

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040490

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.09

(21) Номер заявки
202190302

(22) Дата подачи заявки
2019.08.29

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

(54) СОЕДИНЕНИЯ 2,6-ДИАМИНОПИРИДИНА

(31) 62/726,520

(32) 2018.09.04

(33) US

(43) 2021.06.10

(86) PCT/US2019/048788

(87) WO 2020/051058 2020.03.12

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

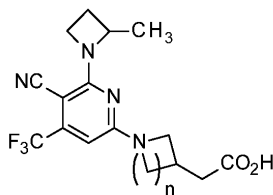
(72) Изобретатель:
Дурхам Тимоти Барретт (US)

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

(56) KIM HUARD ET AL.: "Discovery of Fragment-Derived Small Molecules for in Vivo Inhibition of Kethexokinase (KHK)", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 60, no. 18, 11 September 2017 (2017-09-11), pages 7835-7849, XP055643458, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00947 figures 1-9; tables 1, 2 abstract Scheme 1-3

MARYANOFF BRUCE E. ET AL.: "Inhibitors of Kethexokinase: Discovery of Pyrimidinopyrimidines with Specific Substitution that Complements the ATP-Binding Site", ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 2, no. 7, 14 July 2011 (2011-07-14), pages 538-543, XP008178354, ISSN: 1948-5875, DOI: 10.1021/ML200070G [retrieved on 2011-04-08] the whole document

(57) В изобретении предложено соединение формулы I



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

B1

040490

040490 B1

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

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

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

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

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

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

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

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

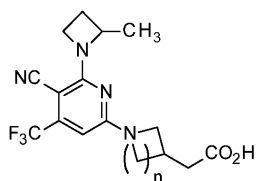
В нескольких эпидемиологических и экспериментальных исследованиях сообщалось, что повышенное потребление фруктозы, а точнее увеличение метаболизма фруктозы, может играть важную роль в развитии метаболического синдрома, в частности в развитии СД 2 типа (Softie et al.; *J. Clin. Invest.*, 127(11), 4059-4074,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

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

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

Соответственно, в настоящем изобретении предложено соединение формулы I

040490



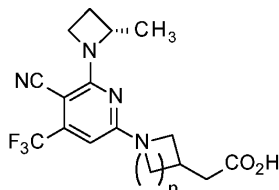
Формула I

где n составляет 1 или 2;

или его фармацевтически приемлемая соль.

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

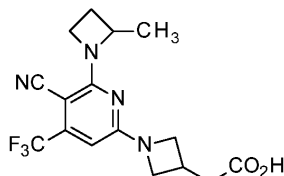
В конкретном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль.

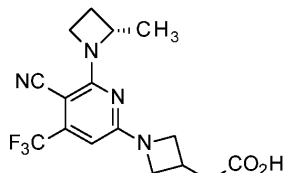
В одном варианте реализации n составляет 1.

В данном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль.

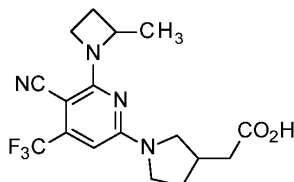
В предпочтительном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль.

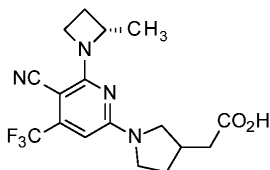
В другом варианте реализации n составляет 2.

В данном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы



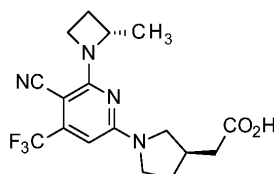
или его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом предпочтительном варианте реализации соединение согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль.

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

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

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

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

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

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

В одном варианте реализации в настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из метаболического синдрома, НАЖБП, ожирения, осложнений диабета, например диабетической ретинопатии, сердечно-сосудистого заболевания, ишемической болезни сердца и дислипидемии, у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации способ включает введение 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

Более того, в одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении СД 2 типа. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении сердечной недостаточности. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении диабетической болезни почек. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении НАСГ. В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении хронической болезни почек. В одном варианте реализации в настоящем изобретении также предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении метаболического синдрома, НАЖБП, ожирения, осложнений диабета, например диабетической ретинопатии, сердечно-сосудистого заболевания, ишемической болезни сердца или дис-

липидемии. В предпочтительном варианте реализации соединения формулы I в терапевтических применениях, указанных выше, представляет собой 2-[(3R)-1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

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

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

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

Применяемый в данном документе термин "пациент" относится к млекопитающему. Предпочтительно пациентом является человек.

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

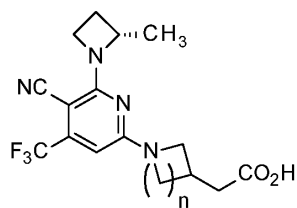
Эффективное количество может установить специалист в данной области техники, используя известные технологии и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациента, рассматривается множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими, вид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

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

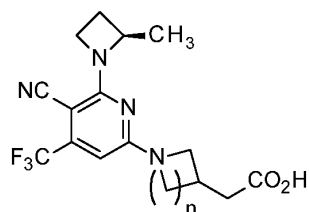
Соединения формулы I или их фармацевтически приемлемые соли особенно подходят для способов лечения согласно настоящему изобретению, но некоторые конфигурации являются предпочтительными. В следующем списке соединений настоящего изобретения описаны такие конфигурации. Следует понимать, что эти предпочтения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

Соединения согласно настоящему изобретению включают

040490



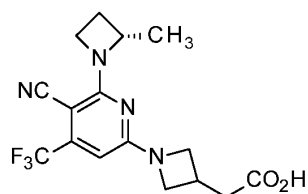
Формула Ia



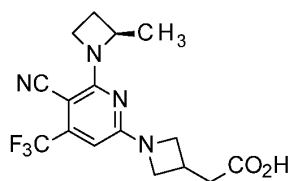
Формула Ib

и их фармацевтически приемлемые соли.

Дополнительные соединения согласно настоящему изобретению включают



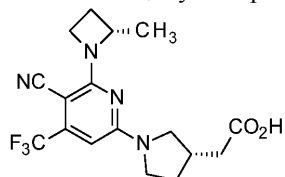
Формула IIa



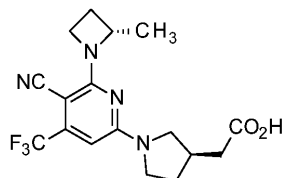
Формула IIb

и их фармацевтически приемлемые соли.

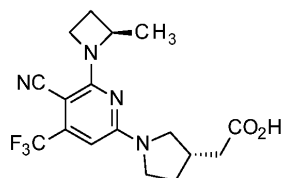
Дополнительные соединения согласно настоящему изобретению включают



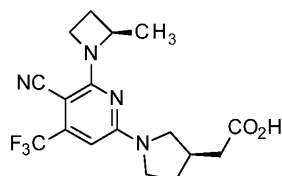
Формула IIIa'



Формула IIIa''



Формула IIIb'



Формула IIIb''

и их фармацевтически приемлемые соли.

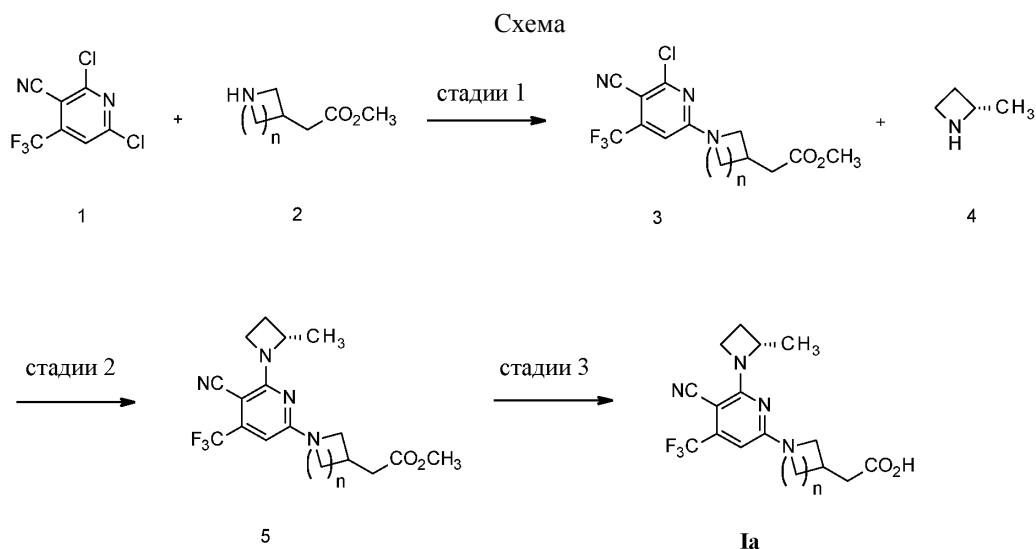
Хотя настоящее изобретение охватывает все индивидуальные энантиомеры и диастереомеры, а также их смеси, включая рацематы, соединения формулы Ia, формулы IIa и IIIa" и их фармацевтически приемлемые соли являются особенно предпочтительными.

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

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

Соединения согласно настоящему изобретению или их соли получают с помощью множества методик, известных специалистам в данной области техники, некоторые из которых представлены ниже на схемах, в способах получения и примерах. Продукты каждой стадии на приведенных ниже схемах можно выделять традиционными способами, хорошо известными в данной области техники, включая экстракцию, упаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. На следующих схемах заместители, если не указано иное, являются такими, как определено ранее. Реагенты и исходные вещества общедоступны специалистам в данной области техники. Не ограничивая объем изобретения, следующие схемы, способы получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации изобретения. Дополнительно специалисту в данной области техники понятно, что соединение формулы I может быть получено с применением исходного материала или промежуточного соединения с соответствующей необходимой стереохимической конфигурацией, которое может быть получено специалистом в данной области техники.

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



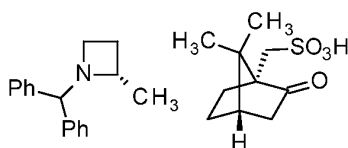
На схеме показано общее получение соединений формулы I. На стадии 1 3-циано-2,6-дихлор-4-(трифторметил)пиридин (1) и циклический амин (2) взаимодействуют в присутствии основания, такого как NaHCO_3 или DIPEA, в EtOH или MeOH с образованием аминопиридина (3). В качестве альтернативы реакционным растворителем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

Получение и примеры.

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

ЖХ-ИЭР/МС проводили на системе для жидкостной хроматографии AGILENT® HP1100. Измерения масс-спектрометрии с электрораспылением (записанные в положительном и/или отрицательном режиме) проводили на квадрупольном масс-спектрометре с масс-селективным детектором, подключенном к системе ВЭЖХ, которая может быть оснащена ELSD или нет. Условия ЖХ-МС (низкое значение pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,0×50 мм 3,0 мкм, 110 Å; градиент: 5-95% В в течение 1,5 мин, а затем 95% В в течение 0,5 мин; температура колонки: $50 \pm 10^\circ\text{C}$; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем впрыска 1 мкл; растворитель А: деионизированная вода с 0,1% HCOOH; растворитель В: ACN с 0,1% муравьиной кислоты; длина волны 200-400 нм и 212-216 нм. Если ВЭЖХ оснащена ELSD, настройки являются следующими: температура испарителя 45°C , температура распылителя 40°C и расход газа 1,6 ст.л/мин. Альтернативные условия ЖХ-МС (высокий pH): колонка: колонка Waters xBridge® C18 2,1×50 мм, 3,5 мкм; градиент: 5-95% В за 1,5 мин, затем 95% В за 0,50 мин; температура колонки: $50 \pm 10^\circ\text{C}$; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем впрыска 1 мкл; растворитель А: 10 mM NH_4HCO_3 , pH 9; растворитель В: ACN; длина волны: 200-400 нм и 212-216 нм; при наличии ELSD: температура испарителя 45°C , температура распылителя 40°C и расход газа 1,60 ст.л/мин.

Получение 1. Соль (2S)-1-бензгидрил-2-метилазетидин[(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксонорборнан-1-ил]метансульфоновой кислоты

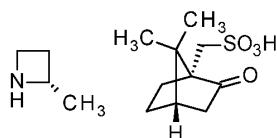


Трехгорлую круглодонную колбу на 2000 мл соединяли с капельной воронкой, впускным отверстием для азота и переходником для термометра. Сосуд продували азотом и добавляли (3R)-бутан-1,3-диол (25 г, 277,4 ммоль), DIPEA (127 мл, 731 ммоль) и ACN (556 мл). Остужали до -30°C . Добавляли ангидрид трифторметансульфоновой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

мин при температуре от -35 до -30°C . Добавляли ангидрид трифторметансульфоновой кислоты (1,9 мл, 11 ммоль) по каплям в течение 5 мин так, чтобы внутренняя температура поддерживалась от -35 до -30°C . После завершения добавления перемешивали в течение 10 мин при температуре от -35 до -30°C . Добавляли DIPEA (127 мл, 731 ммоль) по каплям в течение 15 мин так, чтобы внутренняя температура поддерживалась от -35 до -30°C . После завершения добавления перемешивали в течение 10 мин при температуре от -35 до -30°C . В отдельной колбе в атмосфере азота растворяли аминодифенилметан (48,0 мл, 270 ммоль) в ACN (49 мл, 935 ммоль), и полученный раствор переносили в капельную воронку. Раствор амина по каплям добавляли к холодному трифлату в течение 40 мин, чтобы внутренняя температура поддерживалась в пределах от -20 до -35°C . После завершения добавления перемешивали в течение 30 мин при температуре от -35 до -30°C . Реакционную смесь переносили на водяную баню и позволяли ей медленно нагреться в течение 30 мин. Баню убрали и позволяли реакционной смеси нагреться до комнатной температуры в течение 30 мин. Сосуд переносили в колбонагреватель и реакционную смесь нагревали до 45°C в течение 30 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь выливали в 1200 мл воды и экстрагировали толуолом (400 мл \times 3). Экстракты объединяли, промывали водой, насыщ. водн. раствором NaCl, сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Материал сушили под вакуумом в течение ночи. Остаток растворяли в ДХМ (400 мл). Готовили подушку из диоксида кремния на воронке со спеченным слоем и уравнивали ее смесью гептан/EtOAc 1:1. Загружали раствор продукта на подушку из диоксида кремния и промывали с применением 1600 мл смеси гептан/EtOAc 1:1. Фильтрат концентрировали для получения красного масла. Масло растворяли в MeOH (250 мл) и колбу помещали на водяную баню ($\sim 10^{\circ}\text{C}$). Частями добавляли L(-)-камфорсульфоновую кислоту (61,6 г, 265 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 20°C . Полученную смесь перемешивали в течение 15 мин, и затем концентрировали на роторном испарителе до получения коричневой пены. Пену сушили на вакуумном насосе в течение 2 ч. Пену растворяли в 130 мл ДХМ. Капельную воронку присоединяли к колбе. С помощью воронки медленно добавляли 1100 мл EtOAc к перемешиваемому раствору. Полученную смесь переносили в химический стакан на 4000 мл и перемешивали на воздухе в течение ночи. Стакан охлаждали на ледяной бане в течение 10 мин. Осадок собирали в воронку со спеченным слоем вакуумной фильтрацией, промывая минимальным количеством ледяного EtOAc. Твердое вещество сушили на спеченном слое в течение 2 ч. Полученное белое твердое вещество растворяли в минимальном количестве ДХМ, переносили в химический стакан на 2000 мл и затем медленно разбавляли посредством EtOAc, пока прозрачный раствор не становился мутным. Суспензию перемешивали в течение 4 ч на открытом воздухе. Твердые вещества собирали фильтрованием под вакуумом с применением воронки со спеченным слоем и сушили на спеченном слое в течение ночи с получением указанного в заголовке соединения (111,8 г, 238,06 ммоль, выход 86%) в виде белого твердого вещества.

^1H ЯМР (400 МГц, (d_6 -DMCO): 10,54-10,47 (m, 1H), 7,61 (d, $J=7,3$ Гц, 5H), 7,47-7,37 (m, 7H), 5,85 (d, $J=10,3$ Гц, 1H), 4,68-4,61 (m, 1H), 3,91-3,83 (m, 2H), 3,37 (s, 8H), 2,99 (d, $J=14,6$ Гц, 1H), 2,77-2,68 (m, 1H), 2,51-2,44 (m, 4H), 2,30-2,16 (m, 2H), 1,91-1,81 (m, 2H), 1,42-1,28 (m, 3H), 1,08 (s, 3H), 1,01 (d, $J=6,6$ Гц, 3H), 0,77 (s, 4H); >98% ee [ВЭЖХ: Chiralcel OJ (10 см \times 4,6 мм, 5 мкм), 5 мл/мин, 40°C изократический 10% EtOH (0,2% PrNH $_2$)/CO $_2$].

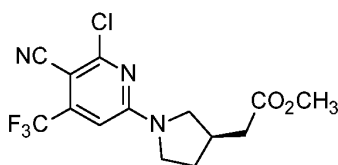
Получение 2. Соль [(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксонорборнан-1-ил]метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия



В сосуд Парра объемом 2250 мл добавляли 20 мас.% Pd(OH) $_2$ на угле (6,62 г). Бутыль продували азотом и добавляли 250 мл MeOH. К полученной суспензии медленно добавляли соль (2S)-1-бензгидрил-2-метилазетидин[(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксонорборнан-1-ил]метансульфоновой кислоты (111 г, 236 ммоль), растворенную в 250 мл MeOH. Сосуд закупоривали. Продували азотом, затем водородом и повышали давление до 60 PSI. Энергично встряхивали реакционный сосуд в смесительном аппарате Парра в течение 15 ч при комнатной температуре. Сосуд продували азотом и затем фильтровали реакционную смесь через слой целита, промывая MeOH. Фильтрат концентрировали с получением белого твердого вещества и сушили под вакуумом. Твердое вещество суспендировали в 780 мл смеси MTBE/EtOAc 1:1, смесь нагревали до 65°C в течение 20 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Твердые вещества собирали посредством фильтрации. Твердые вещества суспендировали в 380 мл MTBE и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Белое твердое вещество собирали посредством фильтрации с получением указанного в заголовке соединения (41,5 г, 136,78 ммоль, выход 58%).

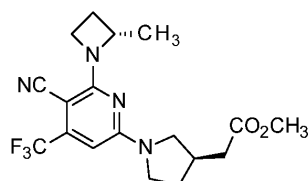
^1H ЯМР (400 МГц, d_6 -DMCO): 8,68-8,55 (m, 1H), 4,51-4,42 (m, 1H), 3,91-3,75 (m, 1H), 3,36 (s, 3H), 2,91 (d, $J=14,6$ Гц, 1H), 2,69-2,61 (m, 1H), 2,52-2,46 (m, 2H), 2,28-2,22 (m, 1H), 2,17-2,10 (m, 1H), 1,96 (t, $J=4,5$ Гц, 1H), 1,89-1,79 (m, 1H), 1,43 (d, $J=6,7$ Гц, 2H), 1,36-1,26 (m, 1H), 1,05 (s,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

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



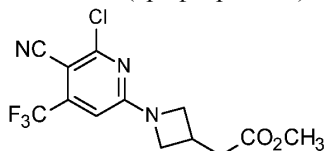
В круглодонную колбу добавляли 3-циано-2,6-дихлор-4-(трифторметил)пиридин (123 ммоль, 29,6 г) и EtOH (230 мл). Смесь охлаждали до 0°C. Добавляли NaHCO₃ (368 ммоль, 31 г), после которого добавляли раствор гидрохлорида метил (R)-пирролидин-3-ацетата (23 г, 123 ммоль) в EtOH (230 мл). Полученной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры в течение ночи. Реакционную смесь упаривали досуха на роторном испарителе. Добавляли воду (200 мл) и экстрагировали посредством МТВЕ (2×200 мл). Экстракты объединяли и упаривали досуха. Очищали хроматографией на силикагеле с применением гексана/МТВЕ (градиент от 20 до 70%), с получением указанного в заголовке соединения (34,7 г, 99,89 ммоль, выход 81%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 348,0, 350,0 [M+H]⁺.

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



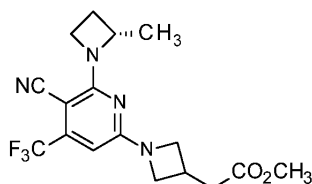
В круглодонную колбу добавляли метил 2-[(3R)-1-[6-хлор-5-циано-4-(трифторметил)-2-пиридил]пирролидин-3-ил]ацетат (25,5 г, 73,3 ммоль), соль [(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксонорборнан-1-ил]метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия (88,0 ммоль, 26,7 г), MeOH (255 мл), и NaHCO₃ (220 ммоль, 18,5 г). Смесь перемешивали при 65°C в течение 16 ч. Добавляли соль [(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксонорборнан-1-ил]метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия (22,0 ммоль, 6,68 г) и NaHCO₃ (147 ммоль, 12,3 г), продолжали перемешивание в течение 32 ч. Растворитель удаляли на роторном испарителе. К остатку добавляли воду (300 мл) и экстрагировали посредством МТВЕ (2×200 мл). Экстракты объединяли и сушили над безводным MgSO₄, фильтровали через силикагель и концентрировали досуха с получением указанного в заголовке соединения (28,0 г, 73,2 ммоль, выход 99%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 383,2 [M+H]⁺.

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



К раствору 3-циано-2,6-дихлор-4-(трифторметил)пиридина (500 мг, 2,03 ммоль) в EtOH (15 мл) добавляли NaHCO₃ (0,549 г, 6,51 ммоль) и соль метил 2-(азетидин-3-ил)ацетат трифторуксусной кислоты (0,494 г, 2,03 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли насыщенным водным раствором NaCl (30 мл). Смесь экстрагировали посредством EtOAc (20 мл ×3). Экстракты объединяли и промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, проводя элюирование посредством EtOAc в петролейном эфире (градиент 0-30%), с получением указанного в заголовке соединения (470 мг, 1,41 ммоль, выход 66%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z) = 333,9 [M+H]⁺.

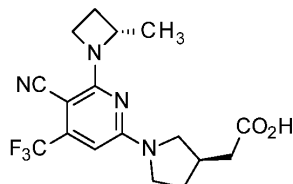
Получение 6. Метил 2-[1-[5-циано-6-[(2S)-2-метилазетидин-1-ил]-4-(трифторметил)-2-пиридил]азетидин-3-ил]ацетат



К раствору метил 2-[1-[6-хлор-5-циано-4-(трифторметил)-2-пиридил]азетидин-3-ил]ацетата (200 мг, 0,569 ммоль) в EtOH (6 мл) добавляли NaHCO₃ (0,173 г, 2,05 ммоль) и соль [(1R,4S)-7,7-диметил-2-оксонорборнан-1-ил]метансульфонат (2S)-2-метилазетидин-1-ия (0,194 г, 0,626 ммоль). Смесь нагревали до 80°C в течение 16 ч. Смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (40 мл ×3). Экстракты объ-

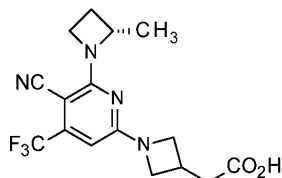
единяли и промывали насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-10%, EtOAc в петролейном эфире) с получением указанного в заголовке соединения (176 мг, 0,46 ммоль, выход 77%) в форме белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 383,1 [M+H]⁺.

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



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

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



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

Методы анализа.

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

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

Анализ RapidFire MS для количественного определения F1P.

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

Растворитель А, применяемый для загрузки и промывки образца, представляет собой 6 мМ октил-амин (Acros Organics 129495000), доведенный до pH 5,0 с помощью уксусной кислоты. Растворитель В, применяемый для элюирования образца, представляет собой 20% воды в ACN, содержащем 0,1% муравьиной кислоты. Образцы последовательно анализировали посредством отбора 10 мкл на заборную петлю под вакуумом непосредственно из многолуночных планшетов. 10 мкл образца загружали в кар-

тридж C18 и промывали с применением растворителя А при скорости потока 1,25 мл/мин в течение 5000 мс. Удерживаемый аналит элюировали в масс-спектрометр с применением растворителя В при скорости потока 1,25 мл/мин в течение 5000 мс. Систему повторно уравнивали с применением растворителя А при скорости потока 1,25 мл/мин в течение 2000 мс.

Трехквadrупольный масс-спектрометр оснащен источником ИЭР, и аналиты контролировали с помощью мониторинга выбранной реакции (SRM) в отрицательном режиме [М-Н]. F1P контролировали при m/z 259,02/96,9, и $^{13}\text{C}_6$ -фруктоза-6-фосфат контролировали при m/z 264,99/97. Значения отношения площадей для F1P рассчитывали с применением $^{13}\text{C}_6$ -фруктоза-6-фосфата в качестве внутреннего стандарта.

Соединения примеров 1 и 2 тестировали, как описано выше.

Таблица 1

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

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

Анализ клеточной активности КНК.

Эффективность можно измерить с помощью клеточного анализа ингибирования превращения фруктозы в F1P клеточной КНК. Клетки HepG2 высевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток в среде для выращивания [среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, 10% инактивированная нагреванием фетальная бычья сыворотка (Ш ФБС), 1× пенициллин/стрептомицин] и оставляли для прикрепления в течение ночи в инкубаторе при 37°C. Среду для выращивания промывали и заменяли аналитической средой, состоящей из среды Gibco OptiMEM 1 с пониженным содержанием сыворотки, 0,1% казеина, 8,33 мМ D-фруктозы- $^{13}\text{C}_6$ и соединения в концентрациях от 100 до 0,0051 мкМ (10-точечная кривая концентрации). Планшеты инкубировали при 37°C в течение 3 ч, после чего среду для анализа откачивали из лунок для клеток. Затем к клеткам добавляли останавливающий раствор, состоящий из 80% метанола, 2 мМ ацетата аммония и 50 нг/мл фруктозо-6-фосфата- $^{13}\text{C}_6$. Планшеты хранили при -20°C до анализа RapidFire MS (описанного выше).

Соединения примеров 1 и 2 тестировали, как описано выше.

Таблица 2

Номер примера	HepG2 IC ₅₀
1	127
2	316

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

Жидкостной хроматографический метод с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) для проведения фармакокинетических анализов. Образцы экстрагировали с помощью осаждения белка путем добавления 180 мкл MeOH:ACN (1:1, об./об.), содержащего внутренний стандарт, и 25 мкл (образцы грызунов) или 50 мкл (образцы не грызунов) плазмы. Затем образцы разбавляли смесью MeOH:вода (1:1, об./об.) для получения концентраций в пределах диапазона стандартной кривой. Разбавленные образцы анализировали с помощью ЖХ-МС/МС с применением тройного квадрупольного масс-спектрометра Sciex API 4000 (Applied Biosystems/MDS; Foster City, CA), оборудованного интерфейсом TurboIonSpray и работающего в режиме положительных ионов. Анализируемые вещества разделяли хроматографически с применением колонки Javelin Thermo Betasil C18 5 мкм 20×2,1 мм (образцы грызунов) или колонки Advantage ECHOLON C18 4 мкм 20 мм×2,1 мм (образцы не грызунов). Условия ЖХ представляли собой следующие: вода/1М бикарбонат аммония (2000:10, об./об.) (подвижная фаза А) и MeOH/1М бикарбонат аммония, (2000:10, об./об.) (подвижная фаза В).

Фармакокинетика у мышей.

Фармакокинетические свойства *in vivo* и участие переносчика OATP1A/1B в фармакокинетике в примере 1 продемонстрированы на мышцах FVB дикого типа и мышцах с выключенным геном OATP1A/1B (Taconic # 10707) (натошак; n = 4/генотип). Пример 1 вводили однократно внутривенно (IV; 1 мг/кг; объем 1 мл/кг) в носителе. Кровь собирали у каждого животного через 0, 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после введения дозы. Печень, селезенку и поджелудочную железу собирали, взвешивали и перфузировали через 24 ч после введения дозы. Концентрации в плазме и ткани примера 1 определяли способом ЖХ-МС/МС, как описано выше.

У мышей FVB пример 1 имел период полураспада 5,43 ч, средний клиренс 6,91 мл/ч/кг, объем распределения 2,74 л/кг, со средним коэффициентом распределения несвязанной формы в печени ($K_{руш}$)

67,5. У мышей с выключенным геном OATP1A/1B пример 1 имеет период полувыведения 9,36 ч, средний клиренс 1,34 мл/ч/кг, объем распределения 0,986 л/кг, со средним коэффициентом распределения несвязанной формы в печени ($K_{руи}$) 24,2. Эти данные показывают, что OATP участвует в захвате печеную соединения примера 1 у мышей и что участие этого переносчика влияет на клиренс.

Фармакокинетика у собак.

Фармакокинетические свойства примера 1 *in vivo* продемонстрированы на собаках породы бигль (после кормления, $n=3-4$). Пример 1 вводили однократно перорально (PO; 3 мг/кг; объем 2 мл/кг) или внутривенно (IV; 1 мг/кг; объем 1 мл/кг) в носителя. Кровь отбирали у каждого животного при 0, 0,03 (только IV группа), 0,08 (IV), 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32 (IV), 48 (IV) и 72 (IV) ч после введения дозы. Концентрации в плазме для примера 1 определяли методом ЖХ-МС/МС, как описано выше.

Для пероральных доз средний период полувыведения из примера 1 составлял 6,9 ч, и биодоступность составляла ~93%. Для внутривенных доз средний период полувыведения примера 1 составлял 7,4 ч, и средний клиренс составлял 2,52 мл/ч/кг при низком объеме распределения (1,33 л/кг). Эти данные показывают, что пример 1 имеет низкий общий клиренс, низкий объем распределения и высокую биодоступность при пероральном введении собакам.

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

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

Фармакокинетика у яванских макак.

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

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

Внутренний клиренс в гепатоцитах человека (\pm АВТ).

Данный способ предназначен для определения метаболического клиренса *in vitro* по истощению субстрата в гепатоцитах. Инкубирование в присутствии и в отсутствие АВТ, ингибитора фермента рар-СУР450, применяли для оценки роли в метаболизме, опосредованном СУР. Криоконсервированные гепатоциты человека размораживали при 37°C, центрифугировали и восстанавливали в поддерживающей среде для гепатоцитов до плотности 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В предварительно нагретый 96-луночный планшет добавляли 196 мкл суспензии гепатоцитов в каждую лунку. Клетки предварительно инкубировали с АВТ и без него следующим образом: для предварительного инкубирования с АВТ добавляли 2 мкл 100 мМ раствора АВТ (2 мкл среды без АВТ добавляли к контрольным образцам), и планшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин при постоянном встряхивании (~600 об/мин). После этого добавляли 2 мкл 30 мМ исходного раствора исследуемого вещества, и через 0, 15, 30, 60, 120, 240 мин отбирали аликвоты по 20 мкл и гасили путем переноса в АСН, содержащий внутренний стандарт. После центрифугирования при 4000 об/мин в течение 30 мин концентрацию супернатанта определяли с помощью ЖХ-МС/МС. Клиренс рассчитывали по наклону % оставшегося соединения с течением времени.

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

Ингибирование OATP1B1 и OATP1B3.

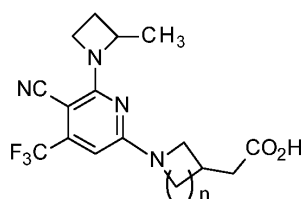
Клетки OATP1B1, OATP1B3 и векторный контроль (VC) выращивали в 5% CO₂ при 37°C во влажной атмосфере в среде DMEM с добавлением 10% ФБС, 50 мкг/мл гентамицина и 5 мкг/мл бластицидина. Клетки высевали в 24-луночные планшеты BioCoat Poly-D-Lysine. Клетки обрабатывали 5 мМ бутирата натрия в среде DMEM с добавками за 24 ч до эксперимента. Клеточные культуры дважды промывали предварительно нагретым ФБР перед экспериментом. После отмывки все типы клеток инкубировали в течение 30 мин при 37°C в 200 мкл буфера, буфера с изменяющейся концентрацией тестируемого вещества или с подходящим ингибитором положительного контроля. На основе предварительных данных тестировали концентрации от 0,025 до 12,5 мкМ для OATP1B1 и от 0,20 до 100 мкМ для OATP1B3 (но-

минальные). В начале предварительного инкубирования удаляли 50 мкл буфера для определения концентраций исследуемых веществ в лунках с помощью ЖХ-МС/МС. По истечении прединкубационного периода буфер удаляли. Эксперименты начинали с добавления 200 мкл раствора субстрата (всего 400 нМ розувастатина, включая 1,4 нМ меченного тритием розувастатина). Инкубирование проводили с ингибитором и без него. Ингибитор положительного контроля, применяемый для каждой клеточной линии, представлял собой 50 мкМ рифамицина SV. Эксперименты проводили в течение 1 мин при 37°C, при которой реакцию останавливали, и промывали добавлением 1000 мкл ледяного ФБР на лунку. Затем содержимое каждой лунки откачивали и их дважды промывали ледяным ФБР. Клетки в каждой лунке лизировали в 400 мкл 1% Triton X 100 в ФБР (по объему). Образцы отбирали из каждой лунки из планшетов для подсчета радиоактивности, и концентрацию белка в каждой лунке определяли методом с бичинхоиновой кислотой. Значения IC_{50} определяли путем подбора данных с помощью GraphPad Prism. Перед установкой номинальные концентрации преобразовали в измеренные.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



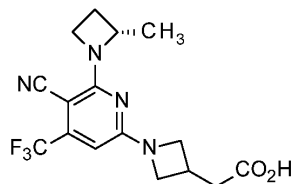
Формула I,

где n составляет 1 или 2;

или его фармацевтически приемлемая соль.

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

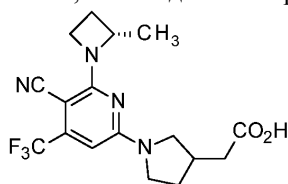
3. Соединение по п.2, отличающееся тем, что соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

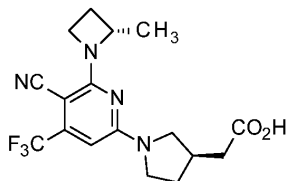
4. Соединение по п.1, отличающееся тем, что n составляет 2, или его фармацевтически приемлемая соль.

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



или его фармацевтически приемлемая соль.

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



или его фармацевтически приемлемая соль.

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

8. Способ лечения сердечной недостаточности у пациента, включающий введение пациенту, нуж-

дающемуся в таком лечении, эффективного количества соединения по любому из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемой соли.

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

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

11. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения диабета 2 типа.

12. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения сердечной недостаточности.

13. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения диабетической болезни почек.

14. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-6 для лечения неалкогольного стеатогепатита.

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

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

