

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045067**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.27**

(51) Int. Cl. *A61K 31/4439* (2006.01)  
*C07D 405/14* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202192992**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.06.19**

(54) **АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКАГОНПОДОБНОГО ПЕПТИДА 1**

(31) **62/868,117; 62/904,906**

(56) **WO-A1-2018109607**

(32) **2019.06.28; 2019.09.24**

(33) **US**

(43) **2022.04.04**

(86) **PCT/US2020/038617**

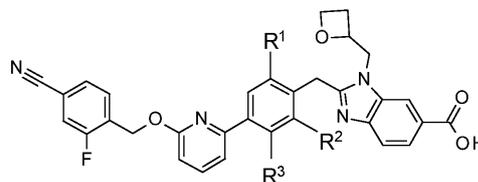
(87) **WO 2020/263695 2020.12.30**

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

(72) Изобретатель:  
**Коутс Дэвид Эндрю, Филдс Тодд, Хо  
Джозеф Дэниел, Цюй Фучэн (US)**

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

(57) В одном варианте реализации изобретения предложено соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, а также способы применения указанного соединения для лечения сахарного диабета II типа.

**B1**

**045067**

**045067**

**B1**

Данное изобретение относится к агонистам рецептора глюкагонподобного пептида-1 и к терапевтическому применению указанных соединений для лечения сахарного диабета II типа.

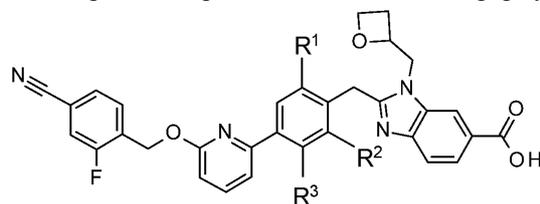
Глюкагонподобный пептид-1 (GLP-1) является членом инкретинового семейства пептидных гормонов, секретируемых энтероэндокринными L-клетками кишечника. GLP-1 вызывает высвобождение инсулина из бета-клеток глюкозозависимым образом. Однако GLP-1 быстро метаболизируется, поэтому лишь небольшой процент GLP-1 может быть использован для инициации секреции инсулина. Для коррекции указанного эффекта разработаны агонисты рецептора GLP-1 (GLP-1R) для усиления секреции инсулина в качестве средства лечения сахарного диабета II типа.

Большинство агонистов GLP-1R, одобренных для лечения сахарного диабета II типа, являются агентами для инъекций. Пациенты часто предпочитают перорально вводимые лекарственные средства, что обусловлено недостатками, связанными с инъекцией, такими как неудобство, боль и возможное раздражение в области инъекции.

В WO 2018/109607 предложены некоторые производные бензимидазолы, которые описаны как агонисты GLP-1R.

Однако существует потребность в альтернативных агонистах GLP-1R. В частности, существует потребность в агонистах GLP-1R, которые можно вводить перорально. В частности, существует потребность в агонистах GLP-1R, обладающих улучшенной эффективностью, благоприятным токсикологическим профилем и/или фармакокинетическим профилем, предполагающим введение один раз в сутки.

Соответственно в данном изобретении предложено соединение формулы



Формула I

где R<sup>1</sup> представляет собой H или F;

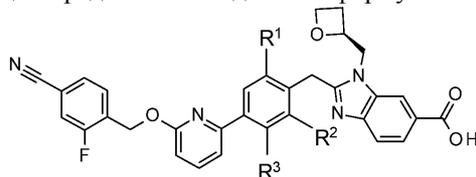
R<sup>2</sup> представляет собой H или F; и

R<sup>3</sup> представляет собой H или CH<sub>3</sub>,

или его фармацевтически приемлемая соль.

Формула I включает все отдельные энантиомеры и их смеси, а также рацематы и их фармацевтически приемлемые соли.

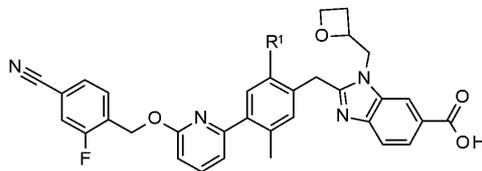
В одном варианте реализации предложено соединение формулы



Формула Ia

или его фармацевтически приемлемая соль.

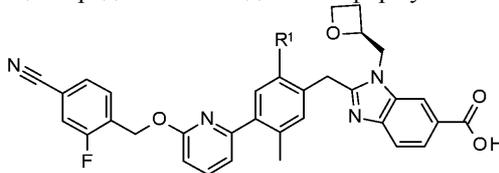
В одном варианте реализации предложено соединение формулы



Формула II

где R<sup>1</sup> представляет собой H или F, или его фармацевтически приемлемая соль.

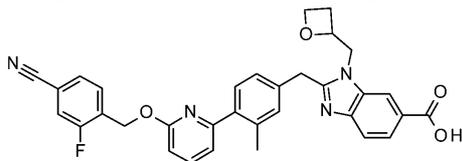
В одном варианте реализации предложено соединение формулы



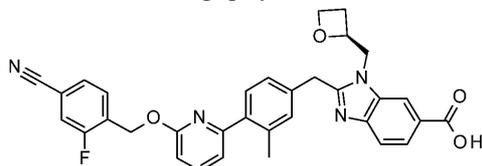
Формула IIa

где R<sup>1</sup> представляет собой H или F, или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы

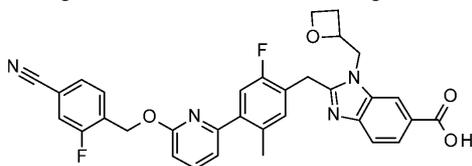


или его фармацевтически приемлемую соль. В предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы

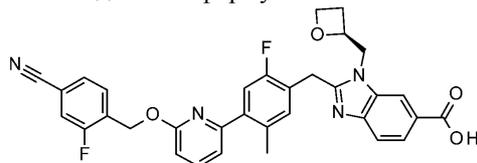


или его фармацевтически приемлемую соль.

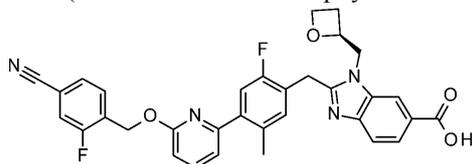
В одном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы



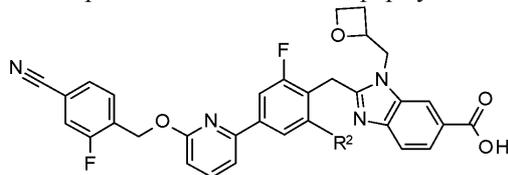
или его фармацевтически приемлемую соль. В предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль. В особенно предпочтительном варианте реализации предложена трет-бутиламинная соль (также известная как эрбуминовая соль) соединения



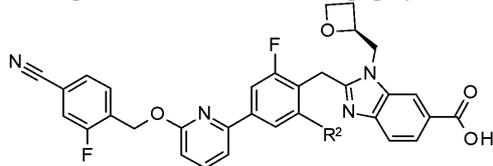
В одном варианте реализации предложено соединение формулы



Формула III

где  $R^2$  представляет собой H или F, или его фармацевтически приемлемая соль.

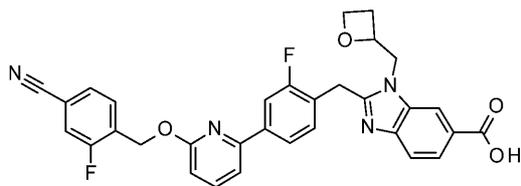
В одном варианте реализации предложено соединение формулы



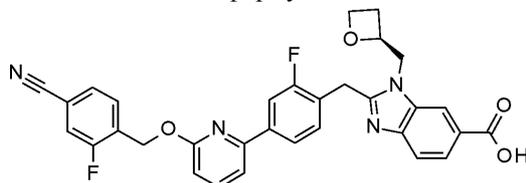
Формула IIIa

где  $R^2$  представляет собой H или F, или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы

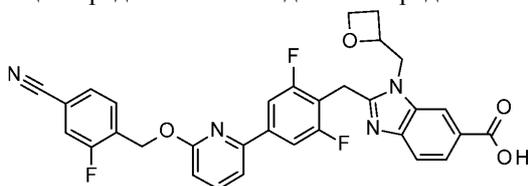


или его фармацевтически приемлемую соль. В предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы

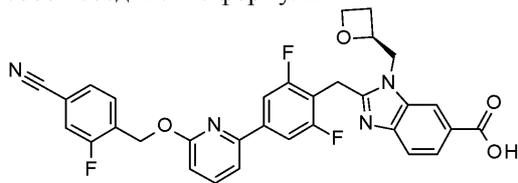


или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль. В предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой соединение формулы



или его фармацевтически приемлемую соль.

Формула I охватывает формулы Ia, Ib, II, IIa, IIb, III, IIIa и IIIb, и упоминание ниже формулы I, например, в способах лечения и терапевтического применения, также следует понимать как упоминание каждой из всех вышеуказанных подформул.

В одном варианте реализации предложена фармацевтически приемлемая композиция, содержащая соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или вспомогательного вещества. В предпочтительном варианте реализации фармацевтически приемлемая композиция составлена для перорального введения.

В другом варианте реализации предложен способ лечения у млекопитающего сахарного диабета II типа, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в лечении, фармацевтически приемлемой композиции, содержащей эффективное количество соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере один из фармацевтически приемлемого носителя, разбавителя или вспомогательного вещества. В одном варианте реализации фармацевтически приемлемая композиция составлена для перорального введения. Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека.

В другом варианте реализации предложен способ лечения у млекопитающего сахарного диабета II типа, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации млекопитающее представляет собой человека.

В другом варианте реализации предложен способ понижения уровня глюкозы в крови млекопитающего, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации млекопитающее представляет собой человека.

В другом варианте реализации предложен способ лечения гипергликемии у млекопитающего, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в лечении, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В предпочтительном варианте реализации млекопитающее представляет собой человека.

В одном варианте реализации предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

В другом варианте реализации предложено соединение формулы I или его фармацевтически при-

емлемая соль для применения для лечения сахарного диабета II типа.

В другом варианте реализации предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения для понижения уровня глюкозы в крови.

В другом варианте реализации предложено также соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения гипергликемии.

В одном варианте реализации предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для производства лекарственного средства для лечения сахарного диабета II типа.

В одном варианте реализации предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для производства лекарственного средства для понижения уровня глюкозы в крови.

В одном варианте реализации предложено соединение формулы I или его фармацевтически приемлемая соль для производства лекарственного средства для лечения гипергликемии.

В предпочтительном варианте реализации соединения формулы I вводят перорально. В предпочтительном варианте реализации соединения формулы I вводят один раз в сутки. В другом предпочтительном варианте реализации терапевтическое применение предназначено для человека.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" в данном контексте относится к соли соединения по данному изобретению, которая считается приемлемой для клинического и/или ветеринарного применения. Примеры фармацевтически приемлемых солей и общие методики их получения представлены в публикациях "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use", P. Stahl et al., 2-е пересмотренное издание, Wiley-VCH, 2011; и S.M. Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, 66(1), 1-19.

Примеры фармацевтических композиций и способов их получения представлены в публикации "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Loyd, V. et al. ред., 22-е изд., Mack Publishing Co., 2012. В одном варианте реализации фармацевтические композиции могут быть составлены для перорального введения. Предпочтительно, фармацевтические композиции составлены в форме таблетки, капсулы или раствора. Таблетка, капсула или раствор может содержать соединение формулы I в количестве, эффективном для лечения пациента, нуждающегося в лечении.

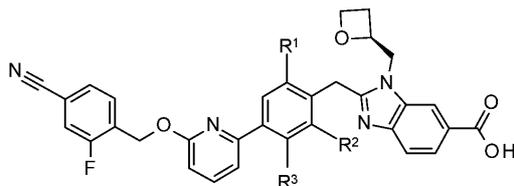
Термин "эффективное количество" относится к такому количеству или дозе соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли, которое при однократном или многократном введении пациенту обеспечивает требуемый эффект у пациента, которому поставлен диагноз или который проходит лечение. Лечащий врач, как специалист в данной области техники, может без труда определить эффективное количество, используя стандартные технологии и изучая результаты, полученные в аналогичных обстоятельствах. Факторы, учитываемые при определении эффективного количества или дозы соединения, включают тот факт, является ли вводимое соединение таковым или его солью; совместное введение других агентов, в случае их использования; биологический вид млекопитающего, подлежащего лечению; его размер, возраст и общее состояние здоровья; степень вовлеченности или тяжести расстройства; ответ конкретного млекопитающего; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему введения доз; и другие релевантные обстоятельства. Соединения по данному изобретению являются эффективными при введении суточной дозы, входящей в диапазон от около 0,01 до около 15 мг/кг массы тела.

В данном контексте термины "лечить" или "лечение" относятся к снижению, уменьшению или реверсированию развития или тяжести существующего симптома, расстройства или патологического состояния, такого как гипергликемия, которое может включать увеличение секреции инсулина.

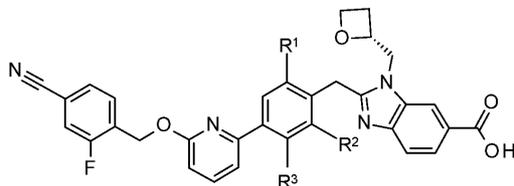
Соединения формулы I могут быть составлены в форме фармацевтических композиций, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения. Предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Remington, J.P., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L.V. Allen, ред., 22-е изд., Pharmaceutical Press, 2012).

Соединения формулы I и их фармацевтически приемлемые соли пригодны для терапевтического применения по данному изобретению, причем предпочтительны определенные конфигурации.

Соединения по данному изобретению включают



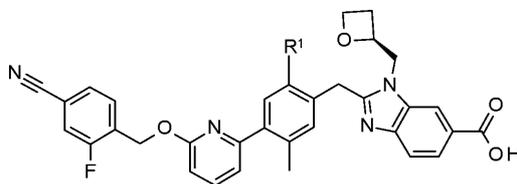
Формула Ia; и



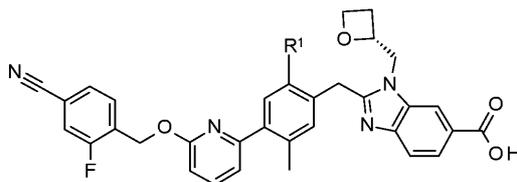
Формула Ib,

или их фармацевтически приемлемые соли.

Дополнительные соединения по данному изобретению включают



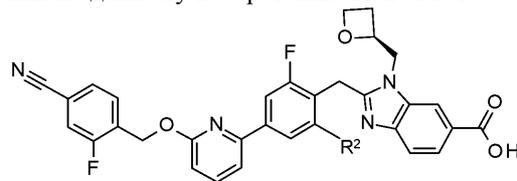
Формула IIa; и



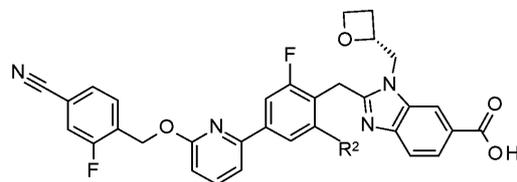
Формула IIb,

или их фармацевтически приемлемые соли.

Дополнительные соединения по данному изобретению включают



Формула IIIa; и



Формула IIIb,

или их фармацевтически приемлемые соли.

Несмотря на то что данное изобретение предусматривает все отдельные энантимеры, их смеси и рацематы, особенно предпочтительны соединения формулы Ia, IIa и IIIa и их фармацевтически приемлемые соли.

Отдельные энантимеры могут быть выделены или разделены специалистом в данной области техники в любой удобной точке синтеза соединений по данному изобретению такими способами как технологии селективной кристаллизации, хиральная хроматография (см., например, J. Jacques et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981; и E.L. Eliel, S.H. Wilen", Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994) или сверхкритическая жидкостная хроматография (СЖХ) (см.,

например, T.A. Berger; "Supercritical Fluid Chromatography Primer" Agilent Technologies, июль 2015).

Фармацевтически приемлемые соли соединений по данному изобретению могут быть получены, например, посредством приведения во взаимодействие соединения формулы I и соответствующего фармацевтически приемлемого основания в подходящем растворителе в стандартных условиях, известных в данной области техники (см., например, Bastin, R.J., et al; Org. Process. Res. Dev., 4, 427-435, 2000, и Berge, S.M., et al.; J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977). Предпочтительная соль представляет собой трет-бутиламинную (или эрбуминовую) соль.

Некоторые сокращения, использованные в данном контексте, определены в соответствии с Daub G.H. et al., "The Use of Acronyms in Organic Chemistry", Aldrichimica Acta, 1984, 17(1), 6-23. Некоторые сокращения определены следующим образом: "ACN" относится к ацетонитрилу; "АТФ" относится к аденозинтрифосфату; "BSA" относится к альбумину бычьей сыворотки; "цАМФ" относится к циклическому аденозин-3',5'-монофосфату; "ДХМ" относится к дихлорметану или метиленхлориду; "DIPEA" относится к N,N-диизопропилэтиламину; "ДМФА" относится к N,N-диметилформамиду; "ДМСО" относится к диметилсульфоксиду; "ЕС<sub>50</sub>" относится к концентрации агента, которая обеспечивает 50% ответ относительно целевой активности по сравнению с предварительно определенным соединением положительного контроля (абсолютная ЕС<sub>50</sub>); "ЭР/МС" относится к электрораспылительной масс-спектрометрии; "EtOAc" относится к этилацетату; "НАТУ" относится к гексафторфосфату 1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксида; "НЕК" относится к почке эмбриона человека; "HEPES" относится к 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоте; "ч." относится к часам или у соответственно; "MeOH" относится к метанолу или метиловому спирту; "мин" относится к минуте или минутам; "Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>" относится к [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладию (II); "комн. т-ра" относится к комнатной температуре; и "ТГФ" относится к тетрагидрофурану.

Соединения по данному изобретению могут быть получены различными способами, некоторые из которых представлены ниже в разделе "Способы получения и примеры". Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных способов можно комбинировать различным образом с получением соединений по данному изобретению или их солей. Продукт каждой стадии, представленной ниже, можно выделять обычными способами, включая экстракцию, выпаривание, осаждение, хроматографию, фильтрование, растирание и кристаллизацию. Реагенты и исходные вещества без труда доступны специалистам в данной области техники. Отдельные изомеры, энантиомеры и диастереомеры могут быть выделены или разделены на любой удобной точке синтеза такими способами как технологии селективной кристаллизации или хиральная хроматография (см., например, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981; и E.L. Eliel, S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Не ограничивая объем данного изобретения, следующие способы получения и примеры представлены для дополнительной иллюстрации данного изобретения.

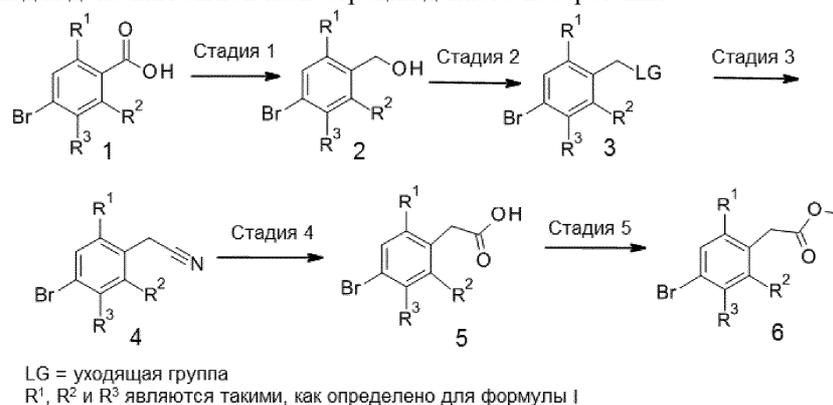
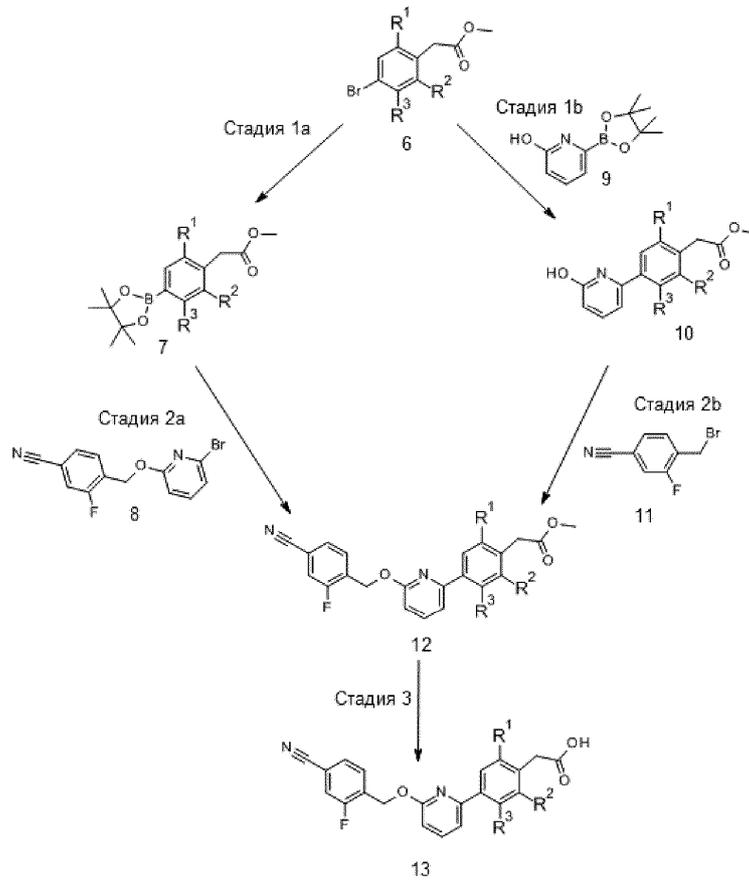


Схема 1

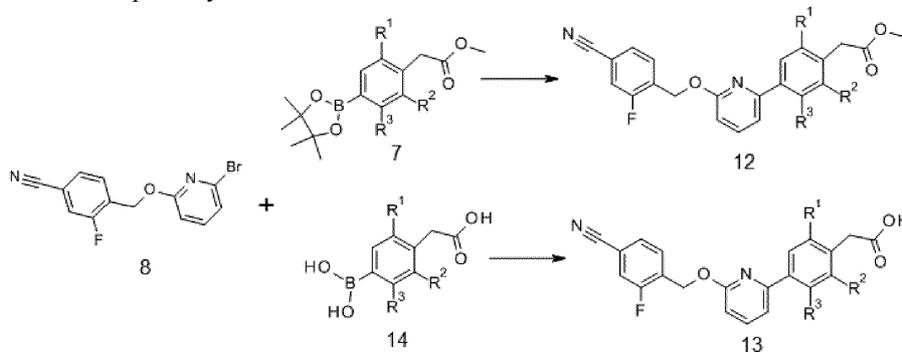
На схеме 1 показан синтез промежуточного соединения 6, которое используют для получения соединений формулы I. Сначала бензойную кислоту 1 подвергают восстановлению с комплексом борана и диметилсульфида на стадии 1 с получением спирта 2. Полученный спирт преобразуют в уходящую группу (LG, промежуточное соединение 3). Например, спирт в промежуточном соединении 2 может быть преобразован в мезилатную группу с использованием метансульфонилхлорида при -15°C на стадии 2, или он может быть преобразован в бромид с использованием трибромид фосфора при 0°C. Промежуточное соединение подвергают взаимодействию с NaCN на стадии 3 с получением нитрила 4. Нитрил 4 преобразуют с помощью KOH при повышенной температуре на стадии 4 с получением кислоты 5, которую затем эстерифицируют на стадии 5 с получением промежуточного соединения 6, используя оксалилхлорид, ДМФА и метанол.



$R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  являются такими, как определено для формулы I

Схема 2

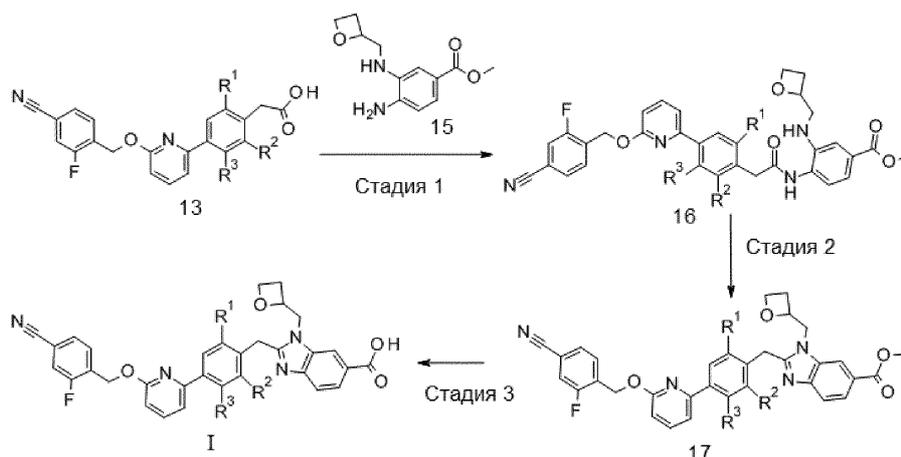
На схеме 2 показано получение ключевого промежуточного соединения 12 для получения соединений формулы I двумя способами. В первом способе арилгалогенид 6 подвергают борилированию Мияуры/сочетанию Сузуки в одном реакторе: используя бис(пинаколато)дибор,  $Pd(dppf)Cl_2$  и ацетат калия при повышенной температуре, арилгалогенид 6 преобразуют на стадии 1a в бороновый сложный эфир 7, после чего в реакционную смесь добавляют бромпиридин 8 и  $K_2CO_3$  (стадия 2a) с получением промежуточного соединения 12. Во втором способе используют двух стадийный процесс: сочетание Сузуки арилгалогенида 6 с пинаколовым эфиром 6-гидроксипиридин-2-бороновой кислоты 9 с использованием  $Pd(dppf)Cl_2$  и  $K_2CO_3$  при повышенной температуре (стадия 1b) приводит к получению промежуточного соединения 10, которое затем алкилируют 4-(бромметил)-3-фторбензонитрилом 6 с использованием  $Ag_2CO_3$  при повышенной температуре (стадия 2b) с получением промежуточного соединения 12. Гидролиз сложного эфира в промежуточном соединении 12 на стадии 3 с использованием  $LiOH$  обеспечивает получение кислотного промежуточного соединения 13.



$R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  являются такими, как определено для формулы I

Схема 3

Альтернативно ключевые промежуточные соединения 12 и 13 могут быть получены по схеме 3, посредством конденсации бромпиридина 8 с бороновым сложным эфиром 7 или бороновой кислотой 14 с использованием  $Pd(dppf)Cl_2$  и карбоната калия при повышенной температуре.



$R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  являются такими, как определено для формулы I

Схема 4

На схеме 4 показано преобразование ключевого промежуточного соединения 13 в соединение формулы I. Связывание амида на стадии 1 с использованием НАТУ и дианилина 15 приводит к получению промежуточного соединения 16. Циклизацию (стадия 2) осуществляют нагреванием промежуточного соединения 16 в уксусной кислоте с получением бензимидазола 17. Наконец, на стадии 3 получают соединения формулы I посредством гидролиза соединения 17 с использованием LiOH.

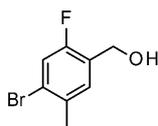
#### Способы получения и примеры

ЖХ-ЭР/МС проводили на системе для жидкостной хроматографии AGILENT® HP 1200. Измерения масс-спектрометрии с электрораспылением (записанные в положительном и/или отрицательном режиме) проводили на квадрупольном масс-спектрометре с масс-селективным детектором, подключенном к системе ВЭЖХ, которая может иметь или не иметь испарительный детектор светорассеяния (ИДСР). Условия ЖХ-ЭР/МС (низкий pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18 2,0×50 мм, 3,0 мкм, 110 Å; градиент: 5-95% В за 1,5 мин, затем 95% В в течение 0,5 мин, температура колонки: 50±10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем ввода пробы 1 мкл; растворитель А: деионизированная вода с 0,1% HCOOH, растворитель В: ACN с 0,1% муравьиной кислоты; длина волны 200-400 нм и 212-216 нм. Если прибор ВЭЖХ оснащен ИДСР, то настройки являются следующими: температура испарителя 45°C, температура распылителя 40°C и скорость потока газа 1,6 ст.л/мин. Альтернативные условия ЖХ-МС (высокий pH): колонка: колонка Waters xBridge® C18, 2,1×50 мм, 3,5 мкм; градиент: 5-95% В за 1,5 мин, затем 95% В в течение 0,50 мин; температура колонки: 50±10°C; скорость потока: 1,2 мл/мин; объем ввода пробы 1 мкл; растворитель А: 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 9; растворитель В: ACN; длина волны: 200-400 нм и 212-216 нм; при наличии ИДСР: температура испарителя 45°C, температура распылителя 40°C и скорость потока газа 1,60 ст.л/мин.

Профили рентгеновской порошковой дифракции (РПД) кристаллических веществ записывали на рентгеновском порошковом дифрактометре Bruker D4 Endeavor, оснащенный источником CuK $\alpha$  и детектором Vantec, работающем при 35 кВ и 50 мА. Образец сканировали от 4 до 40 2 $\theta$ ° с шагом 0,008 2 $\theta$ ° и скоростью сканирования 0,5 с/шаг, и используя дивергенцию 1,0 мм, неподвижную 6,6 мм антирассеивающую и 11,3 мм детекторную щели. Сухой порошок выкладывали на кварцевый держатель образца и при помощи предметного стекла обеспечивали гладкую поверхность. Профили дифракции кристаллической формы записывали при температуре и относительной влажности окружающей среды. Положения пиков кристалла определяли с помощью MDI-Jade после полного сдвига профиля относительно внутреннего стандарта NIST 675 с пиками при 8,853 и 26,774 2 $\theta$ °. В области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы относительные интенсивности пиков дифракции могут варьироваться вследствие предпочтительной ориентации, обусловленной такими факторами как морфология и габитус кристалла. При наличии эффекта предпочтительной ориентации, интенсивности пиков являются переменными, но положения характеристических пиков полиморфа не меняются. См., например, Фармакопею США № 23, национальный формуляр № 18, страницы 1843-1844, 1995. Кроме того, в области кристаллографии хорошо известно, что для любой данной кристаллической формы угловые положения пиков могут незначительно варьироваться. Например, положения пиков могут смещаться вследствие изменения температуры, при которой анализируют образец, вследствие смещения образца или наличия или отсутствия внутреннего стандарта. В данном случае вариабельность положения пика, составляющая ±0,2 2 $\theta$ °, учитывает указанные возможные отклонения, не препятствуя точному определению указанной кристаллической формы. Подтверждение кристаллической формы может быть сделано на основании любой уникальной комбинации характеристических пиков.

Подготовительный синтез 1.

(4-Бром-2-фтор-5-метилфенил)метанол.

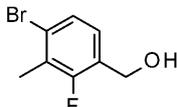


В колбу добавляли 4-бром-2-фтор-5-метилбензойную кислоту (100 г, 421 ммоль), ТГФ (200 мл) и боран (комплекс с диметилсульфидом, 2 моль/л раствор в ТГФ, 210 мл, 10 ммоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Гасили реакционную смесь HCl (1,0 н. водный раствор, 50 мл) и фильтровали смесь. Концентрировали фильтрат в вакууме и разделяли остаток между EtOAc (400 мл) и водой (400 мл). Промывали органическую фазу насыщенным водным раствором NaCl (400 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (93,5 г, 99%).

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,29 (д, J=7,9 Гц, 1H), 7,26 (д, J=9,1 Гц, 1H), 4,69 (с, 2H), 2,38 (с, 3H).

Подготовительный синтез 2.

(4-Бром-2-фтор-3-метилфенил)метанол.

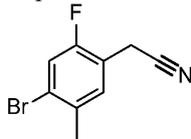


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 1, используя 4-бром-2-фтор-3-метилбензойную кислоту. Продукт очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 10 до 35% EtOAc в гексанах.

Время удерживания пика ЖХ-ЭР/МС: 1,01 мин.

Подготовительный синтез 3.

2-(4-Бром-2-фтор-5-метилфенил)ацетонитрил.

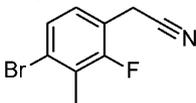


Растворяли (4-бром-2-фтор-5-метилфенил)метанол (92 г, 420 ммоль) в ДХМ (500 мл) и добавляли триэтиламин (120 мл, 861 ммоль). Охлаждали смесь до -15°C и по каплям добавляли в реакционную смесь раствор метансульфонилхлорида (40 мл, 517 ммоль) в ДХМ (30 мл). Перемешивали реакционную смесь в течение 30 мин при комнатной температуре. Разделяли реакционную смесь между ДХМ (500 мл) и водой (500 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (500 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Растворяли остаток в ДМФА (400 мл) и охлаждали смесь на ледяной бане. В реакционную смесь одной порцией добавляли NaCN (21,0 г, 429 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Разделяли смесь между EtOAc (400 мл) и водой (500 мл). Органический слой промывали насыщенным водным раствором NaCl (500 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 10 до 30% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (47,0 г, 48%) в виде маслянистого вещества.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,34 (д, J=8,7 Гц, 1H), 7,32 (д, J=8,1 Гц, 1H), 3,71 (с, 2H), 2,41 (с, 3H).

Подготовительный синтез 4.

2-(4-Бром-2-фтор-3-метилфенил)ацетонитрил.

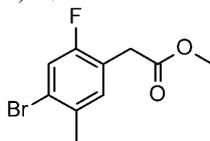


Смешивали (4-бром-2-фтор-3-метилфенил)метанол (1,90 г, 8,67 ммоль) и ДХМ (20 мл). Охлаждали смесь до 0°C, затем по каплям добавляли трибромид фосфора (1,0 мл, 11 ммоль). Перемешивали смесь при 0°C в течение 15 мин, затем подщелачивали смесь насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (10 мл). Экстрагировали смесь ДХМ (40 мл). Органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором (30 мл), сушили над (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фильтровали и концентрировали с получением твердого вещества. Твердое вещество растворяли в DMSO (10 мл), затем добавляли NaCN (0,60 г, 13,0 ммоль) и перемешивали в течение 1 ч. Разделяли смесь между EtOAc (50 мл) и водой (50 мл). Органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением продукта в виде твердого вещества (1,3 г, 64%).

Время удерживания пика ЖХ-ЭР/МС: 1,17 мин.

Подготовительный синтез 5.

Метил-2-(4-бром-2-фтор-5-метилфенил)ацетат.

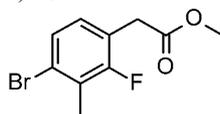


В колбу добавляли: 2-(4-бром-2-фтор-5-метилфенил)ацетонитрил (1,20 г, 5,10 ммоль), этанол (5 мл), воду (3 мл) и гидроксид калия (0,90 г, 16 ммоль). Нагревали смесь при 90°C в течение ночи. Охлаждали смесь на ледяной бане и подкисляли 1,0 М раствором HCl до pH 4-5, затем разделяли смесь между EtOAc (30 мл) и водой (30 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением 2-(4-бром-2-фтор-5-метилфенил)уксусной кислоты в виде твердого вещества. Полученное вещество растворяли в ДХМ (10 мл), затем добавляли ДМФА (0,05 мл, 0,6 ммоль) и оксалилхлорид (0,5 мл, 6 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем по каплям добавляли MeOH (2 мл, 49,4 ммоль). Через 30 мин удаляли растворитель в вакууме и разделяли остаток между EtOAc (40 мл) и 5% NaHCO<sub>3</sub> (30 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (40 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения в виде маслянистого вещества (1,1 г, 80%).

ЭР/МС m/z (<sup>79</sup>Br, <sup>81</sup>Br) 278, 280 (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

Подготовительный синтез 6.

Метил-2-(4-бром-2-фтор-3-метилфенил)ацетат.

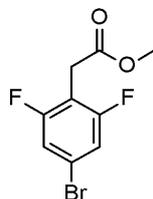


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 5, используя 2-(4-бром-2-фтор-3-метилфенил)ацетонитрил.

Время удерживания пика ЖХ-ЭР/МС: 1,22 мин.

Подготовительный синтез 7.

Метил-2-(4-бром-2,6-дифторфенил)ацетат.

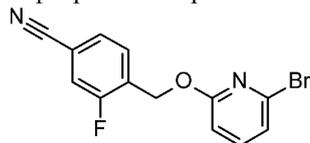


Смешивали 4-бром-2,6-дифторфенилуксусную кислоту (3,30 г, 12,5 ммоль), ДХМ (20 мл), ДМФА (0,05 мл, 0,6 ммоль) и оксалилхлорид (1,3 мл, 15 ммоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 30 мин, затем по каплям добавляли MeOH (1,5 мл, 37 ммоль, 100% мае). Смесь концентрировали и разделяли между EtOAc (30 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (15 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения в виде маслянистого вещества (3,41 г, количественный выход), которое использовали в подготовительном синтезе 10 без дополнительной очистки.

ЭР/МС m/z (<sup>79</sup>Br, <sup>81</sup>Br) 265, 267 (M+H).

Подготовительный синтез 8.

4-[(6-Бром-2-пиридил)оксиметил]-3-фторбензонитрил.

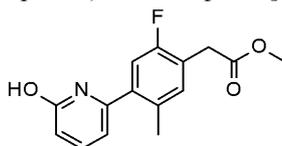


Растворяли 2-бром-6-фторпиридин (2,50 г, 13,8 ммоль) и 3-фтор-4-(гидроксиметил)бензонитрил (2,15 г, 13,8 ммоль) в 1,4-диоксане (25 мл) и по каплям добавляли раствор трет-бутоксид калия (20 мас.% в ТГФ, 10,0 мл, 16,6 ммоль) в течение 12 мин при комнатной температуре. Нагревали реакционную смесь при 40°C в течение 30 мин. Выливали смесь в водный раствор K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 М) и дважды экстрагировали EtOAc. Органическую фазу промывали водой и насыщенным водным раствором NaCl, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток сушили в вакуумной печи при 50°C с получением указанного в заголовке соединения (4,23 г, 95%) в виде светло-желтого твердого вещества.

ЭР/МС m/z (<sup>79</sup>Br, <sup>81</sup>Br) 307, 309 (M+H).

Подготовительный синтез 9.

Метил-2-[2-фтор-4-(6-гидрокси-2-пиридил)-5-метилфенил]ацетат.

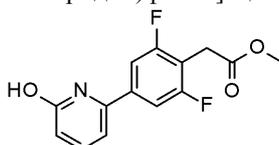


Добавляли в колбу пинаколовый эфир 6-гидроксипиридин-2-бороновой кислоты (1,6 г, 6,9 ммоль), метил-2-(4-бром-2-фтор-5-метилфенил)ацетат (2,2 г, 8,4 ммоль), ТГФ (15 мл), воду (1 мл) и карбонат калия (2,0 г, 14 ммоль). Продували смесь азотом в течение 10 мин, затем добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0,26 г, 0,35 ммоль) и нагревали при 75°C в течение 2 ч. Разделяли смесь между EtOAc (30 мл) и водой (30 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (1,4 г, 74%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС m/z 276 (M+H), 274 (M-H).

Подготовительный синтез 10.

Метил-2-[2,6-дифтор-4-(6-гидрокси-2-пиридил)фенил]ацетат.

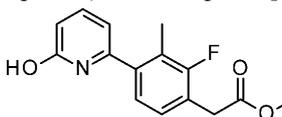


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 9, используя метил-2-(4-бром-2,6-дифторфенил)ацетат, нагревая реакцию смесь при 75°C в течение ночи.

ЭР/МС m/z 280 (M+H).

Подготовительный синтез 11.

Метил-2-[2-фтор-4-(6-гидрокси-2-пиридил)-3-метилфенил]ацетат.

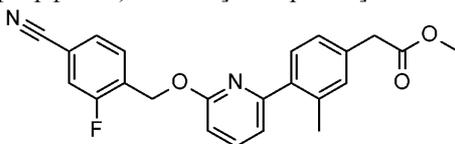


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 9, используя метил-2-(4-бром-2-фтор-3-метилфенил)ацетат, нагревая реакцию смесь при 75°C в течение ночи (18 ч.).

ЭР/МС m/z 276 (M+H), 274 (M-H).

Подготовительный синтез 12.

Метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-3-метилфенил]ацетат.



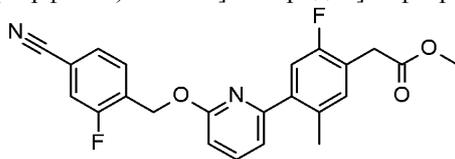
Растворили 2-(4-бром-3-метилфенил)уксусную кислоту (10,7 г, 45,8 ммоль) в ДХМ (50 мл). Охлаждали смесь на бане изо льда/воды и затем добавляли оксалилхлорид (4,8 мл, 55 ммоль) и ДМФА (0,1 мл). Убирали баню изо льда/воды и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. По каплям добавляли MeOH (6,0 мл) в течение 2 мин и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Концентрировали реакцию смесь в вакууме и растворяли остаток в EtOAc. Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным водным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем фильтровали и концентрировали. К остатку добавляли бис(пинаколато)дибор (12,8 г, 50,4 ммоль) и ацетат калия (13,6 г, 137 ммоль). Через реакцию смесь барботировали азот в течение 15 мин, затем добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (комплекс с ДХМ, 1,13 г, 1,37 ммоль). Реакцию смесь нагревали в атмосфере азота при 85°C в течение 15 ч на масляной бане, затем снимали реакцию смесь с масляной бани. Растворили карбонат калия (9,49 г, 68,7 ммоль) в воде (60 мл), через раствор барботировали азот в течение 10 мин и затем полученный раствор добавляли к реакционной смеси, затем добавляли 4-[(6-бром-2-пиридил)оксиметил]-3-фторбензонитрил (14,1 г, 45,8 ммоль). Через объединенную реакцию смесь барботировали азот в течение 5 мин и нагревали в атмосфере азота при 85°C в течение 6 ч. Охлаждали реакцию смесь до температуры, близкой к комнатной, и концентрировали в вакууме для удалений большей части 1,4-диоксана. Полученную смесь разбавляли EtOAc (200 мл) и промывали водой и насыщенным водным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали хроматографией на

силикагеле, используя градиент от 5 до 50% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (13,3 г, 70%) в виде светло-желтого твердого вещества.

ЭР/МС  $m/z$  391 (M+H).

Подготовительный синтез 13.

Метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]ацетат.

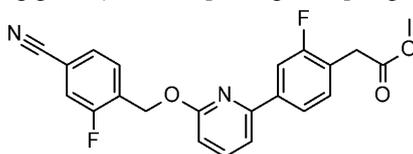


Добавляли в колбу метил-2-[2-фтор-4-(6-гидрокси-2-пиридил)-5-метилфенил]ацетат (1,40 г, 5,09 ммоль), 1,4-диоксан (35 мл), карбонат серебра (1,7 г, 6,2 ммоль) и 4-(бромметил)-3-фторбензонитрил (1,4 г, 6,2 ммоль). Нагревали смесь при 60°C в течение ночи. Отфильтровывали твердое вещество и концентрировали фильтрат. Остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 12 до 55% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (1,60 г, 77%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС  $m/z$  409 (M+H), 407 (M-H).

Подготовительный синтез 14.

Метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фторфенил]ацетат.

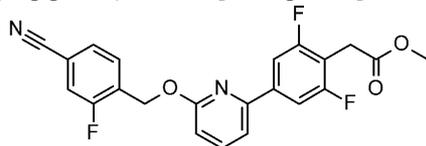


В колбу загружали 4-[(6-бром-2-пиридил)оксиметил]-3-фторбензонитрил (2,02 г, 6,58 ммоль), метил-2-(2-фтор-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)фенил)ацетат (2,99 г, 9,88 ммоль),  $K_2CO_3$  (2,30 г, 16,5 ммоль), 1,4-диоксан (30 мл) и воду (10 мл). Через смесь барботировали азот в течение 10 мин. К смеси добавляли комплекс  $Pd(dppf)Cl_2$  с ДХМ (492 мг, 0,658 ммоль) и нагревали до 80°C в атмосфере азота в течение 5 ч. Охлаждали реакционную смесь, разбавляли EtOAc (75 мл) и фильтровали через слой Celite®. Фильтрат промывали водой и насыщенным водным раствором NaCl, сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле с градиентом от 5 до 90% EtOAc в гексанах с получением указанного в заголовке соединения (2,68 г, 94%).

ЭР/МС  $m/z$  395 (M+H).

Подготовительный синтез 15.

Метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2,6-дифторфенил]ацетат.

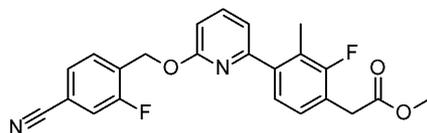


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 13, используя метил-2-[2,6-дифтор-4-(6-гидрокси-2-пиридил)фенил]ацетат, нагревая реакционную смесь при 80°C в течение ночи.

ЭР/МС  $m/z$  413 (M+H).

Подготовительный синтез 16.

Метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-3-метилфенил]ацетат.

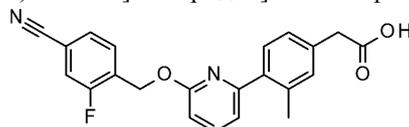


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 13, используя метил-2-[2-фтор-4-(6-гидрокси-2-пиридил)-3-метилфенил]ацетат, нагревая реакционную смесь при 80°C в течение 3 ч.

ЭР/МС  $m/z$  409 (M+H).

Подготовительный синтез 17.

2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-3-метилфенил]уксусная кислота.



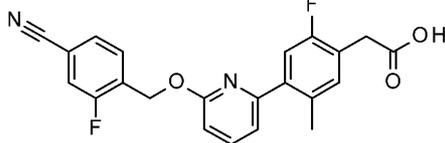
Добавляли в колбу метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-3-метилфенил]ацетат

(1,20 г, 3,07 ммоль), ACN (20 мл), воду (10 мл) и гидроксид лития (0,35 г, 15 ммоль). Нагревали смесь при 45°C в течение 3 ч. Охлаждали смесь на ледяной бане и подкисляли 1,0 М раствором HCl до pH 4-5. Разделяли смесь между EtOAc (30 мл) и водой (30 мл). Органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (1,1 г, 95%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС m/z 377 (M+H).

Подготовительный синтез 18.

2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]уксусная кислота.

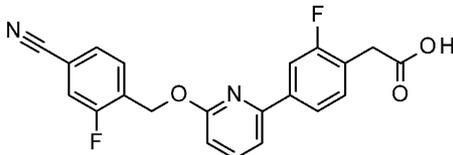


Добавляли в колбу метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]ацетат (1,6 г, 3,9 ммоль), ACN (20 мл), воду (6 мл) и гидроксид лития (0,45 г, 19 ммоль). Нагревали смесь при 45°C в течение 2 ч, охлаждали смесь на ледяной бане и подкисляли 1,0 М раствором HCl до pH 4-5. Разделяли смесь между EtOAc (50 мл) и водой (50 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (1,55 г, 100%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС m/z 395 (M+H).

Подготовительный синтез 19.

2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фторфенил]уксусная кислота.

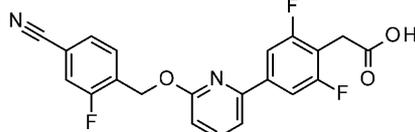


Растворяли метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фторфенил]ацетат (2,68 г, 6,25 ммоль) в ТГФ (50 мл), затем добавляли гидроксид лития (797 мг, 32,9 ммоль) и воду (20 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 5 ч доводили pH реакционной смеси до 5 с помощью водного раствора HCl (1 М). Летучие растворители удаляли в вакууме с получением водной суспензии. Фильтровали и сушили твердое вещество с получением указанного в заголовке соединения (2,24 г, 88%).

ЭР/МС m/z 381 (M+H).

Подготовительный синтез 20.

2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2,6-дифторфенил]уксусная кислота.

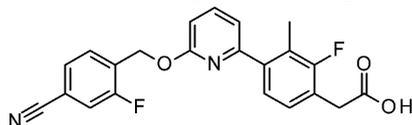


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 18, используя метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2,6-дифторфенил]ацетат.

ЭР/МС m/z 399 (M+H).

Подготовительный синтез 21.

2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-3-метилфенил]уксусная кислота.

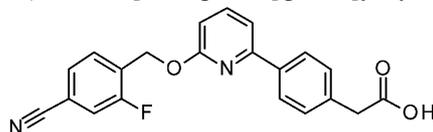


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 17, используя метил-2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-3-метилфенил]ацетат.

ЭР/МС m/z 395 (M+H).

Подготовительный синтез 22.

2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]фенил]уксусная кислота.

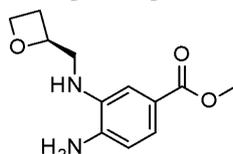


Смешивали 4-[(6-бром-2-пиридил)оксиметил]-3-фторбензонитрил (0,70 г, 2,3 ммоль) и 2-(4-боронофенил)уксусную кислоту (0,64 г, 3,4 ммоль), ТГФ (15 мл), воду (5 мл) и карбонат калия (0,63 г, 4,6 ммоль). Продували смесь азотом в течение 10 мин, затем добавляли Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0,085 г, 0,11 ммоль) и нагревали смесь при 75°C в течение 8 ч. Подкисляли смесь до pH 4-5 водным раствором HCl (1 М). Разделяли смесь между EtOAc (50 мл) и водой (50 мл). Органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили над (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), затем фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 25 до 65% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (800 мг, выход 97%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС m/z 363,0 (M+H).

Подготовительный синтез 23.

Метил-4-амино-3-[[2-(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат.



К раствору метил-3-фтор-4-нитробензоата (2,0 г, 10 ммоль) в ТГФ (10 мл) и ДМФА (10 мл) добавляли триэтиламин (3,1 мл, 22 ммоль) при комнатной температуре. К желтоватому раствору добавляли [(2S)-оксетан-2-ил]метанамин (Austin Chemical Company, 1,0 г, 11 ммоль) и перемешивали раствор цвета ржавчины в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (100 мл) и водой (50 мл). Отделяли органический слой и затем проводили обратную экстракцию водного слоя, используя EtOAc (2×50 мл). Объединяли органические фазы и промывали насыщенным водным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали, концентрировали и сушили остаток под высоким вакуумом. В результате получали неочищенный метил-4-нитро-3-[[2-(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат (2,8 г, 10 ммоль) в виде желтого твердого вещества.

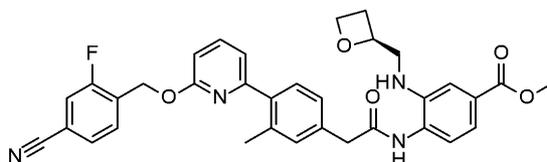
ЭР/МС m/z 267 (M+H).

Затем растворяли метил-4-нитро-3-[[2-(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат (2,8 г, 10 ммоль) в ТГФ (50 мл) и добавляли палладий на углероде (5%, предварительно смоченный водой, 0,5 г). Реакционную смесь очищали вакуумом и водородом, затем перемешивали в атмосфере водорода из баллона при комнатной температуре в течение 2 ч, и за это время исчез желтый цвет. Смесь фильтровали через Celite® и концентрировали с получением указанного в заголовке соединения (2,4 г, 99%).

ЭР/МС m/z 237 (M+H).

Подготовительный синтез 24.

Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-3-метилфенил]ацетил]амино]-3-[[2-(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат.

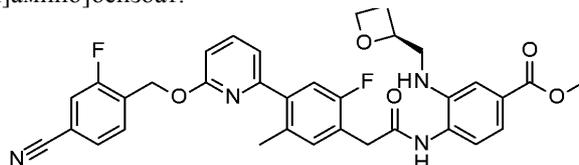


В колбу добавляли 2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-3-метилфенил]уксусную кислоту (1,10 г, 2,92 ммоль), ДМФА (10 мл), НАТУ (1,4 г, 3,6 ммоль), метил-4-амино-3-[[2-(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат (0,76 г, 3,2 ммоль) и DIPEA (1,5 мл, 8,6 ммоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 30 мин, затем разделяли между EtOAc (30 мл) и водой (30 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 10 до 35% EtOAc в ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения (1,2 г, 69%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС m/z 595 (M+1), 593 (M-1).

Подготовительный синтез 25.

Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]ацетил]амино]-3-[[2-(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат.



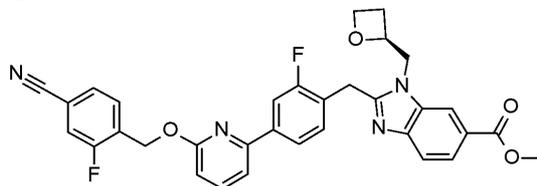
Добавляли в колбу: 2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]уксусную кислоту (1,20 г, 3,04 ммоль), ДМФА (15 мл), НАТУ (1,2 г, 3,1 ммоль), метил-4-амино-3-[[2-(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат (0,80 г, 3,4 ммоль) и DIPEA (1,5 мл, 8,6 ммоль). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 30 мин, затем разделяли между EtOAc (30 мл) и

водой (30 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 10 до 35% EtOAc в ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества (1,20 г, 64%).

ЭР/МС m/z 613 (M+1), 611 (M-H).

Подготовительный синтез 26.

Метил-2-[[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фторфенил]метил]-3-[[2(S)-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоксилат.



В круглодонную колбу добавляли 2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фторфенил]уксусную кислоту (205 мг, 0,540 ммоль), метил-4-амино-3-[[2(S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат (116 мг, 0,490 ммоль), NATU (224 мг, 0,589 ммоль), DIPEA (0,26 мл, 1,5 ммоль) и ДМФА (5 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 3,5 ч реакционную смесь разбавляли EtOAc (30 мл) и промывали водой и насыщенным водным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 0 до 10% MeOH в ДХМ, с получением промежуточного амида (326 мг).

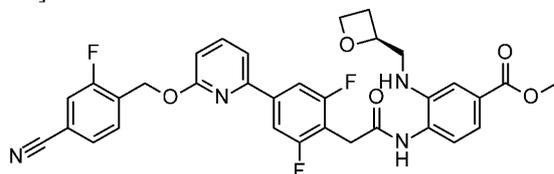
ЭР/МС m/z 599 (M+H).

Нагревали промежуточный амид с уксусной кислотой (5 мл) при 50°C в течение 15 ч. Концентрировали реакционную смесь в вакууме и растворяли полученный остаток в EtOAc (25 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> и насыщенным водным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле, используя градиент от 20 до 100% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке соединения (152 мг, 52%).

ЭР/МС m/z 581 (M+H).

Подготовительный синтез 27.

Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2,6-дифторфенил]ацетил]амино]-3-[[2(S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат.

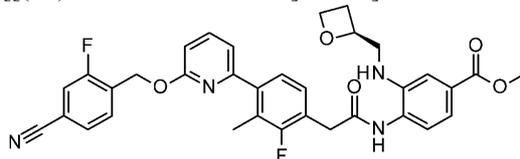


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 24, используя 2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2,6-дифторфенил]уксусную кислоту. Собирали продукт, который выдался в осадок во время выделения продукта с использованием воды, посредством фильтрования и использовали без дополнительной очистки.

ЭР/МС m/z 617 (M+H), 615 (M-H).

Подготовительный синтез 28.

Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-3-метилфенил]ацетил]амино]-3-[[2(S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат.

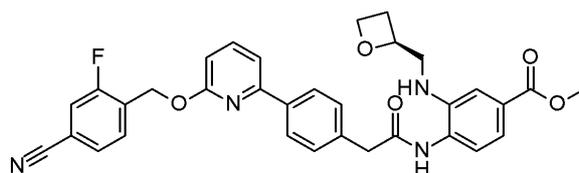


Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 24, используя 2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-3-метилфенил]уксусную кислоту.

ЭР/МС m/z 613 (M+H), 611 (M-H).

Подготовительный синтез 29.

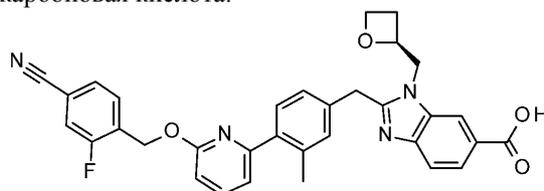
Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]фенил]ацетил]амино]-3-[[2(S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат.



Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в подготовительном синтезе 25, используя 2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]фенил]уксусную кислоту.

ЭР/МС  $m/z$  581,0 (M+H), 579,0 (M-H).

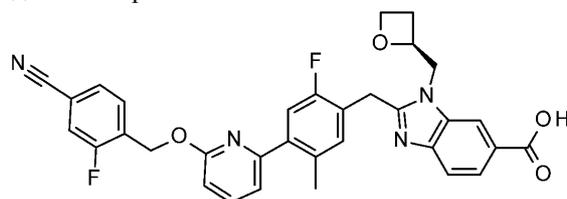
Пример 1. 2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-3-метилфенил]метил]-3-[[2(S)-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоновая кислота.



В колбу добавляли метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-3-метилфенил]ацетил]амино]-3-[[2(S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат (1,2 г, 2,0 ммоль) и уксусную кислоту (6 мл). Нагревали смесь при 80°C в течение 2 ч, затем удаляли растворитель в вакууме. Разделяли остаток между EtOAc (30 мл) и водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (5%, 20 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли в ACN (5 мл) и воде (3 мл), затем добавляли к смеси LiOH (0,22 г, 9,2 ммоль) и перемешивали при 50°C в течение 2 ч. Удаляли растворитель в вакууме. Остаток очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией, используя градиент от 20 до 35% ACN в 5% водном растворе NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, с получением указанного в заголовке соединения (900 мг, 79%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС  $m/z$  563 (M+H), 561 (M-H).

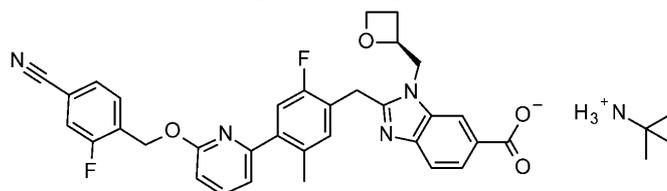
Пример 2. 2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]метил]-3-[[2(S)-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоновая кислота.



Добавляли в колбу метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]ацетил]амино]-3-[[2(S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат (1,20 г, 1,96 ммоль) и уксусную кислоту (15 мл), затем нагревали смесь при 80°C в течение 2 ч. Растворитель удаляли в вакууме. Разделяли остаток между EtOAc (30 мл) и водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (5%, 20 мл). Органическую фазу промывали насыщенным водным раствором NaCl (30 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли в ACN (10 мл) и воде (4 мл), затем добавляли к смеси LiOH (0,24 г, 10 ммоль) и перемешивали при 50°C в течение 2 ч. Смесь подкисляли насыщенным водным раствором лимонной кислоты до pH 4-5. Удаляли растворитель в вакууме. Остаток очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией, используя градиент от 20 до 35% ACN в 5% водном растворе NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, с получением указанного в заголовке соединения (745 мг, 66%) в виде твердого вещества.

ЭР/МС  $m/z$  581 (M+H), 579 (M-H).

Пример 2а. 2-[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]метил]-3-[[2(S)-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоксилат трет-бутиламмония.



Способ 1. Получение без затравочных кристаллов.

Суспендировали 2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]метил]-3-[[2(S)-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоновую кислоту (555 мг, 0,96 ммоль) в ацетоне (6 мл) при перемешивании при 800 об./мин при 50°C с получением суспензии белого твердого вещества. Добавляли трет-бутиламин (115 мкл, 1,09 ммоль, 1,14 экв.), наблюдая быстрое осветление смеси с последующим осаждением белого твердого вещества. Взвесь перемешивали при 50°C в течение 1 ч, затем вы-

ключали нагревание и оставляли образец перемешиваться до достижения комнатной температуры. Отфильтровывали твердое вещество посредством вакуумной фильтрации и сушили на месте в течение 15 мин под потоком азота, затем сушили в вакууме при 50°C в течение 1 ч с получением указанного в заголовке соединения (612 мг, 98%).

Способ 2. Получение с затравочными кристаллами.

Смешивали 2-[[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]метил]-3-[[2S]-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоновую кислоту (50 г, 86,1 ммоль), ацетон (658 мл) и воду (42 мл) и нагревали смесь до 50°C. Смесь фильтровали через бумагу GF/F и промывали смесью 94:6 об.:об. ацетон:вода (25 мл). Полученный раствор нагревали при 50°C. Получали раствор трет-бутиламина (10 мл, 94,7 ммоль, 1,1 экв.) и смеси 94:6 об.:об. ацетон:вода (25 мл). Добавляли часть раствора трет-бутиламина (7 мл), затем затравочные кристаллы 2-[[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]метил]-3-[[2S]-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоксилата трет-бутиламмония (50 мг). Добавляли оставшийся раствор трет-бутиламина в течение около 1 ч через шприцевой насос со скоростью 0,47 мл/мин. Нагревали полученную суспензию при 50°C в течение 2 ч, затем охлаждали смесь до комнатной температуры в течение ночи. Суспензию фильтровали и промывали ацетоном (2×100 мл). Влажный осадок на фильтре сушили при 50°C в вакууме до постоянной массы с получением указанного в заголовке соединения (51,8 г, 92%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

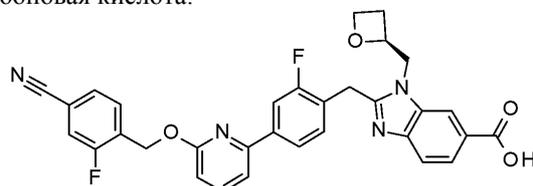
Для полученного образца указанного в заголовке соединения записывали профиль РПД, используя излучение CuK $\alpha$ , который имеет пики дифракции (значения 2-тета), указанные ниже в табл. 1, и, в частности, имеет пики при 6,9 в комбинации с одним или более пиками, выбранными из группы, состоящей из 16,3 и 22,5° с допуском для углов дифракции 0,2°.

Таблица 1

Пики рентгеновской порошковой дифракции 2-[[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-5-метилфенил]метил]-3-[[2S]-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоксилата трет-бутиламмония

Пик	Угол (°2-тета) +/- 0,2°	Относительная интенсивность (% от самого интенсивного пика)
1	5,5	26,20%
2	6,9	64,90%
3	11,2	49,20%
4	16,3	100,00%
5	17,1	34,70%
6	19,6	53,00%
7	21,8	43,10%
8	22,5	93,80%
9	27,3	41,10%
10	28,0	37,90%

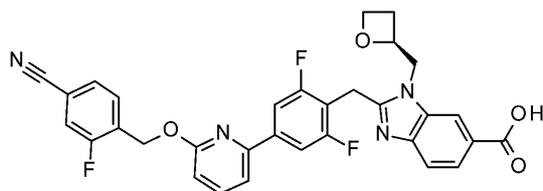
Пример 3. 2-[[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фторфенил]метил]-3-[[2S]-оксетан-2-илметил]бензимидазол-5-карбоновая кислота.



Растворяли метил-2-[[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фторфенил]метил]-3-[[2S]-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоксилат (152 мг, 0,256 ммоль) в ТГФ (6 мл), затем добавляли гидроксид лития (31 мг, 1,26 ммоль) и воду (2 мл). Перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 6 ч, затем доводили pH до 6 с помощью водного раствора HCl (1 н.). Удаляли ТГФ в вакууме и собирали оставшееся твердое вещество фильтрацией. Очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией, используя градиент от 10 до 40% ACN в водном растворе NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (10 mM, pH 10), с получением указанного в заголовке соединения (60 мг, 41%).

ЭР/МС m/z 567 (M+H).

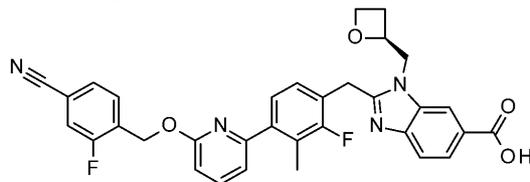
Пример 4. 2-[[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2,6-дифторфенил]метил]-3-[[2S]-оксетан-2-илметил]бензимидазол-5-карбоновая кислота.



Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в примере 1, используя метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2,6-дифторфенил]ацетил]амино]-3-[[2(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат. Продукт очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией, используя градиент от 30 до 50% ACN в водном растворе  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (10 мМ, pH 10).

ЭР/МС m/z 585 (M+H), 583 (M-H).

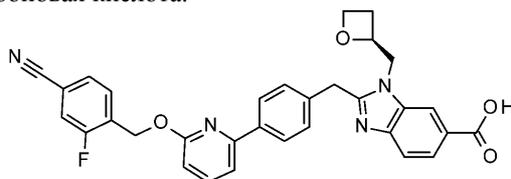
Пример 5. 2-[[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-3-метилфенил]метил]-3-[[2(2S)-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоновая кислота.



Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в примере 2, используя метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]-2-фтор-3-метилфенил]ацетил]амино]-3-[[2(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат. Продукт очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией, используя градиент от 5 до 40% ACN в 5% водном растворе  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

ЭР/МС m/z 581 (M+H), 579 (M-H).

Пример 6. 2-[[4-[6-[(4-Циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]фенил]метил]-3-[[2(2S)-оксетан-2-ил]метил]бензимидазол-5-карбоновая кислота.



Указанное в заголовке соединение получали по существу так, как описано в примере 1, используя метил-4-[[2-[4-[6-[(4-циано-2-фторфенил)метокси]-2-пиридил]фенил]ацетил]амино]-3-[[2(2S)-оксетан-2-илметил]амино]бензоат. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой флэш-хроматографией, используя градиент от 20 до 35% ACN в 5% водном растворе  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

ЭР/МС m/z 549,0 (M+H), 547,1 (M-H).

#### Биологические анализы

Анализ цАМФ человеческого рецептора GLP-1 в клетках HEK293.

Функциональную активность в отношении рецептора GLP-1 определяли посредством измерения цАМФ в клональной клеточной линии HEK293, экспрессирующей человеческий GLP-1R (номер доступа NCBI NP\_002053) при плотности экспрессии  $581 \pm 94$  (n=6) и  $104 \pm 12$  (n=5) фмоль/мг белка (измеренной с помощью анализа конкурентного связывания гомологичного [ $^{125}\text{I}$ ]GLP-1(7-36) $\text{NH}_2$ ). Клетки, экспрессирующие рецептор hGLP-1R, обрабатывали предложенным соединением (20-точечная кривая зависимости от концентрации в ДМСО, прямое 2,75-кратное разбавление Labcyte Echo, 384-луночный планшет Corning, кат. № 3570) в среде DMEM (Gibco, кат. № 31053) с добавлением 1X GlutaMAX™ (Gibco, кат. № 35050), 0,1% бычьего казеина (Sigma, C4765-10ML), 250 мкМ IBMX (3-изобутил-1-метилксантин, Acros, кат. № 228420010) и 20 мМ HEPES (Gibco, кат. № 15630) в 20 мкл аналитического буфера (конечная концентрация ДМСО 0,5%). Через 30 мин инкубации при 37°C количественно измеряли итоговое увеличение внутриклеточного цАМФ, используя аналитический набор CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Вкратце, уровни цАМФ в клетке определяли посредством добавления конъюгата цАМФ-d2 в буфере для лизиса клеток (10 мкл), с последующим добавлением антитела анти-цАМФ-сАМФ-Еu<sup>3+</sup>-криптата, также в буфере для лизиса клеток (10 мкл). Полученную конкурентную аналитическую смесь инкубировали в течение по меньшей мере 60 мин при комнатной температуре, затем считывали на приборе PerkinElmer Envision® при возбуждении при 320 нм и испускании при 665 и 620 нм. Условные единицы (испускание при 665/620 нм×1000) обратно пропорциональны количеству присутствующего цАМФ, и их пересчитывали в нМ цАМФ на лунку по стандартной кривой цАМФ. Количество цАМФ, образованного (нМ) в каждой лунке, пересчитывали в процент от максимального ответа, наблюдаемого с человеческим GLP-1(7-36) $\text{NH}_2$ . Относительное значение  $\text{EC}_{50}$  и верхнее процентное значение ( $\text{E}_{\text{max}}$ ) рассчитывали анализом нелинейной регрессии, используя зависимость процента от максимального ответа от концентрации добавленного соединения, сглаженную по четырехпараметрическому логистическому уравнению. Значения

$EC_{50}$  и  $E_{max}$ , полученные при испытании соединений из примеров 1-6 в анализе цАФМ, описанном выше, с использованием клеток НЕК293, экспрессирующих 581 и 104 фмоль/мг GLP-1, представлены в табл. 2 и 3 соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения из примеров 1-6 являются агонистами человеческого рецептора GLP-1.

Таблица 2

Клеточная линия НЕК293 с плотностью экспрессии GLP-1R 581 фмоль/мг, внутриклеточный ответ цАМФ

Пример	$EC_{50}$ (нМ) $\pm$ СОС (n)	$E_{max}$ (%) $\pm$ СОС (n)
1	9,33 $\pm$ 1,36 (n = 6)	99,5 $\pm$ 2,53 (n = 6)
2	1,14 $\pm$ 0,315 (n = 6)	104 $\pm$ 4,35 (n = 6)
3	3,08 $\pm$ 0,379 (n = 5)	99 $\pm$ 3,69 (n = 5)
4	3,99 $\pm$ 0,378 (n = 3)	99,2 $\pm$ 4 (n = 3)
5	6,45 $\pm$ 0,934 (n = 3)	105 $\pm$ 2,43 (n = 3)
6	20 $\pm$ 6,51 (n = 4)	101 $\pm$ 3,42 (n = 4)

Таблица 3

Клеточная линия НЕК293 с плотностью экспрессии GLP-1R 104 фмоль/мг, внутриклеточный ответ цАМФ

Пример	$EC_{50}$ (нМ) $\pm$ СОС (n)	$E_{max}$ (%) $\pm$ СОС (n)
1	20 $\pm$ 3,25 (n = 6)	71,4 $\pm$ 2,26 (n = 6)
2	3,97 $\pm$ 0,61 (n = 6)	79,2 $\pm$ 3,2 (n = 6)
3	10 $\pm$ 2,3 (n = 5)	81,7 $\pm$ 3,86 (n = 5)
4	9,59 $\pm$ 2,36 (n = 3)	78,3 $\pm$ 5,1 (n = 3)
5	23,6 $\pm$ 5,43 (n = 3)	76,7 $\pm$ 3,88 (n = 3)
6	47,7 $\pm$ 17,9 (n = 4)	80,3 $\pm$ 3,1 (n = 4)

In vivo интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе у мышей с нокином человеческого GLP-1R.

Эффективность иллюстративных соединений в отношении понижения концентрации глюкозы в крови in vivo определяли с использованием мышей, экспрессирующих человеческий GLP-1R (номер доступа NCBI NP\_002053) из генетического локуса Glp-1r мышей (Jun, L.S. et al., PLoS One., 2014, 9:e93746). Мышам, не имевших доступа к корму в течение ночи, перорально вводили экспериментальное соединение, солюбилизованное в 10% растворе Kolliphor® (HS15) в полиэтиленгликоле 400 (ПЭГ400). Через 1 ч после введения дозы животным вводили глюкозу посредством интраперитонеальной инъекции (2 г/кг) и периодически измеряли уровни глюкозы в крови в течение следующих 2 ч, используя глюкометры. Вводили определенный диапазон доз экспериментального соединения и рассчитывали площадь под кривой для каждой дозовой группы, и сглаживали по четырехпараметрической логистической модели для расчета in vivo эффективности как  $ED_{50}$  с доверительным интервалом 95%. При испытании в описанном выше in vivo интраперитонеальном тесте толерантности к глюкозе, соединения из примеров 1-3 демонстрировали активность в отношении снижения концентрации глюкозы в крови мышей, экспрессирующих человеческий GLP-1R, со значениями  $ED_{50}$  (и доверительным интервалом 95%), представленными в табл. 4, что свидетельствует о том, что указанные соединения являются перорально доступными эффективными агонистами GLP-1R у мышей.

Таблица 4

Эффективность в отношении понижения уровня глюкозы в крови мышей, экспрессирующих человеческий GLP-1R

Пример	Снижение уровня глюкозы в крови, $ED_{50}$ (мг/кг)	Доверительный интервал 95%
1	0,09	0,0301-0,2592
2	0,07	0,0246-0,1808
3	0,06	0,013-0,246

Фармакокинетика у приматов, не относящихся к человеку (NHP).

Экспериментальное соединение внутривенно (IV) вводили натошак самцам яванских макаков в дозе 0,5 мг/кг (используя объем дозы 1 мл/кг). Серийные образцы крови собирали через 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после введения болюсной IV дозы. После обработки коагулянтом ЭДТК, посредством цен-

трифугирования получали плазму и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа ЖХ-МС/МС. Определяли концентрацию экспериментального соединения в плазме. Использовали некомпартментный анализ для расчета клиренса плазмы и объема распределения в равновесном состоянии. В табл. 5 представлены фармакокинетические данные, полученные в данном анализе для соединений из примеров 1-3. Отчасти, полученные данные используют для получения информации о механистических прогнозах ФК у людей, которые позволяют сделать предположение о фармакокинетическом профиле у людей в поддержку введения доз один раз в сутки.

Таблица 5

## Фармакокинетические данные у яванских макак

Пример	Клиренс плазмы (мл/мин/кг)	Объем распределения (л/кг)	Носитель*
1	13	1,2	A
2	11	1,1	A
3	6	1,1	B

\* Носитель A: 5% ДМСО и 95% (20% CAPTISOL® (мас./об.) в воде; носитель B: 20% Captisol (мас./об.) в воде+1 мол. экв. NaOH.

Анализ активности фермента фосфодиэстеразы 10 (PDE10).

Для выработки белка фосфодиэстеразы 10A1 (PDE10A1) клонировали полноразмерный клон PDE10A1, соответствующий GenBank ID AAD32595.1, в pFastBacl (Invitrogen). Белок PDE10A1 с С-концевой меткой FLAG экспрессировали посредством бакуловирусного инфицирования клеток насекомых и очищали с помощью анти-FLAG M2-агарозы (Sigma) и эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200 (GE Healthcare), и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в небольших аликвотах (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% глицерина).

Активность фермента PDE10A1 измеряли с помощью сцинтилляционного анализа сближения (SPA) на основе силиката иттрия, в котором обнаруживают монофосфаты с радиоактивным нуклеотидом, но не циклические монофосфаты. Аналитический буфер состоял из 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,4 mM ЭДТК и 0,1% BSA (Sigma). Анализы проводили в 384-луночных планшетах (3706, Corning) в общем объеме 50 мкл: состоящем из 24 мкл фермента PDE10A1, 1 мкл экспериментального соединения и 25 мкл циклического нуклеотида. Экспериментальные соединения разбавляли в чистом ДМСО, используя десятикратные кривые зависимости от концентрации, с 3-кратным фактором разбавления, и вносили 1 мкл в аналитические планшеты, используя акустическую диспенсерную станцию Echo555 (LabCyte). Инкубировали 24 мкл белка PDE10A1 с 1 мкл соединения в течение 30 мин, затем инициировали реакцию посредством добавления субстрата [8-<sup>3</sup>H]-цГМФ (6,5 Ки/ммоль, Perkin Elmer). Конечная концентрация компонентов составляла 70 пМ PDE10A1, 80 нМ (<sup>3</sup>H-cGMP) и 2% ДМСО в аналитическом буфере. Максимальная концентрация соединения в реакционной смеси составляла 10 мкМ. Реакционные смеси инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре, затем гасили и добавляли 400 мг на лунку гранул SPA (RPNQ0150, Perkin Elmer). Радиоактивность после связывания с гранулами (продукта) количественно измеряли через 12 ч с помощью счетчика Microbeta (Perkin Elmer). Нормализовали данные по % ингибированию и рассчитывали значения IC<sub>50</sub>, используя 4-параметрическое логистическое уравнение, как описано ранее (Campbell, R.M., Dymshitz, J., Eastwood, B.J. et al., "Data Standardization for Results Management" в Sittampalam, G.S.; Grossman, A., Brimacombe, K. et al., ред. Assay Guidance Manual., Бетесда (штат Мэриленд): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004). В табл. 6 показана активность соединений из примеров 1-4, измеренная в данном анализе. Полученные данные демонстрируют, что соединения из примеров 1-4 обладают слабой аффинностью связывания с PDE10A, что означает сниженный риск токсичности.

Таблица 6

## In vitro эффективность в отношении ингибирования PDE10A1

Пример	IC <sub>50</sub> (мкМ), n = 1
1	>10
2	7,43
3	>10
4	5,41

Анализ радиолигандного связывания для определения аффинности к K<sup>+</sup> каналу человеческого hERG.

Аффинность соединений к K<sup>+</sup> каналу человеческого hERG в трансфицированных клетках HEK-293

оценивали с помощью анализа радиолигандного связывания, как описано в данном документе. Гомогенаты клеточных мембран (около 40 мкг белка) инкубировали в течение 60 мин при 22°C 3 нМ [<sup>3</sup>H]дофетилида в отсутствие или в присутствии экспериментального соединения в буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM KCl и 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Анализ проводили в формате 96-луночного планшета с объемом 200 мкл, содержащим максимум 1% ДМСО после исходной солиubilизации экспериментального соединения. После инкубации быстро фильтровали образцы под вакуумом через стекловолокнистые фильтры (GF/B, Packard), предварительно пропитанные 0,3% PEI, и несколько раз промывали ледяным 50 mM Tris-HCl, 10 mM KCl и 1 mM MgCl<sub>2</sub>, используя харвестер клеток для 96 образцов (Unifilter, Packard). Сушили фильтры и затем считывали радиоактивность в сцинтиляционном счетчике (Topcount, Packard), используя сцинтиляционный коктейль (Microscint 0, Packard). В табл. 7 показана активность соединений 1-3 в данном анализе, выраженная как процент ингибирования относительно контрольного радиолиганд-специфического связывания. Полученные данные демонстрируют, что соединения из примеров 1-3 обладают слабой активностью ингибирования hERG, что означает сниженный риск токсичности.

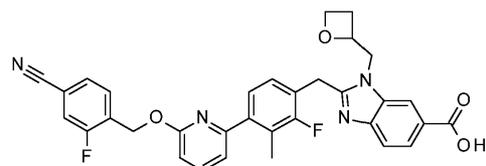
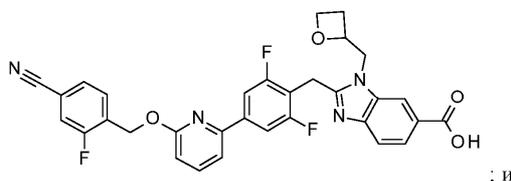
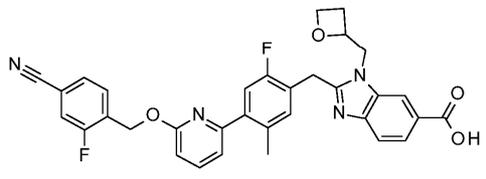
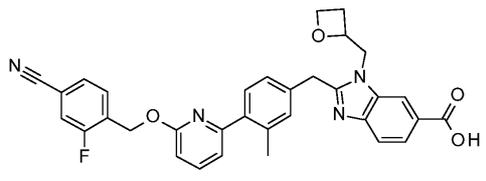
Таблица 7

Радиолигандное процентное ингибирование  
аффинности к K<sup>+</sup> каналу человеческого hERG

Пример	Процентное ингибирование (%) при концентрации соединения 100 мкМ, n = 1
1	0
2	54
3	37

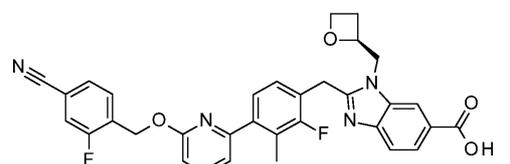
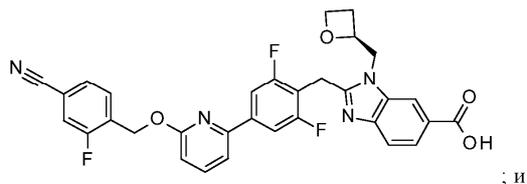
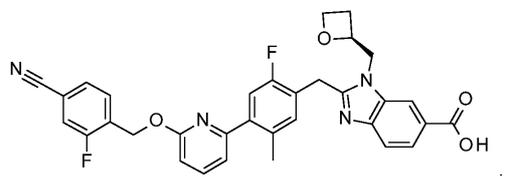
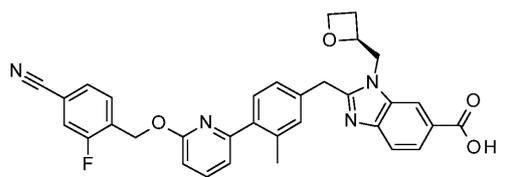
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, выбранное из



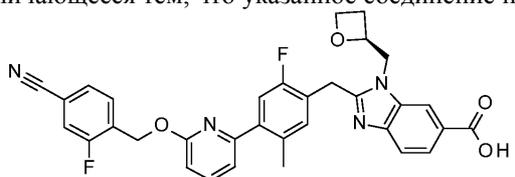
или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, выбранное из



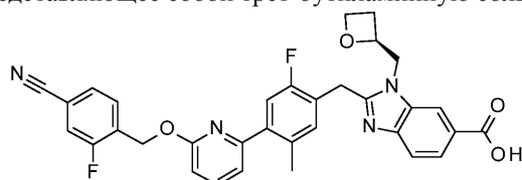
или его фармацевтически приемлемая соль.

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



или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по п.3, представляющее собой трет-бутиламинную соль соединения



5. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-4 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

6. Способ лечения сахарного диабета II типа у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества соединения по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемой соли.

7. Способ снижения уровня глюкозы в крови млекопитающего, включающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемой соли.

8. Способ лечения гипергликемии у млекопитающего, включающий введение млекопитающему эффективного количества соединения по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемой соли.

9. Способ по любому из пп.6-8, отличающийся тем, что соединение вводят перорально.

10. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-4 для лечения сахарного диабета II типа.

11. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-4 для снижения уровня глюкозы в крови.

12. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-4 для лечения гипергликемии.

13. Применение по любому из пп.10-12, причем указанное соединение вводят перорально.

14. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-4 в производстве лекарственного средства для лечения сахарного диабета II типа.

15. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-4 в производстве лекарственного средства для снижения уровня глюкозы в крови.

16. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-4 в производстве лекарственного средства для лечения гипергликемии.

