Это особенно верно для соединения общей формулы (IB), в котором и R¹, и R² представляют собой F.

Соответственно, когда нейродегенеративное расстройство представляет собой деменцию, особенно болезнь Альцгеймера, соединение общей формулы (IB) представляет собой 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (соединение 8).

Соединения общей формулы (I) обычно вводят как часть фармацевтической композиции.

Поэтому, в дополнительном аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение общей формулы (I) и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

Композиция может быть приготовлена в виде препарата для введения любым путем, например парентеральным, включая внутривенный, внутримышечный, подкожный или внутрикожный; или для перорального, ректального, назального, местного (включая глазные капли, местное введение в легкие, трансбуккальное и сублингвальное) или вагинального введения.

Предпочтительно, композицию готовят в виде препарата для парентерального введения или для местного введения в легкие (посредством ингаляции).

Композиция может быть приготовлена посредством объединения определенного выше активного агента с носителем. Как правило, препараты готовят посредством равномерного и тщательного объединения активного агента с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или и с теми, и с другими, а затем, если необходимо, придания продукту формы. Изобретение включает способы получения фармацевтической композиции, включающие сочетание или объединение соединения общей формулы (I) с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем.

Препараты для перорального введения по настоящему изобретению могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, саше или таблетки, каждая из которых содержит заранее определенное количество активного агента; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии активного агента в водной

жидкости или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии типа масло-в-воде или жидкой эмульсии типа вода-в-масле; или в виде болюса и так далее.

В некоторых случаях композиции могут быть приготовлены в виде препарата для отсроченного, замедленного или контролируемого высвобождения соединения общей формулы (I).

Для композиций для перорального введения (например, таблеток и капсул) термин «приемлемый носитель» включает носители, такие как обычные эксципиенты, например связующие вещества, например сироп, аравийскую камедь, желатин, сорбит, трагакант, поливинилпирролидон (повидон), метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу, сахарозу и крахмал; наполнители и носители, например кукурузный крахмал, желатин, лактозу, сахарозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, маннит, дикальцийфосфат, хлорид натрия и альгиновую кислоту; и смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеарат натрия и другие стеараты металлов, стеарат глицерина, стеариновую кислоту, кремнийорганическую жидкость, воски с тальком, масла и коллоидный диоксид кремния. Также могут быть использованы ароматизаторы, такие как мята перечная, гаултериевое масло, вишневый ароматизатор и тому подобное. Может быть желательным добавление красителя, чтобы сделать лекарственную форму легко идентифицируемой. Таблетки также могут быть покрыты оболочкой посредством способов, хорошо известных в данной области техники.

Таблетка может быть изготовлена посредством прессования или формования, возможно с одним или более чем одним вспомогательным ингредиентом. Прессованные таблетки могут быть получены посредством прессования в подходящей машине активного агента в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, возможно смешанного со связующим веществом, смазывающим веществом, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным или диспергирующим веществом. Формованные таблетки могут быть получены посредством формования в подходящей машине смеси порошкообразного соединения, смоченной инертным жидким разбавителем. Таблетки могут быть возможно покрыты оболочкой или с насечками и могут быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечивать замедленное или контролируемое высвобождение активного агента.

Другие препараты, подходящие для перорального введения, включают лепешки, содержащие активный агент на ароматизированной основе, обычно сахарозе и

аравийской камеди или трагаканте; пастилки, содержащие активный агент на инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный агент в подходящем жидком носителе.

Для местного нанесения на кожу соединения общей формулы (I) могут быть приготовлены в виде крема, мази, желе, раствора или суспензии и так далее. Составы кремов или мазей, которые могут быть использованы для лекарственного средства, представляют собой обычные составы, хорошо известные в данной области техники, например, как описаны в стандартных учебниках по фармацевтике, таких как Британская фармакопея.

Местное введение в легкие может быть достигнуто при использовании аэрозольного препарата. Аэрозольные препараты обычно содержат активный ингредиент, суспендированный или растворенный в подходящем аэрозольном пропелленте, таком как хлорфторуглерод (CFC) или гидрофторуглерод (HFC). Подходящие CFC пропелленты включают трихлормонофторметан (пропеллент 11), дихлортетрафторметан (пропеллент 114) и дихлордифторметан (пропеллент 12). Подходящие HFC пропелленты включают тетрафторэтан (HFC-134a) и гептафторпропан (HFC-227). Пропеллент обычно составляет 40%-99,5%, например 40%-90%, от массы всей композиции для ингаляции. Препарат может содержать эксципиенты, включая сорастворители (например этанол) и поверхностно-активные вещества (например лецитин, триолеат сорбитана и тому подобное). Другие возможные эксципиенты включают полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, глицерин и тому подобное. Аэрозольные препараты упаковывают в канистры, и подходящая доза доставляется с помощью дозатора (например как поставляется компаниями Bepak, Valois или 3M, или альтернативно Aptar, Coster или Vari).

Местное введение в легкие также может быть достигнуто при использовании препарата, не находящегося под давлением, такого как водный раствор или суспензия. Их можно вводить посредством небулайзера, например небулайзера, который может быть ручным портативным, или для домашнего использования или в стационаре (то есть непортативный). Препарат может содержать эксципиенты, такие как вода, буферы, агенты, регулирующие тоничность, агенты, регулирующие pH, поверхностно-активные вещества и сорастворители. Суспензионные жидкостные и аэрозольные препараты (как находящиеся под давлением, так и без давления) обычно содержат соединение по

изобретению в тонкоизмельченной форме, например с D_{50} 0,5-10 мкм, например около 1-5 мкм. Распределение частиц по размеру может быть представлено при использовании значений D_{10} , D_{50} и D_{90} . Медианное значение распределения частиц по размеру D_{50} определяют как размер частиц в микронах, который делит распределение пополам. Измерение, полученное с помощью лазерной дифракции, более точно описывают как распределение по объему, и, следовательно, значение D_{50} , полученное с помощью этого метода, более правильно называется значением Dv_{50} (медиана для распределения по объему). Используемые здесь значения Dv относятся к распределению частиц по размеру, измеренному при использовании лазерной дифракции. Аналогично, значения D_{10} и D_{90} , используемые применительно к лазерной дифракции, взяты для обозначения значений Dv_{10} и Dv_{90} и относятся к размеру частиц, при котором 10% распределения лежит ниже значения D_{10} , а 90% распределения лежит ниже значения D_{90} соответственно.

Местное введение в легкие также может быть достигнуто при использовании препарата в виде сухого порошка. Препарат в виде сухого порошка будет содержать соединение по изобретению в тонкоизмельченной форме, обычно с массовым медианным диаметром (MMAD) 1-10 мкм или D_{50} 0,5-10 мкм, например около 1-5 мкм. Порошки соединения по изобретению в тонкоизмельченной форме могут быть получены посредством процесса микронизации или аналогичного процесса измельчения. Микронизация может быть проведена с использованием струйной мельницы, такой как производит компания Hosokawa Alpine. Полученное распределение частиц может быть измерено при использовании лазерной дифракции (например с помощью анализатора Mastersizer 2000S компании Malvern). Препарат обычно будет содержать приемлемый для местного применения разбавитель, например лактозу, глюкозу или маннит (предпочтительно лактозу), обычно со сравнительно большим размером частиц, например с массовым медианным диаметром (MMAD) 50 мкм или более, например 100 мкм или более или D_{50} 40-150 мкм. Используемый здесь термин «лактоза» относится к лактозосодержащему компоненту, включая моногидрат α -лактозы, моногидрат β -лактозы, безводную α -лактозу, безводную β -лактозу и аморфную лактозу. Лактозные компоненты могут быть обработаны посредством микронизации, просеивания, измельчения, прессования, агломерации или распылительной сушки. Также включены имеющиеся в продаже виды лактозы в различных формах, например продукты Lactohale® (лактоза ингаляционного сорта;

DFE Pharma), InhaLac®70 (просеянная лактоза для ингалятора сухого порошка; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) и Respitose® (просеянная лактоза ингаляционного сорта; DFE Pharma). В одном воплощении лактозный компонент выбран из группы, состоящей из моногидрата α -лактозы, безводной α -лактозы и аморфной лактозы. Предпочтительно, лактоза представляет собой моногидрат α -лактозы.

Препараты сухих порошков могут также содержать другие эксципиенты. Таким образом, в одном воплощении препарат сухого порошка согласно настоящему раскрытию содержит стеарат магния или кальция. Такие препараты могут обладать высокой химической и/или физической стабильностью, особенно когда такие препараты также содержат лактозу.

Препарат сухого порошка обычно доставляют с использованием ингалятора сухого порошка (DPI). Примеры систем доставки сухого порошка включают SPINHALER®, DISKHALER®, TURBOHALER®, DISKUS®, SKYEHALER®, ACCUHALER® и CLICKHALER®. Дополнительные примеры систем доставки сухого порошка включают ECLIPSE, NEXT, POTALXALER, ХАНДИХАЛЕР, АЭРОЛАЙЗЕР, ЦИКЛОХАЛЕР, БРИЗХАЛЕР/ НЕОХАЛЕР, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ЭЛЬПЕНХАЛЕР, MIATHALER, ТВИСТХАЛЕР, НОВОЛАЙЗЕР, PRESSAIR, ЭЛЛИПТА, ингалятор сухого порошка ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, ИЗИХЕЙЛЕР, УЛЬТРАХАЛЕР, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR и PROHALER.

В одном воплощении соединение общей формулы (I) предложено в виде препарата микронизированного сухого порошка, например содержащего лактозу подходящего сорта.

Таким образом, в качестве аспекта изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение общей формулы (I) в форме частиц в комбинации с лактозой в форме частиц, при этом указанная композиция возможно содержит стеарат магния.

В одном воплощении соединение общей формулы (I) предложено в виде препарата микронизированного сухого порошка, содержащего лактозу подходящего сорта и стеарат магния, которым заполняют устройство, такое как ДИСКУС. Соответственно, такое устройство представляет собой многодозовое устройство, например, препаратом заполняют блистеры для применения в многодозовом устройстве для стандартных доз, таком как ДИСКУС.

В другом воплощении соединение общей формулы (I) предложено в виде препарата микронизированного сухого порошка, например содержащего лактозу подходящего сорта, которым заполняют твердые капсулы для применения в однократном устройстве, таком как АЭРОЛАЙЗЕР.

В другом воплощении соединение общей формулы (I) предложено в виде препарата микронизированного сухого порошка, содержащего лактозу подходящего сорта и стеарат магния, которым заполняют твердые капсулы для применения в однократном устройстве, таком как АЭРОЛАЙЗЕР.

В другом воплощении соединение общей формулы (I) предложено в виде мелкодисперсного порошка для применения в лекарственной форме для ингаляции, где порошок находится в виде мелких частиц с D_{50} 0,5-10 мкм, например около 1-5 мкм, которые были получены с помощью процесса измельчения, отличного от микронизации в струйной мельнице, например распылительной сушки, распылительного замораживания, микрофлюидизации, гомогенизации высокого давления, кристаллизации из сверхкритических флюидов, ультразвуковой кристаллизации или с помощью комбинаций этих способов, или других подходящих способов образования частиц, известных в данной области техники, которые используют для получения мелких частиц с аэродинамическим размером частиц 0,5-10 мкм. Полученное распределение частиц может быть измерено при использовании лазерной дифракции (например с помощью анализатора Mastersizer 2000S компании Malvern). Частицы могут содержать соединение либо отдельно, либо в комбинации с другими подходящими эксципиентами, которые могут способствовать обработке. Полученные мелкие частицы могут образовывать конечный препарат для доставки людям или возможно могут быть дополнительно приготовлены в виде препарата с другими подходящими эксципиентами для облегчения доставки в приемлемой лекарственной форме.

Соединение по настоящему изобретению также может быть введено ректально, например в форме суппозиториев или клизм, которые включают водные или масляные растворы, а также суспензии, эмульсии и пены. Такие композиции готовят в соответствии со стандартными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Например суппозитории могут быть приготовлены посредством смешивания активного ингредиента с обычной суппозиторной основой, такой как масло какао или другие глицериды. В этом случае лекарственное средство смешивают с

подходящим не вызывающим раздражения эксципиентом, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, будет плавиться в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такие вещества представляют собой масло какао и полиэтиленгликоли.

Препараты для парентерального введения обычно должны быть стерильны.

Практикующий врач или другой квалифицированный специалист сможет определить подходящую дозировку для соединения общей формулы (I) и, следовательно, количество соединения по изобретению, которое должно быть включено в любой конкретный фармацевтический препарат (независимо от того, находится он в стандартной лекарственной форме или нет).

Соединения общей формулы (I) могут быть использованы в комбинации с одним или более чем одним другим активным агентом, который полезен в лечении или профилактике нейродегенеративных расстройств.

Поэтому, в дополнительном аспекте изобретения предложен продукт, содержащий соединение общей формулы (I) и дополнительный агент, полезный в лечении или предупреждении нейродегенеративного расстройства в качестве комбинированного препарата для одновременного, последовательного или раздельного применения в лечении или предупреждении нейродегенеративного расстройства, как описано выше.

Теперь изобретение будет описано более подробно со ссылкой на следующие примеры и графические материалы, в которых:

На **фиг. 1** (фиг. 1A, 1B и 1C) показаны данные для клеточных линий фибробластов от контрольной группы и от 6 пациентов со спорадической формой болезни Паркинсона (сБП). Контроли сравнивают с фибробластами без лечения сБП, фибробластами при сБП, инкубированными с UDCA, и фибробластами при сБП, инкубированными с соединением 7; фиг. 1A: базальное потребление кислорода; фиг. 1B: максимальная частота дыхания; фиг. 1C: АТФ-связанное дыхание.

На **фиг. 2** показана скорость внеклеточного закисления в клеточных линиях фибробластов от контрольной группы и от 6 пациентов со спорадической болезнью Паркинсона (сБП). Контрольные фибробласты сравнивают с фибробластами без лечения сБП, фибробластами при сБП, инкубированными с UDCA, и фибробластами при сБП, инкубированными с соединением 7.

На **фиг. 3** показана активность I комплекса дыхательной цепи митохондрий в гомогенате от индуцированной МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) мыши, которой либо не вводили, либо вводили соединение 7 в дозе 4 мг/кг или 12 мг/кг.

На **фиг. 4** показано сравнение активности I комплекса дыхательной цепи митохондрий в гомогенате мозговой ткани мыши из левой области полосатого тела от мыши, которой вводили носитель, носитель плюс 12 мг соединения 7, МРТР или МРТР плюс 1 мг, 4 мг или 12 мг соединения 7.

Сокращения

AcOH	уксусная кислота
Boc	<i>трет</i> -бутилоксикарбонил
^t BuOH	<i>трет</i> -бутанол
BzOH	бензойная кислота
Подсч.	подсчитано
<i>m</i> CPBA	<i>мета</i> -хлорпербензойная кислота
с	сутки
DAST	трифторид диэтиламиносеры
DCM	дихлорметан
DEAD	диэтилазодикарбоксилат
DIPA	диизопропиловый спирт
DIPEA	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин
DMF	<i>N,N</i> -диметилформамид
EDC	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
Эквив.	эквиваленты
EtOAc	этилацетат
EtOH	этанол
Et ₃ N	триэтиламин
ч	часы
HATU	(1-[бис(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-

	триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксид гексафторфосфат
HOBt	гидроксibenзотриазол
HPLC	высокоэффективная жидкостная хроматография
MeOH	метанол
моль	моли
MOM	метоксиметил
NaOMe	метилат натрия
PE	петролейный эфир
PPh ₃	трифенилфосфин
RM	реакционная смесь
К.т.	комнатная температура
Насыщ.	насыщенный
SM	исходное вещество
Tf ₂ O	ангидрид трифторметансульфоновой кислоты (трифлатный ангидрид)
THF	тетрагидрофуран
ТСХ	тонкослойная хроматография
UDCA	урсодезоксихолевая кислота

Общие способы

Общий способ А для защиты 24-карбоновой кислоты в виде сложного метилового эфира

Использовали способ Пелликари (Pellicari) (*ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 273-277). Свободную желчную кислоту (25,0 г; 64 ммоль; 1 эквив.) растворяли в метаноле степени чистоты ВЭЖХ (20 объемов) перед добавлением *пара*-толуолсульфоновой кислоты (0,1 эквив.) и обработкой ультразвуком при 30°C в течение 2 часов. После завершения взаимодействия, что было установлено посредством анализа ТСХ, растворитель удаляли под вакуумом перед растворением остатка в EtOAc (16 объемов), промыванием органической фазы насыщ. NaHCO₃ (дважды), водой и рассолом.

Органическую фазу затем сушили (Na_2SO_4) и концентрировали с получением метилового эфира.

Общий способ В для 3-кето/7-кето-восстановления при использовании $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3$

При использовании условий Черны (Černý) (*Steroids* **2012**, 77, 1233-1241). К раствору кетона (1 эквив.) и CeCl_3 (1,2 эквив.) в MeOH (приблизительно 50 объемов) и EtOAc (2 мл) добавляли NaBH_4 (1,1 эквив.) в течение 5 минут. Раствор перемешивали в течение 30 минут, после чего добавляли дополнительное количество NaBH_4 (1 эквив.) и перемешивали еще 30 минут, чтобы довести взаимодействие до завершения. Реакцию останавливали посредством добавления охлажденной на льду 2 М HCl , и водную фазу промывали EtOAc (дважды). Объединенные органические фазы промывали насыщ. NaHCO_3 и водой, сушили (Na_2SO_4) и концентрировали, затем очищали посредством колоночной хроматографии с получением как α -ОН, так и β -ОН эпимеров.

Общий способ С для омыления метилового эфира при использовании LiOH в MeOH

К раствору метилового эфира (43 мг; 0,11 ммоль; 1 эквив.) в MeOH (приблизительно 70 объемов) добавляли 2 М LiOH (10 эквив.), и раствор оставляли для перемешивания до завершения взаимодействия при комнатной температуре. Растворитель удаляли под вакуумом, и неочищенный остаток подкисляли 2 М HCl , перед экстракцией EtOAc (дважды). Объединенные органические фазы промывали водой и рассолом, сушили (Na_2SO_4) и концентрировали с получением свободной кислоты.

Общий способ D для омыления метилового эфира при использовании LiOH в THF

Метилвый эфир (1,0 эквив.) растворяли в THF (приблизительно 20 объемов) и добавляли LiOH (2 М в H_2O ; 10 эквив.). После перемешивания при комнатной температуре до завершения взаимодействия, реакционную смесь восстанавливали под вакуумом, полученный остаток подкисляли 2 М HCl , и водную фазу экстрагировали EtOAc (дважды). Объединенные органические фазы затем промывали водой и рассолом перед сушкой над Na_2SO_4 и восстановлением под вакуумом с получением свободной кислоты.

Общий способ E для метанолиза ацетата/бензоата

Защищенную ацетатом/бензоатом желчную кислоту (3,1 г; 6,12 ммоль; 1 эквив.) растворяли в безводном MeOH (приблизительно 10 объемов) перед добавлением 25% NaOMe в MeOH (приблизительно 6 объемов), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. После завершения взаимодействия смесь подкисляли до значения pH 4-5 с помощью 2 М HCl и разбавляли H₂O. Водную фазу экстрагировали DCM (дважды), объединенные органические фазы промывали NaHCO₃, сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением вещества со снятой защитой. Использовали без дополнительной очистки.

Общий способ F для омыления эфира при использовании NaOH

В круглодонную колбу добавляли эфир (1,0 эквив.), NaOH (12,95 эквив.) и MeOH (степени чистоты ВЭЖХ; 8,35 мл/моль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После завершения взаимодействия, что было показано посредством анализа ТСХ, растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток разбавляли водой, подкисляли водной HCl и экстрагировали EtOAc (трижды). Объединенный органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением требуемого соединения (очистка посредством флэш-хроматографии при необходимости).

Общий способ G для восстановления производных кетонов при использовании NaBH₄

В круглодонную колбу добавляли кетон (1,0 эквив.), борогидрид натрия (2,4 эквив.) и безводный THF (приблизительно 40 объемов). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, гасили H₂O и экстрагировали этилацетатом (трижды). Объединенный органический слой промывали рассолом, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали посредством флэш-хроматографии и посредством ВЭЖХ при необходимости.

Общий способ K для защиты вторичного спирта в виде MOM эфира

К раствору исходного вторичного спирта (1 эквив.) в безводном DCM (приблизительно 17 объемов) добавляли DIPEA (3 эквив.) и MOM-Cl (5 эквив.) при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры перед тем, как оставить для перемешивания в течение ночи. После завершения перемешивания реакционную смесь гасили водой (приблизительно 3,4 мл/ммоль) и метанолом (приблизительно 3,4 мл/ммоль) перед разделением слоев, и экстракцией водного слоя EtOAc (четыре

раза), и промывкой объединенных органических слоев рассолом (дважды). Органическую фазу затем сушили (Na_2SO_4) и концентрировали под вакуумом с получением неочищенного вещества. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (ВЭЖХ при необходимости) с получением требуемого соединения.

Общий способ L для отщепления MOM-группы при использовании HCl

МOM-защищенное вещество (1,5 г; 1,76 ммоль; 1 эквив.) растворяли в MeOH (приблизительно 30 объемов) и 2 М HCl (приблизительно 5,7 мл/ммоль), затем смесь нагревали до 70°C в течение 5 часов. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали под вакуумом, подвергая азеотропной перегонке досуха ($\text{MeOH} \times 3$, $\text{CHCl}_3 \times 1$) с получением требуемого вещества.

Общий способ M для окисления вторичного спирта при использовании периодина Десса-Мартина

К раствору исходного вторичного спирта (1,0 эквив.) в дихлорметане при 0°C порциями добавляли периодинан Десса-Мартина (приблизительно 1,2 эквив.) в течение 10 минут. После нагревания в течение 18 часов до комнатной температуры посредством анализа ТСХ было установлено, что взаимодействие завершено, и реакцию смесь гасили посредством добавления насыщ. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и насыщ. раствора NaHCO_3 . Водную фазу отделяли и экстрагировали дихлорметаном (трижды), и объединенные органические фракции промывали насыщ. раствором NaHCO_3 , водой и рассолом, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением неочищенного требуемого продукта. Неочищенный продукт очищали посредством флэш-хроматографии (ВЭЖХ при необходимости) с получением требуемого соединения.

Общий способ N для гидрирования/гидрогенолиза при использовании катализатора

В круглодонную колбу добавляли бензил-защищенную желчную кислоту (1,0 эквив.), катализатор [Pd/C или PtO_2] (10 моль%) и растворитель [MeOH, EtOH и так далее]. Реакционную смесь дегазировали газообразным водородом и затем перемешивали в атмосфере H_2 при атмосферном давлении или при повышенном давлении в течение 16-72 часов. Катализатор отфильтровывали через целит, и фильтрат концентрировали и очищали посредством флэш-хроматографии.

Общий способ О для получения силилового эфира енола из производных кетонов

В круглодонную колбу добавляли DIPA (12,6 эквив.) и THF (1,25 мл/ммоль). Раствор охлаждали до -78°C , затем по каплям добавляли н-бутиллитий (2,5 М в гексанах; 12 эквив.) и перемешивали при -78°C в течение 30 минут. Добавляли TMSCl (10 эквив.) и перемешивали в течение 20 минут. Затем по каплям добавляли раствор производного кетона (1 эквив.) в THF (6,5 мл/ммоль) в течение 10 минут и перемешивали при этой температуре в течение 45 минут с последующим добавлением триэтиламина (18 эквив.) и перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь нагревали до -20°C , гасили насыщенным раствором NaHCO_3 и нагревали до комнатной температуры в течение 2 часов. Органический слой отделяли, и водный слой экстрагировали этилацетатом (трижды). Объединенный органический слой промывали насыщенным раствором NaHCO_3 , водой, рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением требуемого промежуточного силилового эфира енола, которое использовали для последующего взаимодействия без какой-либо очистки.

Общий способ Р для электрофильного фторирования силилового эфира енола при использовании Selectfluor (бис(тетрафторборат) 1-хлорметил-4-фтор-1,4-дiazониабицикло [2.2.2] октана) в DMF

В круглодонную колбу добавляли производное силилового эфира енола (1,0 эквив.), DMF (2 мл/ммоль) и раствор Selectfluor (1,5 эквив.) в DMF (3 мл/ммоль) при 0°C . Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, гасили H_2O и экстрагировали этилацетатом (четыре раза). Объединенный органический слой промывали рассолом, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали посредством флэш-хроматографии, и ВЭЖХ при необходимости.

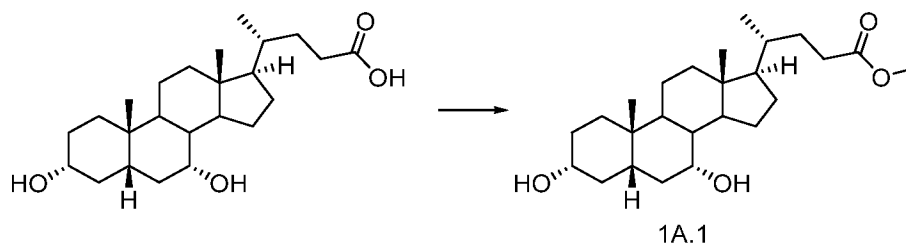
Общий способ Q для образования конъюгатов

Фторированную желчную кислоту (1 эквив.) растворяли в безводном DMF (12 объемов) при перемешивании в атмосфере аргона. Добавляли NATU (1 эквив.), DIPEA (3,0 эквив.) и аминокислоту (1,1 эквив.), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После завершения взаимодействия реакционную смесь наносили с помощью сухой загрузки непосредственно на диоксид кремния и очищали с помощью хроматографии на колонке C18 (градиентное элюирование MeOH в H_2O , 0-100%) с получением конъюгата в виде либо соли DIPEA,

либо свободной кислоты. Соли DIPEA затем обрабатывали с помощью колонки с ионообменной смолой в натриевой форме с получением требуемой натриевой соли соединений в виде остатка.

Пример 1 - синтез 2β-фторсоединений

А. Метил-3α,7α-дигидрокси-5β-холаноат (1A.1)

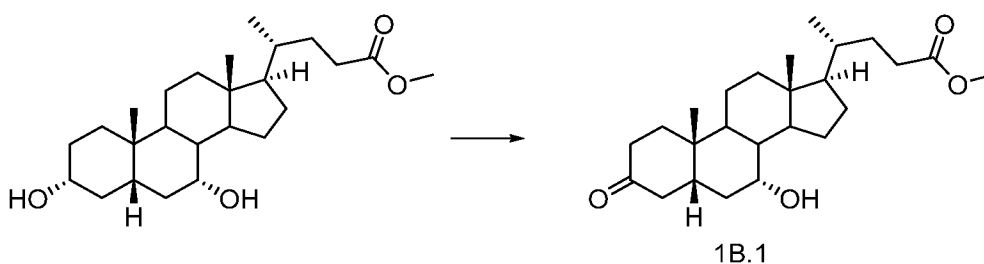


Использовали способ Пелликари (*ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 273-277). CDCA (хенодезоксихолевая кислота) (25,0 г; 64 ммоль; 1 эквив.) растворяли в метаноле степени чистоты ВЭЖХ (500 мл) перед добавлением *para*-толуолсульфоновой кислоты (1,21 г; 6,4 ммоль; 0,1 эквив.) и обработкой ультразвуком при 30°C в течение 2 часов. После завершения, что было установлено анализом ТСХ, растворитель удаляли под вакуумом перед растворением остатка в EtOAc (400 мл), промыванием органической фазы насыщ. NaHCO₃ (2×150 мл), водой (250 мл) и рассолом (250 мл). Органическую фазу затем сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением целевого соединения в виде белого/бледно-желтого твердого вещества (26,0 г; количественный) (общий способ А).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 3.84 (1H, q, J=2,4 Гц), 3.66 (3H, s), 3.44 (1H, tt, J=10,9, 4,5 Гц), 2.34 (1H, ddd, J=15,5, 11,0, 5,0 Гц), 2.28-2.15 (2H, m), 2.12-0.97 (26H, m), 0.93 (3H, d, J=6,2 Гц), 0.90 (3H, s), 0.65 (3H, s) м.д.

МСНР (масс-спектрометрия низкого разрешения) (ИЭР⁺ (ионизация электрораспылением)) m/z: 429,1 [M+Na]⁺.

В. Метил-7α-гидрокси-3-оксо-5β-холаноат (1B.1)



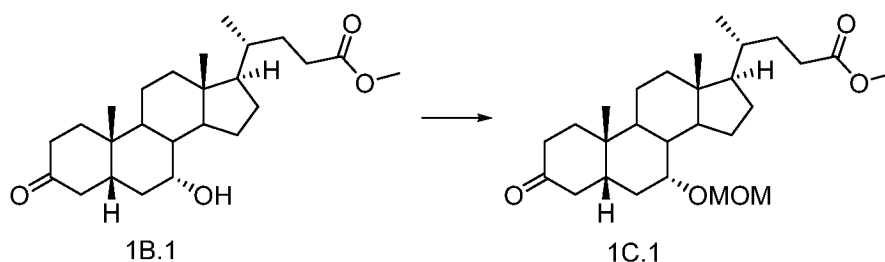
К раствору метил-3α,7α-дигидрокси-5β-холаноата (10,0 г; 24,6 ммоль; 1 эквив.) в воде (25 мл) и *трет*-бутаноле (100 мл) добавляли KBr (5,9 г; 49,0 ммоль; 2 эквив.),

КНСО₃ (24,6 г; 246 ммоль; 10 эквив.) и ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил) (5,0 г; 32,0 ммоль; 1,3 эквив.). Раствор охлаждали до 0°C перед добавлением приблизительно 11% раствора NaClO (54,2 мл; 73,2 ммоль; 3,0 эквив.) порциями в течение 6 часов. Реакцию останавливали медленным добавлением раствора тиосульфата натрия (300 мл; 1,2 М; 350 ммоль). Водную фазу экстрагировали EtOAc (2×300 мл), экстракты объединяли и промывали рассолом (300 мл) и водой (300 мл) перед сушкой (Na₂SO₄) и удалением растворителя под вакуумом. Полученное ярко-красное густое маслянистое неочищенное вещество (15 г) очищали при использовании флэш-хроматографии (PE/EtOAc, от 80:20 до 65:35) с получением белого твердого вещества (6,5 г; 16,0 ммоль; 66%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 3.93 (1H, br s), 3.67 (3H, s), 3.40 (1H, t, J=14,4 Гц), 2.46-1.10 (30H, m), 1.01 (3H, s), 0.95 (3H, d, J=6,6 Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 422,1 [M+NH₄]⁺, 427,1 [M+Na]⁺.

С. Метил 7α-метоксиметоксил-3-оксо-5β-холаноат (1С.1)

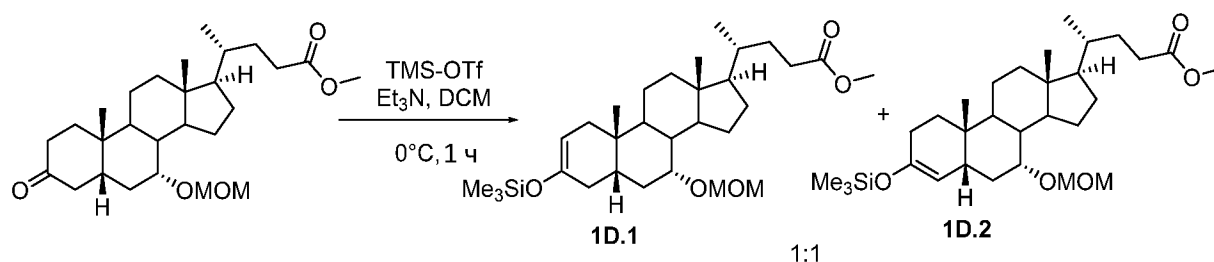


К раствору метил-7α-гидрокси-3-оксо-5β-холаноата (3,0 г; 7,41 ммоль; 1 эквив.) в безводном DCM (50 мл) добавляли DIPEA (3,83 мл; 22,2 ммоль; 3 эквив.) и MOM-Cl (2,82 мл; 37,1 ммоль; 5 эквив.) при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры перед тем, как оставить для перемешивания в течение ночи. После завершения взаимодействия реакцию смесь гасили водой (25 мл) и метанолом (25 мл) перед разделением слоев, и экстракцией водного слоя EtOAc (4×75 мл), и промывкой объединенных органических слоев рассолом (2×150 мл). Органическую фазу затем сушили (Na₂SO₄) и концентрировали под вакуумом с получением 3,8 г неочищенного вещества, которое очищали посредством флэш-хроматографии (PE/EtOAc, 75:25) с получением белого твердого вещества (3,10 г; 6,9 ммоль; 93%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.68 (1H, d, J=6,8 Гц), 4.55 (1H, d, J=6,8 Гц), 3.72-3.62 (4H, m), 3.43-3.28 (4H, m), 2.49-1.05 (27H, m), 1.03 (3H, s), 0.94 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.69 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 449,3 [M+H]⁺, 471,1 [M+Na]⁺.

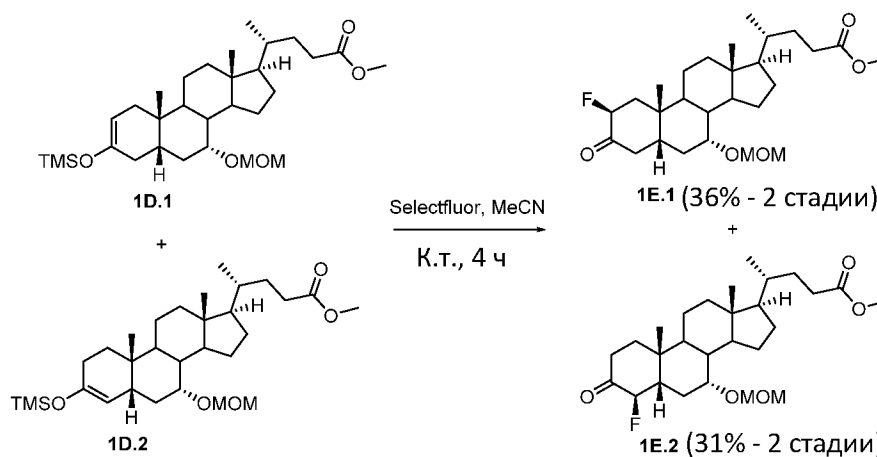
D. Метил-7 α -метоксиметоксил-3-триметилсилилокси-5 β -хол-2-еноат (1D.1) и метил-7 α -метоксиметоксил-3-триметилсилилокси-5 β -хол-3-еноат (1D.2)



Следовали способу Barlow et al (*Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1545-1554). К раствору метил-7 α -метоксиметоксил-3-оксо-5 β -холаноата (1,0 г; 2,23 ммоль; 1 эквив.) в безводном DCM (20 мл) при 0°C добавляли Et₃N (0,62 мл; 4,46 ммоль; 2 эквив.) и триметилсилилтрифлат (0,44 мл; 2,45 ммоль; 1,1 эквив.). Реакционную смесь оставляли для перемешивания в течение 1 часа перед разбавлением дополнительным количеством DCM (150 мл) и гашением насыщ. NaHCO₃ (100 мл). Слои разделяли, и водную фазу экстрагировали дополнительным количеством DCM (3×100 мл), экстракты объединяли и промывали рассолом (150 мл), сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением бесцветного масла (1,2 г), которое содержало метил-7 α -метоксиметоксил-3-триметилсилилокси-5 β -хол-2-еноат (1A.1) и метил-7 α -метоксиметоксил-3-триметилсилилокси-5 β -хол-3-еноат (1A.2) в соотношении приблизительно 1:1. Это неочищенное вещество использовали на последующих стадиях без дополнительной очистки.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.80-4.44 (3H, m), 3.67 (3H, s), 3.66-3.56 (1H, m), 3.40 (1,5H, s), 3.36 (1,5H, s), 2.51-1.08 (31H, m), 0.99-0.95 (3H, m), 0.93 (3H, d, J=6,2 Гц), 0.66 (1,5H, br. s), 0.65 (1,5H, br. s), 0.21-0.15 (9H, m) м.д.

Е. Метил-2β-фтор-7α-метоксиметоксил-3-оксо-5β-холаноат (1Е.1) и метил-4β-фтор-7α-метоксиметоксил-3-оксо-5β-холаноат (1Е.2)



Следовали способу Fujimoto *et al* (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6409-6413). К раствору 7 α -метоксиметоксил-3-триметилсилилокси-5 β -хол-2-еноата и метил-7 α -метоксиметоксил-3-триметилсилилокси-5 β -хол-3-еноата (1,10 г; 2,2 ммоль; 1 эквив.) в безводном ацетонитриле добавляли Selectfluor® (1,20 г; 3,3 ммоль; 1,5 эквив.), оставляя реакционную смесь для перемешивания при комнатной температуре в течение 4 часов. Растворитель удаляли под вакуумом перед разбавлением EtOAc (100 мл) и водой (100 мл). Слои разделяли перед экстракцией водного слоя дополнительным количеством EtOAc (2×100 мл). Объединенные органические слои затем промывали рассолом (150 мл), сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением 1,05 г бледно-желтого твердого неочищенного вещества. Неочищенное вещество очищали при использовании флэш-хроматографии (PE/EtOAc, 80:20) с получением метил-2 β -фтор-7 α -метоксиметоксил-3-оксо-5 β -холаноата в виде белого твердого вещества (377 мг; 0,81 ммоль; 36% за две стадии) и метил-4 β -фтор-7 α -метоксиметоксил-3-оксо-5 β -холаноата в виде белого твердого вещества (321 мг; 0,69 ммоль; 31% за две стадии).

1E.1: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 5.05 (1H, ddd, J=49,4, 13,5, 5,6 Гц), 4.67 (1H, d, J=6,8 Гц), 4.54 (1H, d, J=6,8 Гц), 3.67 (4H, s), 3.48 (1H, t, J=13,9 Гц), 3.37 (3H, s), 2.52 (1H, dt, J=12,7, 6,1 Гц), 2.42-1.12 (27H, m), 1.08 (3H, s), 0.95 (3H, d, J=6,6 Гц), 0.69 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (CDCl₃, 376 МГц): δ -195.19 (ddt, J=49,2, 9,6, 6,2 Гц) м.д.

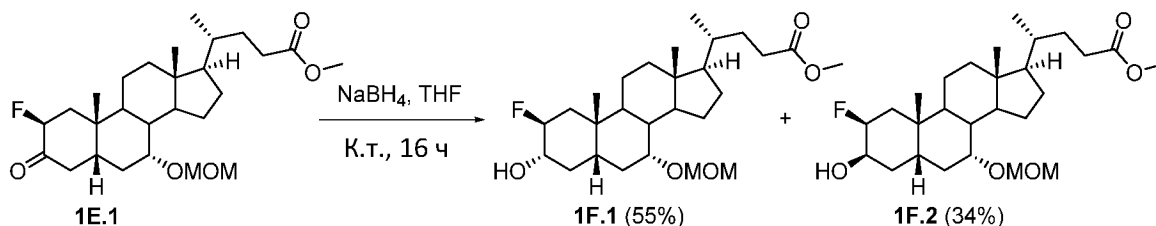
МСНР (ИЭР⁺) m/z: 484,2 [M+NH₄]⁺, 489,1 [M+Na]⁺.

1E.2: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 5.78 (1H, dd, J=46,8, 11,7 Гц), 4.77 (1H, d, J=6,8 Гц), 4.59 (1H, d, J=6,8 Гц), 3.78 (1H, q, J=2,7 Гц), 3.67 (3H, s), 3.40 (3H, s), 2.52 (1H, td, J=14,4, 4,9 Гц), 2.42-1.11 (24H, m), 1.07 (3H, s), 0.94 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (CDCl₃, 376 МГц): δ -200.67 (ddd, J=46,8, 12,1, 6,9 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 484,2 (M+NH₄)⁺, 489,1 (M+Na)⁺.

F. Метил-2 β -фтор-3 α -гидрокси-7 α -метоксиметоксил-5 β -холаноат (1F.1) и метил-2 β -фтор-3 β -гидрокси-7 α -метоксиметоксил-5 β -холаноат (1F.2)



К раствору метил-2 β -фтор-7 α -метоксиметоксил-3-оксо-5 β -холаноата (260 мг; 0,56 ммоль; 1 эквив.) в безводном тетрагидрофуране (20 мл) добавляли борогидрид

натрия (64 мг; 1,70 ммоль; 3 эквив.), и реакционную смесь оставляли для перемешивания в течение ночи при комнатной температуре. После завершения взаимодействия, что было установлено посредством анализа ТСХ, реакционную смесь разбавляли EtOAc (150 мл) и гасили водой (100 мл), разделяя слои перед экстракцией водного слоя дополнительным количеством EtOAc (2×100 мл). Объединенные органические слои затем промывали водой (150 мл) и рассолом (150 мл) перед сушкой (Na₂SO₄) и концентрированием под вакуумом с получением 306 мг бледного неочищенного масла. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (PE/EtOAc, 65:35) с получением метил-2β-фтор-3α-гидрокси-7α-метоксиметоксил-5β-холаноата в виде белого твердого вещества (144 мг; 0,307 ммоль; 55%) и метил-2β-фтор-3β-гидрокси-7α-метоксиметоксил-5β-холаноата в виде бесцветной смолы (88 мг; 0,19 ммоль; 34%).

1F.1: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.68 (1H, d, J=6,8 Гц), 4.54 (1H, d, J=7,1 Гц), 4.40 (1H, dddd, J=52,3, 12,0, 8,6, 4,4 Гц), 3.66 (3H, s), 3.62-3.47 (3H, m), 3.37 (3H, s), 2.48-1.01 (27H, m), 0.99 (3H, s), 0.92 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.64 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (CDCl₃, 376 МГц): δ -187.47 (ddq, J=52,3, 12,7, 7,1 Гц) м.д.

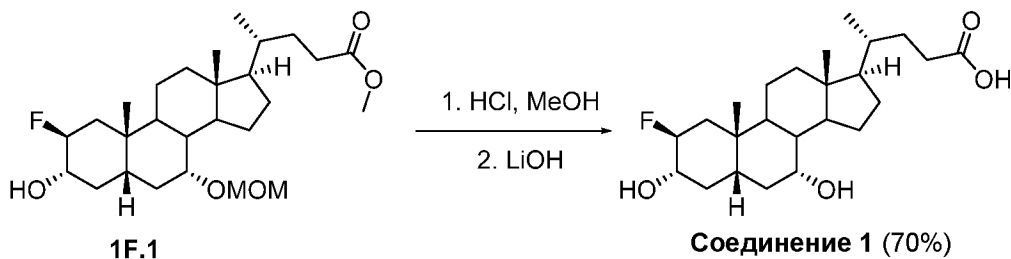
МСНР (ИЭР⁺) m/z: 486,1 [M+NH₄]⁺, 491,2 [M+Na]⁺.

1F.2: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.72-4.51 (3H, m), 4.20-4.09 (1H, m), 3.66 (3H, s), 3.59 (1H, d, J=2,4 Гц), 3.38 (3H, s), 2.45 (1H, ddd, J=15,2, 12,4, 2,2 Гц), 2.35 (1H, ddd, J=15,0, 10,3, 5,1 Гц), 2.22 (1H, ddd, J=15,6, 9,5, 6,5 Гц), 2.06-1.05 (25H, m), 1.02 (3H, s), 0.93 (3H, d, J=6,6 Гц), 0.65 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (CDCl₃, 376 МГц): δ -187.31 (dquin, J=47,2, 7,5 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 486,0 [M+NH₄]⁺, 491,1 [M+Na]⁺.

G. 2β-Фторхенодезоксихолево́вая кислота (соединение 1)



При использовании общего способа L с последующим применением общего способа С снимали защиту с метил-2β-фтор-3α-гидрокси-7α-метоксиметоксил-5β-холаноата (1F.1; 118 мг; 0,25 ммоль; 1 эквив.) с получением 2β-

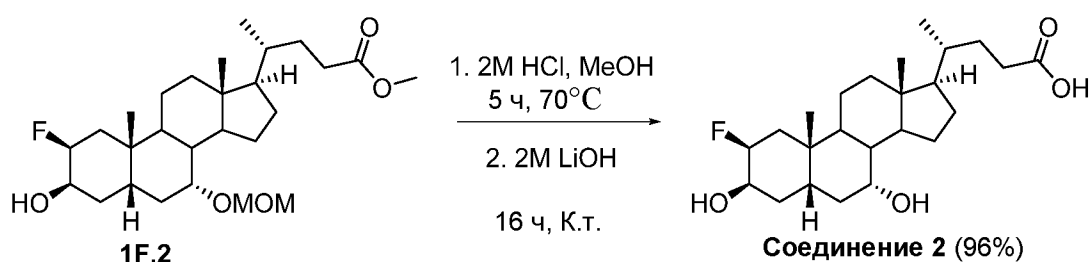
фторхенодезоксихолево́й кислоты (**соединение 1**) в виде бледно-желтого твердого вещества (72 мг; 0,18 ммоль; 70%).

Соединение 1: ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ 4.32 (1H, dddd, $J=52,5, 12,5, 8,6, 4,0$ Гц), 3.78 (1H, q, $J=2,3$ Гц), 3.44 (1H, tdd, $J=12,0, 8,7, 5,0$ Гц), 2.43 (1H, q, $J=13,2$ Гц), 2.33 (1H, ddd, $J=15,5, 11,0, 5,0$ Гц), 2.25-2.11 (2H, m), 2.04 (1H, dt, $J=12,4, 2,9$ Гц), 1.99-1.04 (22H, m), 1.00 (3H, s), 0.97 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CD_3OD): δ -186.77 (ddq, $J=52,2, 11,9, 7,8$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 393,1 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 821,2 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 843,3 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

Н. 2 β -Фтор-3 β ,7 α -дигидрокси-5 β -холановая кислота (**соединение 2**)



При использовании общего способа L с последующим применением общего способа С снимали защиту с метил-2 β -фтор-3 β -гидрокси-7 α -метоксиметоксил-5 β -холаноата (1F.2; 25 мг; 0,053 ммоль; 1 эквив.) с получением 2 β -фтор-3 β ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 2**) в виде смолистого твердого вещества (21 мг; 0,05 ммоль; 96%).

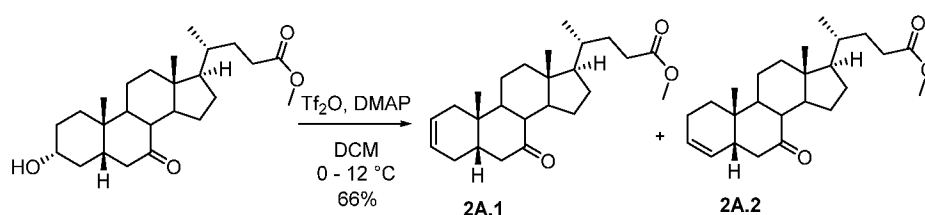
Соединение 2: ^1H ЯМР (400 МГц, ацетон- D_6): δ 10.42 (1H, br. s), 4.58 (1H, dddd, $J=47,7, 12,1, 4,4, 2,8$ Гц), 4.12-4.00 (1H, m), 3.80 (1H, q, $J=2,4$ Гц), 3.59 (1H, br. s), 3.29 (1H, br. s), 2.61 (1H, ddd, $J=15,3, 12,8, 2,3$ Гц), 2.34 (1H, ddd, $J=15,5, 11,0, 5,0$ Гц), 2.21 (1H, ddd, $J=15,5, 9,6, 6,4$ Гц), 2.03-1.03 (31H, m), 1.01 (3H, s), 0.97 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетон- D_6): δ -186.90 (dquin, $J=47,6, 7,6$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 393,4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 373,4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HF}]^+$, 355,5 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{HF}]^+$.

Пример 2 - синтез 2 α -фторсоединений

А. Метил-7-оксо-5 β -хол-2-еноат (2A.1) и метил-7-оксо-5 β -хол-3-еноат (2A.2)

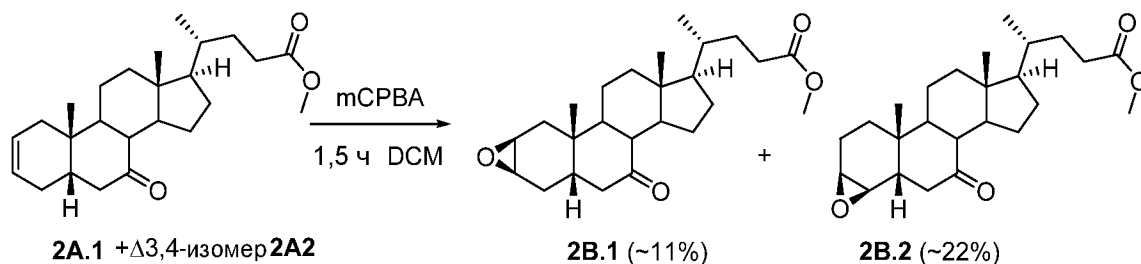


Метил-3 α -гидроксил-7-оксо-5 β -холаноат (60 г; 148 ммоль; 1,0 эквив; синтезированный из 7-кетолитолевой кислоты при использовании способа А) и DMAP (30 г; 122 ммоль; 2,0 эквив.) растворяли в DCM (500 мл) и охлаждали до 0°C на льду. Затем добавляли трифлатный ангидрид (26,1 мл; 156 ммоль; 1,05 эквив.) в течение 15 минут. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 часов, хотя взаимодействие отсутствовало. Реакционную смесь затем медленно нагревали до 10-12°C, и взаимодействие контролировали посредством ТСХ. После подтверждения завершения взаимодействия спустя 2 часа реакционную смесь гасили 2 М HCl (500 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали рассолом (500 мл), сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением 78 г коричневого смолистого твердого вещества. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EtOAc, от 95:5 до 90:10) с получением смеси алкенов метил-7-оксо-5 β -хол-2-еноата и метил-7-оксо-5 β -хол-3-еноата в виде бесцветной смолы (37,5 г; 97 ммоль; 66%).

2A.1 и 2A.2: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 5.67-5.30 (2H, m), 3.65 (3H, s), 2.89-2.79 (1H, m), 2.58-2.48 (1H, m), 2.44-1.26 (21H, m), 1.23 (2H, s), 1.21 (1H, s), 0.91-0.88 (3H, m), 0.65 (3H, m) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 387,2 [M+H]⁺, 404,2 [M+NH₄]⁺.

В. Метил-2 β ,3 β -эпокси-7-оксо-5 β -холаноат (2B.1) и метил-3 β ,4 β -эпокси-7-оксо-5 β -холаноат (2B.2)



Смесь алкенов метил-7-оксо-5 β -хол-2-еноата и метил-7-оксо-5 β -хол-3-еноата (20 г; 51,8 ммоль; 1 эквив.) растворяли в DCM (200 мл) при комнатной температуре перед добавлением mCPBA (19,1 г; 77,7 ммоль; 1,5 эквив.). Завершение взаимодействия было подтверждено через 1,5 часа, при этом в ходе взаимодействия смесь превратилась из раствора в суспензию. Реакционную смесь гасили насыщ. водн. Na₂S₂O₃ (150 мл) и оставляли для перемешивания в течение 30 минут. Дополнительное количество DCM (200 мл) и H₂O (150 мл) добавляли для облегчения сольватации. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали дополнительным количеством DCM (200 мл), затем

объединенные органические слои промывали насыщ. водн. NaHCO_3 (200 мл) и сушили (Na_2SO_4) и концентрировали с получением 20,5 г бледно-желтого смолистого твердого вещества. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/ EtOAc , от 92,5:7,5 до 92:8 до 80:10 до 88:12 до 80:20) с получением чистого $\Delta 3\beta,4\beta$ -эпоксида (2,00 г) вместе с $\Delta 2\beta,3\beta$ -эпоксидом 80% чистоты (1,85 г) и значительного количества смешанных фракций (8,5 г). Смесь фракций повторно очищали (петролейный эфир/ EtOAc , от 93:7 до 92:8 до 91:9 до 80:10 до 88:12 до 85:15 до 80:20) с получением чистого $\Delta 3\beta,4\beta$ -эпоксида (0,8 г) вместе с $\Delta 3\beta,4\beta$ -эпоксидом 80% чистоты (2,15 г) и $\Delta 2,3$ -эпоксидом 60% чистоты (1,30 г). В общей сложности был выделен метил-2 $\beta,3\beta$ -эпокси-7-оксо-5 β -холаноат в виде белого кристаллического твердого вещества (приблизительно 2,3 г; 5,8 ммоль; 11%) вместе с метил-3 $\beta,4\beta$ -эпокси-7-оксо-5 β -холаноатом в виде белого твердого вещества (приблизительно 4,5 г; 11,3 ммоль; 22%).

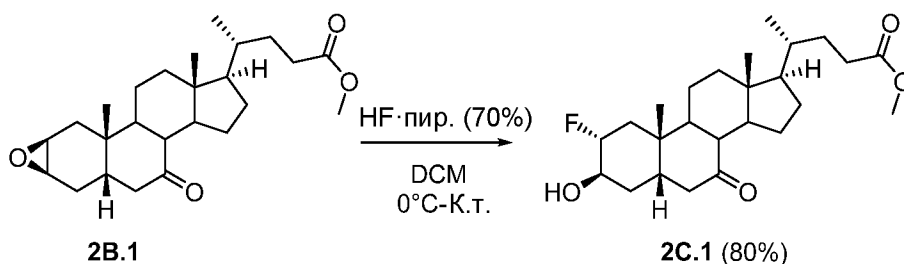
2B.1: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.63 (3H, s), 3.13-3.09 (1H, m), 2.98 (1H, dd, $J=5,3, 4,4$ Гц), 2.78 (1H, dd, $J=12,3, 4,3$ Гц), 2.39-2.11 (5H, m), 1.91 (6H, m), 1.61-1.17 (10H, m), 1.13 (3H, m), 1.09-0.92 (2H, m), 0.89 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.63 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 403,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 425,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 403,1 $[\text{M}+\text{H}-\text{MeCN}]^+$.

2B.2: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.64 (3H, s), 3.16-3.13 (1H, m), 2.89 (1H, dd, $J=12,6, 7,0$ Гц), 2.82 (1H, d, $J=3,8$ Гц), 2.42-1.17 (24H, m), 1.13 (3H, s), 0.89 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.64 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 403,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 425,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

С. Метил-2 α -фтор-3 β -гидрокси-7-оксо-5 β -холаноат (2C.1)



Раствор метил-2 $\beta,3\beta$ -эпокси-7-оксо-5 β -холаноата (830 мг; 2,06 ммоль; 1 эквив.) в безводном DCM (25 мл) охлаждали до 0°C перед добавлением 70% комплекса $\text{HF}\cdot\text{пиридин}$ (830 мкл) и оставляли для нагревания до комнатной температуры. После подтверждения завершения взаимодействия спустя 2 суток реакционную смесь снова охлаждали до 0°C и осторожно гасили посредством добавления по каплям насыщенного NaHCO_3 (20 мл). Слои разделяли, и водный слой

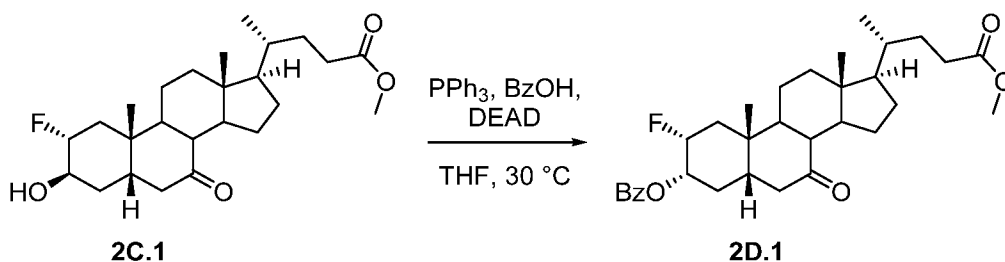
экстрагировали дополнительным количеством DCM (20 мл); объединенные органические фазы промывали 2 М HCl и рассолом (по 30 мл каждого), сушили (Na_2SO_4) и концентрировали до получения 840 мг белого пенистого твердого вещества. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (PE/EtOAc, 70:30) с получением метил-2 α -фтор-3 β -гидрокси-7-оксо-5 β -холаноата в виде смолистого твердого вещества (700 мг; 1,66 ммоль; 80%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ .53 (1H, dq, $J=47,0$, 2,6 Гц), 4.04-3.96 (1H, m), 3.65 (3H, s), 2.87 (1H, dd, $J=12,7$, 6,1 Гц), 2.42-1.25 (25H, m), 1.22 (3H, s), 1.20-1.00 (3H, m), 0.90 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.64 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (CDCl_3 , 376 МГц): δ -184.60 (tt, $J=48,6$, 8,7 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 423,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 445,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 845,5 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

D. Метил-2 α -фтор-3 α -бензоилокси-7-оксо-5 β -холаноат (2D.1)



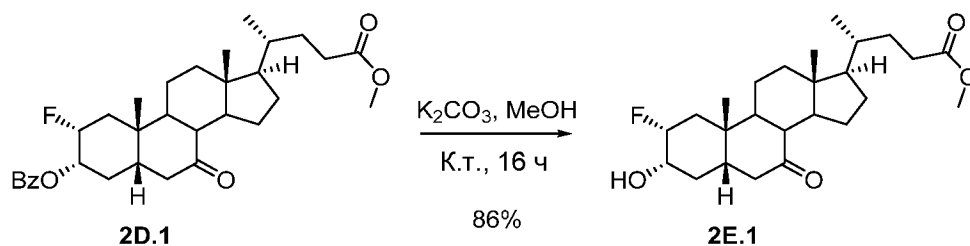
К раствору метил-2 α -фтор-3 β -гидрокси-7-оксо-5 β -холаноата (1,05 г; 2,5 ммоль; 1 эквив.), PPh_3 (980 мг; 3,7 ммоль; 1,5 эквив.) и бензойной кислоты (450 мг; 3,7 ммоль; 1,5 эквив.) в безводном THF (25 мл) добавляли DEAD (650 мкл; 3,7 ммоль; 1,5 эквив.). Раствор оставляли для перемешивания при 30 $^\circ\text{C}$ в течение выходных дней, после чего анализ ^{19}F ЯМР неочищенного вещества показал приблизительно 40% превращение в требуемый бензоат. Добавляли дополнительные количества PPh_3 , BzOH и DEAD (1,5 эквив. каждого), и реакционную смесь оставляли для перемешивания в течение ночи, после чего превращение составило приблизительно 60%. Добавляли дополнительные количества PPh_3 , бензойной кислоты и DEAD (0,5 эквив. каждого), перемешивали в течение ночи и достигали 80% превращения. Добавляли еще PPh_3 , бензойной кислоты и DEAD (0,5 эквив. каждого) и еще раз перемешивали в течение ночи, хотя дальнейшего взаимодействия не отмечали. Растворитель удаляли под вакуумом, и неочищенное ярко-желтое вещество разделяли посредством флэш-хроматографии (PE/EtOAc, от 98:2 до 95:5 до 85:15 до 70:30 до 0:100) с получением 285 мг метил-2 α -фтор-3 α -бензоилокси-7-оксо-5 β -холаноата (приблизительно 90% чистоты) вместе с 1,28 г дополнительных смешанных фракций.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 8.04 (2H, dd, J=7,8, 1,2 Гц), 7.56 (1H, tt, J=7,6, 1,2 Гц), 7.44 (2H, t, J=7,8 Гц), 5.12-4.79 (2H, m), 3.67 (3H, s), 2.92 (1H, dd, J=12,6, 5,9 Гц), 2.53-1.29 (21H, m), 1.26 (3H, s), 1.24-1.04 (4H, m), 0.93 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.67 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (CDCl₃, 376 МГц): δ -199.45 (tdd, J=49,9, 28,6, 8,7 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 527,2 [M+H]⁺, 544,1 [M+NH₄]⁺, 549,1 [M+Na]⁺.

Е. Метил-2α-фтор-3α-гидрокси-7-оксо-5β-холаноат (2Е.1)



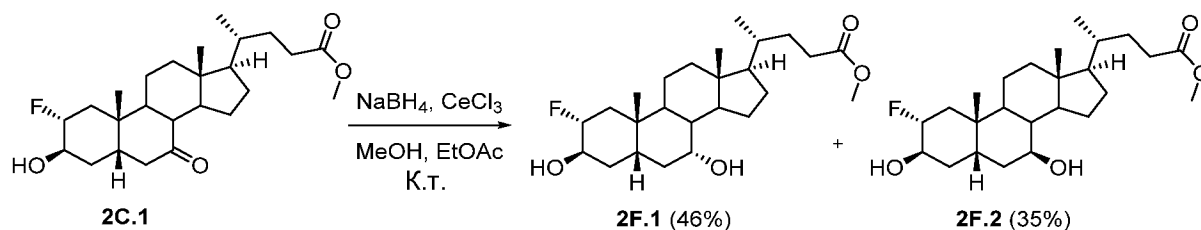
Использовали способ Zhao *et al* (Eur. J. Org. Chem., 2005, 2005, 4414-4427). Смесь метил-2α-фтор-3α-бензоилокси-7-оксо-5β-холаноата (400 мг; 0,76 ммоль; 1 эквив.) и карбоната калия (20 мг; 0,15 ммоль; 0,2 эквив.) суспендировали в безводном MeOH (20 мл) и оставляли для перемешивания в течение 16 часов при комнатной температуре. Через 16 часов реакционная смесь превращалась в бесцветный раствор, и завершение взаимодействия было установлено посредством анализа ТСХ. Растворитель удаляли под вакуумом, и неочищенный остаток распределяли между EtOAc/H₂O (5 мл каждого), и водный слой экстрагировали дополнительным количеством EtOAc (2×5 мл). Объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением 320 мг бледной смолы. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (PE/ацетон, 70:30) с получением метил-2α-фтор-3α-гидрокси-7-оксо-5β-холаноата (275 мг; 0,65 ммоль; 86%) в виде смолистого твердого вещества.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.71 (1H, d, J=52,0 Гц), 3.62 (3H, s), 3.59-3.45 (1H, m), 2.84 (1H, dd, J=12,5, 6,0 Гц), 2.43 (1H, d, J=8,3 Гц), 2.39-2.26 (3H, m), 2.24-2.08 (2H, m), 2.01-1.20 (18H, m), 1.18 (3H, s), 1.14-1.02 (3H, m), 0.88 (3H, d, J=6,5 Гц), 0.61 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (CDCl₃, 376 МГц): δ -202.32 (tdd, J=51,2, 29,5, 8,7 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 423,4 [M+H]⁺.

Г. Метил-2α-фтор-3β,7α-дигидрокси-5β-холаноат (2Г.1) и метил-2α-фтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холаноат (2Г.2)



При использовании общего способа В восстанавливали метил-2α-фтор-3β-гидрокси-7-оксо-5β-холаноат (300 мг; 0,71 ммоль; 1 эквив.). Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (PE/EtOAc, от 65:35 до 55:45) с получением метил-2α-фтор-3β,7α-дигидрокси-5β-холаноата (140 мг; 0,33 ммоль; 46%) и метил-2α-фтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холаноата (107 мг; 0,25 ммоль; 35%).

2F.1: $^1\text{H ЯМР}$ (400 МГц, CDCl_3): δ 4.55 (1H, dq, $J=47,4, 2,8$ Гц), 4.00 (1H, dq, $J=7,2, 3,4$ Гц), 3.86 (1H, q, $J=2,6$ Гц), 3.66 (3H, s), 2.72 (1H, tt, $J=14,3, 2,4$ Гц), 2.35 (1H, ddd, $J=15,5, 11,0, 5,0$ Гц), 2.22 (1H, ddd, $J=15,7, 9,4, 6,5$ Гц), 2.11-1.06 (27H, m), 0.97 (3H, s), 0.92 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.66 (3H, s) м.д.

$^{19}\text{F ЯМР}$ (376 МГц, CDCl_3): δ -184.70 (tt, $J=48,6, 8,7$ Гц) м.д.;

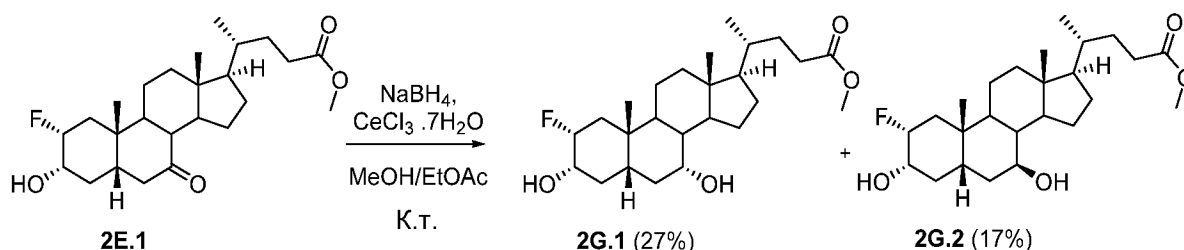
МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 447,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2F.2: $^1\text{H ЯМР}$ (400 МГц, CDCl_3): δ 4.50 (1H, dq, $J=47,3, 2,8$ Гц), 3.95 (1H, dq, $J=7,2, 3,4$ Гц), 3.63 (3H, s), 3.55 (1H, td, $J=9,7, 5,1$ Гц), 2.32 (1H, ddd, $J=15,4, 10,2, 5,0$ Гц), 2.19 (1H, ddd, $J=15,6, 9,4, 6,5$ Гц), 2.11-1.02 (27H, m), 0.96 (3H, s), 0.90 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.65 (3H, s) м.д.

$^{19}\text{F ЯМР}$ (376 МГц, CDCl_3): δ -184.43 (tt, $J=47,7, 8,7$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 447,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

G. Метил-2α-фтор-3α,7α-дигидрокси-5β-холаноат (2G.1) и метил-2α-фтор-3α,7β-дигидрокси-5β-холаноат (2G.2)



При использовании общего способа В восстанавливали метил-2 α -фтор-3 α -гидрокси-7-оксо-5 β -холаноат (270 мг; 0,64 ммоль; 1 эквив.). Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (РЕ/ацетон, 75:25) с получением 33 мг чистого 7 α -ОН аналога вместе с 140 мг смеси как 7 α -ОН, так и 7 β -ОН эпимеров. Смесь повторно очищали посредством флэш-хроматографии (РЕ/EtOAc, от 60:40 до 50:50) с получением дополнительного количества чистого метил-2 α -фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холаноата (всего 74 мг; 0,17 ммоль; 27%) и чистого метил-2 α -фтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноата (45 мг; 0,11 ммоль; 17%), оба в виде смолистых твердых веществ.

2G.1: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4.67 (1H, d, $J=52,1$ Гц), 3.78 (1H, q, $J=2,4$ Гц), 3.59 (3H, s), 3.37 (1H, dddd, $J=28,5, 12,0, 4,4, 2,5$ Гц), 2.46 (1H, q, $J=13,0$ Гц), 2.37-2.23 (2H, m), 2.20-2.10 (1H, m), 2.04-0.88 (27H, m), 0.88-0.83 (6H, m), 0.59 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (CDCl_3 , 376 МГц): δ -202.71 (tdd, $J=52,0, 27,7, 8,7$ Гц) м.д.

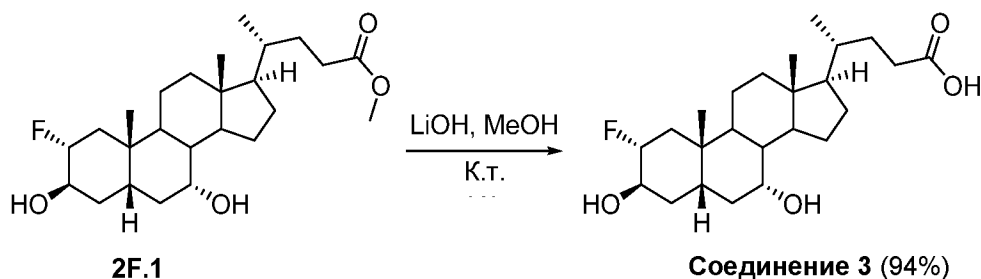
МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 407,4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 387,3 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HF}]^+$.

2G.2: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4.74 (1H, d, $J=52,1$ Гц), 3.66 (3H, s), 3.63-3.35 (2H, m), 2.43-2.29 (2H, m), 2.28-2.14 (1H, m), 2.08-1.00 (29H, m), 0.96 (3H, s), 0.92 (3H, d, $J=6,2$ Гц), 0.67 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (CDCl_3 , 376 МГц): δ -202.49 (tdd, $J=52,0, 29,5, 8,7$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z 407,4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 387,3 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HF}]^+$.

Н. 2 α -Фтор-3 β ,7 α -дигидрокси-5 β -холановая кислота (соединение 3)



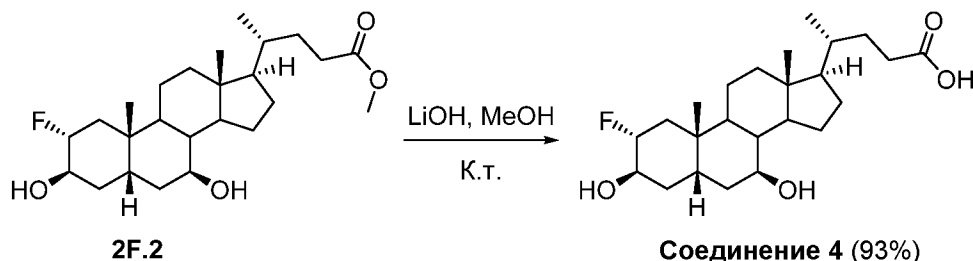
При использовании общего способа С метил-2 α -фтор-3 β ,7 α -дигидрокси-5 β -холаноат (105 мг; 0,25 ммоль; 1 эквив.) гидролизovali с получением 2 α -фтор-3 β ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 3**) (96 мг; 0,23 ммоль; 94%) в виде бледного твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, ацетон- D_6): δ 10.51 (1H, br. s), 4.58 (1H, dq, $J=48,0, 2,7$ Гц), 3.96 (1H, dq, $J=7,2, 3,4$ Гц), 3.91 (1H, q, $J=2,8$ Гц), 2.89 (1H, tt, $J=14,2, 2,6$ Гц), 2.43 (1H, ddd, $J=15,5, 10,7, 5,3$ Гц), 2.30 (1H, ddd, $J=15,0, 9,4, 6,7$ Гц), 2.20-2.06 (4H, m), 2.01-1.13 (21H, m), 1.11-0.97 (6H, m), 0.78 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетон- D_6): δ - 184.37 (tt, $J=49,4, 8,7$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 409,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 819,5 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

I. 2 α -Фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холановая кислота (соединение 4)



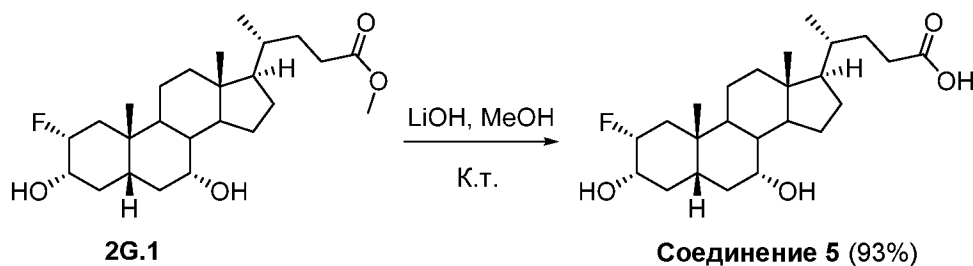
При использовании общего способа С метил-2 α -фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (90 мг; 0,21 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2 α -фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 4**) (80 мг; 0,19 ммоль; 93%) в виде бесцветного твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, ацетон- D_6): δ 10.43 (br. s), 4.58 (1H, dq, $J=48,0, 3,1$ Гц), 3.99 (1H, dq, $J=7.1, 3,3$ Гц), 3.57 (1H, tdd, $J=10,2, 5,0, 1,0$ Гц), 2.42 (1H, ddd, $J=15,5, 11,0, 5,0$ Гц), 2.29 (1H, ddd, $J=15,8, 9,2, 6,8$ Гц), 2.22-2.06 (4H, m), 2.04-1.14 (23H, m), 1.07 (3H, s), 1.05 (3H, d, $J=6,6$ Гц), 0.79 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетон- D_6): δ -184.29 (tt, $J=49,4, 8,7$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 409,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 819,5 $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

J. 2 α -Фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановая кислота (соединение 5)



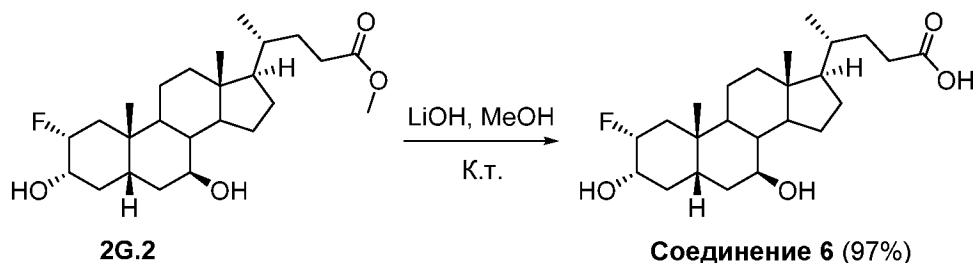
При использовании общего способа С метил-2 α -фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холаноат (74 мг; 0,17 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2 α -фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 5**) (65 мг; 0,16 ммоль; 93%) в виде бесцветного твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, ацетон- D_6): δ 4.65 (dq, $J=52,3, 1,7$ Гц), 3.81 (1H, q, $J=2,8$ Гц), 3.40 (1H, dddd, $J=29,7, 12,0, 3,9, 2,1$ Гц), 2.69 (1H, q, $J=12,6$ Гц), 2.39-2.16 (3H, m), 2.02-1.01 (25H, m), 0.98-0.91 (6H, m), 0.69 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетон- D_6): δ -200.79 (tdd, $J=51,2, 29,5, 8,7$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z : 841,4 $[2M+H]^+$, 393,4 $[M+H-H_2O]^+$, 375,4 $[M+H-H_2O-HF]^+$, 373,4 $[M+H-2H_2O]^+$.

К. 2 α -Фтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановая кислота (соединение 6)



При использовании общего способа С метил-2 α -фтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (44 мг; 0,10 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2 α -фтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 6**) (40 мг; 0,97 ммоль; 97%) в виде бесцветного твердого вещества.

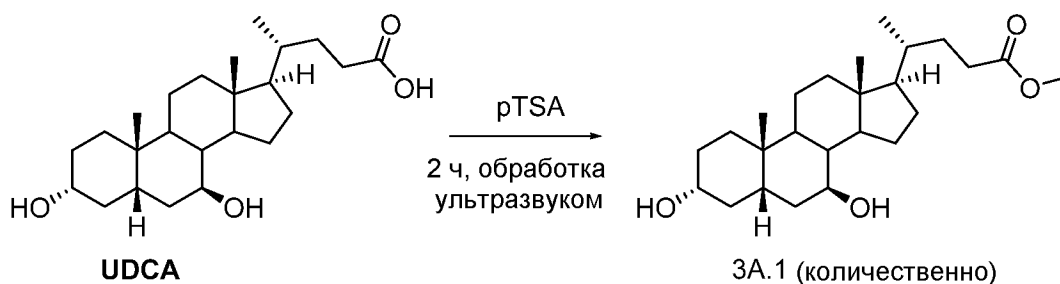
¹H ЯМР (400 МГц, ацетон-D₆): δ 4.67 (1H, dq, $J=52,1, 1,7$ Гц), 3.61-3.42 (2H, m), 2.39-2.15 (3H, m), 2.02-1.06 (29H, m), 0.99-0.93 (6H, m), 0.70 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, ацетон-D₆): δ -200.58 (tdd, $J=50,7, 30,3, 6,9$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z : 393,4 $[M+H-H_2O]^+$, 375,4 $[M+H-H_2O-HF]^+$, 373,4 $[M+H-2H_2O]^+$.

Пример 3 - синтез 2,2-дифторированных аналогов

А. Метил-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (3А.1)



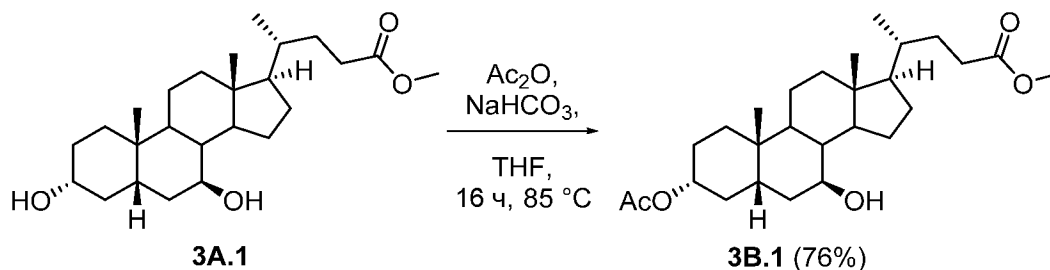
При использовании общего способа А защищали UDCA (100 г; 250 ммоль; 1 эквив.) с получением метил-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноата в виде белого твердого вещества (103 г; 250 ммоль; количественно).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 3.66 (3H, s), 3.73-3.63 (2H, m), 3.58 (2H, td, $J=10,4, 5,3$ Гц), 2.35 (1H, ddd, $J=15,3, 10,1, 4,8$ Гц), 2.21 (1H, ddd, $J=15,6, 9,6, 6,4$ Гц), 1.99 (1H, dt, $J=12,3, 2,8$ Гц), 1.95-0.97 (26H, m), 0.94 (3H, s), 0.92 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.67 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z : 389,5 $[M+H-H_2O]^+$, 371,5 $[M+H-2H_2O]^+$.

Данные согласуются с литературными данными (кроме точки плавления); смотри J. Ren, Y. Wang, J. Wang, J. Lin, K. Wei, R. Huang, *Steroids* **2013**, 78, 53-58.

В. Метил-3 α -ацетокси-7 β -гидрокси-5 β -холаноат (3В.1)

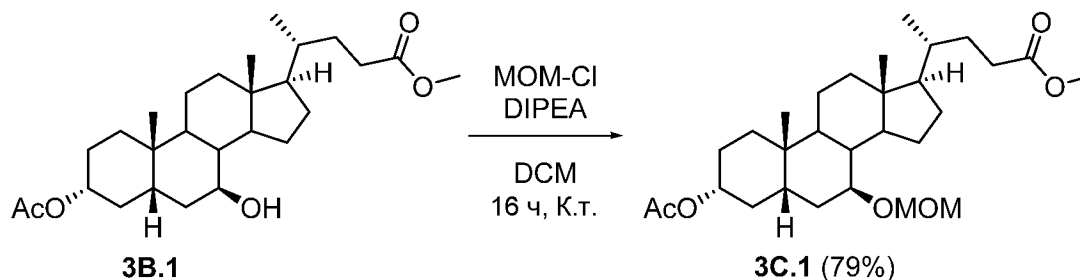


Метил-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (30,0 г; 73,8 ммоль; 1 эквив.), ангидрид уксусной кислоты (35 мл; 369 ммоль; 1 эквив.) и NaHCO₃ (37,2 г; 443 ммоль; 6 эквив.) помещали в THF (600 мл), и реакционную смесь нагревали до 85°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали, фильтровали, и супернатант концентрировали под вакуумом с получением неочищенного остатка. Его помещали в EtOAc и рассол (по 300 мл каждого), слои затем разделяли, и водный слой экстрагировали дополнительным количеством EtOAc (2×200 мл). Объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением 37 г прозрачной смолы/жидкости. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EtOAc, от 85:15 до 80:20 до 70:30) с получением метил-3 α -ацетокси-7 β -гидрокси-5 β -холаноата в виде смолистого твердого вещества (25,3 г; 56,4 ммоль; 76%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.64 (1H, tt, J=10,5, 5,5 Гц), 3.64 (3H, s), 3.55 (1H, ddd, J=11,5, 8,7, 5,1 Гц), 2.33 (1H, ddd, J=15,5, 11,0, 5,0 Гц), 2.20 (1H, ddd, J=15,6, 9,6, 6,4 Гц), 2.00 (3H, s), 1.97-0.98 (24H, m), 0.93 (3H, s), 0.90 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.65 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 471,5 [M+Na]⁺, 371,4 [M+H-H₂O-HOAc]⁺.

С. Метил-3 α -ацетокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноат (3С.1)



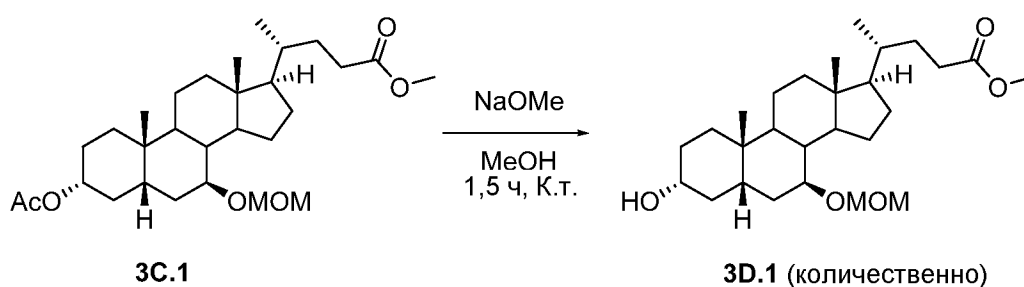
При использовании общего способа К метил-3 α -ацетокси-7 β -гидрокси-5 β -холаноат (72 г; 160,5 ммоль) защищали в виде MOM эфира. Неочищенное вещество

очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EtOAc, от 85:15 до 80:20 до 70:30 до 60:40) с получением метил-3 α -ацетокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноата в виде смолистого твердого вещества (62 г; 126 ммоль; 79%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.70-4.61 (1H, m), 4.60 (2H, s), 3.64 (3H, s), 3.39-3.25 (4H, m), 2.33 (ddd, J=15,5, 11,0, 5,0 Гц), 2.19 (1H, ddd, J=15,5, 9,6, 6,4 Гц), 2.00 (3H, s), 1.90-0.98 (25H, m), 0.94 (3H, s), 0.90 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.65 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 515,5 [M+Na]⁺, 371,5 [M+H-НОСН₂ОСН₃-НОАс]⁺.

D. Метил-3 α -гидрокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноат (3D.1)

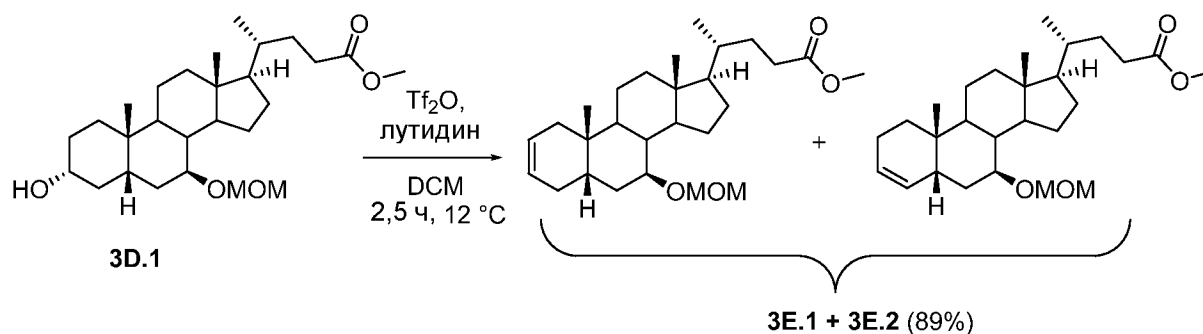


При использовании общего способа Е метил-3 α -ацетокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноат (82 г; 166 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением метил-3 α -гидрокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноата в виде бледно-желтой смолы (75 г; 166 ммоль; количественный выход).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.61 (2H, s), 3.65 (3H, s), 3.56 (1H, tt, J=10,5, 5,0 Гц), 3.41-3.25 (4H, m), 2.34 (1H, ddd, J=15,5, 11,0, 5,0 Гц), 2.20 (1H, ddd, J=15,5, 9,6, 6,4 Гц), 2.02-1.90 (1H, m), 1.89-1.72 (6H, m), 1.70-0.97 (19H, m), 0.94 (3H, s), 0.90 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.66 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 371,5 [M+H-НОСН₂ОСН₃-H₂O]⁺.

Е. Метил-7 β -метоксиметоксил-5 β -хол-2-еноат (3E.1) и метил-7 β -метоксиметоксил-5 β -хол-3-еноат (3E.2)

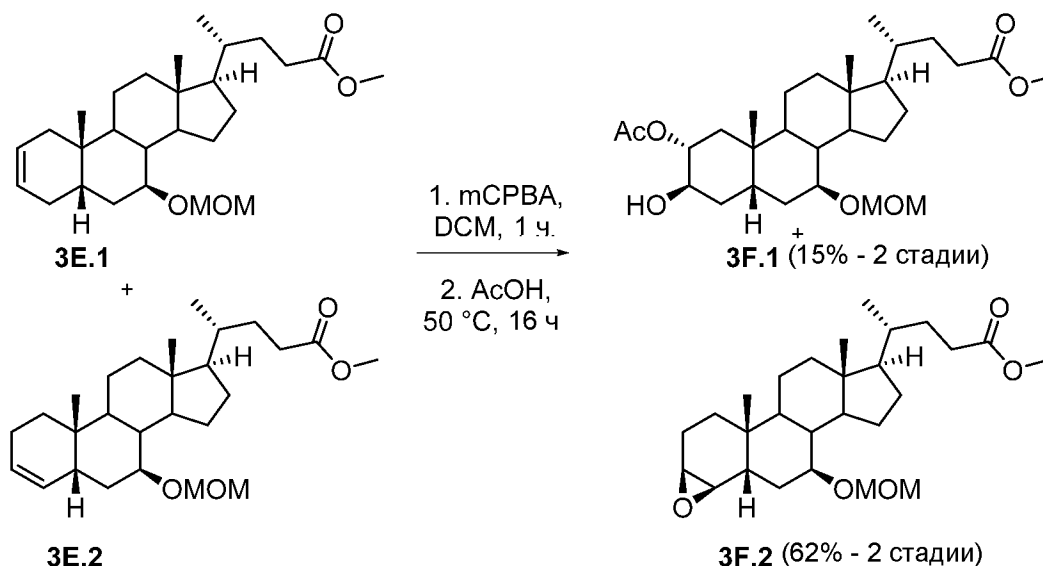


Метил-3 α -гидрокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноат (75 г; 166 ммоль; 1 эквив.)

растворяли в DCM (650 мл) и охлаждали до 5°C на льду перед добавлением лутидина (58 мл; менее 500 ммоль; 3 эквив.) и Tf₂O (31 мл; 183 ммоль; 1,1 эквив.). Реакционную смесь нагревали до 8-10°C в течение 1 часа, однако взаимодействие не было завершено, добавляли дополнительное количество лутидина (25 мл) и Tf₂O (15 мл), и реакционную массу дополнительно нагревали до 12-14°C в течение еще 1,5 часа. Завершение взаимодействия было установлено посредством анализа ТСХ. Реакционную смесь наносили с помощью сухой загрузки на диоксид кремния и очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EtOAc, от 98:2 до 97:3 до 95:5) с получением неразделимой смеси метил-7β-метоксиметоксил-5β-хол-2-еноата и метил-7β-метоксиметоксил-5β-хол-3-еноата в виде бледно-желтой смолы (64,1 г; 148 ммоль; 89%).

3E.1/3E.2: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 5.74-5.34 (2H, m), 4.68-4.62 (2H, m), 3.66 (3H, s), 3.37 (3H, s), 3.13 (1H, td, J=10,2, 5,0 Гц), 2.32 (1H, ddd, J=15,5, 10,3, 5,0 Гц), 2.26-2.16 (1H, m), 2.15-1.00 (27H, m), 0.98 (2H, s), 0.92 (2H, d, J=6,4 Гц), 0.86 (2H, d, J=6,6 Гц), 0.68 (3H s) м.д.

F. Метил-2α-ацетокси-3β-гидрокси-7β-метоксиметоксил-5β-холаноат (3F.1) и метил-3β,4β-эпоксид-7β-метоксиметоксил-5β-холаноат (3F.2)



Смесь метил-7β-метоксиметоксил-5β-хол-2-еноата и метил-7β-метоксиметоксил-5β-хол-3-еноата (63,0 г; 146 ммоль; 1 эквив.) вместе с mCPBA (54,0 г; 1,5 эквив.) растворяли в DCM и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную массу гасили насыщ. водн. Na₂S₂O₃ (250 мл) и перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали

DCM (300 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщ. водн. NaHCO_3 (300 мл), сушили (Na_2SO_4) и концентрировали с получением 72 г бледно-желтой смолы, содержащей неразделимую смесь $\Delta^{2\beta,3\beta}$ - и $\Delta^{3\beta,4\beta}$ -эпоксидов (принять количественный выход). Эту смесь затем растворяли в AcOH (600 мл) и нагревали до 50°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, затем подвергали азеотропной перегонке ($\text{EtOAc} \times 3$; $\text{DCM} \times 1$), перед тем как неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EA, от 85:15 до 80:20 до 70:30 до 60:40 до 50:50) с получением метил-2 α -ацетокси-3 β -гидрокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноата в виде смолистого твердого вещества (11,1 г; 21,9 ммоль; 15%-2 стадии) и метил-3 $\beta,4\beta$ -эпокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноата в виде смолистого твердого вещества (40,5 г; 90 ммоль; 62%-2 стадии).

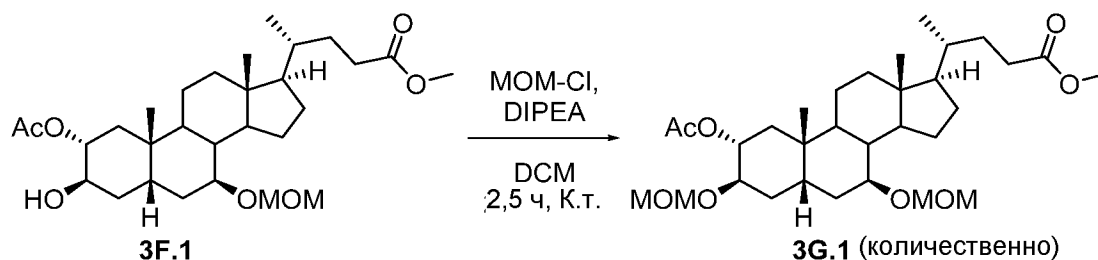
3F.1: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4.74 (1H, q, $J=3,9$ Гц), 4.62 (2H, s), 3.79 (1H, q, $J=3,7$ Гц), 3.64 (3H, s), 3.36-3.31 (4H, m), 2.33 (1H, ddd, $J=15,5, 11,0, 5,0$ Гц), 2.20 (1H, ddd, $J=15,5, 9,6, 6,4$ Гц), 2.03 (3H, s), 2.01-0.99 (29H, m), 0.98 (3H, s), 0.90 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.65 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 531,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 387,4 $[\text{M}+\text{H}-\text{HOCH}_2\text{OCH}_3-\text{HOCH}_2\text{OCH}_3]^+$.

3F.2: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4.64 (2H, s), 3.64 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.19 (1H, br. s), 3.10 (1H, td, $J=10,8, 4,5$ Гц), 2.88 (1H, d, $J=3,7$ Гц), 2.32 (1H, ddd, $J=15,5, 11,0, 5,0$ Гц), 2.19 (1H, ddd, $J=15,5, 9,6, 6,4$ Гц), 2.12-2.04 (1H, m), 2.03-0.95 (25H, m), 0.90 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.87 (3H, s), 0.65 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 417,4 $[\text{M}, \text{частичное } -\text{MOM} \text{ отщепление}]^+$, 387,4 $[\text{M}+\text{H}-\text{HOCH}_2\text{OCH}_3]^+$.

G. Метил-2 α -ацетокси-3 $\beta,7\beta$ -диметоксиметоксил-5 β -холаноат (3G.1)

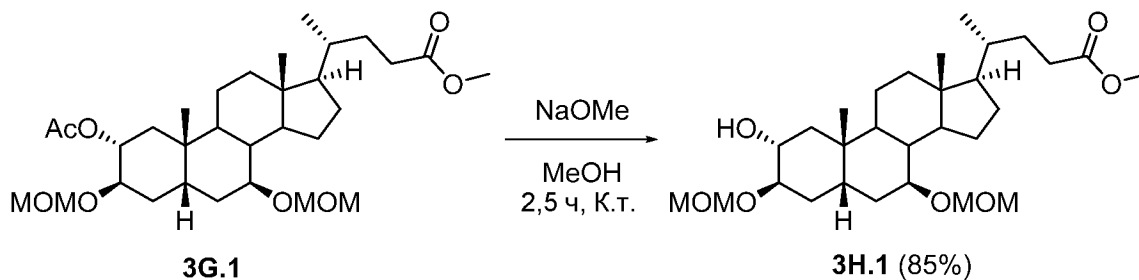


При использовании общего способа К метил-2 α -ацетокси-3 β -гидрокси-7 β -метоксиметоксил-5 β -холаноат (11,0 г; 21,6 ммоль; 1 эквив.) защищали в виде MOM производного с получением метил-2 α -ацетокси-3 $\beta,7\beta$ -диметоксиметоксил-5 β -холаноата в виде бледно-желтого масла/смолы (13,0 г; количественный).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4.83 (1H, q, $J=3,1$ Гц), 4.62 (2H, s), 4.62 (2H, s), 3.67 (1H, q, $J=2,9$ Гц), 3.63 (3H, s), 3.33 (3H, s), 3.33 (3H, s), 3.32-3.30 (1H, m), 2.32 (1H, ddd, $J=15,5, 11,0, 5,0$ Гц), 2.19 (1H, ddd, $J=15,6, 9,4, 6,5$ Гц), 2.01 (3H, s), 1.99-1.25 (25H, m), 0.95 (3H, s), 0.89 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.65 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР^+) m/z : 575,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 491,6 $[\text{M}-\text{HOCH}_2\text{OCH}_3]^+$, 429,5 $[\text{M}-2\text{HOCH}_2\text{OCH}_3]^+$.

Н. Метил-2 α -гидрокси-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноат (3Н.1)

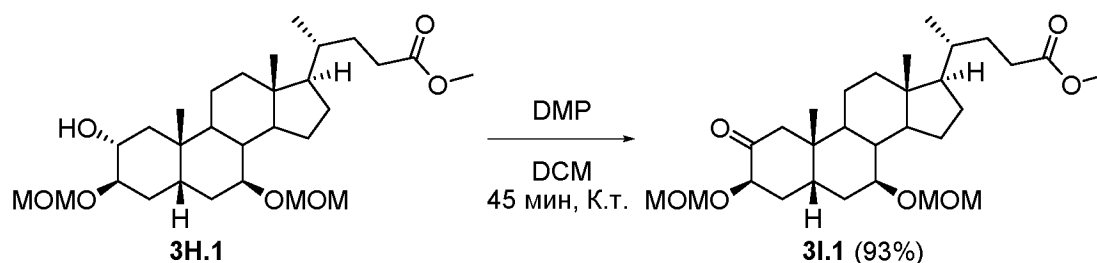


При использовании общего способа Е метил-2 α -ацетокси-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноат (13,0 г; 21,6 ммоль; 1 эквив.) подвергали метанолизу с получением метил-2 α -гидрокси-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноата в виде бледно-желтой смолы (9,5 г; 18,3 ммоль; 85%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 4.65 (1H, d, $J=6,8$ Гц), 4.62 (1H, d, $J=6,8$ Гц), 4.60 (1H, d, $J=6,8$ Гц), 4.57 (1H, d, $J=6,8$ Гц), 3.65-3.59 (4H, m), 3.43-3.36 (1H, m), 3.34 (3H, s), 3.33-3.31 (1H, m), 3.31 (3H, s), 2.96 (1H, br. s), 2.29 (1H, ddd, $J=15,6, 10,5, 5,0$ Гц), 2.16 (1H, ddd, $J=15,6, 9,4, 6,5$ Гц), 1.97-1.23 (21H, m), 1.16-0.96 (4H, m), 0.92 (3H, s), 0.86 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.61 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР^+) m/z : 533,7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 399,5 $[\text{M}-\text{HOCH}_2\text{OCH}_3-\text{H}_2\text{O}-\text{OMe}]^+$, 387,4 $[\text{M}+\text{H}-2\text{HOCH}_2\text{OCH}_3]$.

І. Метил-2-оксо-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноат (3І.1)



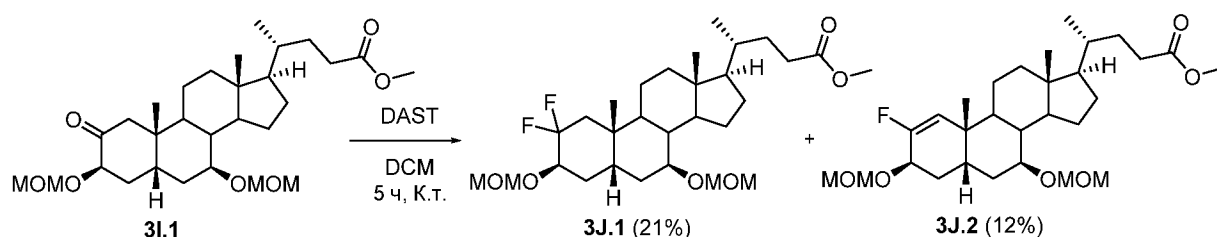
При использовании общего способа М метил-2 α -гидрокси-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноат (9,2 г; 18,0 ммоль; 1 эквив.) окисляли, затем очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/ EtOAc , от 80:20 до 70:30 до

65:35) с получением метил-2-оксо-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноата в виде бледного смолистого твердого вещества (8,5 г; 16,7 ммоль; 93%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.62 (2H, d, J=7,0 Гц), 4.58 (2H, d, J=7,0 Гц), 3.76 (1H, t, J=2,6 Гц), 3.63 (3H, s), 3.34 (3H, s), 3.32 (3H, s), 3.31-3.23 (1H, m), 2.64 (1H, d, J=12,8 Гц), 2.38-2.03 (5H, m), 2.01-1.25 (14H, m), 1.21-1.10 (2H, m), 1.09 (3H, s), 0.87 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.63 (3H, s) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 531,6 [M+Na]⁺, 477,6 [M-OMe]⁺, 415,5 [M-HOCH₂OCH₃-OMe]⁺.

Ж. Метил-2,2-дифтор-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноат (3J.1) и метил-2-фтор-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -хол-1-еноат (3J.2)



Метил-2-оксо-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноат (8,0 г; 15,7 ммоль; 1 эквив.) растворяли в DCM (40 мл) перед добавлением DAST (1004 мл; 78,6 ммоль; 5 эквив.), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов. Смесь затем разбавляли DCM (100 мл) перед добавлением по каплям к охлажденному на льду насыщ. водн. раствору NaHCO₃ (150 мл), затем перемешивали в течение 20 минут. Слои разделяли, затем водный слой экстрагировали DCM (100 мл), объединенные органические слои затем сушили (Na₂SO₄) и концентрировали с получением 7,5 г бледно-коричневой смолы/масла. Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EtOAc, от 90:10 до 85:15 до 80:20) с получением метил-2,2-дифтор-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноата (1,75 г; 3,3 ммоль; 21%) вместе с метил-2-фтор-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -хол-1-еноатом (970 мг; 1,9 ммоль; 12%), оба в виде смолистых твердых веществ.

3J.1: ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.72 (1H, d, J=6,6 Гц), 4.66 (1H, d, J=6,6 Гц), 4.63 (2H, s), 3.81 (1H, br. s), 3.66 (3H, s), 3.38 (3H, s), 3.36 (3H, s), 3.31-3.21 (1H, s), 2.34 (1H, ddd, J=15,6, 10,5, 5,0 Гц), 2.21 (1H, ddd, J=15,6, 9,4, 6,5 Гц), 2.12 (1H, br. s), 2.05-1.08 (25H, m), 1.04 (3H, s), 0.92 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.67 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, CDCl₃): δ -99.89 (d, J=259,0 Гц), -102.89 (ddt, J=250,6, 40,7, 5,0 Гц) м.д.

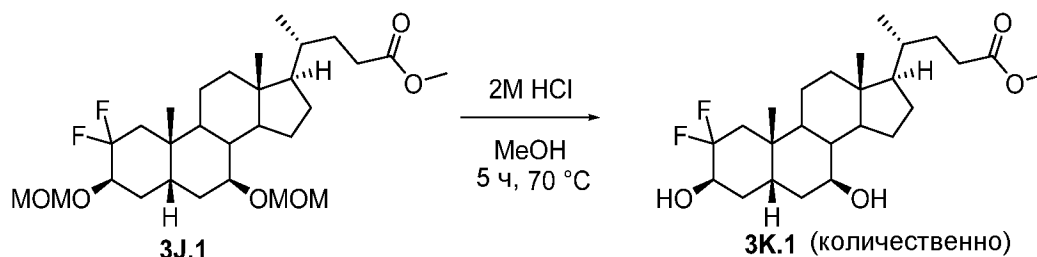
МСНР (ИЭР⁺) m/z: 553,5 [M+Na]⁺, 437,5 [M-HOCH₂OCH₃-OCH₃]⁺.

3J.2: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 5.39 (1H, d, $J=17,7$ Гц), 4.71 (1H, d, $J=6,8$ Гц), 4.69 (1H, d, $J=6,8$ Гц), 4.64 (2H, s), 4.12-4.08 (1H, m), 3.66 (3H, s), 3.40 (3H, s), 3.36 (3H, s), 3.27-3.17 (1H, m), 2.34 (1H, ddd, $J=15,6, 10,5, 5,0$ Гц), 2.21 (1H, ddd, $J=15,6, 9,4, 6,5$ Гц), 2.12-1.14 (24H, m), 1.12 (3H, s), 1.10-0.96 (2H, m), 0.91 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.68 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CDCl_3): δ -115.57 (dt, $J=17,0, 8,5$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 448,6 $[\text{M} + \text{H} - \text{HOCH}_2\text{OCH}_3]^+$, 387,4 $[\text{M} + \text{H} - 2\text{HOCH}_2\text{OCH}_3]^+$.

К. Метил-2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (3K.1)



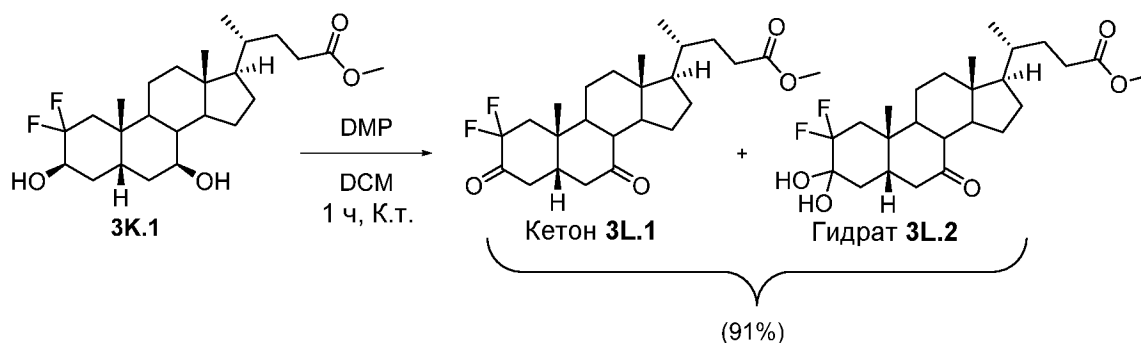
При использовании общего способа Л снимали защиту с метил-2,2-дифтор-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -холаноата (1,5 г; 1,76 ммоль; 1 эквив.) с получением метил-2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноата в виде смолистого твердого вещества (1,3 г; количественный выход).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.89 (1H, t, $J=5,7$ Гц), 3.67 (3H, s), 3.54 (1H, ddd, $J=11,6, 9,2, 5,1$ Гц), 2.36 (1H, ddd, $J=15,6, 10,5, 5,0$ Гц), 2.22 (1H, ddd, $J=15,6, 9,4, 6,5$ Гц), 2.17-1.07 (27H, m), 1.05 (3H, s), 0.93 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.69 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CDCl_3): δ -100.05 (d, $J=251,4$ Гц), -105.16 (ddt, $J=252,1, 40,5, 7,2$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 425,5 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 405,5 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{HF}]^+$.

Л. Метил-2,2-дифтор-3,7-диоксо-5 β -холаноат (3L.1) плюс гидрат (3L.2)



При использовании общего способа М метил-2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (1,0 г; 2,26 ммоль; 1 эквив.) окисляли с получением смеси метил-2,2-дифтор-3,7-диоксо-5 β -холаноата и гидрата (900 мг; 2,05 ммоль; 91%-общий выход).

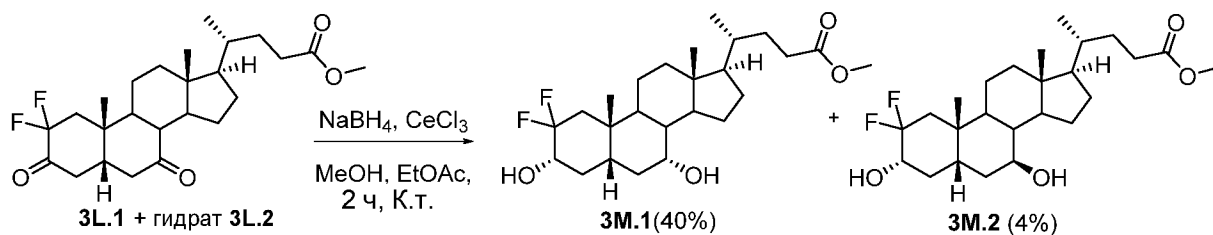
3L.1 ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.67 (3H, s), 2.93 (1H, ddd, $J=13,2, 5,5, 0,8$ Гц), 2.77-2.63 (2H, m), 2.52-1.38 (23H, m), 1.37 (3H, s), 1.35-0.96 (6H, m), 0.94 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CDCl_3): δ -104.37 (ddd, $J=263,6, 39,9, 12,1$ Гц), -111.15 (dq, $J=263,6, 5,0$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 439,5 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

3L.2 МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 457,5 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

М. Метил-2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холаноат (3М.1) плюс метил-2,2-дифтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (3М.2)



При использовании общего способа В восстанавливали смесь метил-2,2-дифтор-3,7-диоксо-5 β -холаноата и гидрата (750 мг; 1,71 ммоль; 1 эквив.). Неочищенное вещество очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/ EtOAc , от 70:30 до 60:40 до 50:50) с получением метил-2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холаноата (300 мг; 0,68 ммоль; 40%) и метил-2,2-дифтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноата (26 мг; 0,06 ммоль; 4%).

3М.1: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.86 (1H, q, $J=2,7$ Гц), 3.67 (3H, s), 3.65-3.56 (1H, m), 2.54 (1H, q, $J=13,2$ Гц), 2.47-2.31 (2H, m), 2.28-2.17 (1H, m), 2.05-1.04 (19H, m), 1.00 (3H, s), 0.94 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.67 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CDCl_3): δ -101.58 (dquin, $J=235,8, 5,2$ Гц), -119.95 (dddd, $J=235,8, 39,9, 20,8, 10,4$ Гц) м.д.

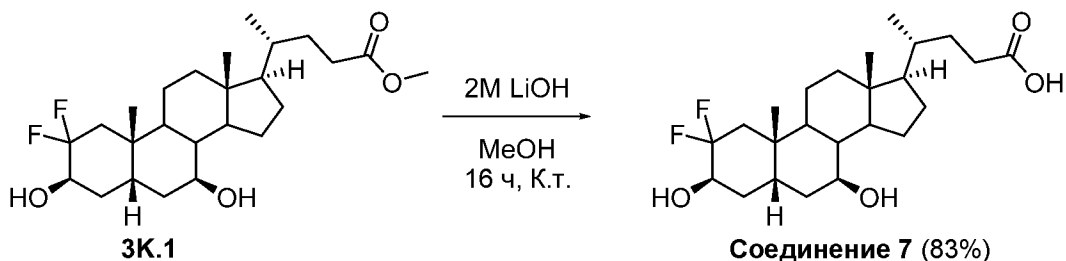
МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 425,5 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$.

3М.2: ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.73 (1H, ddt, $J=19,7, 10,9, 5,4$ Гц), 3.67 (3H, s), 3.57 (1H, ddd, $J=11,3, 9,5, 5,1$ Гц), 2.43-2.30 (2H, m), 2.22 (2H, ddd, $J=15,7, 9,4, 6,6$ Гц), 2.04-1.05 (31H, m), 1.02 (3H, s), 0.93 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.68 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CDCl_3): δ -101.31 (dquin, $J=237,6$, 5,2 Гц), -119.06 (dddd, $J=237,6$, 38,2, 19,0, 10,2 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 425,5 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

Н. 2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холановая кислота (соединение 7)



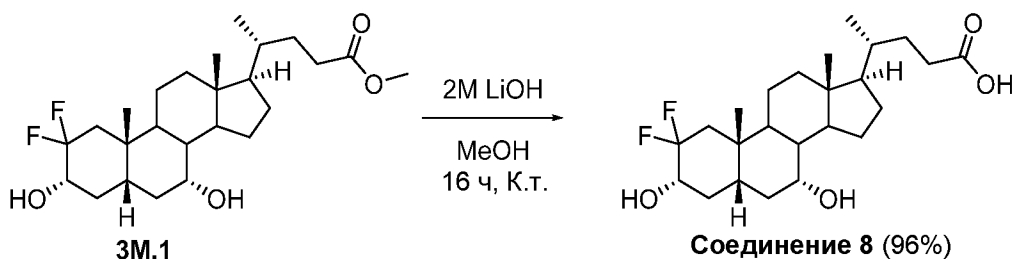
При использовании общего способа С метил-2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (60 мг; 0,14 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 7**) в виде бледного твердого вещества (50 мг; 0,12 ммоль; 83%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 3.89 (1H, br. s), 3.55 (1H, ddd, $J=11,4$, 9,2, 5,2 Гц), 2.39 (1H, ddd, $J=15,6$, 10,5, 5,0 Гц), 2.26 (1H, ddd, $J=15,8$, 9,4, 6,5 Гц), 2.18-1.07 (26H, m), 1.05 (3H, s), 0.94 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.69 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CDCl_3): δ -100.00 (d, $J=253,2$ Гц), -105.12 (ddt, $J=251,4$, 41,6, 8,0 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 411,5 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 391,5 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HF}]^+$.

О. 2,2-Дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановая кислота (соединение 8)



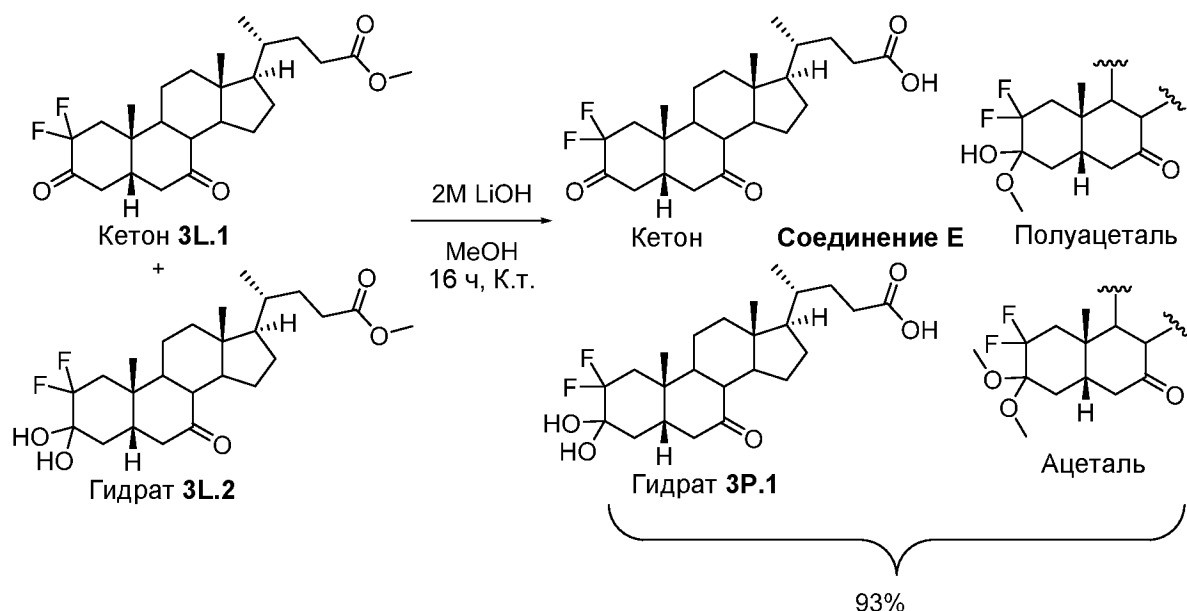
При использовании общего способа С метил-2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холаноат (75 мг; 0,17 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 8**) в виде белого твердого вещества (70 мг; 0,16 ммоль; 96%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 33.86 (1H, q, $J=2,0$ Гц), 3.62 (1H, ddt, $J=19,7$, 10,9, 5,4 Гц), 2.54 (1H, q, $J=13,0$ Гц), 2.44-2.35 (2H, m), 2.25 (1H, ddd, $J=15,9$, 9,6, 6,5 Гц), 2.02-1.02 (25H, m), 0.99 (3H, s), 0.94 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.67 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, CDCl₃): δ - 119.67 (d, J=235,8 Гц), -119.67 (dddd, J=235,8, 38,2, 19,1, 10,4 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 411,5 [M+H-H₂O]⁺, 393,4 [M+H-2H₂O]⁺.

Р. 2,2-Дифтор-3,7-диоксо-5β-холановая кислота (соединение Е) плюс гидрат (3Р.1)



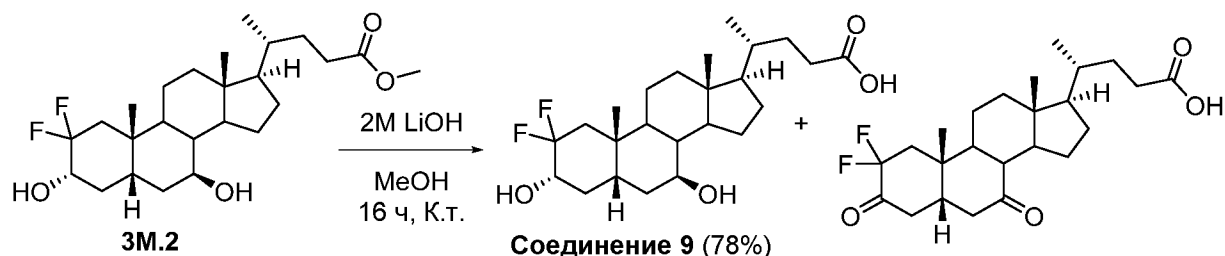
При использовании общего способа С метил-2,2-дифтор-3,7-диоксо-5β-холаноат и гидрат (60 мг; 0,14 ммоль; 1 эквив.) гидролизovali с получением 2,2-дифтор-3,7-диоксо-5β-холановой кислоты (**соединение Е**) и гидрата в виде белого твердого вещества в виде смеси аддуктов кетон/гидрат/ацеталь (55 мг; 0,13 ммоль; 93%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN): δ 2.93 (1H, dd, J=13,1, 5.9 Гц), 2.90-2.84 (1H, m), 2.70-1.97 (9H, m), 1.93-0.93 (19H, m), 0.91 (2H, d, J=6,4 Гц), 0.89 (1H, d, J=6,4 Гц), 0.67 (2H, s), 0.64 (1H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, CD₃CN): δ -103.96 (1F, ddd, J=261,6, 38,1, 15,0 Гц), -108.59 (0.2F, ddd, J=246,2, 39,0, 11,3 Гц), -110.91 (1F, dq, J=263,6, 5,2 Гц), -113.71- -112.69 (0.1F, dq, J=246,2, 5,2 Гц), -116.15 (0.1F, dq, J=246,2, 5,2 Гц), -117.09 (0.2F, dq, J=246,2, 5,2 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: **Кетон**: 425,5 [M+H]⁺; **Гидрат**: 443,5 [M+H]⁺; **Полуацеталь**: 457,7 [M+H]⁺, 439,5 [M+H-H₂O]⁺; **Ацеталь**: 443,5 [M+H]⁺, 439,5 [M+H-MeOH]⁺.

Q. 2,2-Дифтор-3α,7β-дигидрокси-5β-холановая кислота (соединение 9)



При использовании общего способа С метил-2,2-дифтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холаноат (25 мг; 0,06 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2,2-дифтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (**соединение 9**) в виде смолистого твердого вещества (20 мг; 0,05 ммоль; 78%).

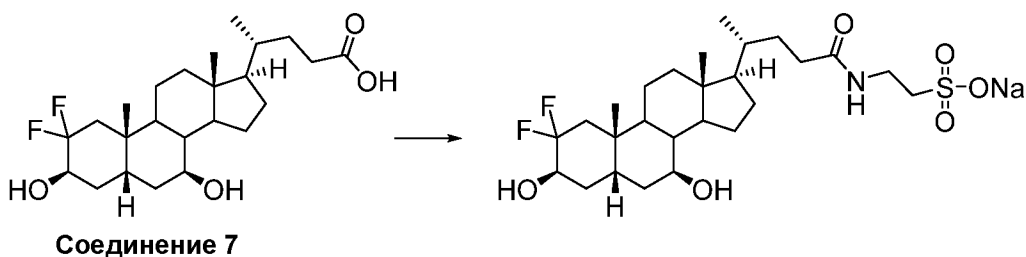
^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ 3.69 (1H, ddt, $J=21,0, 11,0, 5,0$ Гц), 3.44 (1H, ddd, $J=11,5, 9,8, 5,0$ Гц), 2.38-2.26 (2H, m), 2.25-2.14 (2H, m), 2.08-1.06 (32H, m), 1.03 (3H, s), 0.96 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CD_3OD): δ -101.64 (dquin, $J=239,3, 5,0$ Гц), -120.18 (dddd, $J=239,3, 38,2, 20,8, 10,4$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 411,4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 393,3 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$.

Пример 4 - синтез конъюгатов соединения 9

А. Натриевая соль *N*-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-этилсульфоновой кислоты (соединение 10)



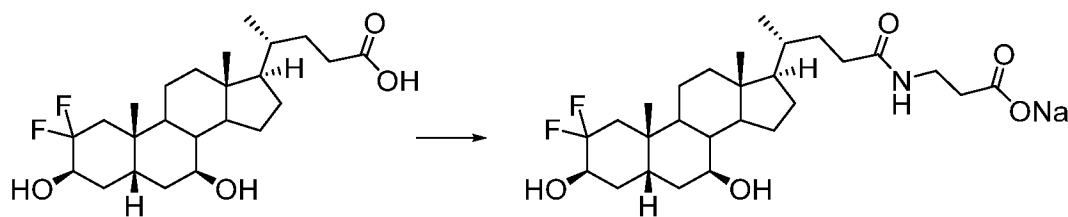
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (7,4 мг; 0,017 ммоль) с получением натриевой соли *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-этилсульфоновой кислоты в виде прозрачного остатка (7,4 мг; 77%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.61-3.56 (2H, m), 3.40 (1H, ddd, $J=14,6, 9,7, 5,2$ Гц), 2.95 (2H, app.t., $J=6,9$ Гц), 2.24 (1H, ddd, $J=15,0, 10,6, 5,2$ Гц), 2.12-1.07 (23H, m), 1.05 (3H, s), 0.97 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -101.00 (d, $J=251.4$ Гц), -105.55 (ddt, $J=250,3, 40,3, 7,8$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺): [M-Na]⁺: подсчитано 534,2706; обнаружено 534,2709.

В. Натриевая соль *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-пропионовой кислоты (соединение 11)



Соединение 7

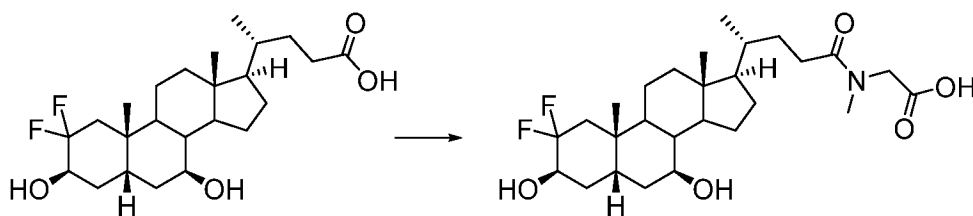
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением натриевой соли *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-пропионовой кислоты в виде прозрачного остатка (17,66 мг; 73%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.45 -3.35 (3H, m), 2.40-2.30 (2H, m), 2.23 (1H, m), 2.12-1.06 (23H, m), 1.05 (3H, s), 0.96 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.62 (d, $J=250,4$ Гц), -105.55 (ddt, $J=250,4, 40,8, 7,6$ Гц) м.д.

МСВР (масс-спектрометрия высокого разрешения) (ИЭР⁺): [M+Na]⁺: подсчитано 522,3002; обнаружено 522,3007.

С. *N*-(метил),*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-уксусная кислота (соединение 12)



Соединение 7

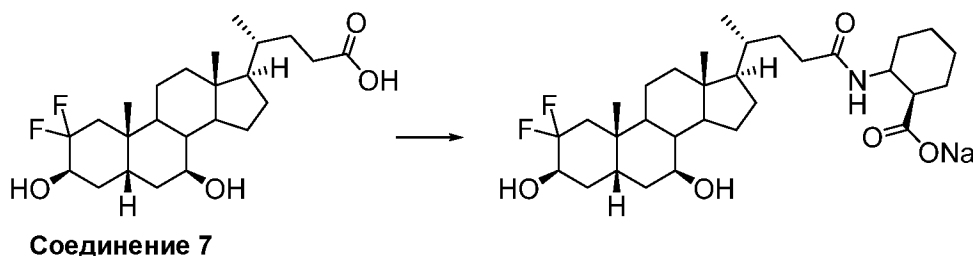
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (25,36 мг; 0,059 ммоль) с получением *N*-(метил),*N*-

(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-уксусной кислоты в виде прозрачного остатка (13,3 мг; 45%).

^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.96 (2H, br. d, $J=18,1$ Гц), 3.78 (1H, br. s), 3.40 (1H, m), 3.08 (1,5H, s), 2.94 (1,5H, s), 2.48 (1H, m), 2.41-1.06 (23H, m), 1.05 (1,5H, s), 1.05 (1,5H, s), 1.00 (1,5H, d, $J=6,5$ Гц), 0.96 (1,5H, d, $J=6,5$ Гц), 0.73 (1,5H, s), 0.71 (1,5H, s) м.д.; ^{19}F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.62 (d, $J=250,7$ Гц), -105.55 (ddt, $J=250,0, 40,2, 7,2$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР $^+$): $[\text{M}+\text{Na}]^+$: подсчитано 522,3002; обнаружено 522,2998.

D. Натриевая соль *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-*транс*-2-циклогексанкарбоновой кислоты (соединение 13)



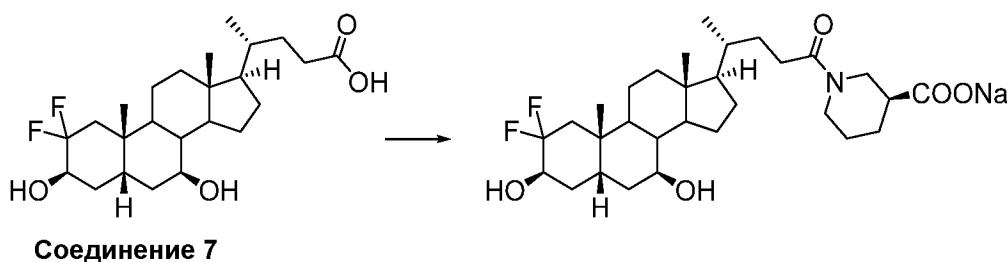
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением натриевой соли *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-*транс*-2-циклогексанкарбоновой кислоты в виде прозрачного остатка (18,18 мг; 68%).

^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.89-3.72 (2H, m), 3.40 (1H, m), 2.28-1.06 (33H, m), 1.05 (3H, s), 0.96 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

^{19}F $\{^1\text{H}\}$ ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.61 (d, $J=249,4$ Гц), -105.55 (d, $J=250,2, 4$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$: подсчитано 554,3652; обнаружено 554,3656.

E. 1-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-пиперидин-3-карбоксилат натрия (соединение 14)



При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением 1-(2,2-дифтор-

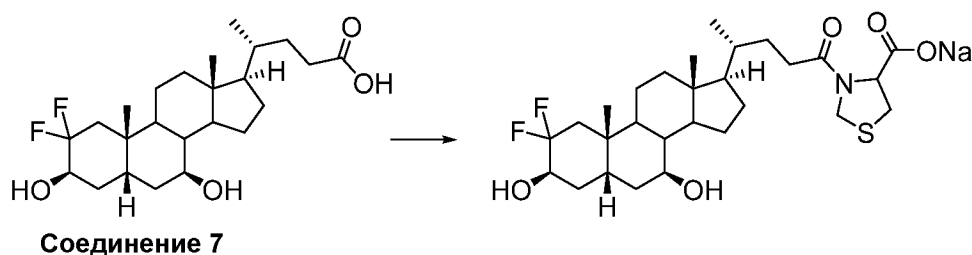
3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)- пиперидин-3-карбоксилата натрия в виде остатка (21,88 мг; 83%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.41 (1H, ddd, J=14,8, 9,9, 5,2 Гц), 2.57-1.07 (33H, m), 1.05 (3H, s), 0.99 (3H, d, J=6,5 Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.63 (d, J=250,3 Гц), -105.55 (ddt, J=249,8, 40,9, 7,8 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+H]⁺: подсчитано 540,3495; обнаружено 540,3507.

Е. 3-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-4-тиазолидин-карбоксилат натрия (соединение 15)



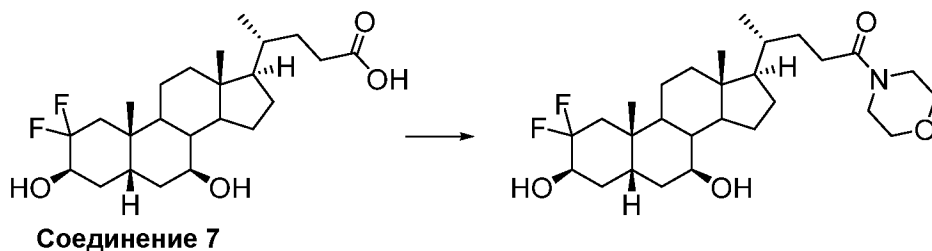
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением 3-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-4-тиазолидин-карбоксилата натрия в виде остатка (21,41 мг; 81%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.90-4.78 (0.4H, m), 4.77 (0.6H, d, J=9,8 Гц), 4.71 (0.4H, d, J=8,4 Гц), 4.60 (0.4H, d, J=8,4 Гц), 4.59 (0.6H, m), 4.48 (0.6H, d, J=9,8 Гц), 3.78 (1H, br. s), 3.46-3.15 (3H, m), 2.58-1.07 (24H, m), 1.04 (3H, br. s), 0.99 (1.2H, d, J=6,5 Гц), 0.96 (1.8H, d, J=6,5 Гц), 0.73 (1.2H, s), 0.71 (1.8H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.63 (d, J=249,1 Гц), -105.52 (ddt, J=250,1, 41,4, 7,8 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+H]⁺: подсчитано 544,2903; обнаружено 544,2904.

Г. N-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-морфолин (соединение 16)



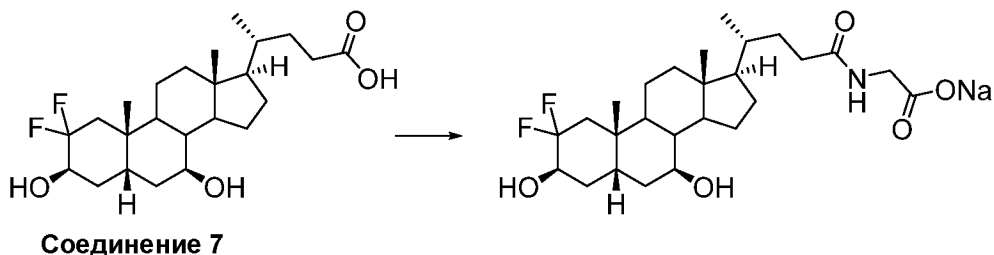
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-морфолин в виде прозрачного остатка (9,83 мг; 65%).

^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.72-3.59 (4H, m), 3.59-3.50 (4H, m), 3.40 (1H, ddd, $J=14,8, 9,7, 5,2$ Гц), 2.42 (1H, m), 2.30 (1H, m), 2.13-1.06 (22H, m), 1.05 (3H, s), 0.99 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -101.64 (d, $J=250,3$ Гц), -105.55 (ddt, $J=249,6, 40,6, 7,8$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$: подсчитано 498,3389; обнаружено 498,3394.

Н. Натриевая соль *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-метилкарбоновой кислоты (соединение 17)



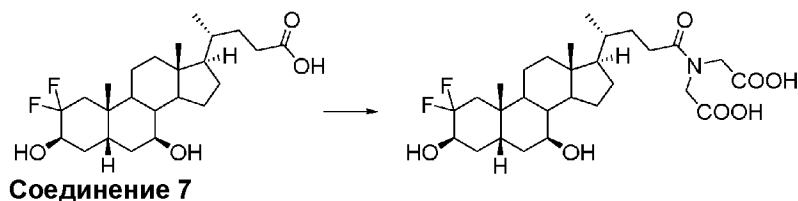
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением натриевой соли *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-метилкарбоновой кислоты в виде прозрачного остатка (18,12 мг; 77%).

^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.75 (2H, s), 3.40 (1H, ddd, $J=14,8, 9,7, 5,2$ Гц), 2.30 (1H, m), 2.13-1.06 (23H, m), 1.05 (3H, s), 0.98 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -101.61 (d, $J=249,7$ Гц), -105.55 (ddt, $J=249,6, 40,6, 7,8$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР $^+$): $[\text{M}+\text{H}]^+$: подсчитано 486,3026; обнаружено 486,3029.

И. Динатриевая соль *N*-(карбоксиметил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоуксусной кислоты (соединение 18)



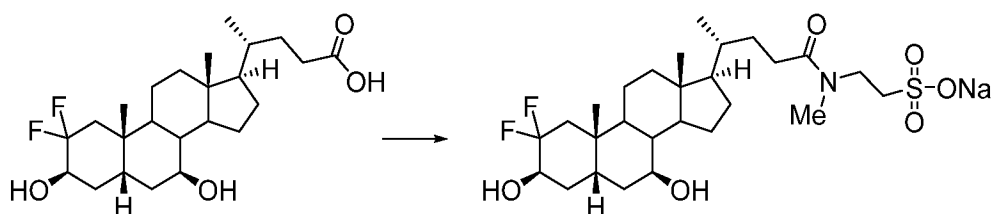
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением динатриевой соли *N*-(карбоксиметил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоуксусной кислоты в виде прозрачного остатка (14,81 мг; 59%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.00 (4H, d, $J=19,4$ Гц), 3.78 (1H, br. s), 3.40 (1H, ddd, $J=14,8, 9,7, 5,2$ Гц), 2.42 (1H, m), 2.23 (1H, m), 2.14-1.07 (22H, m), 1.05 (3H, s), 0.96 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.65 (d, $J=250,7$ Гц), -105.55 (ddt, $J=249,6, 40,6, 7,8$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+H]⁺: подсчитано 544,3080; обнаружено 544,3081.

Ж. Натриевая соль *N*-(метил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-этилсульфоновой кислоты (соединение 19)



Соединение 7

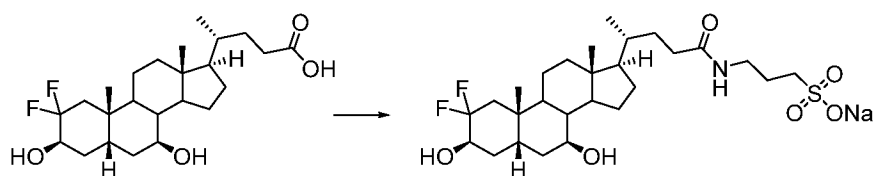
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением натриевой соли *N*-(метил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)-этилсульфоновой кислоты в виде прозрачного остатка (9,49 мг; 36%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.84-3.68 (3H, m), 3.40-3.36 (1H, m), 3.11 (1,5H, s) 3.08-2.99 (2H, m), 2.92 (1,5H, m), 2.57-1.07 (23H, m), 1.05 (3H, s), 0.99 (1,5H, d, $J=6,5$ Гц), 0.98 (1,5H, d, $J=6,5$ Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.64 (d, $J=249,4$ Гц), -105.54 (ddt, $J=250,3, 40,3, 7,8$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+Na]⁺: подсчитано 572,2828; обнаружено 572,2830.

К. 3-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)амино-пропансульфонат натрия (соединение 20)



Соединение 7

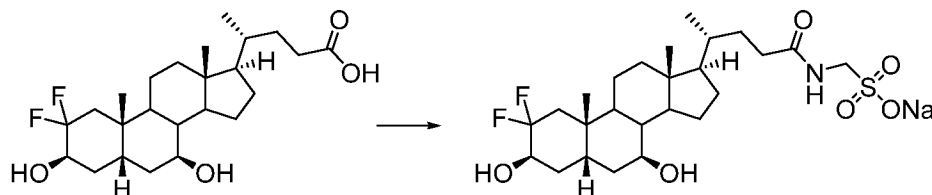
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (25,0 мг; 0,058 ммоль) с получением 3-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-амино-пропансульфоната натрия в виде прозрачного остатка (25,44 мг; 76%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.40 (1H, ddd, J=14,6, 9,7, 5,2 Гц), 3.33-3.25 (2H, m), 2.86-2.78 (2H, m), 2.24 (1H, m), 2.17-1.07 (25H, m), 1.05 (3H, s), 0.97 (3H, d, J=6,5 Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.59 (d, J=250,1 Гц), -105.55 (ddt, J=249,4, 40,8, 7,5 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+Na]⁺: подсчитано 594,2647; обнаружено 594,2648.

L. Натриевая соль N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)метансульфоновой кислоты (соединение 21)



Соединение 7

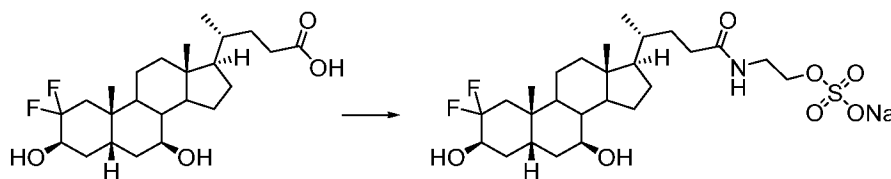
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (25,0 мг; 0,058 ммоль) с получением натриевой соли N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-амид)метансульфоновой кислоты в виде прозрачного остатка (27,63 мг; 87%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.32 (1H, d, J=17,8 Гц), 4.28 (1H, d, J=17,8 Гц), 3.78 (1H, br. s), 3.41 (1H, ddd, J=14,6, 9,8, 5,1 Гц), 2.33 (1H, m), 2.25-1.07 (23H, m), 1.05 (3H, s), 0.98 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.61 (d, J=250,8 Гц), -105.55 (ddt, J=249,4, 40,8, 7,5 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M-2H+D+2Na]⁺: подсчитано 567,2397; обнаружено 567,2387.

M. N-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтилсульфат натрия (соединение 22)



Соединение 7

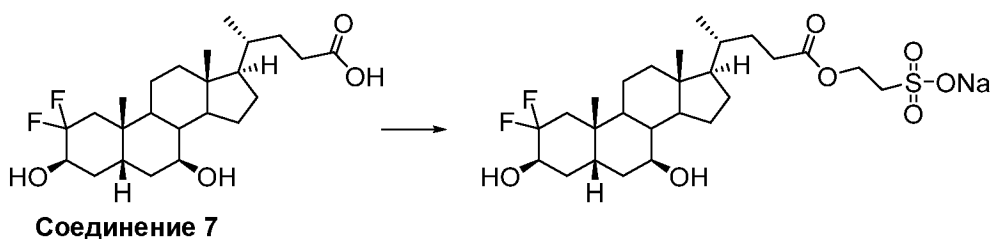
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (30,0 мг; 0,070 ммоль) с получением *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-аминоэтилсульфата натрия.

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.04 (2H, app. t, J=5,5 Гц), 3.78 (1H, br. s), 3.44 (2H, app. t, J=5,5 Гц), 3.41 (1H, m), 2.26 (1H, ddd, J=15,5, 10,5, 5,2 Гц), 2.18-1.06 (23H, m), 1.05 (3H, s), 0.98 (3H, d, J=6,5 Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.59 (d, J=250,0 Гц), -105.48 (ddt, J=249,4, 40,8, 7,5 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+Na]⁺: подсчитано 574,2621; обнаружено 574,2620.

N. Натриевая соль *O*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-гидроксиэтилсульфоновой кислоты (соединение 23)



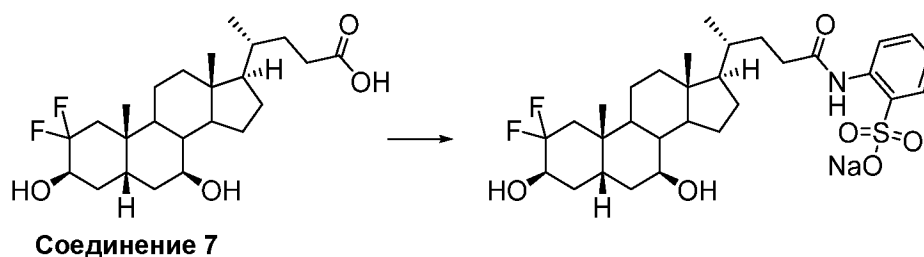
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением натриевой соли *O*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-гидроксиэтилсульфоновой кислоты в виде прозрачного остатка (15,06 мг; 58%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.42 (2H, app. t, J=7,0 Гц), 3.78 (1H, br. s), 3.41 (1H, ddd, J=14,8, 9,8, 5,0 Гц), 3.12 (2H, app. t, J=7,2 Гц), 2.39 (1H, m), 2.26 (1H, m), 2.14-1.06 (22H, m), 1.05 (3H, s), 0.95 (3H, d, J=6,7 Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.65 (d, J=250,5 Гц), -105.48 (ddt, J=249,8, 40,9, 7,6 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+Na]⁺: подсчитано 581,2331; обнаружено 581,2332.

O. Натриевая соль *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)анилин-2-сульфоновой кислоты (соединение 24)



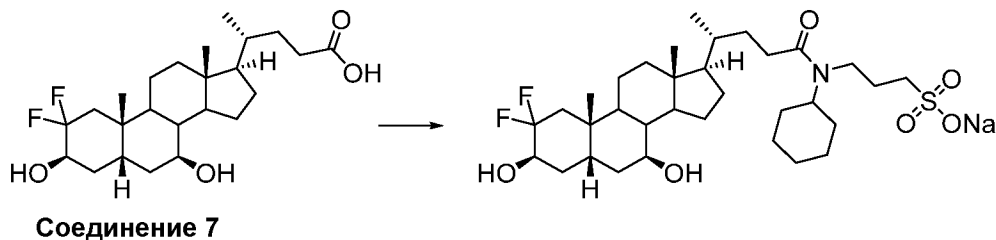
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением натриевой соли *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)анилин-2-сульфоновой кислоты в виде белого остатка (24,04 мг; 85%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 8.30 (1H, d, J=8,2 Гц), 7.86 (1H, dd, J=7,9, 1,5 Гц), 7.40 (1H, m), 7.12 (1H, m), 3.79 (1H, br. s), 3.41 (1H, ddd, J=14,8, 9,8, 5,0 Гц), 2.50 (1H, m), 2.34 (1H, m), 2.15-1.08 (22H, m), 1.05 (3H, s), 1.02 (3H, d, J=6,3 Гц), 0.73 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.62 (d, J=251,2 Гц), -105.49 (ddt, J=249,3, 40,6, 7,2 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M-H+2Na]⁺: подсчитано 628,2491; обнаружено 628,2494.

Р. *N*-(Циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-пропансульфонат натрия (соединение 25)



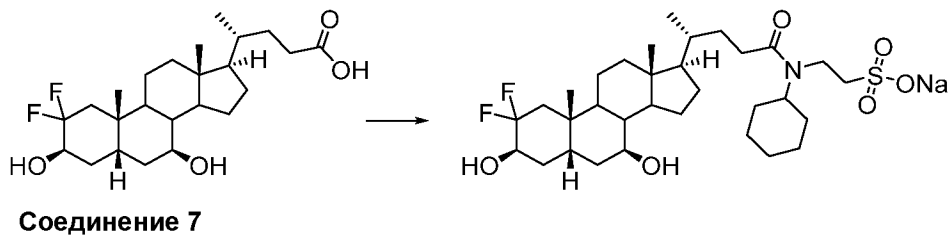
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением *N*-(циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-пропансульфоната натрия в виде прозрачного остатка (27,97 мг; 92%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.17 (0.4H, m), 3.78 (1H, br. s), 3.62 (0.6H, m), 3.45-3.33 (3H, m), 2.87-2.75 (2H, m), 2.41 (1H, m), 2.30 (1H, m), 2.14-1.07 (34H, m), 1.05 (3H, br. s), 1.02-0.97 (3H, m), 0.73 (1.8H, s), 0.72 (1.2H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.60 (d, J=249,8 Гц), -105.48 (ddt, J=250,1, 41,0, 7,6 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+Na]⁺: подсчитано 654,3610; обнаружено 654,3606.

Q. *N*-(Циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-амино-этансульфонат натрия (соединение 26)



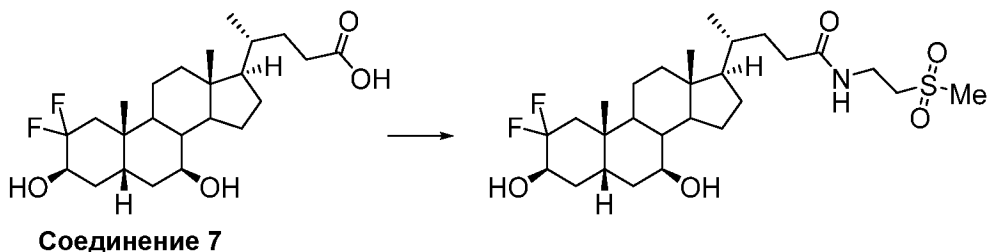
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением *N*-(циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтансульфоната натрия в виде прозрачного остатка (28,41 мг; 95%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.73-3.56 (3H, m), 3.40 (1H, ddd, $J=14,7, 9,7, 5,0$ Гц), 3.09-2.96 (2H, m), 2.44 (1H, m), 2.31 (1H, m), 2.15-1.07 (32H, m), 1.05 (3H, br. s), 1.02-0.97 (3H, m), 0.73 (1.8H, s), 0.72 (1.2H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.57 (d, $J=251,0$ Гц), -105.49 (ddt, $J=250,3, 40,9, 7,0$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M-H+2Na]⁺: подсчитано 662,3273; обнаружено 662,3285.

R. *N*-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтилметилсульфон (соединение 27)



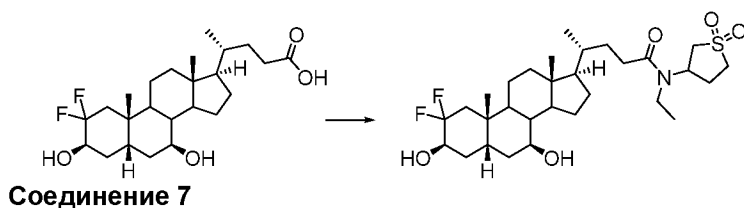
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением *N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтилметилсульфона в виде прозрачного остатка (22,49 мг; 90%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.62 (2H, app. t, $J=6,7$ Гц), 3.40 (1H, ddd, $J=14,7, 9,6, 4,9$ Гц), 3.29 (2H, app. t, $J=6,5$ Гц), 2.99 (3H, s), 2.26 (1H, ddd, $J=15,3, 10,4, 5,3$ Гц), 2.17-1.06 (23H, m), 1.05 (3H, s), 0.97 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.60 (d, $J=249,7$ Гц), -105.49 (ddt, $J=249,9, 41,2, 7,1$ Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+Na]⁺: подсчитано 556,2879; обнаружено 556,2873.

S. *N*-(этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-аминотетрагидротиофен-диоксид (соединение 28)



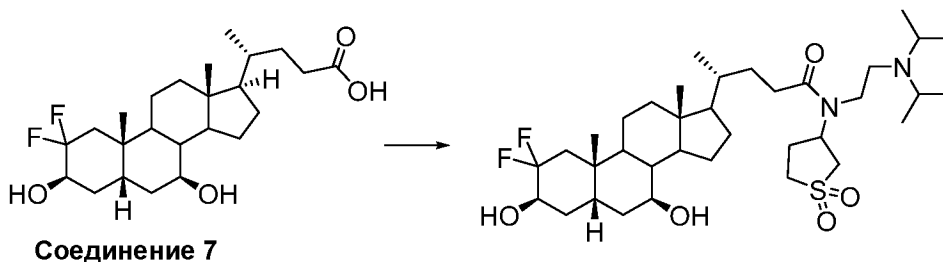
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением *N*-(этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-тетрагидротиофен-диоксида в виде прозрачного остатка (20,71 мг; 77%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.56 (1H, m), 3.78 (1H, br. s), 3.51 (4H, m), 3.33-3.21 (2H, m), 3.08 (1H, m), 2.63-1.06 (29H, m), 1.05 (3H, s), 0.99 (3H, d, J=6,5 Гц), 0.72 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.59 (d, J=250,4 Гц), -105.48 (ddt, J=250,4, 41,5, 7,4 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+H]⁺: подсчитано 574,3372; обнаружено 574,3370.

Т. *N*-(2-(диизопропиламино)этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-тетрагидротиофен-диоксид (соединение 29)



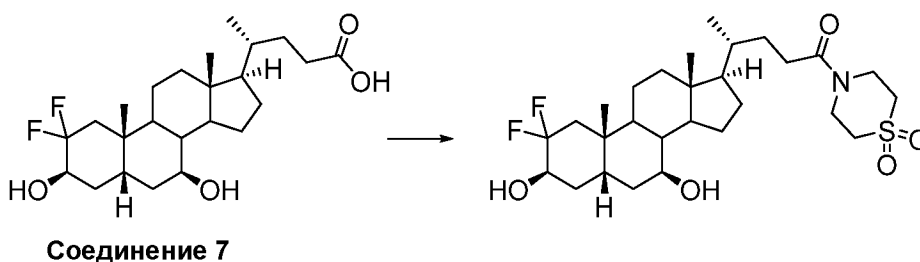
При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением *N*-(2-(диизопропиламино)этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-амино-тетрагидротиофен-диоксида в виде остатка (23,90 мг; 76%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 3.78 (1H, br. s), 3.50-0.88 (m), 0.72 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.56 (d, J=250,5 Гц), -105.49 (m) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+H]⁺: подсчитано 673,4420; обнаружено 673,4430.

U. *N*-(2,2-Дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-тиоморфолин-диоксид (соединение 30)



При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением *N*-(2,2-дифтор-

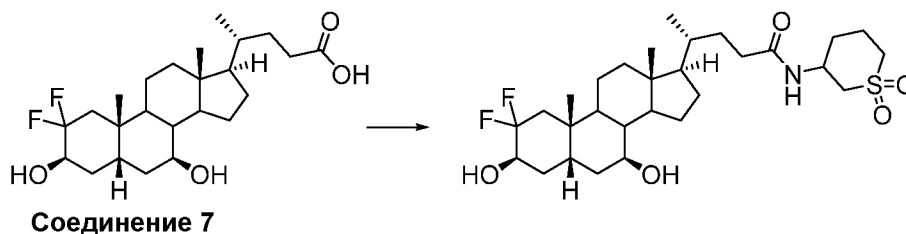
3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)- тиоморфолин-диоксида в виде прозрачного остатка (22,2 мг; 87%).

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.09-3.93 (4H, m), 3.78 (1H, br. s), 3.40 (1H, ddd, J=14,6, 9,6, 5,1 Гц), 3.23-3.04 (4H, m), 2.52 (1H, m), 2.38 (1H, m), 2.14-1.07 (22H, m), 1.05 (3H, s), 0.99 (3H, d, J=6,6 Гц), 0.73 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.63 (d, J=249,3 Гц), -105.54 (ddt, J=250,6, 41,6, 7,5 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+H]⁺: подсчитано 546,3059; обнаружено 546,3065.

V. N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-3-иламин (соединение 31)



При использовании общего способа Q конъюгировали 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (20,0 мг; 0,047 ммоль) с получением N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-3-иламина в виде остатка (22,44 мг; 88%).

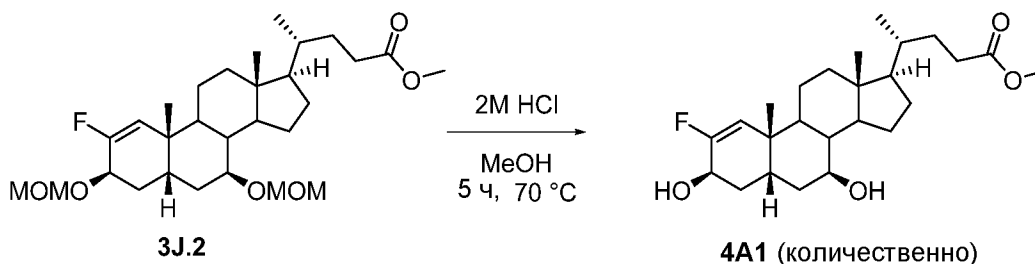
¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 4.26 (1H, tt, J=11,1, 3.6 Гц), 3.78 (1H, br. s), 3.40 (1H, ddd, J=14,5, 10,0, 5,1 Гц), 3.27 (1H, m), 3.08-2.91 (3H, m), 2.30-1.06 (26H, m), 1.05 (3H, s), 0.97 (3H, d, J=6,5 Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, MeOD) δ -100.63 (d, J=250,3 Гц), -105.49 (ddt, J=250,7, 41,5, 7,9 Гц) м.д.

МСВР (ИЭР⁺): [M+H]⁺: подсчитано 560,3216; обнаружено 560,3217.

Сравнительный пример 5 - синтез 2-фторалкеновых соединений

А. Метил 2-фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -хол-1-еноат (4А.1)



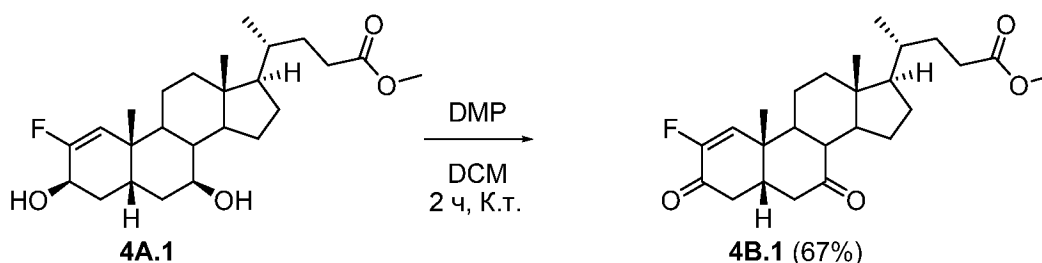
При использовании общего способа L снимали защиту с метил-2-фтор-3 β ,7 β -диметоксиметоксил-5 β -хол-1-еноата из примера 4J (900 мг; 1,76 ммоль; 1 эквив.) с получением метил-2-фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -хол-1-еноата в виде белого смолистого твердого вещества (750 мг; количественный выход).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 5.34 (1H, d, J=17,6 Гц), 4.20 (1H, ddd, J=7,7, 4,7, 1,3 Гц), 3.67 (3H, s), 3.50 (1H, ddd, J=11,2, 9,6, 4,8 Гц), 2.35 (1H, ddd, J=15,6, 10,5, 5,0 Гц), 2.22 (1H, ddd, J=15,6, 9,4, 6,5 Гц), 2.12 (1H, td, J=14,0, 5,3 Гц), 2.04-1.21 (23H, m), 1.12 (3H, d, J=0,7 Гц), 0.92 (3H, d, J=6,5 Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, CDCl₃): δ -117.65 (dt, J=17,0, 8,5 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 405,5 [M+H-H₂O]⁺, 387,5 [M+H-2H₂O]⁺.

В. Метил-2-фтор-3,7-ди-оксо-5 β -хол-1-еноат (4В.1)



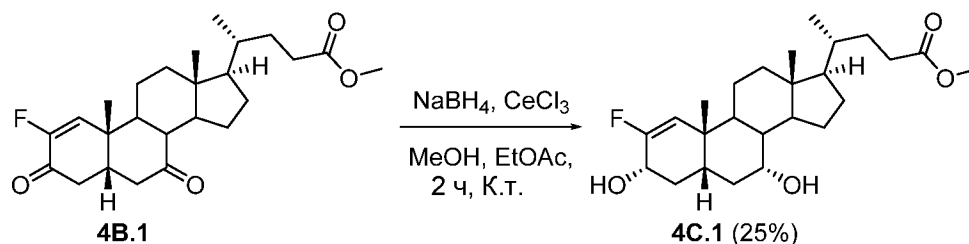
При использовании общего способа М метил-2-фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -хол-1-еноат (600 мг; 1,42 ммоль; 1 эквив.) окисляли, затем очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EtOAc, от 80:20 до 70:30 до 60/40) с получением метил-2-фтор-3,7-ди-оксо-5 β -хол-1-еноата в виде смолистого твердого вещества (400 мг; 0,96 ммоль; 67%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 6.34 (1H, d, J=14,7 Гц), 3.66 (3H, s), 2.89 (1H, dd, J=12,8, 5,9 Гц), 2.61 (1H, dtd, J=13,5, 5,8, 2,0 Гц), 2.55-2.11 (7H, m), 2.07 (1H, dd, J=13,2, 2,0 Гц), 2.04-1.71 (5H, m), 1.51 (3H, s), 1.49-0.94 (8H, m), 0.92 3H, (d, J=6,4 Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, CDCl₃): δ -131.67 (dd, J=15,6, 3,5 Гц), м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 419,5 [M+H]⁺, 460,5 [M+H+MeCN]⁺.

С. Метил-2-фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -хол-1-еноат (4С.1)



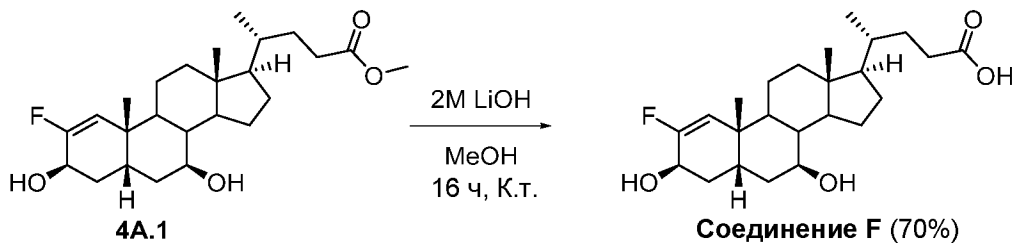
При использовании общего способа В метил-2-фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -хол-1-еноат (400 мг; 0,96 ммоль; 1 эквив.) восстанавливали, затем очищали посредством флэш-хроматографии (петролейный эфир/EtOAc, от 70:30 до 60:40 до 50:50) с получением метил-2-фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -хол-1-еноата в виде смолистого твердого вещества (99 мг; 0,22 ммоль; 25%).

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 5.25 (1H, d, $J=18,2$ Гц), 4.35 (1H, t, $J=7,9$ Гц), 3.85 (1H, q, $J=1,7$ Гц), 3.67 (3H, s), 3.65 (1H, d, $J=1,8$ Гц), 2.53-2.32 (2H, m), 2.29-2.17 (1H, m), 2.04-1.07 (29H, m), 1.04 (3H, d, $J=0,9$ Гц), 0.93 (3H, d, $J=6,4$ Гц), 0.68 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CDCl_3): δ -125.36 (dd, $J=19,1, 6,9$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 405,5 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 387,5 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$.

D. 2-Фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -хол-1-еновая кислота (соединение сравнения F)



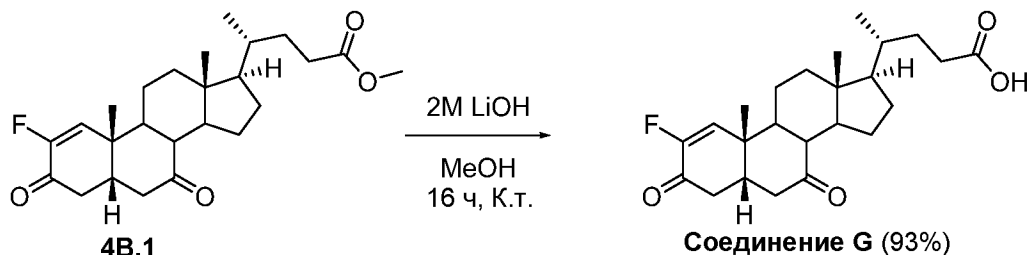
При использовании общего способа С метил-2-фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -хол-1-еноат со стадии А (60 мг; 0,14 ммоль; 1 эквив.) гидролизуют с получением 2-фтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -хол-1-еновой кислоты (**соединение F**) в виде белого твердого вещества (40 мг; 0,10 ммоль; 70%).

^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD): δ 5.32 (1H, d, $J=17,7$ Гц), 4.10 (1H, ddd, $J=8,0, 4,5, 1,0$ Гц), 3.38 (1H, td, $J=10,5, 4,8$ Гц), 2.40-1.15 (29H, m), 1.13 (3H, s), 0.95 (3H, d, $J=6,5$ Гц), 0.73 (3H, s) м.д.

^{19}F ЯМР (376 МГц, CD_3OD): δ -117.71 (dt, $J=15,6, 7,6$ Гц) м.д.

МСНР (ИЭР $^+$) m/z : 391,5 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 373,5 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$.

E. 2-Фтор-3,7-диоксо-5 β -хол-1-еновая кислота (соединение сравнения G)



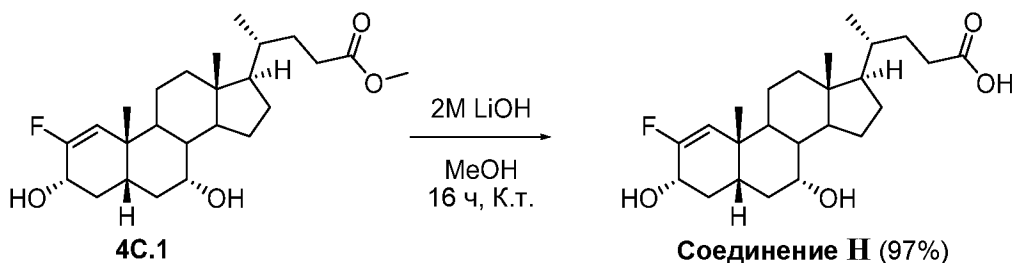
При использовании общего способа С метил-2-фтор-3,7-ди-оксо-5 β -хол-1-еноат со стадии В (50 мг; 0,12 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2-фтор-3,7-диоксо-5 β -хол-1-еновой кислоты (**соединение G**) в виде белого твердого вещества (45 мг; 0,11 ммоль; 93%).

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 6.34 (1H, d, J=14,7 Гц), 2.89 (1H, dd, J=13,0, 6,1 Гц), 2.62 (1H, dtd, J=13,5, 5,8, 2,0 Гц), 2.55-1.73 (13H, m), 1.51 (3H, s), 1.49-0.95 (9H, m), 0.93 (3H, d, J=6,4 Гц), 0.70 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, CDCl₃): δ -131.63 (dd, J=13,9, 3,5 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 405,4 [M+H]⁺, 446,5 [M+H+MeCN]⁺.

F. 2-Фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -хол-1-еновая кислота (соединение сравнения Н)



При использовании общего способа С метил-2-фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -хол-1-еноат со стадии С (50 мг; 0,11 ммоль; 1 эквив.) гидролизовали с получением 2-фтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -хол-1-еновой кислоты (**Соединение Н**) в виде бледного твердого вещества (45 мг; 0,11 ммоль; 97%).

¹H ЯМР (400 МГц, ацетон-D₆): δ 5.16 (1H, d, J=18,6 Гц), 4.23 (1H, ddd, J=9,0, 7,0, 2,5 Гц), 4.07 (1H, br. s), 3.82 (1H, q, J=2,7 Гц), 3.32 (1H, br. s), 2.54 (1H, td, J=13,7, 10,0 Гц), 2.34 (1H, ddd, J=15,5, 11,0, 5,0 Гц), 2.21 (1H, ddd, J=15,6, 9,4, 6,5 Гц), 2.02-1.06 (25H, m), 1.05 (3H, d, J=1,0 Гц), 0.96 (3H, d, J=6,6 Гц), 0.71 (3H, s) м.д.

¹⁹F ЯМР (376 МГц, ацетон-D₆): δ -123.32 (dd, J=19,1, 6,9 Гц) м.д.

МСНР (ИЭР⁺) m/z: 373,5 [M+H-2H₂O]⁺.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ

Сокращения

BDNF	нейротрофический фактор мозга
Cy3	цианин 3
DAPI	4',6-диамидино-2-фенилиндол
DAT	антитело к переносчику дофамина
dcAMP	дибутирилциклический аденозинмонофосфат

DMEM	модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
FGFb	фактор роста фибробластов, основная форма
FGF8	фактор роста фибробластов 8
GDNF	нейротрофический фактор, полученный из глиальных клеток
HBSS	сбалансированный солевой раствор Хэнкса
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
iNPC	индуцированная нейронная клетка-предшественник
MEM	минимальная необходимая среда
MMP	трансмембранный потенциал митохондрий
MPTP	1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
NEEA	добавка заменимых аминокислот для клеточных культур
PBS	фосфатно-солевой буферный раствор
БП	болезнь Паркинсона (сБП представляет собой спорадическую форму болезни Паркинсона)
TGF- β 3	трансформирующий фактор роста бета 3
TMRM	перхлорат метилового эфира тетраметилродамина
Tuj	антитело к бета-III тубулину

Пример 6

А. Культура первичных фибробластов, генерация и культура iNPC

Фибробласты культивировали в среде DMEM (Invitrogen) и регулярно пересеивали каждые 3-5 суток при использовании трипсина для их диссоциации. Индуцированные нейронные клетки-предшественники (iNPC) генерировали, как описано ранее (Meyer et al, “Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS” *Proc Natl Acad Sci USA* 2014). iNPC поддерживали в DMEM/Ham F12 (Invitrogen) с добавками N2, B27 (Invitrogen) и FGFb (Peprotech) в покрытых фибронектином (Millipore) чашках Петри и регулярно пересеивали каждые 2-3 суток при использовании аккутазы для их отделения.

В. Дифференциация дофаминергических нейронов iNPC

Вкратце, iNPC помещают в 6-луночный планшет и культивируют в течение 2 суток в среде DMEM/F-12 с Glutamax™ с добавлением 1% NEAA, 2% B27 (Gibco) и 2,5 мкМ DAPT (N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицин-*трет*-бутиловый эфир). На 3 сутки DAPT удаляют и в среду добавляют 1 мкМ агониста белка Smoothened (SAG) и FGF8 (75 нг/мл) на дополнительные 10 суток. На этой стадии нейроны пересевают. Затем SAG и FGF8 удаляют и заменяют на BDNF (30 нг/мл), GDNF (30 нг/мл), TGF- β 3 (2 мМ) и dcAMP (2 мМ; Sigma) на 15 суток.

С. Иммунофлуоресцентное окрашивание и ИФА (иммуноферментный анализ)

Клетки высевают в 96-луночные планшеты и фиксируют при использовании 4% параформальдегида в течение 30 минут. После промывки PBS клетки пермеабилизируют, используя 0,1% Triton™ X-100 в течение 10 минут и блокируют при использовании 5% козьей сыворотки в течение 1 часа. Клетки инкубируют с первичными антителами к тирозингидроксилазе (St John's Laboratory); DAT (Abcam); Tuj (Millipore); Tom20 (BD Biosciences); активированной каспазой 3 (Cell Signaling); альфа-синуклеином (Cell Signaling); фосфорилированным альфа-синуклеином (Millipore) при 4°C в течение 16 часов. Клетки промывают при использовании PBS-Tween® и инкубируют с 1 мкМ конъюгированных с Alexa Fluor™ вторичных антител 488 и 568 (Invitrogen) и Hoescht (Sigma) перед визуализацией. Визуализацию проводили при использовании многопараметрической системы визуализации Opera Phenix™ (Perkin Elmer).

ИФА дофамина проводят при использовании набора ИФА для исследования дофамина (Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG) в соответствии с инструкциями производителя. Высвобождения дофамина достигают при инкубации клеток при 37°C при использовании трех различных условий одновременно для каждой линии. Среда удаляют во всех лунках, затем первую лунку инкубируют с HBSS с Ca^{2+} и Mg^{2+} (Gibco, Life Technologies) в течение 30 минут, вторую лунку инкубируют в HBSS с Ca^{2+} и Mg^{2+} в течение 15 минут и затем добавляют 56 мМ KCl (Fisher chemical) еще на 15 минут, а третью лунку инкубируют с HBSS без Ca^{2+} и Mg^{2+} (Gibco, Life Technologies), но с 2 мМ EDTA в течение 15 минут и затем добавляют 56 мМ KCl еще на 15 минут. Среда сразу же собирают в пробирку типа «Эппендорф», и клетки отбирают с помощью Accutase®, центрифугируют при 400 g в течение 4 мин и

ресуспендируют в 10 мкл PBS. И в среду, и к осадку добавляют 1 mM ЭДТА и 4 mM метабисульфита натрия (Sigma) для сохранения дофамина.

Протокол для ММР

Фибробласты культивировали и высевали в черный 384-луночный планшет μ Clear® Griener из расчета 10000 клеток на лунку в 50 мкл среды. Планшеты оставляют в течение ночи в термостате, чтобы дать фибробластам прилипнуть к поверхности планшета. На следующее утро среду на основе глюкозы заменяют 25 мкл среды на основе галактозы. Затем в планшеты добавляли соединения при использовании станции дозирования жидкостей ECHO® 550. Дозировали в лунки так, чтобы обеспечить 8-точечный диапазон концентраций соединения от 0,06 нМ до 300 нМ. После дозирования в лунки добавляют еще 25 мкл среды на основе галактозы и затем оставляют в термостате на 24 часа. Через 24 часа среду удаляют из лунок и заменяют 25 мкл не содержащей фенола минимальной необходимой среды с 100 нМ TMRM (Sigma) и 10 мкМ красителя Hoechst (Sigma). Планшет возвращают в термостат еще на час, после чего окрашивающую среду удаляют и заменяют 25 мкл MEM без фенола. Затем планшет визуализируют при использовании микроскопа для многопараметрического анализа IN Cell (GE Healthcare) с 10 полями обзора на лунку в 2 каналах, возбуждение Cy3 542 нм, эмиссия 604-64 нм; и возбуждение DAPI 350 нм, эмиссия 450-55 нм при 37°C с CO₂. После визуализации планшет утилизируют, а изображения обрабатывают при использовании программного пакета INCell developer Toolkit (GE Healthcare).

Протокол для АТФ (аденозинтрифосфат)

Протокол для АТФ, в целом, является таким, как описано в Mortiboys *et al*, “Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts”, *Ann Neurol*. 2008 Nov; **64**(5):555-65. Вкратце, фибробласты культивировали и высевали в белые 384-луночные планшеты из расчета 5000 клеток на лунку в 50 мкл среды. Планшеты оставляют в течение ночи в термостате, чтобы дать фибробластам прилипнуть к поверхности планшета. На следующее утро среду на основе глюкозы заменяют 25 мкл среды на основе галактозы. Соединения добавляют в планшеты при использовании станции дозирования жидкостей ECHO 550. Дозировали в лунки так, чтобы обеспечить 8-точечный диапазон концентраций соединения от 0,06 нМ до 300 нМ. После дозирования в лунки добавляют еще 25 мкл среды на основе галактозы и затем оставляют в термостате на 24 часа. После инкубирования среду удаляют из планшета, а лунки дважды промывают стерильным PBS. Лунки заполняют 25 мкл

стерильного PBS с последующим добавлением 12,5 мкл раствора для лизиса из системы анализа для определения уровня АТФ ATPlite™ Luminescence (Perkin Elmer), включая 16 свободных от клеток лунок для использования в качестве пустых проб. Затем планшет помещают на роторный шейкер на 5 мин при 700 об/мин. После встряхивания в каждую лунку добавляют 12,5 мкл раствора субстрата АТФ (Perkin Elmer) и встряхивают еще 5 мин. Планшет затем помещают в темноту на 10 минут перед чтением. С помощью планшетного ридера PHERAStar® регистрируют интенсивность люминесценции. После анализа АТФ планшеты сразу же анализируют на содержание ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) посредством анализа CyQUANT®.

Сразу после анализа АТФ содержание ДНК оценивают с помощью набора CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay Kit (ThermoFisher). Буфер CyQUANT® готовят непосредственно перед анализом, и он состоит из 1 мкл красителя CyQUANT® на 1 мл ×1 раствора HBSS. В каждую лунку добавляют 12,5 мкл буфера CyQUANT®. Планшет оставляют в термостате на 1 час, затем считывают на планшетном ридере PHERAStar® с возбуждением при 497 нм и эмиссией при 520 нм.

Количественное определение АТФ для каждой лунки проводили по следующей формуле:

$$\text{Уровень АТФ} = \frac{\text{Величина при анализе ATPlite, скорректированная с учетом пустых проб}}{\text{Величина при анализе CyQUANT, скорректированная с учетом пустых проб}}$$

Анализ данных для первичных скрининговых исследований

После того, как анализы были проведены в трех повторностях для каждой линии и соединения, данные были введены в программный пакет Graph pad Prism 7, где была построена кривая зависимости доза-эффект с использованием по умолчанию уравнения «[Агонист] в зависимости от эффекта (три параметра)».

$$y = \text{Верхнее значение} + x \times \frac{\text{Верхнее значение} - \text{Нижнее значение}}{\text{EC}_{50} + x}$$

Из этих величин EC₅₀ были взяты минимальный эффект и максимальный эффект, которые использовали для расчета среднего геометрического значения между 5 различными оцениваемыми линиями.

Результаты, полученные для соединений, которые продемонстрировали неоднозначный результат в уравнении «[Агонист] в зависимости от эффекта (три

параметра)», были исключены из расчетов геометрического среднего значения из-за большого разброса, который был внесен их включением.

Анализ с использованием технологии Seahorse

Фибробласты высевают в 24-луночные планшеты Seahorse из расчета 50000 клеток на лунку. Клетки оставляют на 2 дня для прикрепления к поверхности. Среду заменяют на среду Seahorse DMEM с глюкозой и пируватом натрия и оставляют для уравнивания при 37 градусах в нормальных условиях, CO₂ в течение 1 часа. Планшет помещают в анализатор Seahorse и запускают программу смешивания (2 минуты), ожидания (3 минуты) и измерения (3 минуты). После трех измерений базального дыхания и ECAR (скорость внеклеточного закисления) вводят 0,5 мкМ олигомицина, после чего проводят еще три измерения; затем вводят 0,5 мкМ разобщителя окислительного фосфорилирования протонофора FCCP (карбонилцианид-4-трифторметоксифенил-гидразон) и проводят три измерения и, наконец, вводят 1 мкМ ротенона и проводят три измерения. После завершения всех измерений клетки окрашивают 10 мкМ красителя Hoesch и визуализируют при использовании InCell для подсчета количества клеток на лунку для нормализации. Этот классический экспериментальный протокол митохондриального стресс-теста позволяет нам рассчитать базальное митохондриальное дыхание, АТФ-связанное дыхание (количество, которое связано с образованием АТФ), максимальный и резервный дыхательный объем, частоту немитохондриального дыхания и скорость внеклеточного закисления, которая является косвенным показателем гликолиза.

Анализ комплекса I

Мозг мышей гомогенизировали *ex vivo* в буфере из 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES, 3 мМ EDTA, pH 7,5 при 4°C. Гомогенизацию проводили при использовании гомогенизатора Даунса для образцов коры головного мозга и посредством многократного пропускания через шприц на 0,5 мм для выделенного полосатого тела. Затем образцы инкубировали с 30 мкл детергента из набора для колориметрического анализа комплекса I (AbCam) на льду в течение 20 минут. Образцы затем центрифугируют при 13000 об/мин в течение 30 минут. Образцы в трех повторностях для каждого условия блокировали при использовании блокирующего буфера из набора на планшете из набора для колориметрического анализа комплекса I (AbCam) в течение 3 часов. Затем образцы 3 раза промывают при использовании промывочного буфера из набора перед добавлением буфера из набора для анализа, содержащего НАДН

(восстановленный никотинамидадениндинуклеотид) и краситель для колориметрии. Аналитический планшет считывают на планшетном ридере в программе кинетического анализа, считывая 450 нм с 30-секундным интервалом в течение 50 минут.

D. Измерения функции митохондрий и морфологии в индуцированных нейронах

Клетки высевают в 96-луночные планшеты; для прямой визуализации клетки инкубируют в течение одного часа при 37°C с 80 нМ тетраметилродамина (TMRM), 1 мкМ флуорофора LysoTracker® Green (Invitrogen) и раствором красителя Hoechst (Sigma) в концентрации 1 мкМ перед визуализацией при использовании Opera Phenix™. Измерения клеточной АТФ выполняют при использовании набора ATPlite (Perkin Elmer) в соответствии с инструкциями производителя. Образование активных форм кислорода митохондриями оценивали при использовании митохондриального NpFR2 (зонд; любезный подарок доктора Лиз Нью, Сиднейский университет, Австралия) в концентрации 20 мкМ и раствора красителя Hoechst в концентрации 1 мкМ в течение 30 минут при 37°C, затем красители удаляют и клетки визуализируют при использовании Opera Phenix™. Изображения, полученные в результате экспериментов по прямой визуализации, анализировали с помощью Harmony® (программное обеспечение Perkin Elmer). Мы разработали протоколы для сегментации ядра, клеточных стенок и отростков, митохондрий, лизосом, аутофагосом. Мы проанализировали только изображения z-проекции, собранные из срезов по оси z.

Результаты

Фибробласты

Трансмембранный потенциал митохондрий измеряли в фибробластах 6 (Таблица 1) или 3 (Таблица 2) пациентов со спорадической формой болезни Паркинсона, получавших лечение соединениями по изобретению или соединениями сравнения. Результаты показаны в таблицах 1 и 2, где «нижнее значение» представляет собой максимальный ответ при самой низкой дозе соединения (0,06 нМ), а «верхнее значение» представляет собой максимальный ответ при наивысшей дозе соединения (300 нМ).

Таблица 1 - Данные о трансмембранном потенциале митохондрий из фибробластов 6 пациентов со спорадической формой БП

Соединение	Е	Г	Н	2	7	9
Нижнее значение (% от ответа при лечении носителем)	104,9	110	103,4	99,83	107,3	109,8
Верхнее значение (% от ответа при лечении носителем)	111,8	108,1	123,3	109,1	112	112,4
EC ₅₀ (нМ)	23,29	0,6738	282,1	4,581	20,82	2,186

Таблица 2 - Данные о трансмембранном потенциале митохондрий из фибробластов 3 пациентов со спорадической формой БП

Соединение	14	17	19	20	22	27	30	31
Нижнее значение (% от ответа при лечении носителем)	94,3	88,9	95,9	99,8	99,3	102,6	98,4	99,6
Верхнее значение (% от ответа при лечении носителем)	166,8	152,3	143,1	147,1	145,8	158,9	155,6	151,1
EC ₅₀ (нМ)	18,9	127,6	104,4	17,7	45,4	171,1	21,01	5,5

Примечание: у пациентов с сБП среднее снижение ММР по сравнению с контрольной группой составляет 18%; поэтому повышение уровня ММР у пациентов с сБП, получавших носитель, до 118% восстановило бы ММР до контрольных уровней.

Уровни клеточной АТФ измеряли в фибробластах 6 (Таблица 3) или 3 (Таблица 4) пациентов со спорадической формой болезни Паркинсона, получавших лечение соединениями по изобретению или соединениями сравнения. Результаты показаны в таблицах 3 и 4, где «нижнее значение» представляет собой максимальный ответ при самой низкой дозе соединения (0,06 нМ), а «верхнее значение» представляет собой максимальный ответ при наивысшей дозе соединения (300 нМ).

Таблица 3 - Данные об уровнях клеточной АТФ из фибробластов 6 пациентов со спорадической формой БП

Соединение	Е	Г	Н	2	7	9
Нижнее значение (% от ответа при лечении носителем)	81,59	99,91	83,3	87,64	79,9	99,04
Верхнее значение (% от ответа при лечении носителем)	135,5	111,9	92,72	120,8	112,6	102,9
EC ₅₀ (нМ)	18,79	1,912	58,35	0,1247	1,078	0,4293

Таблица 4 - Данные об уровнях клеточной АТФ из фибробластов 3 пациентов со спорадической формой БП

Соединение	14	17	19	20	22	27	30	31
Нижнее значение (% от ответа при лечении носителем)	107	100,7	98,8	102,4	95,9	101,4	96,7	108,1
Верхнее значение (% от ответа при лечении носителем)	126,9	132,2	122,3	121,7	115,9	113,8	115,3	133
EC ₅₀ (нМ)	1,3	17,2	8,9	34,7	6,2	16,6	4,2	13,3

Примечание: в фибробластах при сБП среднее снижение уровня клеточной АТФ по сравнению с контрольной группой составляет 24%. Поэтому, 124% от уровня в фибробластах при сБП, которую лечили носителем, является увеличением для контрольных уровней АТФ.

Описанные выше анализы ММР и АТФ вместе с измерением токсичности включают первичный скрининг соединений в первичных фибробластах пациентов. При рассмотрении того, какое соединение является наиболее активным при первичных скринингах, принимается во внимание вся информация, включая значения EC₅₀, показывающие активность и % максимальных ответов для обоих анализов; на основании объединенной активности эксперты-биологи принимают решения по каждому соединению.

Данные о потреблении кислорода, полученные с помощью анализа с использованием технологии Seahorse для 6 линий фибробластов пациентов со спорадической формой БП и 6 контрольных линий, показаны на фиг. 1А, 1В и 1С, из которых можно видеть, что фибробласты при сБП демонстрируют значительное снижение базального дыхания митохондрий на 42% (**p менее 0,005), максимального дыхания на 48% (*p менее 0,05) и АТФ-связанного дыхания на 18% (*p менее 0,05). При обработке UDCA улучшений не наблюдается, однако обработка соединением 7 значительно улучшает все три митохондриальных параметра. Следует отметить, что оба соединения дозируют при концентрациях EC₉₀, которые составляют 100 нМ для UDCA и 50 нМ для соединения 7. Таким образом, очевидно, что соединение 7 обеспечивает большее увеличение функции митохондрий, измеряемое по потреблению кислорода, и обеспечивает этот эффект при более низкой концентрации.

Скорость внеклеточного закисления в 6 образцах фибробластов при спорадической форме БП и 6 контрольных образцах.

Фибробласты при сБП имеют значительное снижение ECAR (косвенный показатель гликолиза) на 44% по сравнению с контролем (***) р менее 0,005). Как показано на фиг. 2, при обработке UDCA изменений не наблюдается, но есть значительные улучшения при обработке соединением 7.

Приведенные выше данные показывают защитные эффекты соединений в отношении митохондрий в первичных фибробластах пациентов с сБП, однако видом клеток, который в первую очередь повреждается при БП, является дофаминергический нейрон. Приведенные ниже данные показывают результаты, полученные на дофаминергических нейронах, полученных от трех пациентов с сБП; эти культуры примерно на 96% состоят из дофаминергических нейронов, и в настоящее время эта методология является единственным протоколом для создания такой чистой дофаминергической культуры из клеток пациентов (способ, разработанный Mortiboys, University of Sheffield); поэтому, это модель, полученная от пациента, наиболее точно представляет нейроны, пораженные при БП.

В таблице 5 ниже показаны результаты измерений функции митохондрий и морфологии нейронов в индуцированных нейронах пациентов с сБП по сравнению с контрольной группой при отсутствии лечения или при лечении либо UDCA, либо соединением 7.

Таблица 5 - Индуцированные нейроны

Параметр	% от уровня в индуцированных нейронах из контрольной группы		
	Пациенты с сБП, не получающие лечения	Пациенты с сБП, получающие лечение UDCA	Пациенты с сБП, получающие лечение соединением 7
Нормализация АТФ (% от контроля)	50	82	101
EC ₅₀ АТФ (нМ)		5	0,8
Нормализация ММР (% от контроля)	52	73	100
EC ₅₀ ММР (нМ)		7,3	0,52

АФК (активные формы кислорода) (нормализация) (% от контроля)	115	110	103
Морфология нейронов (элонгация; % от контроля)	48	64	78
Уровни активированной каспазы 3	162	143	100
Уровень дофамина	0	Отсутствие эффекта	Приблизительно 5% повышение высвобождения дофамина

Данные в таблице 5 очень четко показывают, что соединение 7 обеспечивает защитный эффект в отношении обоих митохондриальных параметров в дофаминергических нейронах при сБП в дополнение к улучшению морфологии нейронов и снижению уровней апоптоза (определяемым по уровням активированной каспазы 3). Апоптоз является основным механизмом клеточной смерти дофаминергических нейронов в культуре и дофаминергических нейронов у пациентов с БП.

Данные, полученные *in vivo* на мышах с соединением 7

На фиг. 3 показано, что активность I комплекса дыхательной цепи митохондрий значительно увеличивается дозозависимым образом в гомогенате ткани цельного мозга мышей дикого типа после введения соединения 7 в дозе 4 мг/кг и 12 мг/кг. При дозе 4 мг/кг увеличение составляет приблизительно 380%, а при дозе 12 мг/кг наблюдается увеличение активности I комплекса приблизительно на 800% по сравнению с необработанным контролем (*p менее 0,05).

На фиг. 4 показаны результаты активности I комплекса в гомогенате мозговой ткани мыши из левой области полосатого тела от мышей, которым вводили:

- Носитель
- Носитель плюс 12 мг соединения 7
- МРТР

- МРТР плюс 1 мг соединения 7
- МРТР плюс 4 мг соединения 7
- МРТР плюс 12 мг соединения 7

Обработка одним соединением 7 вызывает повышение активности I комплекса приблизительно на 30% по сравнению с необработанным контролем (*р менее 0,05). Обработка МРТР вызывает снижение активности I комплекса на 50% по сравнению с необработанным контролем (**р менее 0,01), но одновременная обработка 1 мг соединения 7 и МРТР предотвращает вызванную МРТР потерю активности I комплекса и сохраняет I комплекс на нормальном уровне (**р менее 0,01 по сравнению с обработкой только МРТР), по-видимому, увеличение доз соединения 7 одновременно с МРТР предотвращает любую потерю активности I комплекса под действием МРТР.

Активность соединений в фибробластах пациентов с болезнью Альцгеймера

Фибробласты пациентов как с сБА (спорадическая форма болезни Альцгеймера), так и с семейной формой БА (мутанты PSEN1) были протестированы при использовании одного и того же первичного скринингового анализа для определения общих уровней клеточной АТФ. У фибробластов пациентов с сБА и PSEN1 наблюдают уменьшение на 21% по сравнению с контролем. Данные, представленные в таблице 6 ниже, представляют собой среднее увеличение уровней АТФ после 24-часовой обработки соединениями в концентрации 100 нМ. Поскольку в клетках наблюдается среднее снижение уровня АТФ на 21%, повышение на 21% восстанавливает контрольные уровни, все, что превышает 21%, повышает контрольные уровни.

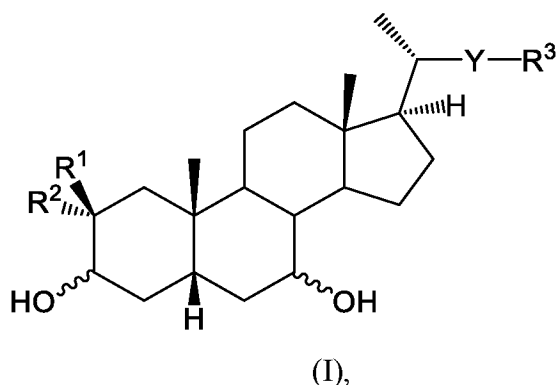
Таблица 6

Соединение	UDCA	2	7	8
% увеличения по сравнению с обработкой носителем	12%	65%	24%	65%

Данные ясно показывают, что обработка соединениями 2, 7 и 8 дает более благоприятное восстановление уровней клеточной АТФ, чем обработка UDCA. Кроме того, соединения 2 и 8 являются особенно эффективными, резко повышая уровни АТФ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение общей формулы (I):



где

один из R^1 и R^2 представляет собой F, а другой из R^1 и R^2 представляет собой H или F;

Y представляет собой связь или C_{1-20} алкиленовую, C_{2-20} алкениленовую или C_{2-20} алкиниленовую линкерную группу;

R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $S(O)_2R^{12}$, $OS(O)_2R^{12}$, $S(O)_2OR^{12}$, $OS(O)_2OR^{12}$, $S(O)_2NR^{12}R^{13}$, $C(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $NHC(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $OP(O)(OR^{12})_2$, $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$ или $C(O)NR^{12}C(O)CH_2NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$;

каждый R^{12} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена, OR^{10} , $NR^{10}R^{11}$, R^{16} и арила;

каждый R^{10} и R^{11} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил;

R^{13} представляет собой H, C_{1-6} алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена и арила; или 3-8-членное карбоциклическое кольцо или гетероциклическое кольцо, где указанное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо возможно замещено одним или более чем одним заместителем, выбранным из $=O$ и R^{16} ; или фенил или 5-6-членное гетероарильное кольцо, где указанный фенил или гетероарильное кольцо возможно замещено заместителем R^{16} ; или

когда R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$ или $S(O)_2NR^{12}R^{13}$, R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 3-8-членное гетероциклическое кольцо, которое возможно содержит один или более чем один дополнительный гетероатом, выбранный из N, O и S; и возможно замещено одним или более чем одним заместителем, выбранным из $CH_2C(O)OH$, $C(O)OH$, C_{1-6} алкила, группы $C(O)OC_{1-6}$.

алкил, $S(O)_2OH$, $=O$ и $=N-OH$; и возможно конденсировано с фенильной группой, которая не замещена или замещена одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена и нитро;

n равен 1, 2 или 3;

каждый R^{15} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена, фенила и 5- или 6-членного гетероарила; 3-8-членную циклоалкильную группу; или группу R^{14} , где R^{14} представляет собой боковую цепь аминокислоты; или

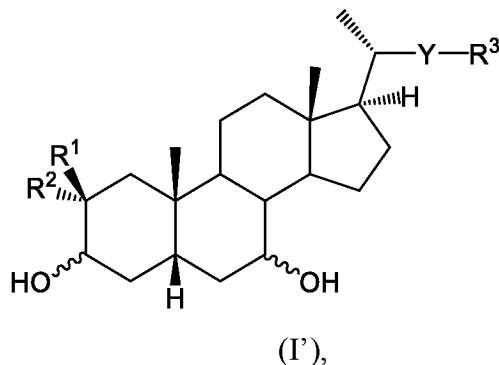
когда n равен 2 или 3, две группы R^{15} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, и возможно с присутствующим между ними атомом углерода, могут объединяться с образованием $-(CH_2)_p-$, так что группа $[CH(R^{15})]_n$ представляет собой 3-8-членное карбоциклическое кольцо;

p равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

R^{16} выбран из $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, группы $S(O)_2(C_{1-6}алкил)$, $OS(O)_2OH$ и $P(O)(OH)_2$;

или его фармацевтически приемлемая соль или изотопная модификация.

2. Соединение общей формулы (I'):



где

один из R^1 и R^2 представляет собой F , а другой из R^1 и R^2 представляет собой H или F ;

Y представляет собой связь или C_{1-20} алкиленовую, C_{2-20} алкениленовую или C_{2-20} алкиниленовую линкерную группу;

R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $S(O)_2R^{12}$, $OS(O)_2R^{12}$, $S(O)_2OR^{12}$, $OS(O)_2OR^{12}$, $S(O)_2NR^{12}R^{13}$, $C(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $NHC(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $OP(O)(OR^{12})_2$, $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$ или $C(O)NR^{12}C(O)CH_2NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$;

каждый R^{12} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой;

R^{13} представляет собой H, C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой, или 5- или 6-членное карбоциклическое кольцо, возможно замещенное заместителем R^{16} ; или

R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо, возможно содержащее дополнительный атом азота, возможно замещенное одним или более чем одним заместителем, выбранным из групп $CH_2C(O)OH$, $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $=O$ и $=N-OH$, и возможно конденсированное с фенильной группой, которая не замещена или замещена одним или более чем одним заместителем, выбранным из галогена и нитро;

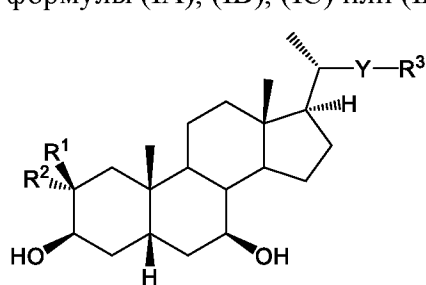
каждый R^{15} независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой, или группу R^{14} , где R^{14} представляет собой боковую цепь аминокислоты;

n равен 1, 2 или 3;

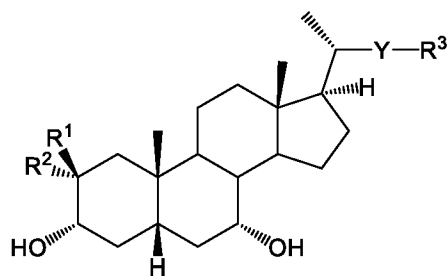
R^{16} выбран из $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $OS(O)_2OH$ и $P(O)(OH)_2$;

или его фармацевтически приемлемая соль или изотопная модификация.

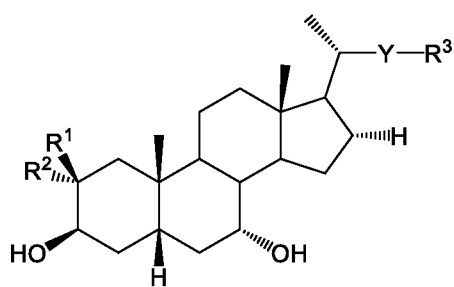
3. Соединение по п. 1 или п. 2, которое представляет собой соединение общей формулы (IA), (IB), (IC) или (ID):



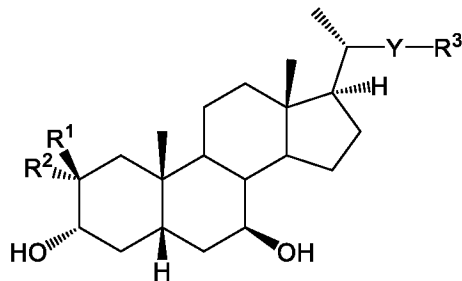
(IA)



(IB)



(IC)



(ID)

где R^1 , R^2 , Y и R^3 являются такими, как определено выше для общей формулы (I).

4. Соединение по п. 3, которое представляет собой соединение общей формулы (IA).

5. Соединение по п. 3, которое представляет собой соединение общей формулы (IB).

6. Соединение по любому из пп. 1-5, где R^1 и R^2 оба представляют собой F.

7. Соединение по любому из пп. 1-6, где Y представляет собой связь, либо C_{1-15} алкиленовую, либо C_{2-3} алкениленовую линкерную группу.

8. Соединение по п. 7, где Y представляет собой $-CH_2CH_2-$.

9. Соединение по любому из пп. 1-8, где:

R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}CH(R^{14})C(O)OH$ или $C(O)NR^{12}CH(R^{15})CH(R^{15})S(O)_2OH$, где R^{12} и R^{14} являются такими, как определено в п. 1, и R^{15} представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой; или

R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, $(C(O)N(R^{12}))(R^{13})$ или $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$;

где R^{12} , R^{13} , R^{15} , R^{16} и n являются такими, как определено в п. 1.

10. Соединение по любому из пп. 1-9, где:

R^{12} представляет собой H или метил или этил, возможно замещенный R^{16} или $N(R^{10})(R^{11})$; или

R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $NHC(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$, $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$ или $C(O)NR^{12}C(O)CH_2NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$; и R^{12} представляет собой H или метил; и/или

R^{13} , когда он присутствует, соответственно представляет собой 5- или 6-членное карбоциклическое кольцо или гетероциклическое кольцо, возможно замещенное R^{16} или $=O$; или фенил, возможно замещенный R^{16} ; или

R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$ или $S(O)_2NR^{12}R^{13}$, и R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 5- или 6-членное гетероциклическое кольцо, возможно замещенное одним или более чем одним заместителем, выбранным из R^{16} и $=O$, и возможно содержащее один или более чем один дополнительный гетероатом, выбранный из O, N и S; и/или

R^{16} , когда он присутствует, представляет собой $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, группу $S(O)_2(C_{1-6}алкил)$ или $OS(O)_2OH$; или

R^{16} , когда он присутствует, представляет собой $C(O)OH$, $S(O)_2OH$, $OS(O)_2OH$ или $P(O)(OH)_2$, и соединение находится в форме фармацевтически приемлемой соли.

11. Соединение по любому из пп. 1-10, где R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Соединение по п. 11, где R^{12} представляет собой H , CH_2R^{16} или $-CH_2CH_2R^{16}$, где R^{16} является таким, как определено выше.

13. Соединение по любому из пп. 1-10, где R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$, или его фармацевтически приемлемая соль.

14. Соединение по п. 13, где R^{12} представляет собой H , метил или метил, замещенный R^{16} .

15. Соединение по п. 13 или п. 14, где R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{14})C(O)OH$ или $C(O)NR^{12}CH(R^{15})CH(R^{15})S(O)_2OH$, где R^{14} представляет собой боковую цепь аминокислоты, и R^{15} представляет собой H или C_{1-6} алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой.

16. Соединение по п. 15, где:

R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{14})C(O)OH$, где R^{12} представляет собой H или метил, и R^{14} представляет собой H ; или

R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{15})CH(R^{15})S(O)_2OH$, где R^{12} представляет собой H или метил, и обе группировки R^{15} представляют собой H .

17. Соединение по п. 13 или п. 14, где:

каждый R^{15} независимо представляет собой H или C_{1-4} алкил, возможно замещенный, как указано в п. 1; или

n равен 2 или 3, и две группы R^{15} объединяются с атомами углерода, к которым они присоединены, и возможно с находящимся между ними атомом углерода, если он присутствует, с образованием 5-7- членного карбоциклического кольца.

18. Соединение по любому из пп. 1-10, где R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}R^{13}$, или его фармацевтически приемлемая соль.

19. Соединение по п. 18, где R^{12} представляет собой H или C_{1-3} алкил, замещенный одним заместителем R^{16} , где R^{16} является таким, как определено в п. 1.

20. Соединение по п. 18 или п. 19, где R^{13} представляет собой фенил или 5-7-членную циклоалкильную или гетероциклическую группу, каждая из которых возможно замещена одним заместителем R^{16} , и где циклоалкильная и гетероциклическая группы замещены одним или более чем одним заместителем $=O$.

21. Соединение по п. 1, выбранное из:

- 2β-фторхенодезоксихолево́й кислоты (соединение 1);
- 2β-фтор-3β,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 2);
- 2α-фтор-3β,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 3);
- 2α-фтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 4);
- 2α-фтор-3α,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 5);
- 2α-фтор-3α,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 6);
- 2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 7);
- 2,2-дифтор-3α,7α-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 8);
- 2,2-дифтор-3α,7β-дигидрокси-5β-холановой кислоты (соединение 9);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-этилсульфоно́вой кислоты (соединение 10);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-пропионо́вой кислоты (соединение 11);
- N*-(метил)-*N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-уксу́сной кислоты (соединение 12);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-*транс*-2-циклогексанкарбоно́вой кислоты (соединение 13);
- 1-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-оил)-пиперидин-3-карбоно́вой кислоты (соединение 14);
- 3-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-4-тиазолидин-карбоно́вой кислоты (соединение 15);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-оил)-морфолина (соединение 16);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-метилкарбоно́вой кислоты (соединение 17)
- N*-(карбоксиметил)-*N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-оил)-2-аминоуксу́сной кислоты (соединение 18);
- N*-(метил)-*N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-этилсульфоно́вой кислоты (соединение 19);
- 3-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-оил)-амино-пропансульфоно́вой кислоты (соединение 20);
- N*-(2,2-дифтор-3β,7β-дигидрокси-5β-холан-24-амид)-метансульфоно́вой кислоты (соединение 21);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтилсерной кислоты (соединение 22);

O-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-гидроксиэтилсульфоновой кислоты (соединение 23);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-анилин-2-сульфоновой кислоты (соединение 24);

N-(циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-аминопропансульфоновой кислоты (соединение 25);

N-(циклогексил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтансульфоновой кислоты (соединение 26);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-2-аминоэтилметилсульфона (соединение 27);

N-(этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-аминотетрагидротиофен-диоксида (соединение 28);

N-(2-(диизопропиламино)этил)-*N*-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-3-аминотетрагидротиофен-диоксида (соединение 29);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-тиоморфолин-диоксида (соединение 30);

N-(2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холан-24-оил)-1,1-диоксидотетрагидро-2Н-тиопиран-3-иламина (соединение 31); и

их фармацевтически приемлемых солей (когда это целесообразно), особенно солей металлов, таких как соли натрия и калия, особенно соли натрия или (для соединения 18) динатриевая соль.

22. Соединение по любому из пп. 1-21 для применения в медицине, например для применения в лечении или предупреждении нейродегенеративного расстройства.

23. Применение соединения по любому из пп. 1-21 в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждении нейродегенеративного расстройства.

24. Способ лечения или предупреждения нейродегенеративного расстройства, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп. 1-21.

25. Соединение для применения по п. 22, применение по п. 23 или способ по п. 24, где нейродегенеративное расстройство представляет собой болезнь Паркинсона,

легкое когнитивное нарушение, деменцию (включая болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви), болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз (болезнь двигательных нейронов), прогрессирующий надъядерный паралич или болезнь Вильсона.

26. Соединение для применения, применение или способ по п. 25, где нейродегенеративное расстройство представляет собой болезнь Паркинсона, и соединение выбрано из соединений общей формулы (IA) и (ID), как определено в п. 3.

27. Соединение для применения, применение или способ по п. 26, где соединение выбрано из 2,2-дифтор-3 β ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (соединение 7) и дифтор-3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (соединение 9).

28. Соединение для применения, применение или способ по п. 26, где нейродегенеративное расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера, и соединение выбрано из соединений общей формулы (IV), как определено в п. 3.

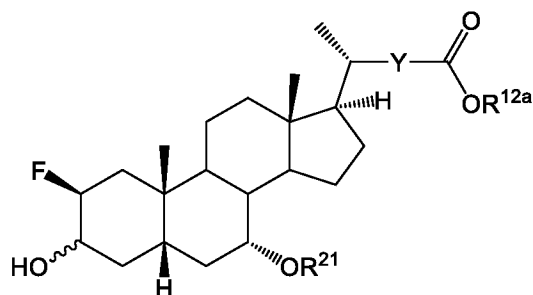
29. Соединение для применения, применение или способ по п. 28, где соединение представляет собой 2,2-дифтор-3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановую кислоту (соединение 8).

30. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-21 и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель.

31. Способ получения соединения по любому из пп. 1-21, включающий:

А. для соединения общей формулы (IV) или (IC), как определено в п. 3, в котором R¹ представляет собой F, и R³ представляет собой C(O)OR^{12a}, где R^{12a} представляет собой C₁-алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой:

обработку кислотой соединения общей формулы (II):

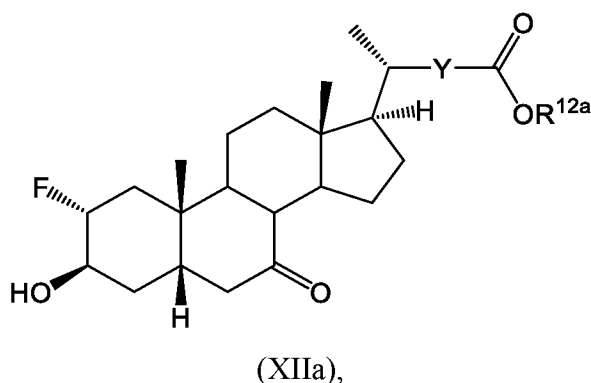


(II),

где Y и R^3 являются такими, как определено в п. 1; R^{12a} представляет собой C_{1-6} -алкил, возможно замещенный одной(им) или более чем одной(им) галогеном или арильной группой; и R^{21} представляет собой защитную группу OH , чувствительную к кислотам;

В. для соединения общей формулы (IA) или (IC), как определено в п. 3, в котором R^2 представляет собой F , и R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$, где R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II):

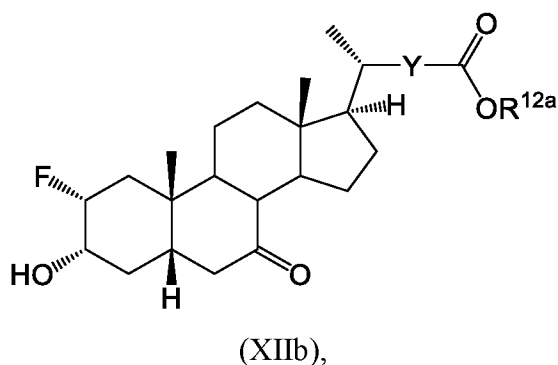
восстановление соединения общей формулы (XIIa):



где Y является таким, как определено в п. 1, и R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II);

С. для соединения общей формулы (IB) или (ID), как определено в п. 3, в котором R^2 представляет собой F , и R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$, где R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II):

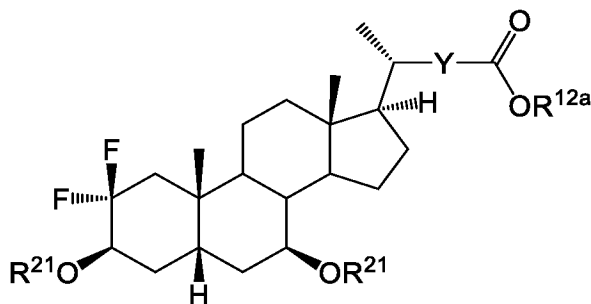
восстановление соединения общей формулы (XIIb):



где Y является таким, как определено в п. 1, и R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II);

D. для соединения общей формулы (IA), как определено в п. 3, в котором R^1 и R^2 оба представляют собой F , и R^3 представляет собой $C(O)OR^{12a}$, где R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II):

взаимодействие с кислотой соединения общей формулы (XXI):

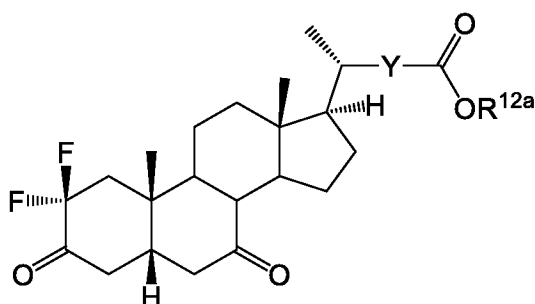


(XXI),

где Y является таким, как определено в п. 1, и R^{12a} и R²¹ являются такими, как определено для общей формулы (II);

Е. для соединения общей формулы (IB) или (ID), как определено в п. 3, в котором R¹ и R² оба представляют собой F, и R³ представляет собой C(O)OR^{12a}, где R^{12a} является таким, как определено для общей формулы (II):

восстановление соединения общей формулы (XXII):



(XXII),

где Y является таким, как определено в п. 1, и R^{12a} и R²¹ являются такими, как определено для общей формулы (II);

Г. для соединения общей формулы (I), в котором R³ представляет собой C(O)OH:

гидролиз соединения общей формулы (I), в котором R³ представляет собой C(O)R^{12a}, где R^{12a} является таким, как определено выше для общей формулы (II);

Г. для соединения общей формулы (I), в котором R³ представляет собой C(O)NR¹²R¹³:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R³ представляет собой C(O)OH, с амином общей формулы:

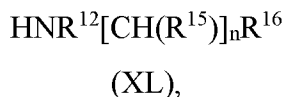


где R¹² и R¹³ являются такими, как определено в п. 1;

в присутствии агента сочетания и амина;

Н. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}[CH(R^{15})]_nR^{16}$:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)OH$, с соединением общей формулы (XL):

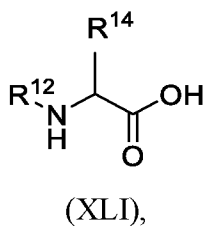


где R^{12} , R^{15} , n и R^{16} являются такими, как определено в п. 1;

в присутствии агента сочетания и амина;

I. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{14})C(O)OH$:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)OH$, посредством реакции с аминокислотой общей формулы (XLI):

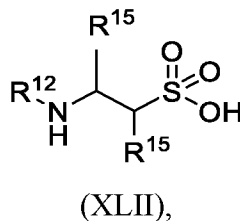


где R^{12} и R^{14} являются такими, как определено в п. 1;

в присутствии агента сочетания и амина;

J. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}CH(R^{15})CH(R^{15})S(O)_2OH$:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)OH$, посредством реакции с соединением общей формулы (XLII):



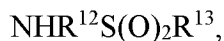
где R^{12} и R^{15} являются такими, как определено в п. 1;

в присутствии агента сочетания и амина;

К. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет

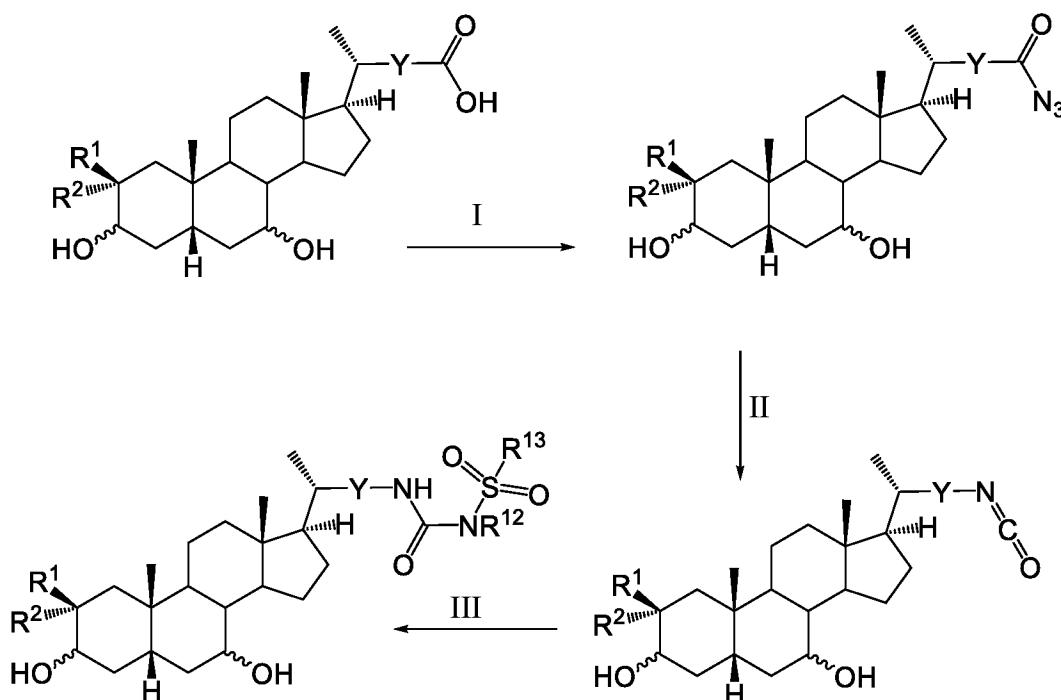
с собой $C(O)OH$, с соединением формулы:



где R^{12} и R^{13} являются такими, как определено в п. 1, в присутствии агента сочетания и амина;

L. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $NHC(O)NR^{12}S(O)_2R^{13}$:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)OH$, как указано далее:



I дифенилфосфорилазид/триэтиламин

II нагревание

III $R^{13}SO_2NHR^{12}$

где R^1 , R^2 , R^{12} и R^{13} являются такими, как определено в п. 1;

M. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $S(O)_2OR^{12}$:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)OH$, с C_{1-6} алканоил- или бензоилхлоридом, или с C_{1-6} алкановым ангидридом с получением защищенного промежуточного соединения; и

превращение карбоксильной группы защищенного промежуточного соединения в OH посредством восстановления гидридным восстановителем с получением восстановленного промежуточного соединения; и

галогенирование восстановленного промежуточного соединения с получением галогенированного промежуточного соединения, в котором группа ОН заменена галогеном; и

взаимодействие галогенированного промежуточного соединения с сульфитом натрия в спиртовом растворителе;

N. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $OS(O)_2R^{12}$:

взаимодействие соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $C(O)OR^{12}$, с C_{1-6} алканоил- или бензоилхлоридом, или с C_{1-6} алкановым ангидридом для защиты любых групп ОН; и

превращение группы $C(O)OR^{12}$ защищенного промежуточного соединения в ОН посредством восстановления гидридным восстановителем с получением восстановленного промежуточного соединения; и

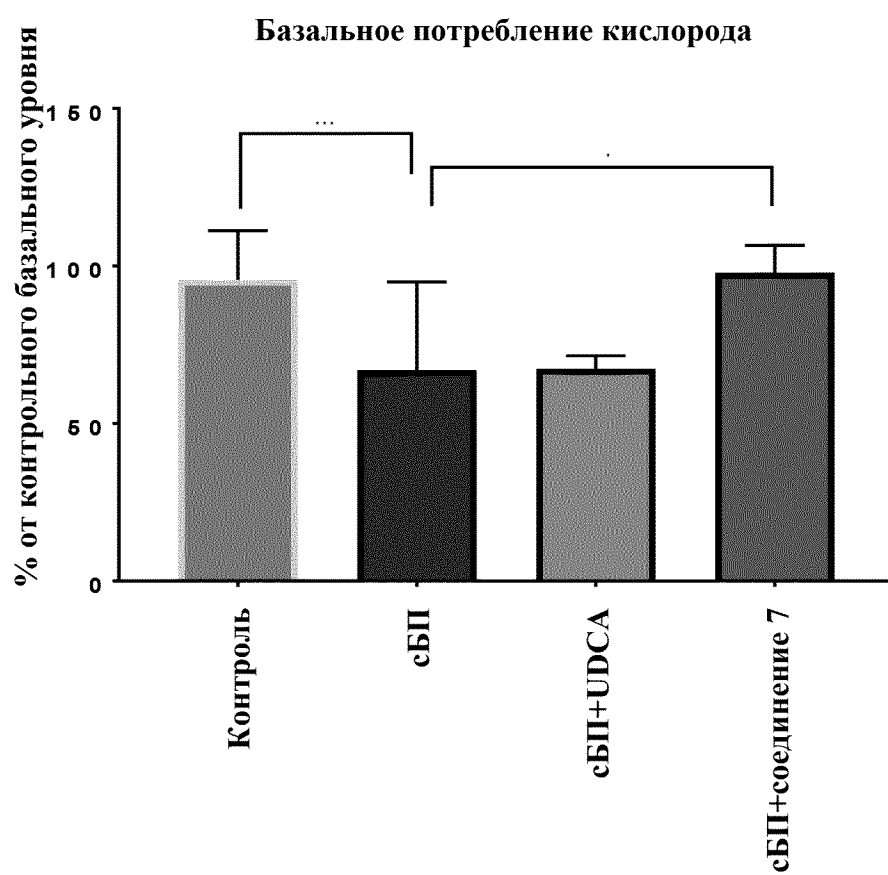
взаимодействие восстановленного промежуточного соединения с хлорсульфоновой кислотой в присутствии основания с получением защищенного продукта; и

щелочной гидролиз защищенного продукта для удаления защитных групп;

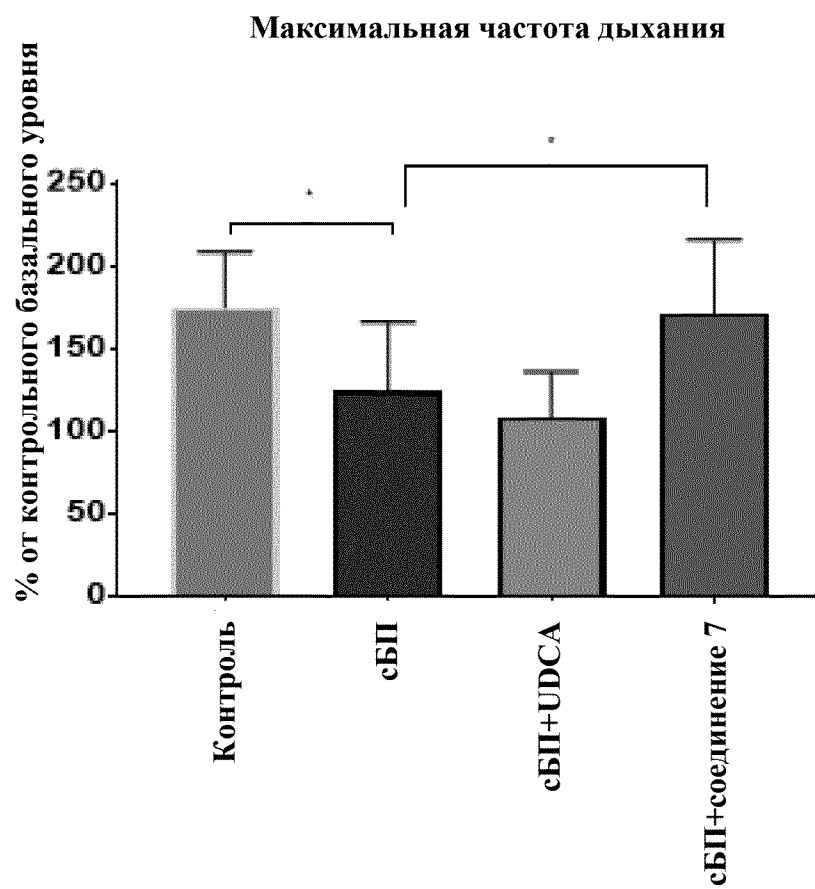
O. для соединения общей формулы (I), в котором R^3 представляет собой $S(O)_2R^{12}$:

взаимодействие восстановленного вышеуказанного промежуточного соединения (H) или (O) с реагентом Лавессона с последующим окислением полученного продукта.

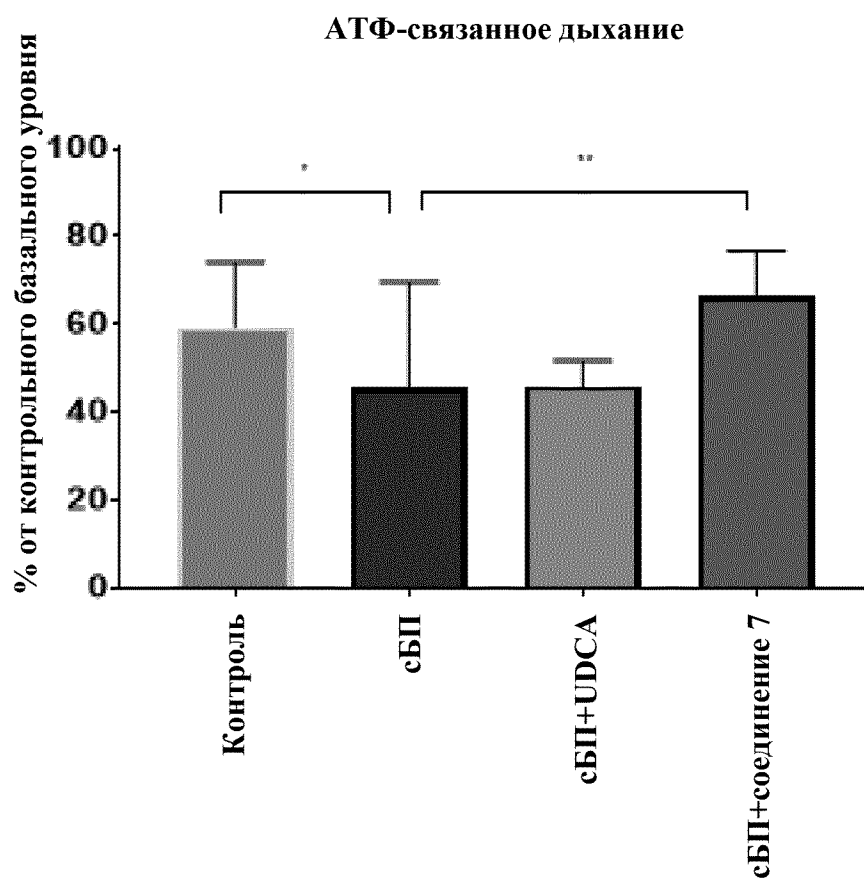
Фиг. 1А



Фиг. 1В

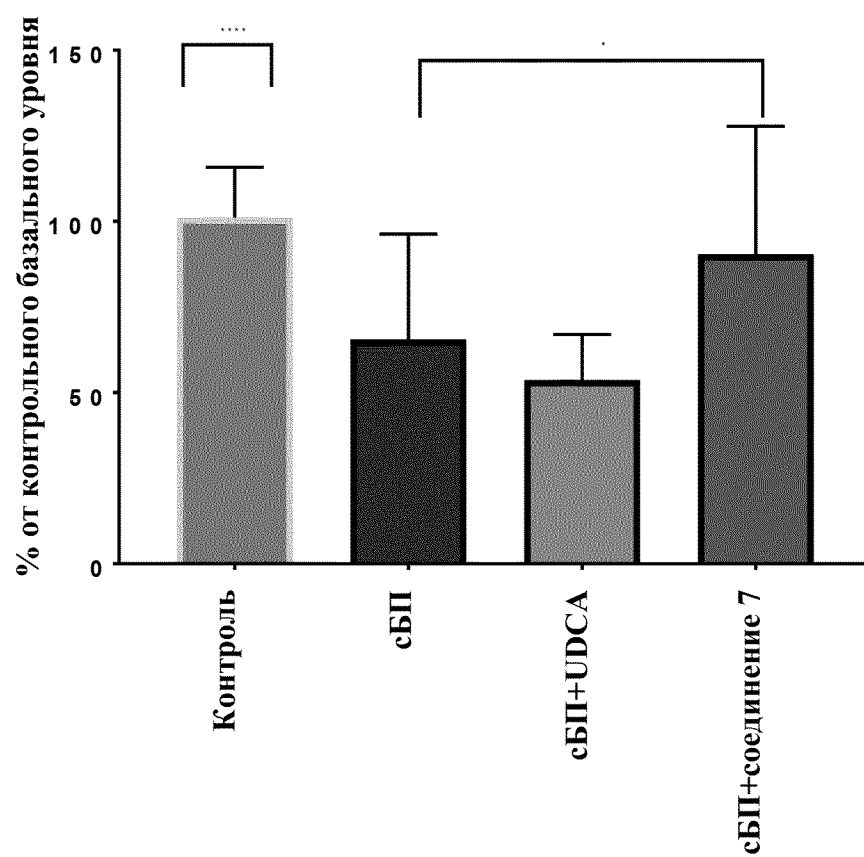


Фиг. 1С

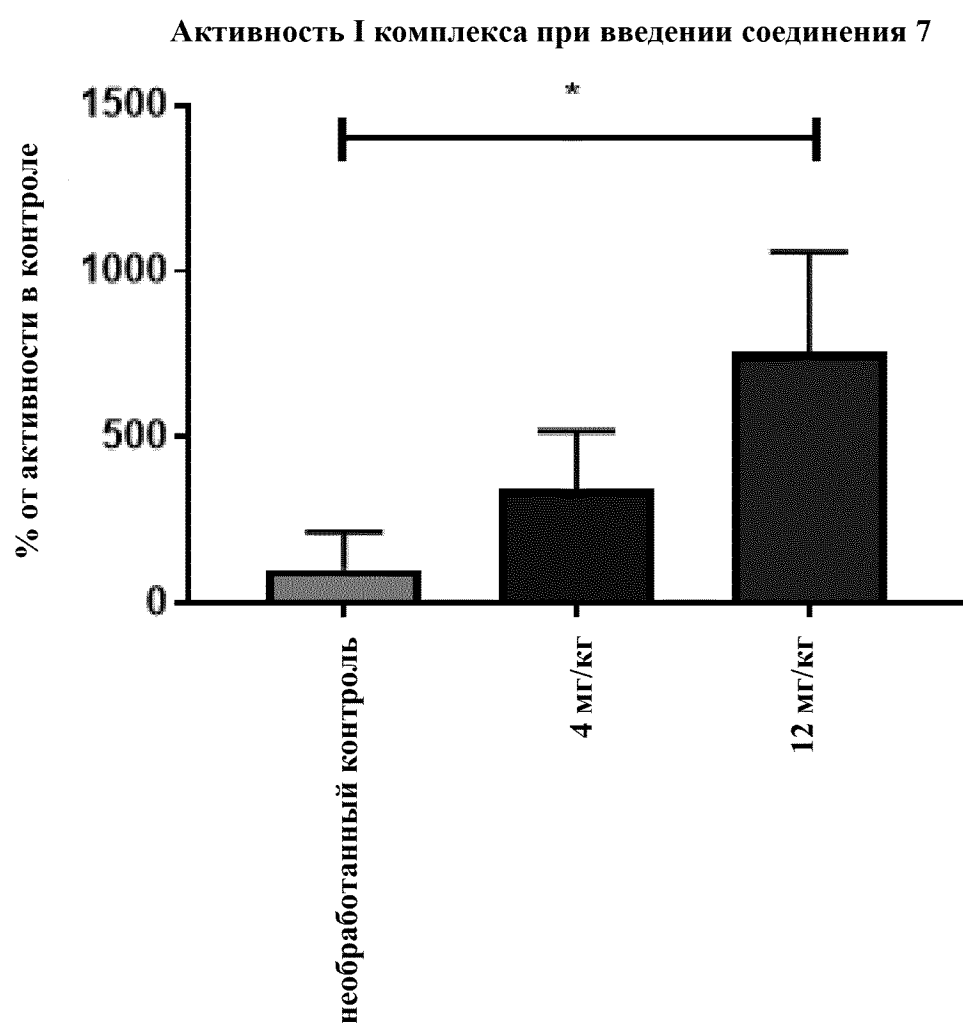


Фиг. 2

ECAR (скорость внеклеточного закисления)



Фиг. 3



непарный t-критерий между контролями и дозой 12 мг/кг

p-уровень значимости 0,0239

p-уровень значимости сводный *

Фиг. 4

