

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 042914

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.04.04

(21) Номер заявки  
202092490

(22) Дата подачи заявки  
2019.04.17

(51) Int. Cl. C07D 405/14 (2006.01)  
C07D 405/12 (2006.01)  
A61K 31/44 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

## (54) МОДУЛЯТОРЫ МЕТИЛМОДИФИЦИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ, КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/659,408

(32) 2018.04.18

(33) US

(43) 2020.12.23

(86) PCT/US2019/027932

(87) WO 2019/204490 2019.10.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
КОНСТЕЛЛЕЙШЕН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Коте Александре, Гелинг Виктор С.,  
Кханна Авинаш, Моине Лудивине,  
Стаки Джейкоб И. (US)

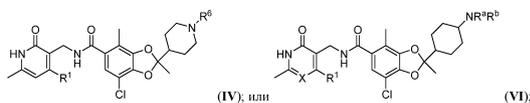
(74) Представитель:  
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,  
Лыу Т.Н., Строкова О.В., Гизатуллин  
Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,  
Христофоров А.А., Джермакян Р.В.,  
Парамонова К.В. (RU)

(56) US-A1-2017073335

PRIYANKA L GAIKWAD ET AL.: "The Use of Bioisosterism in Drug Design and Molecular Modification", AMERICAN JOURNAL OF PHARMTECH RESEARCH AM. J. PHARMTECH RES, vol. 2, no. 4, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 1-23, XP055567975, page 9; table 7

VENKATESAN N.: "BIOISOTERISM REVIEW- AN BIOLOGICAL MODIFICATION", WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 1918-1949, XP055603429, DOI: 10.20959/wjpps20179-10126, page 1921, classification of bioisosteres

(57) Предложены новые соединения формулы



и их фармацевтически приемлемые соли, которые являются пригодными для лечения множества заболеваний, расстройств или состояний, связанных с метилмодифицирующими ферментами. Также представлены фармацевтические композиции, содержащие данные новые соединения формулы (IV) и (VI), их фармацевтически приемлемые соли, и применения для лечения рака.

042914 B1

042914 B1

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке заявлен приоритет предварительной заявки США № 62/659408, поданной 18 апреля 2018, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

### Уровень техники

Эукариотический хроматин состоит из макромолекулярных комплексов, называемых нуклеосомами. Нуклеосома имеет 147 пар оснований ДНК, обернутых вокруг октамера белка, содержащего по две субъединицы каждого из белков гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Белки гистоны подвержены посттрансляционным модификациям, которые, в свою очередь, влияют на структуру хроматина и экспрессию генов. Одним из типов посттрансляционной модификации гистонов является метилирование остатков лизина и аргинина. Метилирование гистонов играет решающую роль в регуляции экспрессии генов у эукариот. Метилирование влияет на структуру хроматина и связано как с активацией, так и с подавлением транскрипции (Zhang and Reinberg, *Genes Dev.* 15: 2343-2360, 2001). Ферменты, которые катализируют прикрепление и удаление метальных групп из гистонов, участвуют в подавлении генов, эмбриональном развитии, пролиферации клеток и других процессах.

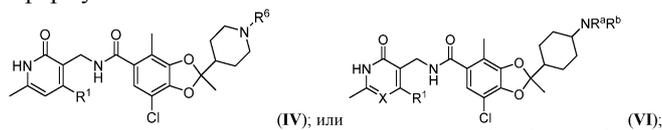
Один класс гистоновых метилаз характеризуется наличием домена SET, содержащего около 130 аминокислот. EZH2 является примером метилазы человека, содержащей SET-домен. EZH2 ассоциируется с EED (развитие эмбриональной эктодермы) и SUZ12 (подавитель гомолога zeste 12) с образованием комплекса, известного как PRC2 (Polycomb Group Repressive Complex 2), обладающего способностью триметилировать гистон H3 по лизину 27 (Cao and Zhang, *Mol. Cell* 15: 57-67, 2004). Комплексы PRC2 могут также включать субъединицы RbAp46 и RbAp48. Другой пример представляет собой родственную метилазу EZH1.

Онкогенная активность EZH2 была показана в ряде исследований на различных типах рака. ~15-20% GCB-ДВККЛ несут мутацию увеличения функции в EZH2 (остаток Y641), и данные клетки являются гиперчувствительными к ингибированию EZH2 как *in vitro*, так и *in vivo* (McCabe et al., 2012; Bradley et al., 2014). В экспериментах с клеточными линиями сверхэкспрессия EZH2 вызывает инвазию клеток, рост в мягком агаре и подвижность, в то время как нокдаун EZH2 ингибирует пролиферацию клеток и клеточную инвазию (Kleer et al., 2003, *Nat. Acad. Sci. USA* 100: 11606-11611; Varambally et al., (2002), "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer," *Nature* 419, 624-629). Было показано, что EZH2 подавляет экспрессию нескольких опухолевых супрессоров, включая E-cadherin, DAB2IP и RUNX3 среди других. В моделях ксенотрансплантатов нокдаун EZH2 подавляет рост опухоли и метастазирование. Было показано, что подавляющая модуляция EZH2 на мышинных моделях блокирует метастазирование рака простаты (Min et al., "An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor - kappaB," *Nat Med.* 2010 Mar; 16(3):286-94). Недавно было продемонстрировано, что EZH2 сверхэкспрессируется в нейроэндокринных опухолях, а ингибирование EZH2 в опухолях мышей восстанавливает андрогенную зависимость (Ku et al, *Science*, 355, 2017). Сверхэкспрессия EZH2 связана с агрессивностью некоторых видов рака, таких как рак груди (Kleer et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100: 11606-11611, 2003). Недавние исследования также предполагают, что специфический для рака предстательной железы онкогенный гибридный ген TMPRSS2-ERG индуцирует репрессивные эпигенетические программы посредством прямой активации EZH2 (Yu et al., "An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression," *Cancer Cell.* 2010 May 18;17(5):443-454).

Учитывая их роль в регулировании разнообразных биологических процессов, метилмодифицирующие ферменты, в частности EZH2 и его мутантные формы, являются привлекательными мишенями для модуляции.

### Сущность изобретения

Было обнаружено, что соединения описанные в данном документе, и их фармацевтически приемлемые композиции модулируют активность EZH2 (см., например, табл. 5). Такие соединения включают соединения структурных формул



или их фармацевтически приемлемые соли, где каждый из  $R^1$ ,  $R^6$ ,  $R^a$ ,  $R^b$  и X определен в данном документе.

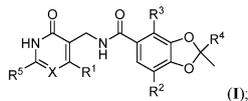
В одном аспекте также было обнаружено, что определенные соединения, описанные в данном документе, имеют увеличенное время удержания (например, >100 ч) и повышенную проницаемость. Было обнаружено, что увеличение времени удержания (т.е. более медленная скорость вывода) и/или проницаемости коррелирует с улучшенной клеточной активностью.

Описанные соединения, фармацевтически приемлемые соли и фармацевтически приемлемые композиции являются пригодными для лечения множества состояний, связанных с метилмодифицирующими ферментами. Данные состояния включают, например, один или несколько видов рака.

## Подробное описание сущности изобретения

### 1. Общее описание соединений

Предложены соединения формулы I



или их фармацевтически приемлемые соли, где

$R^1$  представляет собой галоген,  $-S(C_1-C_4)$ алкил,  $-S(C_3-C_7)$ циклоалкил или  $-S[\text{галоген}(C_1-C_4)\text{алкил}]$ ;

X представляет собой CH или N;

$R^2$  представляет собой водород, галоген,  $(C_1-C_4)$ алкил или галоген $(C_1-C_4)$ алкил;

$R^3$  представляет собой галоген,  $(C_1-C_4)$ алкил или галоген $(C_1-C_4)$ алкил;

$R^4$  представляет собой  $(C_3-C_7)$ циклоалкил или 4-7-членный гетероцикл, каждый из которых обязательно замещен 1-3 группами, выбранными из галогена,  $(C_1-C_4)$ алкила, галоген $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_1-C_4)$ алкокси, галоген $(C_1-C_4)$ алкокси и  $-NR^aR^b$ ;

$R^2$  представляет собой водород,  $(C_1-C_4)$ алкил или галоген $(C_1-C_4)$ алкил;

$R^b$  представляет собой  $(C_1-C_4)$ алкил, галоген $(C_1-C_4)$ алкил или 4-7-членный гетероцикл, где указанный гетероцикл необязательно замещен 1-3 группами, выбранными из галогена,  $(C_1-C_4)$ алкила, галоген $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_1-C_4)$ алкокси и галоген $(C_1-C_4)$ алкокси; или

$R^a$  и  $R^b$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-7-членный гетероцикл, необязательно замещенный 1-3 группами, выбранными из галогена,  $(C_1-C_4)$ алкила, галоген $(C_1-C_4)$ алкила и  $-OR^c$ ;

$R^c$  представляет собой  $(C_1-C_4)$ алкил, галоген $(C_1-C_4)$ алкил или  $(C_3-C_7)$ циклоалкил и

$R^5$  представляет собой галоген,  $(C_1-C_4)$ алкил или галоген $(C_1-C_4)$ алкил.

### 2. Определения

При использовании в связи с описанием химической группы, которая может иметь несколько точек присоединения, дефис (-) обозначает точку присоединения данной группы к переменной, для которой она определена. Например,  $-S(C_3-C_7)$ циклоалкил и  $-S[\text{галоген}(C_1-C_4)\text{алкил}]$  означают, что точка присоединения данной группы находится на атоме серы.

Как используется в данном документе, термины "галоген" и "атом галогена" относятся к атому, выбранному из фтора (фтор, -F), хлора (хлор, -Cl), брома (бром, -Br) и йода (йод, -I).

Как используется в данном документе, термин "алкил" относится к одновалентному насыщенному углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, имеющему, если не указано иное, 1-10 атомов углерода. Примеры алкильных радикалов включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, втор-пентил, изопентил, трет-бутил, н-пентил, неопентил, н-гексил, втор-гексил и тому подобное.

Термин "галогеналкил" включает моно, поли и пергалогеналкильные группы, где галогены независимо выбраны из фтора, хлора, брома и йода.

"Алкокси" представляет собой алкильную группу, которая присоединена к другому фрагменту через кислородный линкер ( $-O(\text{алкил})$ ). Ее неограничивающие примеры включают метокси, этокси, пропокси и бутокси.

"Галогеналкокси" представляет собой галогеналкильную группу, которая присоединена к другому фрагменту через атом кислорода, например, но не ограничиваясь этим,  $-OCH_2CF_2$  или  $-OCF_3$ .

Термин "циклоалкил" относится к 3-12-членной (например, 3-7-членной) моноциклической, бициклической (например, мостиковое или спиробициклическое кольцо) или полициклической (например, трициклическая) углеводородной кольцевой системе, которая является полностью насыщенной. Моноциклические циклоалкильные группы включают, без ограничения, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил. Мостиковые бициклические циклоалкильные группы включают, без ограничения, бицикло[3.2.1]октан, бицикло[2.2.1]гептан, бицикло[3.1.0]гексан, бицикло[1.1.1]пентан и тому подобное. Спиробициклические циклоалкильные группы включают, например, спиро[3.6]декан, спиро[4.5]декан и тому подобное. Конденсированные циклоалкильные кольца включают, например, декагидронафталин, октагидропентален и тому подобное. Если указано, что они необязательно замещенные или замещенные, заместители в циклоалкиле (например, в случае необязательно замещенного циклоалкила) могут присутствовать в любом замещаемом положении и включают, например, положение, к которому присоединена циклоалкильная группа.

Термин "гетероцикл" означает 3-12-членное (например, 4-, 5-, 6- и 7-членное) насыщенное или частично ненасыщенное гетероциклическое кольцо, содержащее от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S. Оно может быть моноциклическим, бициклическим (например, мостиковое, конденсированное или спиробициклическое кольцо) или трициклическим. Термины "гетероцикл", "гетероциклическое кольцо", "гетероциклическая группа", "гетероциклический фрагмент" и "гетероциклический радикал" используются в данном документе взаимозаменяемо. Гетероциклическое кольцо может быть присоединено к своей боковой группе у любого гетероатома или атома углерода, что

приводит к стабильной структуре. Примеры таких насыщенных или частично ненасыщенных гетероциклических радикалов включают, без ограничения, тетрагидрофуранил, тетрагидротииенил, тетрагидропиранил, пирролидинил, пиридионил, пирролидонил, пиперидинил, оксазолидинил, пиперазинил, диоксанил, диоксоланил, морфолинил, дигидрофуранил, дигидропиранил, дигидропиридинил, тетрагидропиридинил, дигидропиримидинил, оксетанил, азетидинил и тетрагидропиримидинил. Гетероциклическая группа может быть моно- или бициклической. Термин "гетероциклил" также включает, например, ненасыщенные гетероциклические радикалы, конденсированные с другим ненасыщенным гетероциклическим радикалом или арильным или гетероарильным кольцом, такие как, например, тетрагидронафтиридин, индолинон, дигидропирролотриазол, имидазопиримидин, хинолинон, диоксапиродекан. Если указано, что они необязательно замещенные или замещенные, заместители в гетероциклиле (например, в случае необязательно замещенного гетероциклила) могут присутствовать в любом замещаемом положении и включают, например, положение, к которому присоединена гетероциклическая группа.

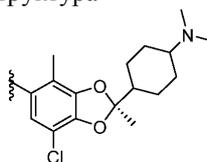
Термин "спиро" относится к двум кольцам, которые имеют один кольцевой атом (например, углерод).

Термин "конденсированный" относится к двум кольцам, которые имеют два соседних друг с другом кольцевых атома.

Термин "мостиковый" относится к двум кольцам, которые имеют три или более общих друг с другом кольцевых атома.

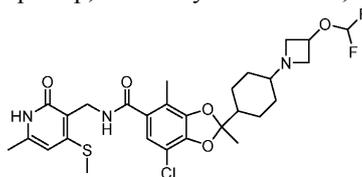
Как используется в данном документе, термин "геометрический изомер" относится к изомерам, которые различаются ориентацией атомов заместителей по отношению к циклоалкильному кольцу, т.е. цис- или транс-изомерам. Когда описанное соединение названо или изображено структурой без указания конкретной цис- или трансгеометрической изомерной формы, следует понимать, что название или структура охватывает один геометрический изомер, свободный от других геометрических изомеров, смеси геометрических изомеров или смеси, обогащенные одним геометрическим изомером относительно другого соответствующего геометрического изомера. Если не указано иное, когда стереохимия описанного соединения названа или изображена структурой, названный или изображенный стереоизомер является чистым по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9% по массе относительно всех других стереоизомеров. Когда один энантиомер назван или изображен структурой, изображенный или названный энантиомер является оптически чистым по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9% по массе. Процент оптической чистоты по массе представляет собой отношение массы энантиомера к сумме массы данного энантиомера и массы его оптического изомера. Энантиомеры могут быть разделены методами, известными специалистам в данной области техники, например, путем образования диастереоизомерных солей, которые можно разделить, например, кристаллизацией; образования диастереоизомерных производных или комплексов, которые можно разделить, например, кристаллизацией, сверхкритической жидкостной хроматографией или жидкостной хроматографией; селективной реакции одного энантиомера с энантиомер-специфическим реагентом, например ферментативной этерификации; или сверхкритической флюидной или жидкостной хроматографией в хиральной среде, например, на хиральном носителе, например диоксиде кремния со связанным хиральным лигандом, или в присутствии хирального растворителя. Конкретные энантиомеры также могут быть синтезированы путем асимметричного синтеза с использованием оптически активных реагентов, субстратов, катализаторов или растворителей или путем преобразования одного энантиомера в другой путем асимметричного превращения. Если не указано иное, когда описанное соединение названо или изображено структурой без указания стереохимии, и соединение имеет по крайней мере один хиральный центр или по крайней мере один геометрический изомер, или оба, название или структура охватывает один энантиомер или геометрический изомер соединения, не содержащий соответствующего оптического изомера или геометрического изомера, рацемическую смесь соединения и смеси, обогащенные одним энантиомером или геометрическим изомером относительно другого соответствующего оптического изомера или геометрического изомера.

Если не указано иное, когда только некоторые из стереохимических центров в описанном соединении названы или изображены структурой, названная или изображенная конфигурация является обогащенной относительно остальных конфигураций, например, молярным избытком не менее 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9%. Например, подструктура



означает, что конфигурация хирального углерода стереохимически обогащена как R (например, за счет молярного избытка не менее 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9%) и что геометрия циклогексила может быть цис- или транс- или их смесью. В некоторых случаях описанное соединение имеет структуру без указания стереохимии, но идентифицируется как стереохимически обогащенное (например, "одиночный энантиомер; одиночный геометрический изомер" или "одиночный энантиомер" в случаях, когда геомет-

рические изомеры невозможны). Например, если не указано иное,



Пример 1  
(единочный энантиомер, одиночный геометрический изомер)

означает, что конфигурация хирального диоксоланильного углерода стереохимически обогащена как R (например, за счет молярного избытка не менее 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9%) или стереохимически обогащена как S (например, за счет молярного избытка не менее 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9%) и что геометрическая конфигурация циклогексильного кольца обогащена как цис (например, за счет молярного избытка не менее 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9%) или обогащена как транс (например, за счет молярного избытка не менее 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 99,9%).

Как используется в данном документе, термин "пациент" означает животное, такое как млекопитающее, и такое как человек. Термины "субъект" и "пациент" могут использоваться взаимозаменяемо.

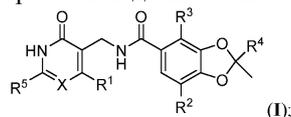
Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному носителю, адъюванту или несущей среде, который не нарушает фармакологическую активность соединения, с которым он составлен. Фармацевтически приемлемые носители, адъюванты или несущие среды, которые можно использовать в композициях, описанных в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, белки сыворотки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтиленполиоксипропилен, полиэтиленгликоль и шерстяной жир. Термины "лечение", "лечить" и "лечащий" относятся к устранению, облегчению или подавлению прогрессирования заболевания или расстройства или одного или нескольких их симптомов, как описано в данном документе. Лечение также можно продолжить после исчезновения симптомов, например, чтобы отсрочить рецидив. "Заболевание", "расстройство" и "состояние" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения, описанного в данном документе, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ у субъекта, например дозировка от 0,01 до 100 мг/кг массы тела/сутки. Термины "субъект" и "пациент" могут использоваться взаимозаменяемо и означают млекопитающее, нуждающееся в лечении, например домашние животные (например, собаки, кошки и тому подобное), сельскохозяйственные животные (например, коровы, свиньи, лошади, овцы, козы и тому подобное) и лабораторные животные (например, крысы, мыши, морские свинки и тому подобное). Как правило, субъектом является человек, нуждающийся в лечении. Термин "ингибировать", "ингибирование" или "ингибирующий" включает снижение базовой активности биологической активности или процесса. Соединения, описанные в данном документе, могут присутствовать в форме фармацевтически приемлемых солей. Для применения в лекарствах соли соединений, описанных в данном документе, относятся к нетоксичным "фармацевтически приемлемым солям". Формы фармацевтически приемлемых солей включают фармацевтически приемлемые кислотные/анионные или основные/катионные соли.

Пригодные фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты соединений, описанных в данном документе, включают, например, соли неорганических кислот (таких как соляная кислота, бромистоводородная, фосфорная, азотная и серная кислоты) и органических кислот (таких как уксусная кислота, бензолсульфоновая, бензойная, метансульфоновая и пара-толуолсульфоновая кислоты).

### 3. Описание соединений примеров

В первом варианте реализации изобретения в данном описании предложены соединения формулы I



(I);

или их фармацевтически приемлемые соли, где переменные являются такими же, как указано выше для формулы I.

Во втором варианте реализации изобретения в соединениях формулы I

R<sup>1</sup> представляет собой галоген или -S(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил;

R<sup>2</sup> представляет собой галоген;

R<sup>3</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил;

R<sup>4</sup> представляет собой (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)циклоалкил или (C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>)гетероцикл, каждый из которых обяза-

тельно замещен 1-2 группами, выбранными из галоген(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила и -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>;

R<sup>a</sup> представляет собой водород или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил;

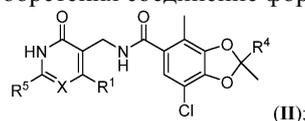
R<sup>b</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил или (C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>)гетероциклил, где указанный гетероциклил обязательно замещен галоген(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкилом; или

R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-7-членный азотсодержащий гетероциклил, необязательно замещенный 1-3 группами, выбранными из галогена и -OR<sup>c</sup>;

R<sup>c</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, галоген(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил или (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)циклоалкил и

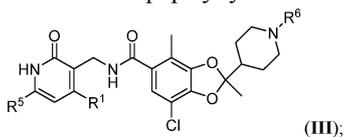
R<sup>5</sup> представляет собой галоген или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил.

В третьем варианте реализации изобретения соединение формулы I имеет формулу II



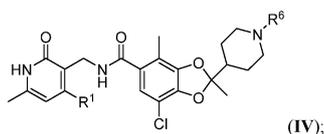
или его фармацевтически приемлемую соль, где остальные переменные являются такими, как описано выше для формулы I или второго варианта реализации изобретения. В четвертом варианте реализации изобретения R<sup>1</sup> в соединении формулы I или формулы II представляет собой хлор, где остальные переменные являются такими, как описано выше для формулы I или второго варианта реализации изобретения.

В пятом варианте реализации изобретения R<sup>1</sup> в соединении формулы I или формулы II представляет собой -SCH<sub>3</sub>, при этом остальные переменные являются такими, как описано выше для формулы I или второго варианта реализации изобретения. В шестом варианте реализации изобретения R<sup>4</sup> в соединении формулы I или формулы II представляет собой циклогексил или пиперидинил, каждый из которых необязательно замещен 1-2 группами, выбранными из галоген(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкила и -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, при этом остальные переменные являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого или пятого вариантов реализации изобретения. В седьмом варианте реализации изобретения соединение формулы I или формулы II имеет формулу III



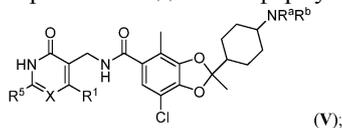
или его фармацевтически приемлемую соль, где R<sup>6</sup> представляет собой галоген(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил и где остальные переменные являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого или пятого вариантов реализации изобретения.

В восьмом варианте реализации изобретения соединение формулы I, формулы II или формулы III имеет формулу IV



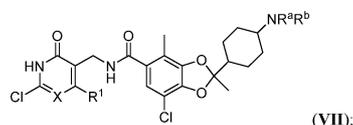
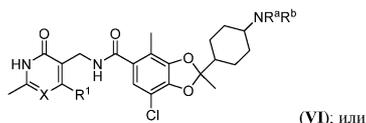
или его фармацевтически приемлемую соль, где остальные переменные являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого, пятого или седьмого вариантов реализации изобретения.

В девятом варианте реализации изобретения соединение формулы I или формулы II имеет формулу V



или его фармацевтически приемлемую соль, где остальные переменные являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого или пятого вариантов реализации изобретения.

В десятом варианте реализации изобретения соединение формулы I, формулы II или формулы V имеет формулу VI или VII



или его фармацевтически приемлемую соль, где остальные переменные и признаки являются таки-

ми, как описано выше для формулы I или второго, четвертого или пятого вариантов реализации изобретения.

В одиннадцатом варианте реализации изобретения  $R^b$  в соединениях формулы I, формулы II, формулы V, формулы VI и формулы VII представляет собой  $(C_1-C_4)$ алкил или оксетанил, где указанный оксетанил необязательно замещен галоген $(C_1-C_4)$ алкилом; или  $R^a$  и  $R^b$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют азетидинил, необязательно замещенный галогеном или  $-OR^c$ , где остальные переменные и признаки являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого или пятого вариантов реализации изобретения.

В двенадцатом варианте реализации изобретения  $R^a$  в соединениях формулы I, формулы II, формулы V, формулы VI и формулы VII представляет собой водород или метил; и  $R^b$  представляет собой метил или оксетанил, где указанный оксетанил необязательно замещен  $-CH_2F$  или  $-CF_3$ , где остальные переменные и признаки являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого, пятого или одиннадцатого вариантов реализации изобретения.

В тринадцатом варианте реализации изобретения  $R^a$  и  $R^b$  в соединениях формулы I, формулы II, формулы V, формулы VI и формулы VII вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют азетидинил, необязательно замещенный 1-2 фторами или  $-OR^c$ ; и  $R^c$  представляет собой  $-CH_3$ ,  $-CHF_2$  или циклопропил, где остальные переменные и признаки являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого, пятого или одиннадцатого вариантов реализации изобретения. В четырнадцатом варианте реализации изобретения конфигурация 1,3-диоксоланила и группы  $NR^aR^b$  в любой из формул I, II, V, VI и VII ориентирована транс относительно циклогексила, при этом остальные признаки являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого, пятого, шестого, одиннадцатого, двенадцатого или тринадцатого вариантов реализации изобретения. В альтернативном варианте конфигурация 1,3-диоксоланила и группы  $NR^aR^b$  формул I, II, V, VI и VII ориентирована цис относительно циклогексила, при этом остальные признаки являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого, пятого, шестого, одиннадцатого, двенадцатого или тринадцатого вариантов реализации изобретения. В пятнадцатом варианте реализации изобретения стереохимическая конфигурация хирального центра 1,3-диоксоланила в любой из формул I, II, III, IV, V, VI и VII представляет собой R, при этом остальные признаки являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого, пятого, шестого, одиннадцатого, двенадцатого, тринадцатого или четырнадцатого вариантов реализации изобретения. В альтернативном варианте стереохимическая конфигурация хирального центра 1,3-диоксоланила в любой из формул I, II, III, IV, V, VI и VII представляет собой S, при этом остальные признаки являются такими, как описано выше для формулы I или второго, четвертого, пятого, шестого, одиннадцатого, двенадцатого, тринадцатого или четырнадцатого вариантов реализации изобретения.

Конкретные примеры соединений представлены в разделе "ПРИМЕРЫ" и включены в данный документ как часть четырнадцатого варианта реализации изобретения. Также включены фармацевтически приемлемые соли, а также нейтральные формы данных соединений. В одном аспекте данное описание включает рацемические формы любого соединения, описанного в данном документе.

#### 4. Использование, составление и введение

В некоторых вариантах реализации изобретения данное описание относится к композиции, содержащей соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемое производное и фармацевтически приемлемый носитель. Количество соединения в предлагаемой композиции является таким, чтобы оно было эффективным для измеримой модуляции фермента, метилмодифицирующего гистон, или его мутанта в биологическом образце или у пациента.

В некоторых вариантах реализации композицию, описанную в данном документе, составляют для введения пациенту, нуждающемуся в такой композиции. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить перорально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Как используется в данном документе, термин "парентеральный" включает подкожные, внутривенные, внутримышечные, внутрисуставные, внутрисиновиальные, внутригрудные, интратекальные, внутрипеченочные, внутриочаговые и внутричерепные методы инъекции или инфузии. В некоторых вариантах реализации изобретения указанные композиции вводят перорально, внутрибрюшинно или внутривенно. Стерильные инъекционные формы композиций, описанных в данном документе, могут представлять собой водную или масляную суспензию. Данные суспензии могут быть составлены в соответствии с методами, известными в данной области техники, с использованием пригодных диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанные композиции вводят перорально.

Конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая активность конкретного применяемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время приема, скорость выведения, комбинацию лекарств, а также мнение лечащего врача и тяжесть конкретного заболевания, которое подвергают лечению. Количество соединения, описанного в данном документе, в композиции также будет зависеть от конкретного соединения в композиции.

Соединения и композиции, описанные в данном документе, как правило пригодны для модулирования активности одного или нескольких ферментов, участвующих в эпигенетической регуляции, и в частности EZH1 и EZH2, и даже более конкретно EZH2 и его мутантных форм. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения, описанные в данном документе, отрицательно регулируют или подавляют активность EZH2. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения, описанные в данном документе, являются антагонистами активности EZH2. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения, описанные в данном документе, отрицательно регулируют или подавляют активность EZH1. В некоторых вариантах реализации изобретения соединения, описанные в данном документе, являются антагонистами активности EZH1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединения и композиции, описанные в данном документе, пригодны для лечения заболеваний и/или расстройств, связанных со сверхэкспрессией EZH1 или EZH2 и/или экспрессией мутантной формы EZH2, такой как те мутантные формы, которые изменяют активность субстрата EZH2. Изучение делеций EZH2, миссенс-мутаций и мутаций сдвига рамки считывания предполагает, что EZH2 действует как опухолевый супрессор при заболеваниях крови, таких как миелодиспластические синдромы (МДС) и миелоидные злокачественные новообразования (Ernst et al., Nat Genet. 2010 Aug; 42(8):722-6; Nikoloski et al., Nat Genet. 2010 Aug; 42 (8): 665-7). В некоторых вариантах реализации изобретения соединения и композиции, описанные в данном документе, пригодны для лечения заболеваний и/или расстройств, связанных с присутствием EZH2, имеющего мутацию Y641N, Y641C, Y641F, Y641H, Y641S, A677G или A687. В конкретном аспекте данного варианта реализации изобретения EZH2 имеет мутацию Y641N.

В некоторых вариантах реализации изобретения в данном описании предложен способ лечения субъекта, страдающего заболеванием и/или расстройством, связанным со сверхэкспрессией EZH1 или EZH2 и/или экспрессией мутантной формы EZH2, включающий стадию введения соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения вышеупомянутый способ дополнительно включает предварительную стадию определения того, сверхэкспрессирует ли субъект EZH2 или мутантную форму EZH2. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное заболевание или расстройство, связанное с присутствием мутантной формы EZH2, представляет собой В-клеточную лимфому человека. В некоторых вариантах реализации изобретения указанное заболевание и/или расстройство, связанное с присутствием Y641N EZH2, представляет собой фолликулярную лимфому или диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому. В некоторых вариантах реализации изобретения указанные соединения или композиции, описанные в данном документе, пригодны при лечении заболеваний крови, таких как миелодиспластические синдромы, лейкоз, анемия и цитопения. Sneeringer et al., "Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas", Sneeringer et al., Proc. Natl Acad. Sci. 2010 Dec; 109(48):20980-20985. В некоторых вариантах реализации изобретения указанные соединения и композиции, описанные в данном документе, пригодны для лечения заболеваний и/или расстройств, связанных с клеточной пролиферацией. В некоторых вариантах реализации изобретения указанные соединения и композиции, описанные в данном документе, пригодны для лечения заболеваний и/или расстройств, связанных с неправильной регуляцией клеточного цикла или репарацией ДНК. В некоторых вариантах реализации изобретения указанные соединения и композиции, описанные в данном документе, пригодны для лечения рака.

В одном аспекте виды рака, который можно лечить соединениями, композициями и способами, описанными в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, такие:

Сердце: саркома (ангиосаркома, фибросаркома, рабдомиосаркома, липосаркома), миксома, рабдомиома, фиброма, липома и тератома;

Легкие: бронхогенная карцинома (плоскоклеточная, недифференцированная мелкоклеточная, недифференцированная крупноклеточная, аденокарцинома), альвеолярная (бронхиолярная) карцинома, бронхиальная аденома, саркома, лимфома, хондроматозная гамартома, мезотелиома;

Желудочно-кишечный тракт: пищевод (плоскоклеточный рак, аденокарцинома, лейомиосаркома, лимфома), желудок (карцинома, лимфома, лейомиосаркома), поджелудочная железа (протоковая аденокарцинома, инсулинома, глюкагонома, гастринома, карциноидные опухоли, випома), тонкий кишечник (аденокарцинома, лимфома, карциноидные опухоли, саркома Капоши, лейомиома, гемангиома, липома, нейрофиброма, фиброма), толстый кишечник (аденокарцинома, канальцевая аденома, ворсинчатая аденома, гамартома, лейомиома);

Мочеполовые пути: почки (аденокарцинома, опухоль Вильма (нефробластома), лимфома, лейкоз), мочевого пузыря и уретра (плоскоклеточный рак, переходно-клеточный рак, аденокарцинома), простата (аденокарцинома, саркома), яички (семинома, тератома, эмбриональная карцинома, тератоканцинома, хориокарцинома, саркома, интерстициально-клеточная карцинома, фиброма, фиброаденома, аденоматозные опухоли, липома);

Печень: гепатома (гепатоцеллюлярная карцинома), холангиокарцинома, гепатобластома, ангиосаркома, гепатоцеллюлярная аденома, гемангиома;

Кости: остеогенная саркома (остеосаркома), фибросаркома, злокачественная фиброзная гистиоци-

тома, хондросаркома, саркома Юинга, злокачественная лимфома (ретикулярно-клеточная саркома), множественная миелома, злокачественная гигантоклеточная хордома, остеохондрома (костно-хрящевые экстоzy), доброкачественная хондрома, хондробластома, хондромиксофиброма, остеоидная остеома и гигантоклеточные опухоли;

Нервная система: череп (остеома, гемангиома, гранулема, ксантома, деформирующий остит), мозговые оболочки (менингиома, менингиосаркома, глиоматоз), мозг (астроцитомы, медуллобластома, глиома, эпендимома, герминома (пинеалома), мультиформная глиобластома, олигодендроглиома, шваннома, ретинобластома, врожденные опухоли), спинной мозг (нейрофиброма, менингиома, глиома, саркома);

Гинекология: матка (карцинома эндометрия), шейка матки (карцинома шейки матки, предопухольная дисплазия шейки матки), яичники (карцинома яичников (серозная цистаденокарцинома, муцинозная цистаденокарцинома, светлоклеточная карцинома, неклассифицированная карцинома), серозная клеточная опухоль), гранулезно-клеточные опухоли, опухоли из клеток Сертоли-Лейдига, дисгерминома, злокачественная тератома), вульва (плоскоклеточная карцинома, интраэпителиальная карцинома, аденокарцинома, фибросаркома, меланома), влагалище (светлоклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, ботриоидная саркома (эмбриональная рабдомиосаркома)), фаллопиевы трубы (карцинома);

Гематология: кровь (миелоидный лейкоз (острый и хронический), острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, миелолиферативные заболевания, множественная миелома, миелодиспластический синдром), болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома (злокачественная лимфома);

Кожа: злокачественная меланома, базалиома, плоскоклеточный рак, саркома Капоши, родинки, диспластические невусы, липома, ангиома, дерматофиброма, келоиды, псориаз и

Надпочечные железы: нейробластома.

В одном аспекте указанный рак, который лечат с помощью соединений, композиций и способов, описанных в данном документе, выбран из следующего: рак надпочечника, ацинозно-клеточная опухоль, невринома слухового нерва, акральная лентигинозная меланома, акроспирома, острый эозинофильный лейкоз, острый эритроидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, аденокарцинома, аденокистозная карцинома, аденома, аденоматоидная одонтогенная опухоль, аденосквамозная карцинома, новообразование подкожно-жировой клетчатки, адренокортикальный рак, Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых, агрессивный лейкоз НК-клеток, СПИД-ассоциированная лимфома, альвеолярная рабдомиосаркома, альвеолярная мягкотканная саркома, амелобластная фиброма, анапластическая крупноклеточная лимфома, анапластический рак щитовидной железы, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиомиолипома, ангиосаркома, астроцитомы, атипичная тератоидно-рабдоидная опухоль, В-клеточный хронический лимфолейкоз, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, В-клеточная лимфома, базалиома, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, бластома, рак кости, опухоль Бреннера, бурая опухоль, лимфома Бёркитта, рак молочной железы, рак головного мозга, карцинома, преинвазивный рак, карциносаркома, опухоль хряща, цемента, миелоидная саркома, хондрома, хордома, хориокарцинома, хориоидпапиллома, светлоклеточная саркома почки, краниофарингиома, кожная Т-клеточная лимфома, рак шейки матки, колоректальный рак, болезнь Дегоса, десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль, диффузная В-крупноклеточная лимфома, дизэмбриопластическая нейроэпителиальная опухоль, дисгерминома, эмбриональная карцинома, новообразование эндокринных желёз, опухоль эндодермального синуса, Т-клеточная лимфома, связанная с энтеропатией, рак пищевода, утробный плод в плоде, фиброма, фибросаркома, фолликулярная лимфома, фолликулярный рак щитовидной железы, ганглионеврома, рак желудочно-кишечного тракта, гоноцитомы, хориокарцинома матки, гигантоклеточная фибробластома, гигантоклеточная опухоль кости, глиальная опухоль, мультиформная глиобластома, глиома, глиоматоз головного мозга, глюкогонома, гонадобластома, гранулезоклеточная опухоль, гинандробластома, рак желчного пузыря, рак желудочно-кишечного тракта, волосатоклеточный лейкоз, гемангиобластома, опухоли головы и шеи, гемангиоперицитомы, гемобластоз, гепатобластома, гепатолиенальная Т-клеточная лимфома, ходжкинская лимфома, неходжкинская лимфома, инвазивная лобулярная карцинома, рак кишечника, рак почки, рак гортани, лентигинозная меланома, смертельная срединная карцинома, лейкоз, опухоль из клеток Лейдига, липосаркома, рак легких, лимфангиома, лимфангиосаркома, лимфоэпителиома, лимфома, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, лимфома MALT, злокачественная фиброзная гистиоцитомы, злокачественная опухоль оболочек периферических нервов, злокачественная тритон-опухоль, мантийноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома маргинальной зоны, тучноклеточный лейкоз, опухоль зародышевых клеток средостения, медуллярный рак молочной железы, медуллярный рак щитовидной железы, медуллобластома, меланома, менингиома, рак клеток Меркеля, мезотелиома, метастатическая уротелиальная карцинома, смешанная мюллерова опухоль, слизистая опухоль, множественная миелома, новообразования мышечной ткани, фунгоидный микоз, миксоидная липосаркома, миксома сердца, миксосаркома, назофарингеальная карцинома, невринома, нейробластома, нейрофиброма, неврома, узловатая меланома, рак глаза, олигоастроцитомы, олигодендроглиома, онкоцитомы, менингиома оболочек зрительного нерва, опухоль зрительного нерва, рак полости рта, остеосаркома,

рак яичника, опухоль Панкоста, папиллярный рак щитовидной железы, параганглиома, пинеобластома, пинеоцитомы, питуицитомы, аденома гипофиза, опухоль гипофиза, плазмоцитомы, полиэмбриомы, лимфома Т-лимфобластных клеток предшественников, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная выпотная лимфома, первичный перитонеальный рак, рак простаты, рак поджелудочной железы, фарингеальный рак, псевдомиксома брюшной полости, почечно-клеточная карцинома, почечная медуллярная карцинома, ретинобластома, рабдомиома, рабдомиосаркома, преобразование Рихтера, рак прямой кишки, саркома, Шванноматоз, семинома, опухоли из клеток Сертоли, опухоль стромы полового тяжа, перстневидноклеточный рак, рак кожи, мелкосинекруглоклеточные опухоли, мелкоклеточная карцинома, саркома мягких тканей, соматостатинома, рак мошонки, опухоль спинного мозга, лимфома маргинальной зоны селезенки, плоскоклеточный рак, синовиальная саркома, болезнь Сезари, рак тонкой кишки, плоскоклеточный рак, рак желудка, Т-клеточная лимфома, рак яичка, текома, рак щитовидной железы, переходно-клеточная карцинома, рак горла, рак урахуса, рак органов мочеполовой системы, уротелиальная карцинома, увеальная меланома, рак матки, веррукозная карцинома, глиома зрительных путей, рак вульвы, рак влагалища, макроглобулинемия Вальденстрема, опухоль Уортина и опухоль Вильмса. В одном аспекте указанный рак, который лечат с помощью соединений, композиций и способов, описанных в данном документе, выбран из следующего: аденокарцинома, Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых, рак мочевого пузыря, бластома, рак кости, рак молочной железы, рак головного мозга, карцинома, миелоидная саркома, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, мультиформная глиобластома, глиома, рак желчного пузыря, рак желудочно-кишечного тракта, опухоли головы и шеи, ходжкинская лимфома, неходжкинская лимфома, рак кишечника, рак почки, рак гортани, лейкоз, рак легких, лимфома, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мезотелиома, множественная миелома, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ), рак глаза, опухоль зрительного нерва, рак полости рта, рак яичника, опухоль гипофиза, первичная лимфома центральной нервной системы, рак простаты, рак поджелудочной железы, фарингеальный рак, почечно-клеточная карцинома, рак прямой кишки, саркома, рак кожи, опухоль спинного мозга, рак тонкой кишки, рак желудка, Т-клеточная лимфома, рак яичка, рак щитовидной железы, рак горла, рак органов мочеполовой системы, уротелиальная карцинома, рак матки, рак влагалища и опухоль Вильмса.

В одном аспекте указанный рак, который лечат с помощью соединений, композиций и способов, описанных в данном документе, выбран из следующего: рак молочной железы, рак простаты, рак толстой кишки, почечно-клеточная карцинома, мультиформная глиобластома, рак мочевого пузыря, меланома, рак бронхов, лимфома и рак печени.

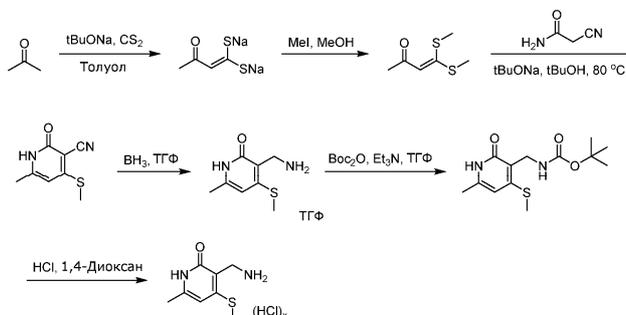
Также предложено применение соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, или композиции, содержащей описанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль, для производства лекарственного средства для лечения состояния, описанного в данном документе. Также предложено соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, или композиция, содержащая описанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль, для применения при лечении состояния, описанного в данном документе.

### Примеры

Репрезентативные примеры, которые следуют ниже, предназначены для того, чтобы помочь проиллюстрировать данное изобретение, и не предназначены и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

### Получение промежуточных соединений

Промежуточное соединение 1: 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-он (гидрохлоридная соль)



Промежуточное соединение 1

Стадия 1: Синтез натрий 3-оксобут-1-ен-1,1-бис(тиолат)

Смесь трет-бутоксид натрия (16,6 г, 172 ммоль) в толуоле (30 мл) дегазировали под вакуумом и продували азотом (3 цикла). Затем при  $0^\circ\text{C}$  добавляли ацетон (5,0 г, 6,4 мл, 86 ммоль) с последующим медленным добавлением сероуглерода (6,6 г, 5,24 мл, 86 ммоль). Полученную смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 4 ч, затем фильтровали. Осадок на фильтре сушили под вакуумом с получением указанного соединения (15,4 г, неочищенное) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на сле-

дующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 2: Синтез 4,4-бис(метилтио)бут-3-ен-2-она

К раствору натрия 3-оксобут-1-ен-1,1-бис(тиолата) (15,4 г, 86,4 ммоль) в метаноле (90 мл) медленно добавляли йодметан (24,5 г, 10,7 мл, 173 ммоль). Смесь перемешивали при 70°C в течение 1 ч, затем упаривали досуха. Добавляли воду (30 мл) и желаемый продукт экстрагировали этилацетатом (60 мл × 3). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением указанного соединения (6,8 г, выход 42%) в виде коричневого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 163,0; найдено 163,0.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 6,02 (с, 1H), 2,45 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 2,15 (с, 3H).

Стадия 3: Синтез 6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрила

К раствору 4,4-бис(метилтио)бут-3-ен-2-она (2,9 г, 18 ммоль) и 2-цианоацетамида (1,5 г, 18 ммоль) в трет-бутаноле (50 мл) добавляли трет-бутоксид натрия (1,9 г, 20 ммоль). Смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч (на данной стадии были выполнены и объединены две загрузки реакции). Добавляли воду (20 мл) и доводили pH до 5-6 с помощью 10% соляной кислоты. Полученную смесь фильтровали и осадок на фильтре промывали петролейным эфиром (20 мл × 2), затем осадок сушили под вакуумом с получением указанного соединения (4,8 г, выход 74%) в виде сероватого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 181,0; найдено 181,0.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 6,27 (с, 1H), 2,56 (с, 3H), 2,25 (с, 3H).

Стадия 4: Синтез 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-она

Смесь 6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбонитрила (3,6 г, 20 ммоль) в тетрагидрофуране (50 мл) дегазировали под вакуумом и продували азотом (3 цикла). Затем при 0°C медленно добавляли комплекс борана с диметилсульфидом (10 М, 8,0 мл, 80 ммоль), после чего реакцию смесь нагревали до 70°C и перемешивали в течение 2 ч. Медленно добавляли метанол (15 мл) при 0°C для гашения реакции перед тем, как смесь упаривали при пониженном давлении с получением указанного соединения (3,8 г, неочищенное) в виде светло-желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 185,1; найдено 185,0.

Стадия 5: Синтез трет-бутил ((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)карбамата

К раствору 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-она (3,6 г, 20 ммоль) в тетрагидрофуране (80 мл) добавляли триэтиламин (5,9 г, 8,1 мл, 59 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин перед добавлением ди-трет-бутилдикарбоната (6,4 г, 29 ммоль) и реакцию смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Затем реакцию смесь упаривали досуха при пониженном давлении, после чего добавляли воду (35 мл) и желаемый продукт экстрагировали смесью петролейного эфира/этилацетата 5:1 (30 мл × 3). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и упаривали с получением указанного соединения (5,8 г, неочищенное) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 285,12; найдено 284,9.

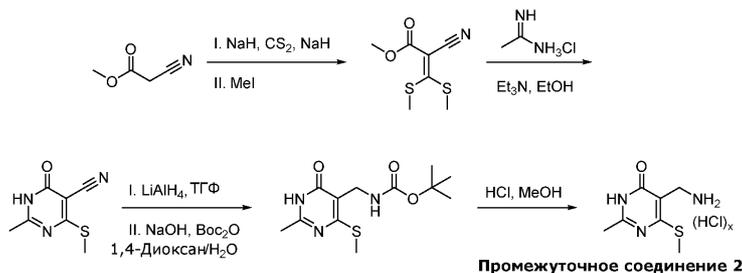
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 6,05 (с, 1H), 4,03-4,00 (м, 2H), 2,42 (с, 3H), 2,15 (с, 3H), 1,39 (с, 9H).

Стадия 6: Синтез 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-она (гидрохлоридная соль)

К раствору хлористого водорода в 1,4-диоксане (4 М, 100 мл, 400 ммоль) при 25°C добавляли трет-бутил ((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)карбамат (5,0 г, 17,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч, затем упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток промывали дихлорметаном (30 мл × 2) и этилацетатом (30 мл) с получением указанного соединения (4,5 г, неочищенное, соль HCl) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 185,1; найдено 185,0.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, D<sub>2</sub>O) δ 6,31 (с, 1H), 4,03 (с, 2H), 2,41 (с, 3H), 2,18 (с, 3H).

Промежуточное соединение 2: 5-(аминометил)-2-метил-6-(метилтио)пиримидин-4(3H)-он (гидрохлоридная соль)



Стадия 1: Синтез метил 2-циано-3,3-бис(метилтио)акрилата

Суспензию гидрида натрия (60% дисперсия в минеральном масле) (4,23 г, 106 ммоль) в тетрагидрофуране (400 мл) охлаждали до 0°C перед добавлением по каплям метилцианоацетата (8,90 мл, 101

ммоль). Реакционную смесь интенсивно перемешивали в течение 15 мин, после чего по каплям добавляли сероуглерод (6,1 мл, 101 ммоль), поддерживая температуру реакции ниже 20°C (белое полутвердое вещество становилось желтым). Затем по каплям добавляли йодметан (15,7 мл, 252 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем реакционную смесь упаривали при пониженном давлении и остаток выливали в ледяную воду. Полученный осадок фильтровали и сушили под вакуумом с получением указанного соединения (11,9 г, выход 58%) в виде желто-коричневого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 3,83 (с, 3H), 2,76 (с, 3H), 2,61 (с, 3H).

Стадия 2: Синтез 2-метил-4-(метилтио)-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-карбонитрила

Метил 2-циано-3,3-бис(метилтио)акрилат (11,9 г, 58,5 ммоль) растворяли в этаноле (1000 мл). К смеси добавляли ацетамидин гидрохлорид (5,53 г, 58,5 ммоль) и триэтиламин (36,7 мл, 263 ммоль) и перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Затем реакционную смесь упаривали при пониженном давлении и остаток промывали 10% соляной кислотой. Осадок фильтровали, и осадок на фильтре промывали водой и диэтиловым эфиром перед сушкой в вакууме с получением указанного соединения (5 г, выход 47%) в виде твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 182,03; найдено 182,10.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 2,57 (с, 3H), 2,37 (с, 3H).

Стадия 3: Синтез трет-бутил ((2-метил-4-(метилтио)-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метил)карбамата

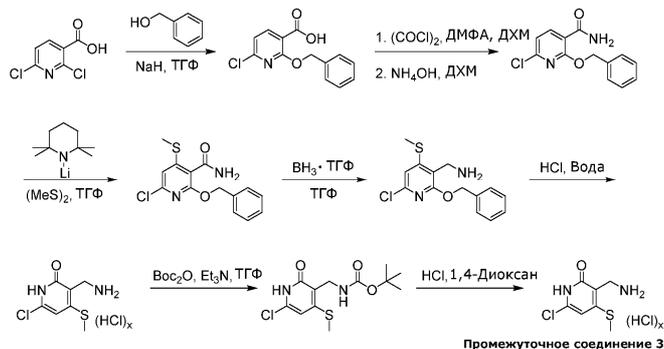
К суспензии 2-метил-4-(метилтио)-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-карбонитрила (1,5 г, 8,27 ммоль) в тетрагидрофуране (50 мл) при 0°C добавляли раствор литий алюминогидрида в тетрагидрофуране (2 М, 6,2 мл, 12,4 ммоль). Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и после завершения реакцию гасили водным раствором гидроксида натрия (1 М, 33 мл, 33,1 ммоль). К данной смеси последовательно добавляли 1,4-диоксан (50 мл) и ди-трет-бутилдикарбонат (3,61 г, 16,6 ммоль). Двухфазную смесь интенсивно перемешивали до полной защиты амина. Двухфазную смесь подкисляли до нейтрального pH уксусной кислотой, отделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток растирали с дихлорметаном и фильтрат (содержащий желаемый продукт) упаривали досуха при пониженном давлении. Полученное твердое вещество очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией (колонка C18, градиент от 5 до 95% ацетонитрила в воде, забуференной 0,1% трифторуксусной кислоты), затем нормально-фазовой флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 30 до 90% этилацетата в дихлорметане) с получением указанного соединения (2,57 г, выход 26%, чистота >99%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС [M-(C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>)+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 230,1; найдено 230,0.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 13,20 (с, 1H), 5,37 (т, J=5,5 Гц, 1H), 4,26 (д, J=5,6 Гц, 2H), 2,51 (с, 3H), 2,44 (с, 3H), 1,44 (с, 9H).

Стадия 4. Синтез 5-(аминометил)-2-метил-6-(метилтио)пиримидин-4(3H)-она (гидрохлоридная соль)

К суспензии трет-бутил ((2-метил-4-(метилтио)-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метил)карбамата (300 мг, 1,05 ммоль) в 1,4-диоксане (7,2 мл) при 23°C добавляли раствор хлористого водорода в 1,4-диоксане (4 М, 2,10 мл, 8,40 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 23°C в течение 3 ч, затем еще добавляли раствор хлористого водорода в 1,4-диоксане (4 М, 2,10 мл, 8,40 ммоль). Затем через 14 ч реакционную смесь упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (254 мг, выход 94%) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+Na]<sup>+</sup> (свободное основание) m/z: расщ. 208,1; найдено 208,1.

Промежуточное соединение 3: 3-(аминометил)-6-хлор-4-(метилтио)пиримидин-2(1H)-он (гидрохлоридная соль)



Стадия 1: Синтез 2-(бензилокси)-6-хлорникотиновой кислоты

К суспензии гидрида натрия (60% дисперсия в минеральном масле) (11,5 г, 286 ммоль) в тетрагидрофуране (500 мл) при 0°C добавляли бензиловый спирт (14 мл, 143 ммоль). Реакционную смесь пере-

мешивали в течение 20 мин, затем добавляли раствор 2,6-дихлорпиридин-3-карбоновой кислоты (25 г, 130 ммоль) в тетрагидрофуране (500 мл) и реакционную смесь перемешивали при 23°C в течение 4 ч. Затем реакцию гасили 10% соляной кислотой (300 мл), обрабатывали твердым  $\text{NaHCO}_3$  до pH ~8, подкисляли уксусной кислотой (50% в воде) и, наконец, экстрагировали этилацетатом (200 мл × 3). Объединенные органические слои промывали соевым раствором (200 мл), сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали досуха. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 5 до 50% этилацетата в дихлорметане) с получением указанного соединения (33,68 г, выход 98%).

Стадия 2: Синтез 2-(бензилокси)-6-хлорникотинамида

К раствору 2-(бензилокси)-6-хлорникотиновой кислоты (33,68 г, 128,2 ммоль) в дихлорметане (500 мл) при 0°C добавляли N,N-диметилформамид (1 мл), а затем оксалилхлорид (11,9 мл, 141 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 23°C в течение 2 ч, затем упаривали досуха. Остаток растворяли в дихлорметане (200 мл) и медленно добавляли при 0°C к концентрированному раствору гидроксида аммония (50 мл). Через 1 ч органический слой собирали, а водную фазу экстрагировали дихлорметаном (50 мл × 3). Объединенные органические слои сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 50% этилацетата в дихлорметане) с получением указанного соединения (количественный выход) в виде твердого вещества.

Стадия 3: Синтез 2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтио)никотинамида

К раствору 2,2,6,6-тетраметилпиперидина (29,45 мл, 175,1 ммоль) в тетрагидрофуране (300 мл) при -78°C добавляли раствор н-бутиллития в гексане (2,5 М, 70 мл, 175,1 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 0°C в течение 30 мин, затем снова охлаждали до -78°C. Затем добавляли раствор 2-(бензилокси)-6-хлорникотинамида (11,5 г, 43,8 ммоль) в тетрагидрофуране (100 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже -60°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -78°C, затем добавляли диметилдисульфид (15,77 мл, 175,1 ммоль). Реакционную смесь дополнительно перемешивали при -78°C в течение 2 ч, затем гасили при -78°C раствором уксусной кислоты в воде (50% об/об). Желаемый продукт экстрагировали этилацетатом (100 мл × 3) и объединенные органические слои промывали водой (20 мл), насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (20 мл), соевым раствором (20 мл), сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 20% этилацетата в дихлорметане) с получением указанного соединения (4,86 г, выход 36%).

Стадия 4: Синтез (2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтио)пиридин-3-ил)метанамина

К раствору 2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтио)никотинамида (4,86 г, 15,7 ммоль) в тетрагидрофуране (100 мл) при 23°C добавляли раствор борана в тетрагидрофуране (1 М, 63 мл, 63 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 15 ч, затем гасили медленным добавлением метанола при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали досуха при пониженном давлении и остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 30% метанола в дихлорметане) с получением указанного соединения (710 мг, выход 15%) в виде белого твердого вещества.

Стадия 5: Синтез 3-(аминометил)-6-хлор-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-она (гидрохлоридная соль)

В колбу, содержащую (2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтио)пиридин-3-ил)метанамин (710 мг, 2,41 ммоль), добавляли концентрированную соляную кислоту (12 М, 5,0 мл, 60 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 23°C в течение 2 ч, затем упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток перекристаллизовывали из смеси метанола и диэтилового эфира с получением указанного соединения (400 мг, выход 69%) в виде белого твердого вещества.

Стадия 6: Синтез трет-бутил ((6-хлор-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)карбамата

К суспензии 3-(аминометил)-6-хлор-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-он гидрохлорида (1,575 г, 6,53 ммоль) в дихлорметане (50 мл) добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (2,85 г, 13,1 ммоль), а затем N,N-диизопропилэтиламин (3,4 мл, 19,6 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч (до полного растворения), затем гасили водой.

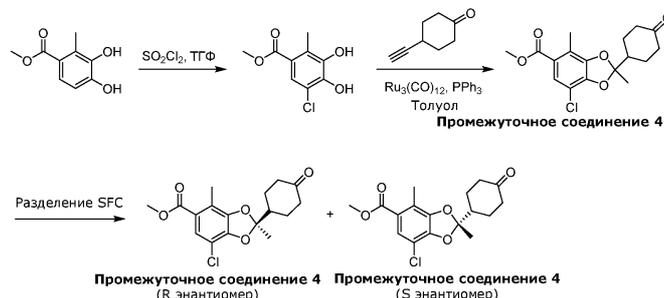
Органический слой отделяли, сушили над сульфатом магния, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 10% метанола в дихлорметане) с получением указанного соединения (1,5 г, выход 75%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z: расщ. 305,1; найдено 305,1.

Стадия 7: Синтез 3-(аминометил)-6-хлор-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-она (гидрохлоридная соль)

К суспензии трет-бутил ((6-хлор-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)карбамата (300 мг, 984 мкмоль) в 1,4-диоксане (4,9 мл) добавляли раствор хлористого водорода в 1,4-диоксане (4 М, 1,96 мл, 7,87 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, затем еще добавляли раствор хлористого водорода в 1,4-диоксане (4 М, 1,96 мл, 7,87 ммоль). Через 14 ч реакционную смесь упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (253 мг, количественный выход) в виде белого твердого вещества, которое

использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС  $[M+Na]^+$  (свободное основание)  $m/z$ : расщ. 227,0; найдено 227,0.

Промежуточное соединение 4: Метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилат



Стадия 1: Синтез метил 5-хлор-3,4-дигидро-2-метилбензоата

К раствору метил 3,4-дигидрокси-2-метилбензоата (5,11 г, 27,9 ммоль) в тетрагидрофуране (199 мл) при  $-20^{\circ}\text{C}$  по каплям добавляли сульфурилхлорид (2,45 мл, 30,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 3 ч, затем гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония (50 мл). Желаемый продукт экстрагировали этилацетатом (25 мл  $\times$  3). Объединенные органические слои промывали соевым раствором (25 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 60% этилацетата в гептане) с получением указанного соединения (4,117 г, выход 68%) в виде бежевого твердого вещества. ЖХ-МС  $[M+H]^+$   $m/z$ : расщ. 217,0; найдено 217,1 (изотопная картина Cl).

Стадия 2: Синтез метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)-2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата

Смесь метил 5-хлор-3,4-дигидрокси-2-метилбензоата (1,2 г, 5,53 ммоль), трирутений додекакарбонил (176 мг, 276 мкмоль) и трифенилфосфина (145 мг, 553 мкмоль) дегазировали под вакуумом и продували азотом (3 цикла). Добавляли толуол (8,1 мл) и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем по каплям добавляли раствор 4-этинилциклогексан-1-она (1,34 г, 11,0 ммоль) в толуоле (17 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 23 ч при кипячении с обратным холодильником. Наконец, реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 60% этилацетата в гептане) с получением указанного соединения (1,327 г, выход 70%) в виде желтого масла. ЖХ-МС  $[M+Na]^+$   $m/z$ : расщ. 361,1; найдено 361,1 (изотопная картина Cl).

Стадия 3: Разделение метил (R)-7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата и метил (S)-7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

Рацемическую смесь метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (4,4 г, 13 ммоль) разделяли препаративной SFC [Колонка: ChiralPak AY от Daicel chemical industries (250 мм  $\times$  50 мм внутренний диаметр, 10 мкм). Подвижная фаза А:  $\text{CO}_2$ /Подвижная фаза В: 0,1%  $\text{NH}_4\text{OH}$  в метаноле. Изократический (85% подвижной фазы А и 15% подвижной фазы В). Скорость потока: 80 мл/мин. Температура колонки:  $40^{\circ}\text{C}$ . Промежуточное соединение 4 (Пик 1) (нежелательный энантиомер/дистомер): Время удерживания = 6,2 мин. Выделение = 1,4 г, 4,05 ммоль, выход 31%, ee 90%, степень чистоты 98% (желтое твердое вещество).

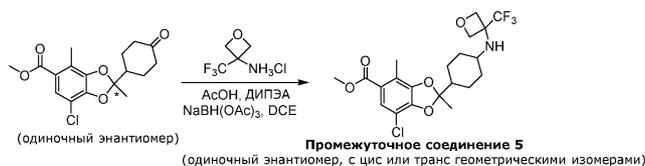
$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  7,48 (с, 1H), 3,78 (с, 3H), 2,44-2,36 (м, 2H), 2,35-2,25 (м, 6H), 2,19 (тдд,  $J=2,8, 5,6, 13,1$  Гц, 2H), 1,70-1,57 (м, 5H).

Промежуточное соединение 4 (Пик 2) (желаемый энантиомер/эутомер): Время удерживания = 7,0 мин. Выделение = 1,1 г, 3,08 ммоль, Выход 23,75%, ee 99%, степень чистоты 95% (желтое твердое вещество).

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  7,49 (с, 1H), 3,78 (с, 3H), 2,44-2,36 (м, 2H), 2,36-2,25 (м, 6H), 2,20 (тдд,  $J=2,8, 5,6, 13,1$  Гц, 2H), 1,72-1,59 (м, 5H).

Аналитический метод SFC: [Колонка: ChiralPak AY-3 (150  $\times$  4,6 мм внутренний диаметр, 3 мкм). Подвижная фаза А:  $\text{CO}_2$ /Подвижная фаза В: 0,05%  $\text{Et}_2\text{NH}$  в  $i\text{PrOH}$ . Градиент: от 5 до 40% подвижной фазы В (в течение 5,5 мин). Скорость потока: 2,5 мл/мин. Температура колонки:  $40^{\circ}\text{C}$ ]. Промежуточное соединение 4 (Пик 1 - нежелательный энантиомер/дистомер): Время удерживания = 2,853 мин. Промежуточное соединение 4 (Пик 2 - желаемый энантиомер/эутомер): Время удерживания = 2,979 мин.

Промежуточное соединение 5: Метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(транс-4-((3-(трифторметил)оксетан-3-ил)амино)циклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилат



Смесь 1-хлор-N-[3-(трифторметил)оксетан-3-ил]гидрогенамина (678 мг, 3,82 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (698 мкл, 4,01 ммоль) в дихлорэтане (9,54 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин перед добавлением уксусной кислоты (218 мкл, 3,82 ммоль) с последующим добавлением метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (650 мг, 1,91 ммоль) к данной реакционной смеси. Через 5 мин при комнатной температуре смесь стала прозрачной (желто-коричневой), затем добавляли триацетоксиборгидрид натрия (404 мг, 1,91 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, затем гасили насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (30 мл). Желаемый продукт экстрагировали дихлорметаном (30 мл × 3) и объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией (колонка C18, ацетонитрил/вода 1:1 с 0,1% трифторуксусной кислотой) с получением двух Геометрических изомеров (цис и транс). Первый пик элюирования соответствует геометрическому изомеру 1.

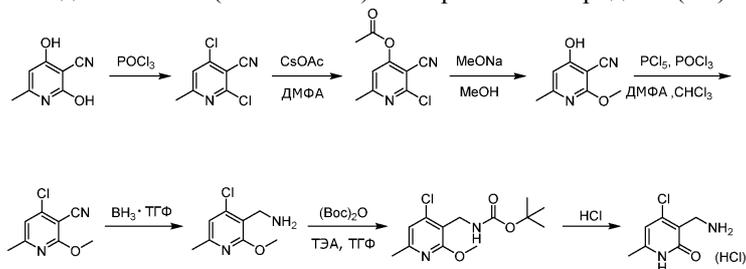
#### Аналитический метод ЖХ-МС (для геометрических изомеров)

[Колонка: Zorbax SB-C8 (75 × 4,6 мм внутренний диаметр, 3,5 мкм). Подвижная фаза А: 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле/Подвижная фаза В: трифторуксусная кислота в воде. Градиент: от 5 до 100% подвижной фазы В (в течение 3,0 мин), затем 100% подвижной фазы В (4,5 мин). Скорость потока: 1,5 мл/мин. Температура колонки: 20°C] Геометрический изомер 1 (желаемый): Время удерживания = 4,073 мин (278 мг, 31%). Геометрический изомер 2 (нежелательный): Время удерживания = 4,277 мин (253 мг, 29%).

Энантиомеры Геометрического Изомера 1 (желаемо на основе метода ЖХ-МС) разделяли препаративной SFC [Колонка: Chiralcel OX-H (250 × 21 мм I.D.). Подвижная фаза А: CO<sub>2</sub>/Подвижная фаза В: 0,25% изопропиламина в смеси изопропанол/гексан 1:1. Изократический (85% подвижной фазы А и 15% подвижной фазы В). Скорость потока: 80 г/мин. Температура колонки: 25°C]. Промежуточное соединение 5 (Пик 1): Время удерживания = 1,84 мин. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 464,15; найдено 464.

Промежуточное соединение 5 (Пик 2): Время удерживания = 2,1 мин. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 464,15; найдено 464,2.

Промежуточное соединение 6: 3-(аминометил)-4-хлор-6-метилпиридин-2(1H)-он



Стадия 1: Синтез 2,4-дихлор-6-метилникотинитрила

Раствор 2,4-дигидрокси-6-метилникотинитрила (80 г, 533,3 ммоль) в оксихлориде фосфора (150 мл) перемешивали при 120°C в течение 2 ч, затем гасили насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (до pH = 8). Его распределяли между водой (2000 мл) и этилацетатом (1000 мл), органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (85 г, выход 86%) в виде коричневого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 186,98; найдено 186,6.

Стадия 2: Синтез 2-хлор-4-гидрокси-6-метилникотинитрила

К раствору 2,4-дихлор-6-метилникотинитрила (10 г, 53 ммоль) в N,N-диметилформамиде (50 мл) добавляли ацетат цезия (30,8 г, 160 ммоль) при комнатной температуре. Реакцию перемешивали при 80°C в течение ночи, затем гасили водой (800 мл). Желаемый продукт экстрагировали этилацетатом (800 мл), и органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Указанное соединение (8,8 г, выход 98%) получали в виде коричневого твердого вещества и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 169,01; найдено 168,8.

Стадия 3: Синтез 4-гидрокси-2-метокси-6-метилникотинитрила

Смесь 2-хлор-4-гидрокси-6-метилникотинитрила (8,8 г, 52,2 ммоль) и метоксида натрия (14,1 г,

261 ммоль) в метаноле (50 мл) перемешивали при 60°C в течение ночи. Смесь гасили 1 М раствором соляной кислоты до pH = 5. Его распределяли между водой (500 мл) и этилацетатом (500 мл), органический слой сушили над сульфатом натрия и упаривали с получением указанного соединения (8,0 г, выход 93%) в виде коричневого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 165,1; найдено 164,8.

Стадия 4: 4-Хлор-2-метокси-6-метилникотинонитрил

Смесь 4-гидрокси-2-метокси-6-метилникотинонитрила (8,0 г, 48,7 ммоль), пентахлорида фосфора (20,3 г, 97,5 ммоль), оксихлорида фосфора (14,9 г, 9,09 мл, 97,5 ммоль) и N,N-диметилформамида (5 мл) в хлороформе (100 мл) перемешивали при 60°C в течение 30 мин. Реакцию гасили насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия (до pH = 8). Его распределяли между водой (1000 мл) и этилацетатом (1000 мл), органический слой сушили над сульфатом натрия и упаривали досуха с получением указанного соединения (8,0 г, выход 90%) в виде коричневого твердого вещества, которое непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 183,0; найдено 182,8.

Стадия 5: Синтез (4-хлор-2-метокси-6-метилпиридин-3-ил)метанамина

К раствору 4-хлор-2-метокси-6-метилникотинонитрила (8,0 г, 43,8 ммоль) в тетрагидрофуране (50 мл) добавляли комплекс борана с диметилсульфидом (10 М, 5,3 мл, 53 ммоль). Смесь перемешивали при 60°C в течение 2 ч, затем гасили метанолом (10 мл) при 0°C. Смесь упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (7,0 г, выход 93%) в виде коричневого твердого вещества, которое непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 187,1; найдено 187,1.

Стадия 6: трет-бутил ((4-хлор-2-метокси-6-метилпиридин-3-ил)метил)карбамат

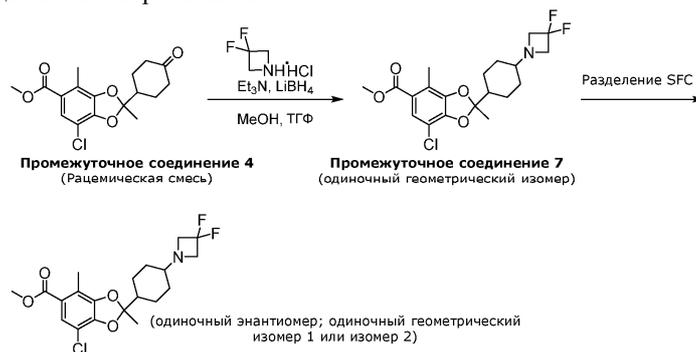
Смесь (4-хлор-2-метокси-6-метилпиридин-3-ил)метанамина (7,0 г, 37,5 ммоль), ди-трет-бутилдикарбоната (15,2 г, 75,0 ммоль) и триэтиламина (11,4 г, 15,7 мл, 113 ммоль) в тетрагидрофуране (50 мл) перемешивали при 20°C в течение 16 ч, затем гасили водой (500 мл). Желаемый продукт экстрагировали этилацетатом (500 мл) и органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-колонкой (колонка с силикагелем, петролейный эфир:этилацетат 40:1) с получением указанного соединения (3,0 г, выход 28%) в виде бесцветного масла. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 287,1; найдено 286,9.

Стадия 7: 3-(Аминометил)-4-хлор-6-метилпиридин-2(1H)-он

К раствору хлористого водорода в воде (4 М, 10 мл, 10 ммоль) добавляли трет-бутил ((4-хлор-2-метокси-6-метилпиридин-3-ил)метил)карбамат (3,0 г, 10,5 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали при 100°C в течение 2 ч, затем упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (1,7 г, выход 94%) в виде желтого твердого вещества. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 173,04; найдено 173,1.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub>): δ 6,38 (с, 1H), 4,15 (с, 2H), 2,32 (с, 3H).

Промежуточное соединение 7: Метил 7-хлор-2-(4-(3,3-дифторазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилат



Стадия 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3,3-дифторазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилат

Раствор метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (Промежуточное соединение 4 - рацемическая смесь) 550 мг, 1,62 ммоль), 3,3-дифторазетидин гидрохлорида (839 мг, 6,48 ммоль) и триэтиламина (895 мкл, 6,64 ммоль) в метаноле (5 мл) и тетрагидрофуране (5 мл) перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. На следующий день реакционную смесь охлаждали до -78°C и по каплям добавляли раствор боргидрида лития (2 М в тетрагидрофуране, 1,21 мл, 2,43 ммоль). Густую желтую смесь постепенно нагревали до комнатной температуры, затем гасили насыщенным водным раствором карбоната натрия при 0°C. Желаемый продукт экстрагировали дихлорметаном (трижды) и объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток дважды очищали флэш-хроматографией (колонка с силикагелем КР-НН, градиент от 0 до 20% этилацетата в гептане) с получением указанного соединения

(354 мг, выход 53%) в виде рацемической смеси одного геометрического изомера (цис или транс). ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 416,9; найдено 416,2.

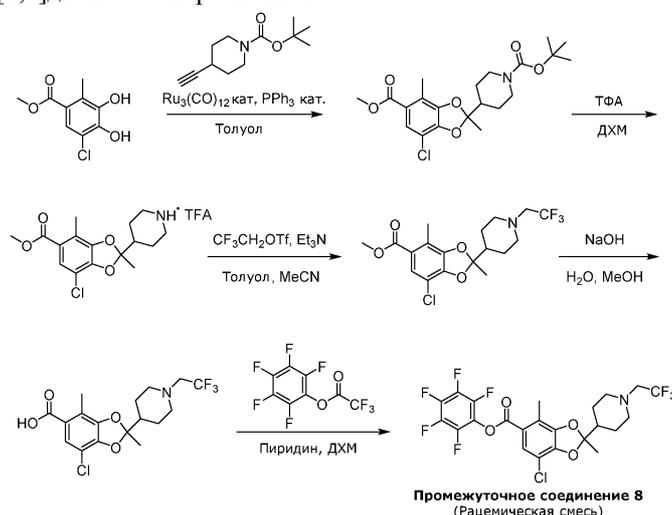
Стадия 2: Разделение метил (2R)-7-хлор-2-(4-(3,3-дифторазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата и метил (2S)-7-хлор-2-(4-(3,3-дифторазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

Рацемическую смесь метил 7-хлор-2-(4-(3,3-дифторазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (560 мг) разделяли препаративной SFC [Колонка: Chiralpak AD-H от Daicel chemical industries. Подвижная фаза А: CO<sub>2</sub>/Подвижная фаза В: 0,25% изопропиламина в смеси гексана и этанола (1:1). Изократический (90% подвижной фазы А и 10% подвижной фазы В). Скорость потока: 80 г/мин. Температура колонки: 25°C]. Аналитический метод SFC: Колонка: Chiralpak AD-H от Daicel chemical industries (100 мм × 4,6 мм. Подвижная фаза А: CO<sub>2</sub>/Подвижная фаза В: 0,1% изопропиламина в смеси гексана и этанола (3:1). Изократический (85% подвижной фазы А и 15% подвижной фазы В). Скорость потока: 4 мл/мин. Температура колонки: 40°C. Промежуточное соединение 7 (Пик 1): время удерживания = 1,02 мин (аналитический метод SFC). Выделение = 173 мг, выход 15%, ee 96%.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7,48 (с, 1H), 3,78 (с, 3H), 2,44-2,36 (м, 2H), 2,35-2,25 (м, 6H), 2,19 (тдд, J=2,8, 5,6, 13,1 Гц, 2H), 1,70-1,57 (м, 5H).

Промежуточное соединение 7 (Пик 2): время удерживания = 1,16 мин (аналитический метод SFC). Выделение = 150 мг, выход 13%, ee 97%. ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 416,86; найдено 416,2.

Промежуточное соединение 8: Перфторфенил 7-хлор-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилат



Стадия 1: Синтез трет-бутил 4-(7-хлор-5-(метоксикарбонил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-2-ил)пиперидин-1-карбоксилата

В грушевидной колбе на 100 мл, снабженной холодильником, смесь метил 5-хлор-3,4-дигидрокси-2-метилбензоата (1,219 г, 5,58 ммоль), трифенилфосфина (146 мг, 0,558 ммоль) и трирутений додекакарбонила (178 мг, 0,279 ммоль) продували циклами азот/вакуум (4 цикла), затем добавляли толуол (12 мл), продували циклами азот/вакуум, затем перемешивали при 120°C в течение 30 мин. К темной смеси добавляли смесь трет-бутил 4-этинилпиперидин-1-карбоксилата (2,32 г, 11,1 ммоль) в толуоле (10 мл). Полученный оранжевый раствор дополнительно перемешивали в течение 2 ч при 120°C. Реакционную смесь упаривали при пониженном давлении, затем очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 100% этилацетата в гептане) с получением указанного соединения (2,33 г, выход 98%) в виде желтого масла. ЖХ-МС  $[M+Na]^+$  m/z: расщ. 448,2; найдено 448,2.

Стадия 2: Синтез метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (соль трифторуксусной кислоты)

К желтому раствору трет-бутил 4-[7-хлор-5-(метоксикарбонил)-2,4-диметил-2Н-1,3-бензодиоксол-2-ил]пиперидин-1-карбоксилата (2,33 г, 5,47 ммоль) в дихлорметане (2 мл) добавляли ТФА (1 мл). Через 30 мин реакционную смесь упаривали при пониженном давлении с получением указанного соединения (2,40 г, колич.) в виде смолы, которую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 326,79; найдено 326,2.

Стадия 3: Синтез метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

К раствору соли трифторуксусной кислоты метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(пиперидин-4-ил)-2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (2,40 г, 5,45 ммоль) в толуоле (20 мл) и ацетонитриле (10 мл) добавляли триэтиламин (8 мл, 57,6 ммоль) и 2,2,2-трифторэтил трифторметансульфонат (3,0 г, 12,9 ммоль). Через 3 ч реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Добавляли воду (50 мл) и смесь экстрагировали EtOAc (30 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (50 мл × 2),

сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении, затем очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 50% этилацетата в гептане) с получением указанного соединения (2,04 г, 92%) в виде желтоватого масла. ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 408,81; найдено 408,2.

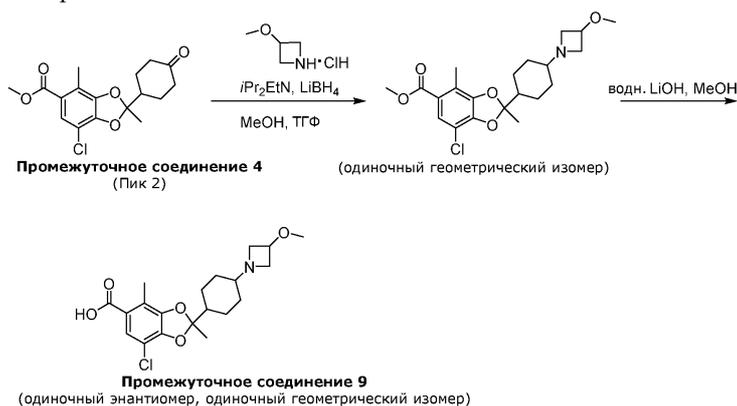
Стадия 4: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты

К раствору метил 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил]-2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (691 мг, 1,69 ммоль) в метаноле (3 мл) добавляли 6 М гидроксид натрия в воде (1 мл, 6,00 ммоль) и нагревали при 60°C. Через 25 мин реакционную смесь упаривали при пониженном давлении для удаления большей части метанола. Затем смесь разбавляли водой, охлаждали до 0°C, затем нейтрализовали до pH = 7 1 М соляной кислотой. Смесь экстрагировали дихлорметаном (3 раза), и объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали при пониженном давлении с получением указанного соединения в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 394,79; найдено 394,2.

Стадия 5: Синтез перфторфенил 7-хлор-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

К перемешиваемому раствору 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифторэтил) пиперидин-4-ил]-2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоновой кислоты (665 мг, 1,68 ммоль) в дихлорметане (5 мл) добавляли пиридин (1 мл, 12,4 ммоль) с последующим добавлением 2,3,4,5,6-пентафторфенил 2,2,2-трифторацетата (500 мкл, 2,90 ммоль). Через 20 мин реакционную смесь упаривали при пониженном давлении с получением указанного соединения, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 560,84; найдено 560,2.

Промежуточное соединение 9: 7-Хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновая кислота



Стадия 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

Раствор 3-метоксиазетидин гидрохлорида (8 г, 64,75 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (12 мл, 68,9 ммоль) в метаноле (30 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин перед добавлением другого раствора метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (Промежуточное соединение 4 - Пик 2) (4,1 г, 12,10 ммоль) в тетрагидрофуране (30 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем охлаждали до -70°C. Добавляли боргидрид лития (500 мг, 22,96 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при -70°C в течение 30 мин [или до полного расходования исходного материала, наблюдаемого с помощью ТСХ, этилацетат/метанол 5:1]. Затем две загрузки реакции объединяли и гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония (120 мл) при 0°C, и желаемый продукт экстрагировали дихлорметаном (200 мл × 3). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 0 до 14% метанола в дихлорметане) с получением указанного соединения (8,05 г, выход 67%, степень чистоты 83%) в виде светло-желтого масла. Образец (50 мг) дополнительно очищали препаративной тонкослойной хроматографией (силикагель, этилацетат:метанол 15:1). ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 410,2; найдено 410,1. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Метанол-d<sub>4</sub>) δ 7,39 (с, 1H), 3,95-3,91 (м, 1H), 3,73 (с, 3H), 3,59-3,51 (м, 2H), 3,16 (с, 3H), 2,97 (ш дд, J=6,4, 8,0 Гц, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,11-2,02 (м, 1H), 1,91-1,73 (м, 5H), 1,54 (с, 3H), 1,22-1,12 (м, 2H), 0,98-0,86 (м, 2H).

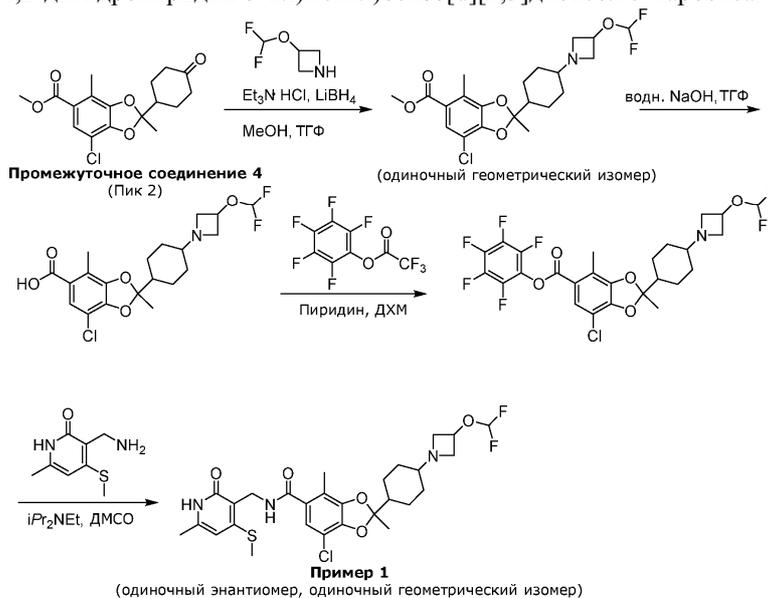
Стадия 2: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты

К раствору метил 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (4 г, 9,75 ммоль) в метаноле (48 мл) добавляли раствор гидрата гидроксида лития (4,03 г, 96,06 ммоль) в воде (12 мл). Реакционную смесь перемешивали при

70°C в течение 2 ч, затем две загрузки объединяли и упаривали при пониженном давлении. Добавляли воду (50 мл) и доводили pH до 6 насыщенным водным раствором лимонной кислоты при 0°C. Желаемый продукт экстрагировали смесью дихлорметана и изопропанола (3:1) (300 мл × 5). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (6,1 г, неочищенное) в виде сероватого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расч. 396,2; найдено 396,1.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ 7,07 (с, 1H), 4,05-4,10 (м, 2H), 3,76-3,88 (м, 1H), 3,67 (ш дд, J=10, 3,6 Гц, 2H), 3,22 (с, 3H), 2,71-2,81 (м, 1H), 2,19 (с, 3H), 1,91-1,99 (м, 4H), 1,75-1,85 (м, 1H), 1,52 (с, 3H), 1,18-1,28 (м, 2H), 1,06-1,14 (м, 2H).

Пример 1. 7-Хлор-2-(4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



Стадия 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

Раствор метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (Промежуточное соединение 4 - Пик 2) (224 мг, 0,661 ммоль), 3-(дифторметокси)азетидина (336 мг, 2,72 ммоль) и триэтиламин гидрохлорида (373 мг, 2,71 ммоль) в смеси метанола (2 мл) и тетрагидрофурана (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч, затем охлаждали до -78°C. По каплям добавляли раствор боргидрида лития в тетрагидрофуране (2 М, 500 мкл, 1 ммоль) при -78°C, после чего реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры в течение 15 мин. Затем смесь охлаждали до 0°C, затем гасили насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия, разбавляли дихлорметаном и нагревали до комнатной температуры. Желаемый продукт экстрагировали из водного слоя дихлорметаном (трижды), и объединенные органические слои сушили с использованием гидрофобного фильтра и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 10 до 100% этилацетата в гептане, затем от 0 до 100% этанола в этилацетате) с получением одного геометрического изомера (цис или транс) указанного соединения (205 мг, выход 70%). ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расч. 445,9; найдено 446,2.

Стадия 2: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты

К раствору метил 7-хлор-2-(4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (205 мг, 0,460 ммоль) в метаноле (3 мл) добавляли раствор гидроксида натрия в воде (6 М, 1 мл, 6,00 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 20 мин, затем разбавляли водой, охлаждали до 0°C, подкисляли до pH=2 1 М соляной кислотой и затем нейтрализовали до pH=7 1 М водным раствором гидроксида натрия. Желаемый продукт экстрагировали дихлорметаном (трижды), сушили с использованием гидрофобного фильтра и упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (176 мг, выход 89%) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расч. 431,9; найдено 432,2.

Стадия 3: Синтез перфторфенил 7-хлор-2-((1r,4R)-4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

К раствору 7-хлор-2-(4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты (176 мг, 0,408 ммоль) в дихлорметане (0,5 мл) добавляли пири-

дин (1,0 мл, 12,4 ммоль) с последующим добавлением 2,3,4,5,6-пентафторфенил 2,2,2-трифторацетата (150 мкл, 0,871 ммоль) при комнатной температуре. Через 20 мин реакционную смесь упаривали досуха при пониженном давлении с получением смеси указанного соединения (100% теоретический выход = 243 мг) и побочных продуктов. Неочищенную смесь использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 597,91; найдено 598,2.

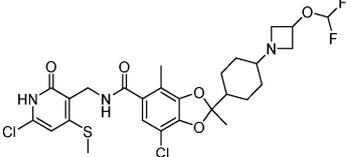
Стадия 4: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамида

К раствору перфторфенил 7-хлор-2-(4-(3-(дифторметокси)азетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата ( $\leq 243$  мг,  $\leq 0,406$  ммоль) в диметилсульфоксиде (1 мл) добавляли 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-он (гидрохлоридная соль) (Промежуточное соединение 1) (222 мг, 1,20 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (0,30 мл, 1,71 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 1 ч, затем упаривали досуха в сильном токе азота в течение ночи.

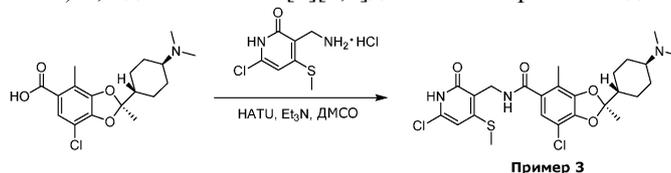
Остаток дважды очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией (колонка C18, градиент от 0 до 100% ацетонитрила в воде с 0,1% трифторуксусной кислоты). Остаток разбавляли дихлорметаном и насыщенным раствором гидрокарбоната натрия. Водный слой промывали дихлорметаном. Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и упаривали при пониженном давлении с получением указанного соединения (166 мг, выход 68% за две стадии) в виде одного геометрического изомера (цис или транс). ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 598,1; найдено 598,3.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  6,88 (с, 1H), 6,26 (с, 1H), 6,38 (т,  $J=74,3$  Гц, 2H), 4,71 (quin,  $J=6,0$  Гц, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,69-3,60 (м, 2H), 3,18-3,11 (м, 2H), 2,52 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 2,18 (с, 3H), 2,10 (tt,  $J=3,5, 11,2$  Гц, 1H), 1,98-1,86 (м, 4H), 1,85-1,78 (м, 1H), 1,60 (с, 3H), 1,32-1,21 (м, 2H), 1,06-0,92 (м, 2H).

Таблица 1. Следующее соединение получали аналогично примеру 1 с использованием соответствующего исходного материала

| Пример | Структура   | Аналитические данные   |
|--------|---|--|
| 2      |  <p>(одиночный энантиомер, одиночный геометрический изомер)<br/>Полученный из Промежуточного соединения 3 и Промежуточного соединения 4 (Пик 2)</p> | ЖХ-МС $[M+H]^+$ m/z:<br>расщ. 618,1; найдено 618,1. $^1\text{H}$ ЯМР (400 МГц, Хлороформ- $d$ ) $\delta$ 6,91 - 6,88 (м, 1H), 6,58 (т, $J = 5,4$ Гц, 1H), 6,53 (с, 1H), 6,39 - 5,97 (м, 2H), 3,80 (д, $J = 7,3$ Гц, 2H), 3,14 (д, $J = 6,4$ Гц, 2H), 2,53 - 2,49 (м, 3H), 2,26 (с, 3H), 2,13 (ш. с., 1H), 1,99 - 1,78 (м, 5H), 1,60 (с, 3H), 1,45 (д, $J = 3,4$ Гц, 1H), 1,28 - 1,18 (м, 2H), 1,15 - 1,01 (м, 2H). |

Пример 3. (R)-7-Хлор-N-((6-хлор-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(транс-4-(диметиламино)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

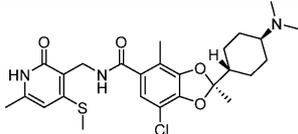
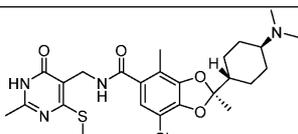


К раствору (R)-7-хлор-2-(транс-4-(диметиламино)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты (полученной по методике, описанной в патентной заявке US 2017/0073335 A1) (48 мг, 0,1356 ммоль) в диметилсульфоксиде (0,5 мл), добавляли триэтиламин (56,6 мкл, 0,407 ммоль) и O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруний гексафторфосфат (41,2 мг, 0,108 ммоль) при комнатной температуре. Поскольку образование активированного сложного эфира было неполным по данным ЖХ-МС ( $[M+H]^+$  m/z: 368,2) через 5 мин, дважды добавляли дополнительное количество O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруний гексафторфосфата (16 мг, 0,042 ммоль) в диметилсульфоксиде (1 мл). После завершения активации кислоты добавляли суспензию 3-(аминометил)-6-хлор-4-(метилсульфанил)-1,2-дигидропиридин-2-он гидрохлорида (65,3 мг, 0,271 ммоль) и триэтиламина (56,6 мкл, 0,407 ммоль) в диметилсульфоксиде (0,5 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь на-

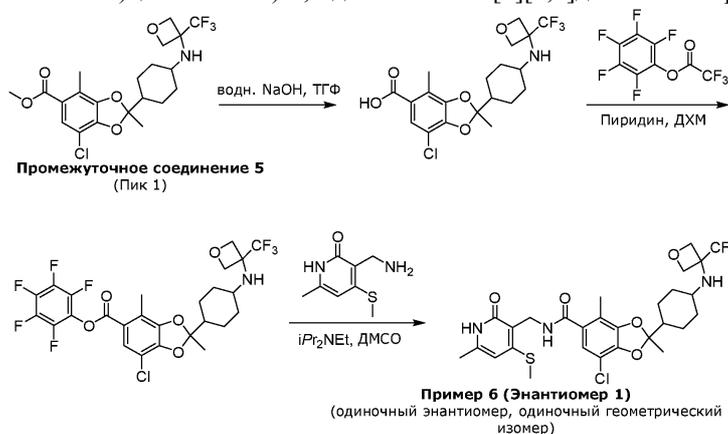
гревали при 60°C в течение 45 мин, затем разбавляли дихлорметаном и водой. Органический слой сушили с использованием гидрофобного фильтра и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией [колонка с силикагелем KP-NH, градиент от 0 до 100% этилацетата в гептане, затем от 0 до 100% этанола в дихлорметане, затем от 0 до 100% метанола (с 20% гидроксидом аммония) в этилацетате] с получением указанного соединения (30 мг, выход 41%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 540,5; найдено 540,2.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ 6,89 (с, 1H), 6,68 (с, 1H), 4,50 (с, 2H), 3,20 (тт, J=3,2, 11,9 Гц, 1H), 2,83 (с, 6H), 2,53 (с, 3H), 2,18 (с, 3H), 2,16-2,08 (м, 4H), 2,02-1,94 (м, 1H), 1,62 (с, 3H), 1,54 (дк, J=3,4, 12,4 Гц, 2H), 1,47-1,37 (м, 2H).

Таблица 2. Следующие соединения получали аналогично примеру 3 с использованием соответствующего исходного материала

| Пример | Структура  | Аналитические данные  |
|--------|--|---|
| 4      |  <p>(R энантиомер; транс геометрический изомер)<br/>Полученный из Промежуточного соединения 1</p>   | ЖХ-МС [M+H] <sup>+</sup> m/z: рассч. 520,2; найдено 520,3. <sup>1</sup> H ЯМР (400 МГц, Диметилсульфоксид-d <sub>6</sub> ) δ 11,52 (шир. С., 1H), 8,00 (т, J = 4,4 Гц, 1H), 6,85 (с, 1H), 6,08 (с, 1H), 4,27 (д, J = 4,4 Гц, 2H), 3,57 (с, 1H), 2,45 (с, 3H), 2,17 (с, 3H), 2,14 (с, 9H), 1,92 - 1,77 (м, 5H), 1,60 (с, 3H), 1,15 (т, J = 9,0 Гц, 4H) |
| 5      |  <p>(R энантиомер; транс геометрический изомер)<br/>Полученный из Промежуточного соединения 2</p> | ЖХ-МС [M+H] <sup>+</sup> m/z: рассч. 521,2; найдено 521,2. ЯМР (400 МГц, Диметилсульфоксид-d <sub>6</sub> ) δ 12,60 - 12,19 (м, 2H), 8,05 (т, J = 4,4 Гц, 1H), 6,87 (с, 1H), 4,21 (д, J = 4,4 Гц, 2H), 2,47 (с, 3H), 2,29 (с, 2H), 2,19 - 2,12 (м, 9H), 2,09 (ш.с., 1H), 1,94 - 1,76 (м, 5H), 1,60 (с, 3H), 1,15 (т, J = 9,5 Гц, 4H)                  |

Пример 6 (Энантиомер 1). 7-Хлор-N-((6-хлор-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(4-(диметиламино)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



Стадия 1: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-((3-(трифторметил)оксетан-3-ил)амино)циклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты

К раствору метил 7-хлор-2,4-диметил-2-[4-{{3-(трифторметил)оксетан-3-ил}амино}циклогексил]-

2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (Промежуточное соединение 5 - Пик 1) (81 мг, 0,174 ммоль) в метаноле (1 мл) добавляли гидроксид натрия (72 мг, 1,79 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 20 мин, охлаждали до 0°C и затем подкисляли до pH=2 1 М соляной кислотой. Затем желаемый продукт экстрагировали дихлорметаном (трижды), и объединенные органические слои сушили с использованием гидрофобного фильтра. Фильтрат упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (70 мг, выход 89%) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 450,1; найдено 450,2.

Стадия 2: Синтез перфторфенил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-((3-(трифторметил)оксетан-3-ил)амино)циклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

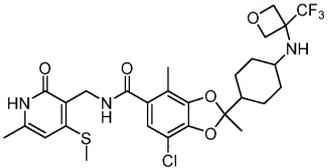
К раствору 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-((3-(трифторметил)оксетан-3-ил)амино)циклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты (70 мг, 155 мкмоль) в дихлорметане (0,5 мл) добавляли пиридин (24,9 мкл, 310 мкмоль) и 2,3,4,5,6-пентафторфенил 2,2,2-трифторацетат (39,8 мкл, 232 мкмоль) при комнатной температуре. Через 15 мин реакционную смесь упаривали при пониженном давлении с получением смеси указанного соединения и побочных продуктов (68 мг, неочищенное). Неочищенную смесь использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 616,1; найдено 616,2.

Стадия 3: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(4-((3-(трифторметил)оксетан-3-ил)амино)циклогексил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

К раствору 2,3,4,5,6-пентафторфенил 7-хлор-2,4-диметил-2-[4-{{3-(трифторметил)оксетан-3-ил}амино}циклогексил]-2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (≤68 мг, ≤110 мкмоль) в N,N-диметилформамиде (1 мл) добавляли 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилсульфанил)-1,2-дигидропиридин-2-он (свободное основание) (30,4 мг, 0,165 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (0,1 мл, 574 мкмоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 30 мин, затем непосредственно добавляли на колонку C18 для очистки обращенно-фазовой флэш-хроматографией (колонка C18, градиент от 5 до 50% ацетонитрила в воде с 0,1% трифторуксусной кислоты) с получением соли трифторуксусной кислоты указанного соединения. Соль растворяли в дихлорметане и органический слой промывали насыщенным водным раствором гидрокарбоната натрия. Наконец, органический слой упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (свободное основание) (42 мг, выход 62%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 616,19; найдено 616,3.

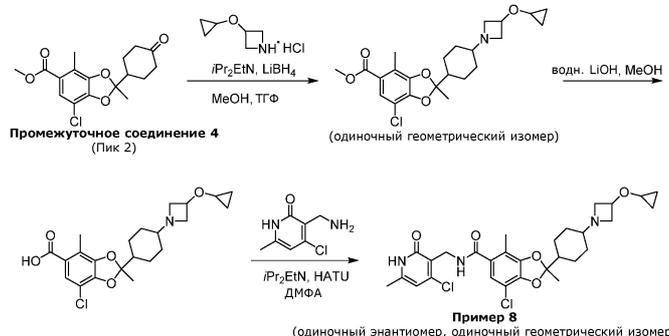
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 12,62-12,44 (м, 1H), 7,16 (т, J=5,1 Гц, 1H), 6,91 (с, 1H), 6,04 (с, 1H), 4,76 (с, 3H), 4,62-4,46 (м, 4H), 2,72-2,63 (м, 1H), 2,49 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 2,27 (с, 3H), 1,92 (д, J=5,9 Гц, 4H), 1,80 (шир. С, 1H), 1,60 (с, 3H), 1,36-1,10 (м, 6H).

Таблица 3. Следующие соединения получали аналогично примеру 6 с использованием соответствующего исходного материала

| Пример                 | Структура   | Аналитические данные  |
|------------------------|---|---|
| 6<br>(Энантиомер<br>2) |  <p>(одиночный энантиомер,<br/>одиночный геометрический<br/>изомер)</p> <p><i>Полученный из Промежуточного</i></p> | ЖХ-МС [M+H] <sup>+</sup> m/z: рассч.<br>616,19; найдено 616,3. <sup>1</sup> H<br>ЯМР (400 МГц,<br>Хлороформ-d) δ 12,45 -<br>12,30 (м, 1H), 7,14 (т, J = 5,4<br>Гц, 1H), 6,91 (с, 1H), 6,04 (с,<br>1H), 4,75 (д, J = 7,3 Гц, 2H),<br>4,61 (с, 2H), 4,55 - 4,51 (м,<br>2H), 2,68 (т, J = 9,5 Гц, 1H), |

|                     |   |   |
|---------------------|---|---|
|                     | соединения 1 и Промежуточного соединения 5 (Пик 2)  | 2,49 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 2,27 (с, 3H), 1,92 (д, $J = 6,4$ Гц, 4H), 1,83 (т, $J = 11,7$ Гц, 1H), 1,61 (с, 3H), 1,35 - 1,12 (м, 6H).   |
| 7<br>(Энантиомер 1) | <p>(единичный энантиомер, единичный геометрический изомер)<br/>Полученный из Промежуточного соединения 1 и Промежуточного соединения 7 (Пик 1)</p>          | ЖХ-МС $[M+H]^+$ m/z: расщ. 568,2; найдено 568,3. $^1H$ ЯМР (400 МГц, Метанол- $d_4$ ) $\delta$ 6,93 - 6,84 (м, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,67 (шир. Т, $J = 12,0$ Гц, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 2,26 - 2,19 (м, 1H), 2,18 (с, 3H), 2,02 - 1,81 (м, 5H), 1,61 (с, 3H), 1,34 - 1,21 (м, 2H), 1,13 - 1,00 (м, 2H). |
| 7<br>(Энантиомер 2) | <p>(единичный энантиомер, единичный геометрический изомер)<br/>Пометка: Полученный из Промежуточного соединения 1 и Промежуточного соединения 7 (Пик 2)</p> | ЖХ-МС $[M+H]^+$ m/z: расщ. 568,2; найдено 568,3. $^1H$ ЯМР (400 МГц, Метанол- $d_4$ ) $\delta$ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,49 (с, 2H), 3,61 (т, $J = 12,0$ Гц, 4H), 2,53 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 2,23 - 2,08 (м, 4H), 2,03 - 1,78 (м, 5H), 1,61 (с, 3H), 1,35 - 1,22 (м, 2H), 1,12 - 0,99 (м, 2H).                           |

Пример 8. 7-Хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



Стадия 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата

Раствор 3-(циклопропокси)азетидин гидрохлорида (1,9 г, 12,7 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (2,7 мл, 15,5 ммоль) в метаноле (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч перед добавлением другого раствора метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (Промежуточное соединение 4 - Пик 2) (860 мг, 2,54 ммоль) в тетрагидрофуране (30 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч, затем охлаждали до  $-70^\circ\text{C}$ . Добавляли боргидрид лития (120 мг, 5,51 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при  $-70^\circ\text{C}$  в течение 30 мин [или до полного расходования исходного материала, наблюдаемого с помощью ТСХ, этилацетат/метанол 5:1]. Затем реакцию гасили насыщенным водным раствором хлорида аммония (100 мл) и желаемый продукт экстрагировали этилацетатом (50 мл  $\times$  2). Объединенные органические слои промывали соевым раствором (30 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент от 50 до 100% этилацетата в петролейном эфире) с получением указанного соединения (760 мг, выход 65%, степень чистоты 95%) в виде желтого масла. ЖХ-МС  $[M+H]^+$  m/z: расщ. 436,1; найдено 436,0.

Стадия 2: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты

К раствору метил 7-хлор-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксилата (760 мг, 1,74 ммоль) в метаноле (15 мл) и воде (3 мл) добавляли гидрат гидроксида лития (962 мг, 22,93 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при  $70^\circ\text{C}$  в течение 15 ч, за-

тем упаривали при пониженном давлении.

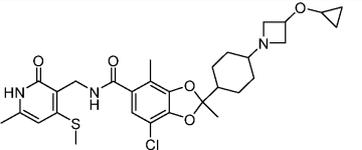
Добавляли воду (15 мл) и доводили pH до 6 насыщенным водным раствором лимонной кислоты при 0°C. Желаемый продукт экстрагировали смесью дихлорметана и изопропанола (10:1) (30 мл × 3). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (150 мл × 2), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали досуха при пониженном давлении с получением указанного соединения (720 мг, неочищенное) в виде желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 422,1; найдено 422,0.

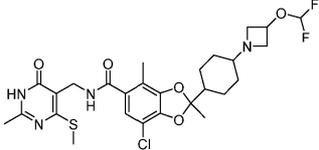
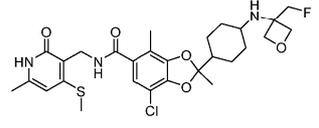
Стадия 3: Синтез 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамида

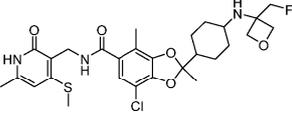
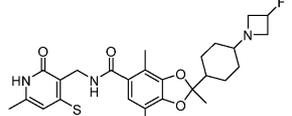
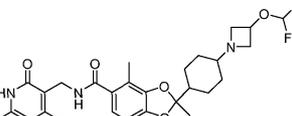
К раствору 7-хлор-2-[4-[3-(циклопропокси)азетидин-1-ил]циклогексил]-2,4-диметил-1,3-бензодиоксол-5-карбоновой кислоты (360 мг, 0,853 ммоль) в N,N-диметилформамиде (4 мл) добавляли O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруний гексафторфосфат (500 мг, 1,31 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (1 мл, 5,74 ммоль). Смесь перемешивали при 15°C в течение 30 мин перед добавлением 3-(аминометил)-4-хлор-6-метил-1H-пиридин-2-он гидрохлорида (Промежуточное соединение 6) (250 мг, 1,2 ммоль). Реакционную смесь дополнительно перемешивали при 15°C в течение 4 ч, затем фильтровали. Фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ [Колонка: Waters Xbridge (150 мм × 25 мм, 5 мкм). Подвижная фаза А: вода (0,05% об/об гидроксида аммония/Подвижная фаза В: ацетонитрил. Градиент (от 65 до 55% подвижной фазы А/от 35 до 65% подвижной фазы В, в течение 9,5 мин). Температура колонки: 30°C] с получением указанного соединения (209 мг, выход 42%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: рассч. 576,2; найдено 576,2.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ 6,90 (с, 1H), 6,30 (с, 1H), 4,52 (с, 2H), 4,22 (quin, J=6,0 Гц, 1H), 3,61 (дд, J=6,4, 8,6 Гц, 2H), 3,31-3,25 (м, 1H), 2,99 (дд, J=6,3, 8,4 Гц, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 2,12-2,04 (м, 1H), 1,99-1,85 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,33-1,24 (м, 2H), 1,06-0,95 (м, 2H), 0,56-0,51 (м, 2H), 0,51-0,44 (м, 2H).

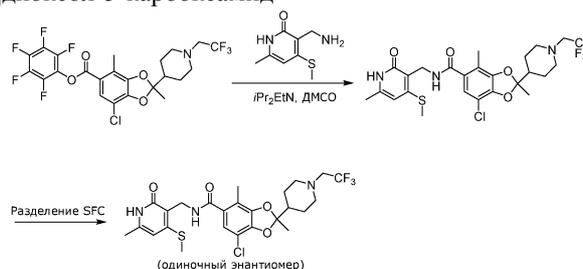
Таблица 4. Следующие соединения получали аналогично примеру 8 с использованием соответствующего исходного материала

| Пример | Структура   | Аналитические данные  |
|--------|---|---|
| 9      |  | ЖХ-МС [M+H] <sup>+</sup> m/z: рассч. 588,2; найдено 588,2. <sup>1</sup> H ЯМР (400 МГц, Метанол-d <sub>4</sub> ) δ 6,91 (с, 1H), 6,29 (с, |

|    |  |  |
|----|--|--|
|    | (одинокный энантиомер, одиночный геометрический изомер)<br><i>Полученный из Промежуточного соединения 1 и Промежуточного соединения 4 (Пик 2)</i>  | 1H), 4,53 (с, 2H), 4,26 - 4,17 (м, 1H), 3,69 - 3,59 (м, 2H), 3,30 - 3,24 (м, 1H), 3,06 - 2,94 (м, 2H), 2,54 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 2,10 - 2,02 (м, 1H), 1,99 - 1,80 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,35 - 1,18 (м, 2H), 1,08 - 0,93 (м, 2H), 0,58 - 0,50 (м, 2H), 0,50 - 0,42 (м, 2H).   |
| 10 | <br>(одинокный энантиомер, одиночный геометрический изомер)<br><i>Полученный из Промежуточного соединения 2 и Промежуточного соединения 4 (Пик 2)</i> | ЖХ-МС [M+H] <sup>+</sup> m/z: расщ. 599,2; найдено 599,1. <sup>1</sup> H ЯМР (400 МГц, Метанол-d <sub>4</sub> ) δ 6,92 (с, 1H), 6,40 (т, J = 76 Гц, 1H), 4,73 (т, J = 8 Гц, 1H), 4,43 (с, 2H), 3,68 - 3,64 (м, 2H), 3,18 - 3,14 (м, 2H), 2,57 (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 2,14 - 2,09 (м, 1H), 1,97 - 1,83 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,32 - 1,23 (м, 2H), 1,05 - 0,95 (м, 2H). |
| 11 | <br>(геометрический изомер 1)<br><i>Полученный из Промежуточного соединения 1 и Промежуточного соединения 4 (Пик 2)</i>                              | ЖХ-МС [M+H] <sup>+</sup> m/z: расщ. 580,2; найдено 580,2. <sup>1</sup> H ЯМР (400 МГц, Метанол-d <sub>4</sub> ) δ 6,91 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 4,82 - 4,79 (м, 1H), 4,68 (с, 1H), 4,55 (дд, J = 4,0, 6,4 Гц, 2H), 4,52 - 4,46 (м, 4H), 2,63 (шир. Т, J = 10,8 Гц, 1H), 2,55 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 1,94 (широкий д, J = 13,2 Гц, 2H), 1,89 - 1,80 (м, 3H),              |

|    |  |  |
|----|--|--|
|    |  | 1,62 (с, 3H), 1,31 (кв, $J = 12,0$ Гц, 2H), 1,25 - 1,15 (м, 2H).   |
| 11 |  <p>(геометрический изомер 2)<br/>Полученный из Промежуточного соединения 1 и Промежуточного соединения 4 (Пик 2)</p>                                 | ЖХ-МС $[M+H]^+$ m/z: расч. 580,2; найдено 580,1. $^1H$ ЯМР (400 МГц, Метанол- $d_4$ ) $\delta$ 6,91 (с, 1H), 6,30 (с, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,63 (с, 1H), 4,62 - 4,59 (м, 2H), 4,52 - 4,47 (м, 4H), 3,06 (шир. С, 1H), 2,55 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,22 (с, 3H), 1,91 (шир. Д, $J = 10,4$ Гц, 1H), 1,68 (шир. С, $J = 8,4$ Гц, 4H), 1,65 (с, 5H), 1,61 (шир. С, 1H), 1,57 (шир. С, 1H). |
| 12 |  <p>(одиночный энантиомер, одиночный геометрический изомер)<br/>Полученный из Промежуточного соединения 1 и Промежуточного соединения 4 (Пик 2)</p>   | ЖХ-МС $[M+H]^+$ m/z: расч. 572,2; найдено 571,9. $^1H$ ЯМР (400 МГц, Метанол- $d_4$ ) $\delta$ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,96 - 5,23 (м, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,54 - 3,69 (м, 2H), 3,18 - 3,30 (м, 2H), 2,52 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,06 - 2,15 (м, 1H), 1,80 - 1,98 (м, 5H), 1,61 (с, 3H), 1,19 - 1,32 (м, 2H), 0,93 - 1,05 (м, 2H).                                  |
| 13 |  <p>(одиночный энантиомер, одиночный геометрический изомер)<br/>Полученный из Промежуточного соединения 6 и Промежуточного соединения 4 (Пик 2)</p> | ЖХ-МС $[M+H]^+$ m/z: расч. 586,2; найдено 586,1. $^1H$ ЯМР (400 МГц, Метанол- $d_4$ ) $\delta$ 6,90 (с, 1H), 6,40 (т, $J = 76$ Гц, 1H), 6,30 (с, 1H),  |
|    |  | 4,73 (т, $J = 8$ Гц, 1H), 4,53 (с, 2H), 3,68 - 3,64 (м, 2H), 3,18 - 3,14 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 2,15 - 2,08 (м, 1H), 1,97 - 1,83 (м, 5H), 1,63 (с, 3H), 1,35 - 1,23 (м, 2H), 1,05 - 0,90 (м, 2H).  |

Пример 14. (R)-7-Хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиперидин-3-ил)метил)-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид и (S)-7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиперидин-3-ил)метил)-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



Стадия 1: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиперидин-3-ил)метил)-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид  
К раствору 2,3,4,5,6-пентафторфенил 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил]-

2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (Промежуточное соединение 8) (752 мг, 1,34 ммоль) в диметилсульфоксиде (4 мл) добавляли 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилсульфанил)-1,2-дигидропиридин-2-он (Промежуточное соединение 1) (740 мг, 4,02 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (932 мкл, 5,36 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C и через 1 ч добавляли на колонку C18 для очистки. Желаемый продукт очищали дважды обращенно-фазовой флэш-хроматографией (колонка C18, градиент от 0 до 100% ацетонитрила в воде с 0,1% трифторуксусной кислоты) с получением указанного соединения (289 мг, выход 38%) в виде рацемической смеси в виде смолы.

Стадия 2: Разделение (R)-7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид и (S)-7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

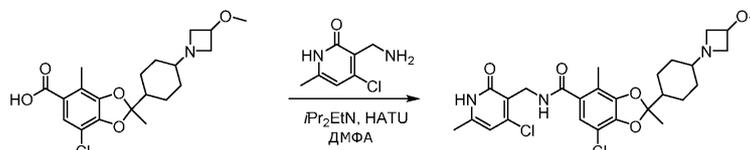
Рацемическую смесь 7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид (289 мг) разделяли препаративной SFC [Колонка: ChromegaChiral CC4 от ES Industries (250 мм × 20 мм внутренний диаметр). Подвижная фаза А: CO<sub>2</sub>/Подвижная фаза В: 0,25% изопропиламина в метаноле. Изократический (55% подвижной фазы А и 45% подвижной фазы В). Скорость потока: 80 г/мин. Температура колонки: 25°C]. Аналитический метод SFC: Колонка: Chiralcel OX-H от Chiral Technologies (100 мм × 4,6 мм внутренний диаметр). Подвижная фаза А: CO<sub>2</sub>/Подвижная фаза В: 0,1% изопропиламина в метаноле. Изократический (75% подвижной фазы А и 25% подвижной фазы В). Скорость потока: 4 мл/мин. Температура колонки: 40°C. Пример 16 (Энантиомер 1) (желаемый энантиомер/эутомер): Время удерживания = 3,74 мин (аналитический метод SFC). Выделение = 90 мг, выход 12%, ee 99% (желтое твердое вещество). ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 560,2; найдено 560,2.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,49 (с, 2H), 3,08-2,98 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,34 (шир. Т, J=11,0 Гц, 2H), 2,29 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 1,93-1,84 (м, 1H), 1,83-1,76 (м, 2H), 1,62 (с, 3H), 1,60 - 1,47 (м, 2H).

Пример 16 (Энантиомер 2) (нежелательный энантиомер/дистомер): Время удерживания = 4,25 мин (аналитический метод SFC). Выделение = 101 мг, выход 13%, ee 98% (желтое твердое вещество). ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 560,2; найдено 560,2.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,49 (с, 2H), 3,08-2,98 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,34 (шир. Т, J=11,0 Гц, 2H), 2,29 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 1,93-1,84 (м, 1H), 1,83-1,76 (м, 2H), 1,62 (с, 3H), 1,60-1,47 (м, 2H).

Пример 15. 7-Хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

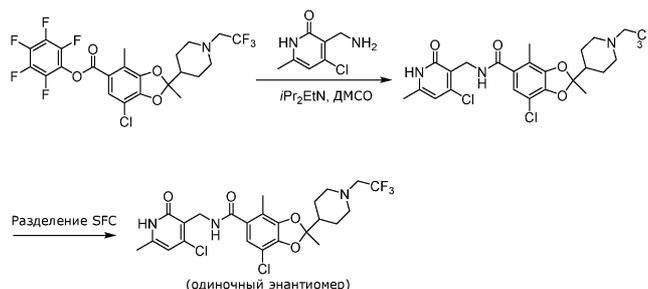


Промежуточное соединение 9 (одиночный энантиомер, одиночный геометрический изомер) (одиночный энантиомер, одиночный геометрический изомер)

К раствору 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты (900 мг, 2,27 ммоль) в N,N-диметилформамиде (5 мл) добавляли O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий гексафторфосфат (1,04 г, 2,73 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (2,38 мл, 13,6 ммоль). Смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин перед добавлением 3-(аминометил)-4-хлор-6-метил-1Н-пиридин-2-он гидрохлорида (Промежуточное соединение 6) (710 мг, 3,4 ммоль). Реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч, затем фильтровали. Фильтрат дважды очищали препаративной ВЭЖХ [Колонка: YMC-Actus Triart C18 (100 мм × 30 мм, 5 мкм). Подвижная фаза А: вода (0,05% соляной кислоты)/Подвижная фаза В: ацетонитрил. Градиент (от 85 до 55% подвижной фазы А/от 15 до 45% подвижной фазы В, в течение 10 мин). Температура колонки: 30°C и Колонка: Xtimate C18 (150 мм × 25 мм, 5 мкм). Подвижная фаза А: вода (0,05% об/об гидроксида аммония)/Подвижная фаза В: ацетонитрил. Градиент (от 69 до 39% подвижной фазы А/от 31 до 61% подвижной фазы В, в течение 7 мин). Температура колонки: 30°C] с получением указанного соединения (533 мг, выход 43%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 550,2; найдено 550,1.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 11,97 (широкий, 1H), 7,06-7,03 (м, 1H), 6,88 (с, 1H), 6,19 (с, 1H), 4,65 (д, J=6,0 Гц, 2H), 4,05-4,01 (м, 1H), 3,66-3,62 (м, 2H), 3,25 (с, 3H), 2,93-2,90 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,25 (с, 3H), 1,93-1,81 (м, 6H), 1,60 (с, 3H), 1,25-1,02 (м, 4H).

Пример 16. (R)-7-Хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид и (S)-7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



Стадия 1: Синтез 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

К раствору 2,3,4,5,6-пентафторфенил 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил]-2Н-1,3-бензодиоксол-5-карбоксилата (Промежуточное соединение 8) (188 мг, 0,3358 ммоль) в диметилсульфоксиде (1 мл) добавляли 3-(аминометил)-4-хлор-6-метил-1,2-дигидропиридин-2-он гидрохлорид (Промежуточное соединение 6) (70,2 мг, 0,336 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (233 мкл, 1,34 ммоль).

Реакционную смесь нагревали при 60°C и через 1 ч добавляли на колонку C18 для очистки. Желаемый продукт очищали дважды обращенно-фазовой флэш-хроматографией (колонка C18, градиент от 0 до 100% ацетонитрила в воде с 0,1% трифторуксусной кислоты) с получением указанного соединения (180 мг, выход 98%) в виде рацемической смеси в виде смолы.

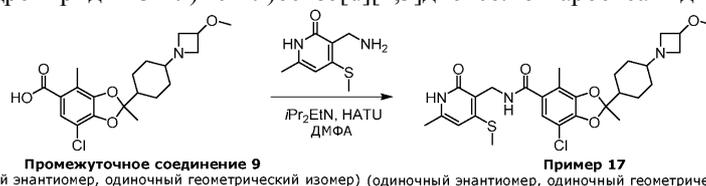
Стадия 2: Разделение (R)-7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид и (S)-7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

Рацемическую смесь 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифторэтил)пиперидин-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид (180 мг) разделяли препаративной SFC [Колонка: ChromegaChiral CC4 от ES Industries (250 мм × 20 мм внутренний диаметр). Подвижная фаза А: CO<sub>2</sub>/Подвижная фаза В: 0,25% изопропиламина в метаноле. Изократический (65% подвижной фазы А и 35% подвижной фазы В). Скорость потока: 80 г/мин. Температура колонки: 25°C].

Аналитический метод SFC: Колонка: Chiralcel OZ-H от Chiral Technologies (100 мм × 4,6 мм внутренний диаметр, 5 мкм). Подвижная фаза А: CO<sub>2</sub>/Подвижная фаза В: 0,1% изопропиламина в метаноле. Изократический (65% подвижной фазы А и 35% подвижной фазы В). Скорость потока: 4 мл/мин. Температура колонки: 40°C. Пример 17 (Энантиомер 1) (желаемый энантиомер/эутомер): Время удерживания = 0,73 мин (аналитический метод SFC). Выделение = 61 мг, выход 33%, ee 100% (желтое твердое вещество). Пример 17 (Энантиомер 2) (нежелательный энантиомер/дистомер): Время удерживания = 0,98 мин (аналитический метод SFC). Выделение = 63 мг, выход 34%, ee 97% (желтое твердое вещество). ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 548,1; найдено 548,2.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub>) δ 6,89 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 4,52 (с, 2H), 3,04 (кв, J=9,8 Гц, 4H), 2,35 (шир. Т, J=11,0 Гц, Н), 2,27 (с, 3H), 2,19 (с, 3H), 1,95-1,85 (м, 1H), 1,85-1,75 (м, 2H), 1,63 (с, 3H), 1,62-1,50 (м, 2H).

Пример 17. 7-Хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтио)-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-ил)метил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



К раствору 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-ил)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновой кислоты (Промежуточное соединение 9 - одиночный энантиомер и геометрический изомер) (5 г, 12,63 ммоль) в N,N-диметилформамиде (50 мл) добавляли O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний гексафторфосфат (5,7 г, 14,99 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (11 мл, 63,15 ммоль). Смесь перемешивали при 20°C в течение 30 мин перед добавлением 3-(аминометил)-6-метил-4-(метилтио)пиридин-2(1H)-он гидрохлорида (Промежуточное соединение 1) (4,2 г, 19,03 ммоль). Реакционную смесь дополнительно перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч, затем фильтровали. Фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ [Колонка: Phenomenex Gemini C18 (250 мм × 50 мм, 10 мкм). Подвижная фаза А: вода (0,04% об/об гидроксида аммония и 10 мМ гидрокарбоната аммония)/Подвижная фаза В: ацетонитрил. Градиент (от 75 до 44% подвижной фазы А/от 25 до 56% подвижной фазы В, в течение 23 мин). Температура колонки: 30°C] с получением указанного соединения (4,4 г, выход 60%, степень чистоты 96%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС [M+H]<sup>+</sup> m/z: расщ. 562,2;

найдено 562,2.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, метанол- $d_4$ )  $\delta$  6,91 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 4,50 (с, 2H), 4,01 (quin, J=6 Гц, 1H), 3,58 (дд, J=8,8, 6,4 Гц, 2H), 3,26 (с, 3H), 2,92-3,02 (м, 2H), 2,54 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 2,01-2,11 (м, 1H), 1,79-2,00 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,19-1,34 (м, 2H), 0,91-1,08 (м, 2H).

#### Анализы EZH2

##### Измерения $\text{IC}_{50}$ для ингибиторов с использованием EZH2

Биохимический анализ EZH2 ( $\text{IC}_{50}$ ): Эффективность соединений оценивали путем включения  $^3\text{H}$ -SAM в биотинилированный пептид H3. В частности, 30 пМ PRC2, содержащего EZH2 дикого типа (пентамерный комплекс, полученный в компании), предварительно инкубировали с 450 нМ SAM, 450 нМ  $^3\text{H}$ -SAM, 2 мкМ активирующего пептида H3K27me3 ( $\text{H}_2\text{N-RKQLATKAAR(Kme3)SAPATGGVKKP}$ -амид) и соединением (в виде 10-точечного двукратного титрования реакции на дозу в ДМСО, конечный анализ 0,8% ДМСО (об/об)) в течение 3-5 ч в 50 мМ Трис (рН 8,5), 1 мМ DTT, 0,07 мМ Brij-35, 0,1% БСА и 0,8% ДМСО в общем объеме 12,5 мкл. Реакцию инициировали биотинилированным субстратным пептидом H3 ( $\text{H}_2\text{N-RKQLATKAAR(Kme1)SAPATGGVKKP-NTPEGBiot}$ ) в виде 2 мкМ исходного раствора в 12,5 мкл буфера и оставляли для реакции при комнатной температуре в течение 18-22 ч. Гашение осуществляли добавлением 20 мкл СТОП раствора (50 мМ Трис (рН 8,5), 200 мМ ЭДТА, 2 мМ SAH). 35 мкл погашенного раствора переносили на планшеты FlashPlates, покрытые стрептавидином (PerkinElmer), инкубировали 1-2 ч, промывали и считывали на планшет-ридере TopCount (PerkinElmer).  $\text{IC}_{50}$  рассчитывали в Genedata Screener с использованием нелинейного подбора по четырем параметрам методом наименьших квадратов, где четырьмя параметрами были  $\text{IC}_{50}$ , наклон Хилла, исходный уровень до перехода (0% INH) и исходный уровень после перехода (100% INH).

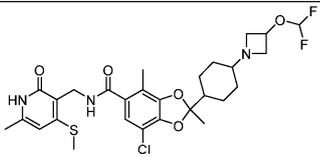
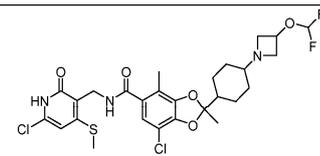
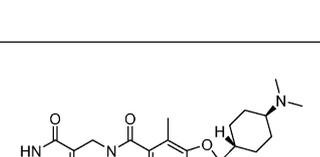
##### Измерения $\text{EC}_{50}$ для ингибиторов в анализах клеток HeLa

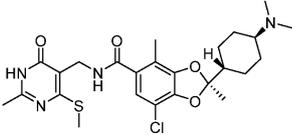
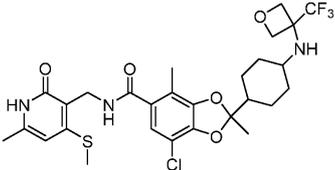
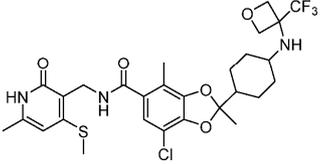
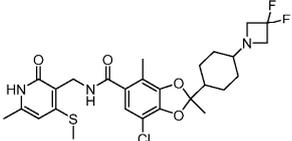
Анализ H3K27me3 Alpha Hela (AlphaLISA). Десять различных доз каждого тестируемого соединения (в серии 3-кратных разведений) помещали в двух экземплярах в 384-луночные планшеты, обработанные культурой ткани (№ по каталогу 6007680; Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Клетки Hela, выращенные в культуре, обрабатывали трипсином и подсчитывали с помощью счетчика клеток Countess® (№ по каталогу C10281; Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк). Клетки разбавляли до 67000 клеток на мл в 10% DMEM (Каталожный № 10569-010 Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) и 15 мкл (1000 клеток) с использованием дозатора Biotek MicroFlo™ Select (BioTek Instruments, Inc., Вермонт, США) наносили в каждую лунку 384-луночного планшета. Планшеты инкубировали при 37°C/5%  $\text{CO}_2$  в течение 72 ч. Одну из дублирующих пластин использовали для анализа HeLa, а вторую использовали для анализа жизнеспособности. 5 мкл буфера для лизиса клеток-гистонов (1X) (№ по каталогу AL009F1 Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс) на лунку добавляли на планшет, обработанный для AlphaLISA, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин на шейкере для планшетов с низкой скоростью (модель № 4625-Q Thermo Scientific; Уолтем, Массачусетс). Затем добавляли 10 мкл на лунку буфера для экстракции гистонов (№ по каталогу AL009F2; Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс) и планшет дополнительно инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин на шейкере для планшетов с низкой скоростью. Затем в каждую лунку добавляли 10 мкл 5-кратной смеси акцепторных гранул анти-K27me3 плюс биотинилированное антитело против гистона H3 (C-ter) (разведенное до конечной концентрации 3 нМ) (№ по каталогу AL118 Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс). Разбавление акцепторных гранул и антигистона H3 проводили в буфере для обнаружения гистонов 1X (№ по каталогу AL009F3 Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс), который получали разбавлением предоставленного 10X исходного раствора. Планшет герметизировали алюминиевым герметиком для планшетов и инкубировали при 23°C в течение 60 мин. Затем добавляли 10 мкл 5-кратного раствора стрептавидиновых донорных гранул (№ по каталогу 6760002 Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс) (конечная концентрация 20 мкг/мл в 1-кратном буфере для обнаружения гистонов) = планшет герметично закрывали алюминиевым герметиком и инкубировали при 23°C в течение 30 мин. Затем планшеты считывали с помощью EnVision-Alpha Reader (модель № 2104 Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс). Жизнеспособность клеток оценивали путем добавления 15 мкл Cell Titer Glo (№ по каталогу G9241 Promega, Мэдисон, Висконсин) в каждую лунку с клетками со средой. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 15-20 мин на шейкере для планшетов с низкой скоростью. Затем планшеты считывали с помощью EnVision-Alpha Reader (модель № 2104 Perkin Elmer; Уолтем, Массачусетс).

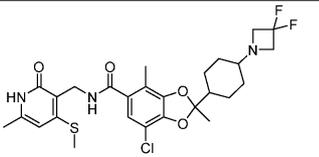
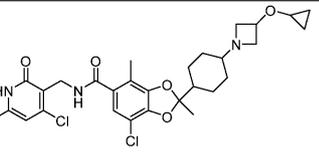
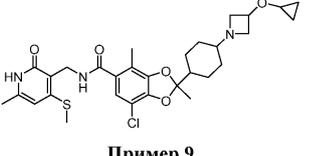
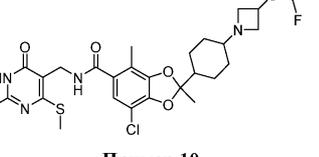
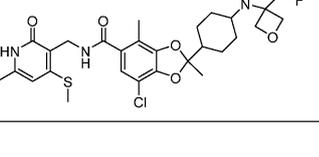
##### Измерения $\text{GI}_{50}$ для ингибиторов в анализах жизнеспособности Karpas-422

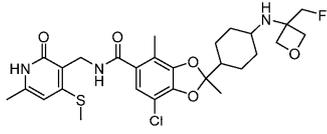
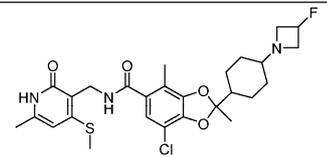
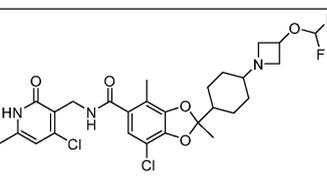
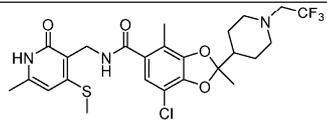
Клеточные линии Karpas-422 получали от DSMZ (Брауншвейг, Германия) и выращивали в среде RPMI-1640. Все среды содержали 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 1% пенициллин/стрептомицин (Invitrogen). 20К клеток на лунку высевали на 96-луночные планшеты, покрытые соединением. Клетки разделяли и высевали с исходной плотностью посева (на основе подсчета лунок ДМСО) каждые 4 дня в планшеты, содержащие свежие ингибиторы EZH2. Относительное количество клеток оценивали с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток Cell Titer-Glo (Promega) на 8-й день для аппроксимации кривой использовали GraphPad Prism 5, и были получены значения  $\text{GI}_{50}$ . Данные представлены в табл. 5.

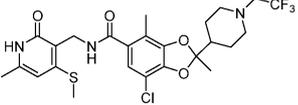
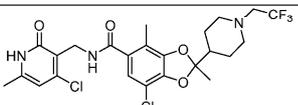
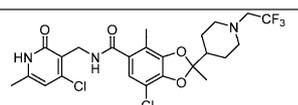
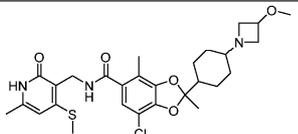
Таблица 5

| Пример   | EZH2<br>IC <sub>50</sub><br>(пМ) | HeLa<br>EC <sub>50</sub><br>(нМ) | Karapas-<br>422 GI <sub>50</sub><br>(нМ) |
|--|----------------------------------|----------------------------------|--|
|  <p><b>Пример 1</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p> | 91                               | 0,52                             | 3,9                                      |
|  <p><b>Пример 2</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p> | 1500                             | 15                               | 250                                      |
|  <p><b>Пример 3</b></p>   | 370                              | 2,4                              | 29                                       |
|  <p><b>Пример 4</b><br/>(R энантиомер; транс геометрический изомер)</p>           | 38                               | 0,51                             | 4,0                                      |

|  |      |     |     |
|--|------|-----|-----|
|  <p><b>Пример 5</b><br/>(R энантиомер; транс геометрический изомер)</p>                             | 54   | 3,6 | 22  |
|  <p><b>Пример 6 - Энантиомер 1</b><br/>(одинокный энантиомер, однокный геометрический изомер)</p>   | 1800 | 39  | 720 |
|  <p><b>Пример 6 - Энантиомер 2</b><br/>(одинокный энантиомер, однокный геометрический изомер)</p>  | 140  | 4,2 | 53  |
|  <p><b>Пример 7 - Энантиомер 1</b><br/>(одинокный энантиомер, однокный геометрический изомер)</p> | 8600 |     |     |

|  |     |      |     |
|--|-----|------|-----|
|  <p><b>Пример 7 - Энантиомер 2</b><br/>(одинокый энантиомер, однокый геометрический изомер)</p> | 120 |      | 12  |
|  <p><b>Пример 8</b><br/>(одинокый энантиомер, однокый геометрический изомер)</p>                | 39  | 0,52 | 5,0 |
|  <p><b>Пример 9</b><br/>(одинокый энантиомер, однокый геометрический изомер)</p>                | 54  | 0,61 | 3,7 |
|  <p><b>Пример 10</b><br/>(одинокый энантиомер, однокый геометрический изомер)</p>              | 202 | 1,9  | 20  |
|   | 140 | 1,3  | 8,6 |

|   |     |      |     |
|---|-----|------|-----|
| <p><b>Пример 11</b><br/>(одинокный энантиомер;<br/>геометрический изомер 1)</p>   |     |      |     |
|  <p><b>Пример 11</b><br/>(одинокный энантиомер;<br/>геометрический изомер 2)</p>                         | 180 | 1,7  |     |
|  <p><b>Пример 12</b><br/>(одинокный энантиомер, однокный<br/>геометрический изомер)</p>                  | 92  | 0,59 | 4,4 |
|  <p><b>Пример 13</b><br/>(одинокный энантиомер, однокный<br/>геометрический изомер)</p>                  | 84  | 0,81 | 9,7 |
|  <p><b>Пример 14 - Энантиомер 1</b><br/>(одинокный энантиомер, однокный<br/>геометрический изомер)</p> | 37  | 1,4  |     |

|   |        |      |     |
|---|--------|------|-----|
|  <p><b>Пример 14 - Энантиомер 2</b><br/>(одиночный энантиомер)</p>                   | 7000   | 210  |     |
|  <p><b>Пример 16 - Энантиомер 1</b><br/>(одиночный энантиомер)</p>                   | 310    | 22   |     |
|  <p><b>Пример 16 - Энантиомер 2</b><br/>(одиночный энантиомер)</p>                   | >10000 | >300 |     |
|  <p><b>Пример 17</b><br/>(одиночный энантиомер, одиночный геометрический изомер)</p> | 43     | 0,33 | 3,5 |

#### Измерения времени удержания

Анализ времени удержания EZH2: время удержания соединения оценивали путем отслеживания восстановления активности фермента после 100-кратного разбавления предварительно сформированного комплекса фермент-ингибитор (реакция разведения) и сравнения его с активностью неразбавленного контроля с такими же конечными концентрациями всех реагентов (контрольная реакция). Активность фермента измеряли по включению  $^3\text{H}$ -SAM в биотинилированный пептид H3. Для реакции разведения 20 нМ PRC2, содержащего EZH2 дикого типа (пентамерный комплекс, полученный в компании), предварительно инкубировали с 1 мкМ активирующего пептида ( $\text{H}_2\text{N-RKQLATKAAR}(\text{Kme}_3)\text{SAPATGGVKKP}$ -амид) и соединением при 600-кратном значении от  $K_i$  для 2 ч в 40 мкл буфера (50 мМ Tris pH 8,5, 4 мМ DTT, 1 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,07 мМ  $\text{Vgij-35}$  и 0,1 мг/мл БСА), затем разбавляли в 100 раз и реакцию инициировали переносом 1,4 мкл к 138,6 мкл объема буфера, содержащего 1 мкМ активирующего пептида, 5,05 мкМ субстратного пептида ( $\text{H}_2\text{N-RKQLATKAARKSAPATGGVKKP-NTPEGbiot}$ ), 1,01 мкМ SAM и 1,01 мкМ  $^3\text{H}$ -SAM. Для контрольной реакции 0,202 нМ PRC2 предварительно инкубировали с 1 мкМ активирующего пептида, 1,01 мкМ SAM, 1,01 мкМ  $^3\text{H}$ -SAM и соединением при 6,06-кратном значении от  $K_i$  в течение 2 ч в 138,6 мкл буфера, затем реакцию инициировали добавлением 1,4 мкл 500 мкМ субстратного пептида в воде. Реакции гасили в различные моменты времени, вплоть до 10 ч, путем переноса аликвот по 8 мкл из реакционного сосуда на планшет, содержащий 8 мкл на лунку СТОП раствора (50 мМ Tris pH 8,5, 200 мМ ЭДТА, 2 мМ SAH). После последней временной точки 12 мкл погашенных растворов переносили на покрытый стрептавидином FlashPlate (PerkinElmer), содержащий 40 мкл на лунку СТОП раствора, инкубировали 1-8 ч, промывали и считывали на планшет-ридере TopCount (PerkinElmer).

Для аппроксимирования данных о ходе контрольной реакции на прямую линию и данных о ходе реакции разбавления использовали специальный скрипт:

$$y = v_s t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs} t}) + \text{background}$$

Где  $y$  представляет собой образовавшийся продукт,  $t$  представляет собой время реакции,  $v_i$  представляет собой начальную скорость,  $v_s$  представляет собой установившуюся скорость, а  $k_{obs}$  представляет собой константу скорости перехода от фазы кривой начальной скорости к фазе кривой стационарной скорости. При аппроксимировании данных о ходе реакции разбавления,  $v_s$  был ограничен наклоном линии, аппроксимированной к данным о ходе контрольной реакции. Аппроксимированное значение  $k_{obs}$  затем преобразовывали во время удержания:

$$\tau = \frac{[EI] - \frac{1}{K_i} [E][I]}{k_{obs}[EI]}$$

где  $\tau$  представляет собой время удержания,  $K_i$  представляет собой константу ингибирования,  $[EI]$  представляет собой расчетную равновесную концентрацию комплекса фермент-ингибитор,  $[E]$  представляет собой расчетную равновесную концентрацию свободного фермента, а  $[I]$  представляет собой рас-

четную равновесную концентрацию свободного ингибитора.

### Измерения Клеточной проницаемости ингибиторов в анализе MDCK

Культура клеток: клетки MDCK II (полученные от Пита Борста в Нидерландском институте рака) высевали на полиэтиленовые мембраны (ПЭТ) в 96-луночные системы вставки BD при  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл до 4-7 дней для образования монослоя конфлюэнтных клеток.

Методика эксперимента:

Тестируемые и контрольные соединения (надолол, метопролол и дигоксин) разбавляли транспортным буфером (HBSS с 10 mM HEPES, pH 7,4) из исходного раствора до концентрации 2 мкМ (<1% ДМСО) и наносили на апикальную (А) или базолатеральную (В) сторону клеточного монослоя. Проницаемость тестируемых соединений из А по направлению к В или из В по направлению к А определяли в двух экземплярах с ингибитором Р-gp (GF120918, 10 мкМ). Дигоксин тестировали в концентрации 10 мкМ из А по направлению к В или из В по направлению к А с/без ингибитора Р-gp (GF120918, 10 мкМ), в то время как надолол и метопролол тестировали в концентрации 2 мкМ в из А по направлению к В без ингибитора Р-gp (GF120918, 10 мкМ) в двух экземплярах. Планшет инкубировали в течение 2,5 ч в инкубаторе с CO<sub>2</sub> при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  с 5% CO<sub>2</sub> при насыщенной влажности без встряхивания. Кроме того, также определяли коэффициент эффлюкса каждого соединения. Тестируемые и контрольные соединения количественно определяли с помощью анализа ЖХ/МС/МС на основании отношения площадей пика аналита/ВС. После анализа переноса применяли анализ отторжения Люцифера желтого для определения целостности клеточного монослоя. Буферы удаляли как из апикальной, так и из базолатеральной камер с последующим добавлением 75 мкл 100 мкМ люцифера желтого в транспортном буфере и 250 мкл транспортного буфера в апикальную и базолатеральную камеры соответственно. Планшет инкубировали в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> и относительной влажности 95% без встряхивания. После 30-минутной инкубации с апикальных сторон брали образцы люцифера желтого по 20 мкл с последующим добавлением 60 мкл транспортного буфера. Затем с базолатеральных сторон брали образцы люцифера желтого по 80 мкл. Единицу относительной флуоресценции (RFU) люцифера желтого измеряли при 425/528 нм (возбуждение/эмиссия) с помощью планшет-ридера Molecular Device M2e. Анализ данных: Кажущийся коэффициент проницаемости  $P_{app}$  (см/с) рассчитывали по формуле:

$$P_{app} = (dC_r/dt) \times V_r / (A \times C_0)$$

где  $dC_r/dt$  представляет собой кумулятивную концентрацию соединения в приемной камере как функцию времени (мкМ/с);

$V_r$  представляет собой объем раствора в приемной камере (0,075 мл на апикальной стороне, 0,25 мл на базолатеральной стороне);

$A$  представляет собой площадь поверхности для переноса, т.е. 0,0804 см<sup>2</sup> для площади монослоя;

$C_0$  представляет собой начальную концентрацию в донорской камере (мкМ).

Коэффициент эффлюкса рассчитывали по формуле:

$$\text{Коэффициент эффлюкса} = P_{app} (BA) / P_{app} (AB)$$

Процент извлечения рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ извлечения} = 100 \times [(V_r \times C_r) + (V_d \times C_d)] / (V_d \times C_0)$$

где  $V_d$  представляет собой объем донорских камер (0,075 мл на апикальной стороне, 0,25 мл на базолатеральной стороне);

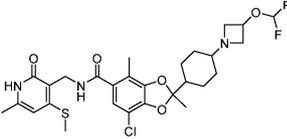
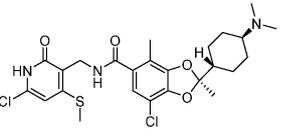
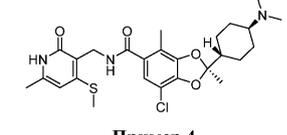
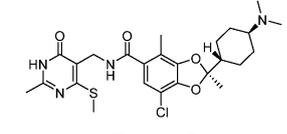
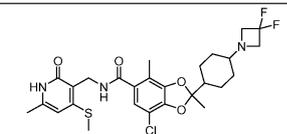
$C_d$  и  $C_r$  представляют собой конечные концентрации переносимого соединения в донорской и приемной камерах соответственно. Процент люцифера желтого (% Lucifer Yellow) в базолатеральной лунке рассчитывали по формуле:

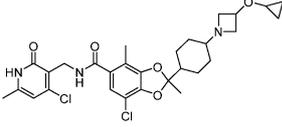
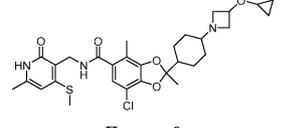
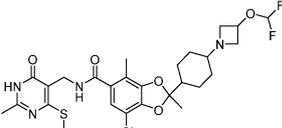
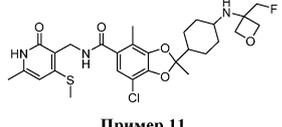
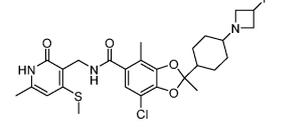
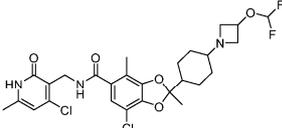
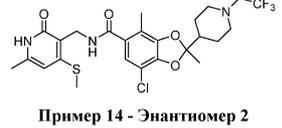
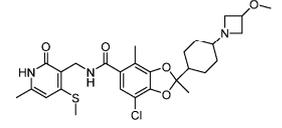
$$\% \text{ Lucifer Yellow} = \frac{V_{Basolateral} \times RFU_{Basolateral}}{V_{Apical} \times RFU_{Apical} + V_{Basolateral} \times RFU_{Basolateral}} \times 100$$

где  $RFU_{Apical}$  и  $RFU_{Basolateral}$  представляют собой относительные значения единиц флуоресценции люцифера желтого в апикальной и базолатеральной лунках, соответственно;

$V_{Apical}$  и  $V_{Basolateral}$  представляют собой объем апикальной и базолатеральной лунок (0,075 мл и 0,25 мл) соответственно. Процент люцифера желтого должен быть менее 2. Данные представлены в табл. 6.

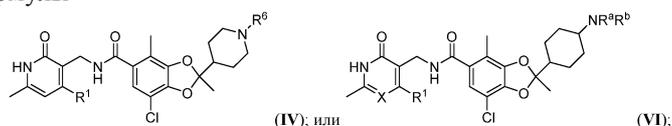
Таблица 6

| Пример  | EZH2 Время удержания (часы) | Клеточная проницаемость ( $10^{-6}$ см/с)/ Коэффициент эффлюкса |
|---|-----------------------------|---|
|  <p><b>Пример 1</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p>                  | >100                        | 5,6/0,79  |
|  <p><b>Пример 3</b></p>  |                             | 3,7/1,2   |
|  <p><b>Пример 4</b><br/>(R энантиомер; транс геометрический изомер)</p>                             |                             | 0,62/2,3  |
|  <p><b>Пример 5</b><br/>(R энантиомер; транс геометрический изомер)</p>                            |                             | 1,1/3,6   |
|  <p><b>Пример 7 - Энантиомер 2</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p> | 33                          | 12/0,71   |

|   |      |          |
|---|------|----------|
|  <p><b>Пример 8</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p>    | >100 | 6,1/0,9  |
|  <p><b>Пример 9</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p>    | >100 | 3,8/1,4  |
|  <p><b>Пример 10</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p>   | 37   | 6,5/0,69 |
|  <p><b>Пример 11</b><br/>(одиничный энантиомер;<br/>геометрический изомер 1)</p>      |      | 5,3/1,3  |
|  <p><b>Пример 12</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p> | >100 | 6,3/1,2  |
| <p><b>Пример 12</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p>   |      |          |
|  <p><b>Пример 13</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p> | 48   | 8,9/0,64 |
|  <p><b>Пример 14 - Энантиомер 2</b><br/>(одиничный энантиомер)</p>                   |      | 13/0,56  |
|  <p><b>Пример 17</b><br/>(одиничный энантиомер, одиничный геометрический изомер)</p> | >100 | 2,5/1,8  |

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, где

$R^1$  представляет собой  $-SCH_3$  или хлор;

X представляет собой CH;

$R^a$  представляет собой водород,  $(C_1-C_4)$ алкил или галоген $(C_1-C_4)$ алкил;

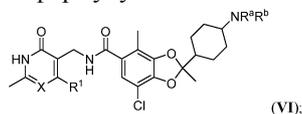
$R^b$  представляет собой  $(C_1-C_4)$ алкил, галоген $(C_1-C_4)$ алкил или 4-7-членный гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, где указанный гетероцикл может быть замещен 1-3 группами, выбранными из галогена,  $(C_1-C_4)$ алкила, галоген $(C_1-C_4)$ алкила,  $(C_1-C_4)$ алкокси и галоген $(C_1-C_4)$ алкокси; или

$R^a$  и  $R^b$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-7-членный гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из N, O и S, необязательно замещенный 1-3 группами, выбранными из галогена,  $(C_1-C_4)$ алкила, галоген $(C_1-C_4)$ алкила и  $-OR^c$ ;

$R^c$  представляет собой  $(C_1-C_4)$ алкил, галоген $(C_1-C_4)$ алкил или  $(C_3-C_7)$ циклоалкил и

$R^6$  представляет собой галоген $(C_1-C_4)$ алкил.

## 2. Соединение по п.1, которое имеет формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

## 3. Соединение по п.1 или 2, где

$R^b$  представляет собой  $(C_1-C_4)$ алкил или оксетанил, где указанный оксетанил может быть замещен галоген $(C_1-C_4)$ алкилом; или

$R^a$  и  $R^b$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют азетидинил, который может быть замещен галогеном или  $-OR^c$ .

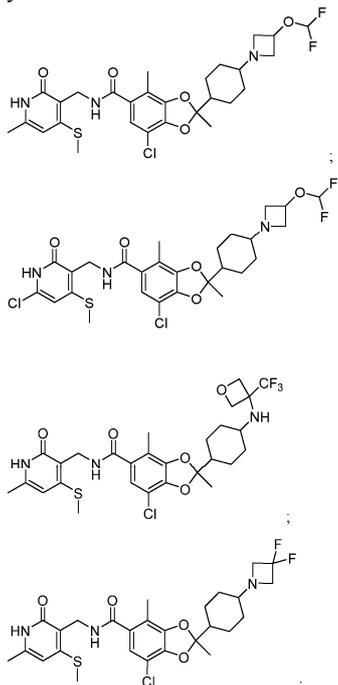
4. Соединение по любому из пп.1-3, где  $R^a$  представляет собой водород или метил и  $R^b$  представляет собой метил или оксетанил, где указанный оксетанил может быть замещен  $-CH_2F$  или  $-CF_3$ .

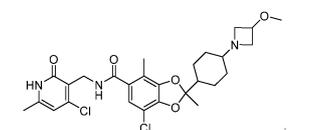
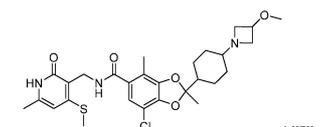
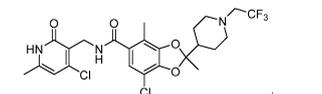
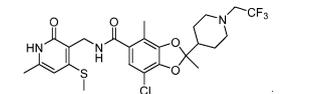
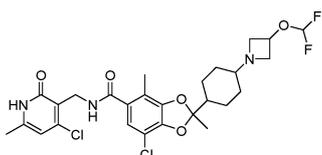
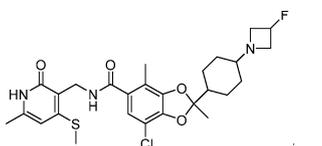
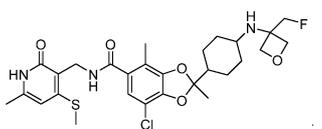
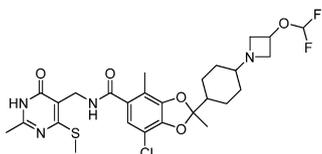
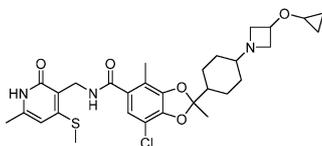
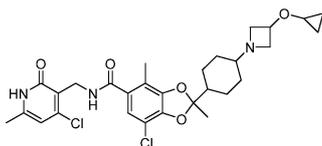
## 5. Соединение по любому из пп.1-4, где

$R^a$  и  $R^b$  вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют азетидинил, который может быть замещен 1-2 фторами или  $-OR^c$ ; и

$R^c$  представляет собой  $-CH_3$ ,  $-CHF_2$  или циклопропил.

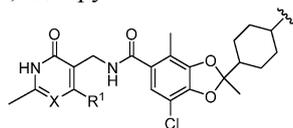
## 6. Соединение, имеющее формулу





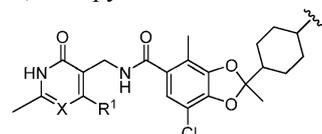
или его фармацевтически приемлемая соль.

7. Соединение по любому из пп. 1-6, где группа



и  $NR^aR^b$  ориентированы транс относительно циклогексила.

8. Соединение по любому из пп. 1-6, где группа

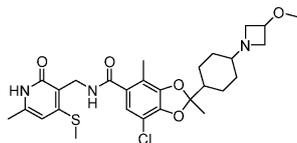


и  $NR^aR^b$  ориентированы цис относительно циклогексила.

9. Соединение по любому из пп. 1-8, где стереохимическая конфигурация хирального центра 1,3-диоксоланила представляет собой R.

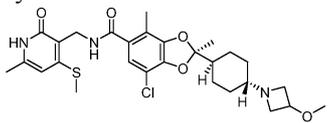
10. Соединение по любому из пп.1-8, где стереохимическая конфигурация хирального центра 1,3-диоксоланила представляет собой S.

11. Соединение, имеющее формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Соединение, имеющее формулу



или его фармацевтически приемлемая соль.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-12 или его фармацевтически приемлемую соль; и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Применение соединения по любому из пп.1-12 для лечения рака.

15. Применение по п.14, отличающееся тем, что указанный рак выбран из рака груди, рака простаты, рака толстой кишки, почечно-клеточной карциномы, мультиформной глиобластомы, рака мочевого пузыря, меланомы, рака бронхов, лимфомы, холангиосаркомы, множественной миеломы, рака легких, рака яичников и рака печени.

