

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391809 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.04(22) Дата подачи заявки
2021.12.20(51) Int. Cl. C07D 451/02 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/46 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

(31) 2020191.9

(32) 2020.12.18

(33) GB

(86) PCT/GB2021/053372

(87) WO 2022/129951 2022.06.23

(71) Заявитель:
ХЕПТАРЕС ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)

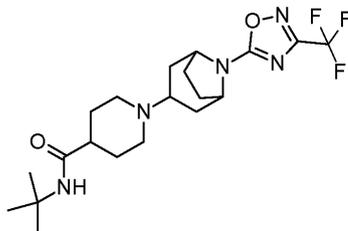
(72) Изобретатель:

Филдхаус Шарлотт, Конгрив Майлс
Стюарт (GB)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, которые являются агонистами мускариновых рецепторов M_1 и M_4 и которые применимы для лечения заболеваний, опосредованных мускариновыми рецепторами M_1 и/или M_4 . Также предложены фармацевтические композиции, содержащие соединения, и терапевтическое применение этих соединений. Предложенные соединения представляют собой соединения формулы (1):



и их соли.

A1

202391809

202391809

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к классу новых гетероциклических соединений, их солям, содержащим их фармацевтическим композициям и их терапевтическому применению для людей. В частности, изобретение относится к классу соединений, которые являются агонистами мускариновых рецепторов M_1 и/или M_4 и, следовательно, применимы для лечения болезни Альцгеймера, шизофрении, когнитивных расстройств и других заболеваний, опосредованных мускариновыми рецепторами M_1/M_4 , включая, среди прочего, лечение или облегчение боли.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR) являются членами суперсемейства связанных с G-белком рецепторов, которые опосредуют действия нейротрансмиттера ацетилхолина как в центральной, так и в периферической нервной системе. Было клонировано пять подтипов mAChR, от M_1 до M_5 . M_1 mAChR преимущественно экспрессируются постсинаптически в коре, гиппокампе, полосатом теле и таламусе; M_2 mAChR преимущественно расположены в стволе мозга и таламусе, хотя также присутствуют в коре, гиппокампе и полосатом теле, где они располагаются на холинергических синаптических окончаниях (Langmead et al., 2008 Br J Pharmacol). Однако M_2 mAChR также экспрессируются периферически в сердечной ткани (где они опосредуют вагусную иннервацию сердца), в гладких мышцах и экзокринных железах. M_3 mAChR экспрессируются на относительно низком уровне в ЦНС, но в значительной степени экспрессируются в гладких мышцах и железистых тканях, таких как потовые и слюнные железы (Langmead et al., 2008 Br J Pharmacology).

В центральной нервной системе мускариновые рецепторы, в особенности M_1 mAChR, играют важную роль в опосредовании высших когнитивных функций. Заболевания, связанные с когнитивными нарушениями, такие как болезнь Альцгеймера, сопровождаются потерей холинергических нейронов в базальных отделах переднего мозга (Whitehouse et al., 1982 Science). При шизофрении, которая также характеризуется когнитивными нарушениями, плотность mAChR снижена в префронтальной коре, гиппокампе и дорсальном полосатом теле больных (Dean et al., 2002 Mol Psychiatry). Кроме того, на животных моделях было показано, что блокада или поражение центральных холинергических путей приводит к глубокому когнитивному дефициту, а у пациентов с психическими расстройствами неселективные антагонисты mAChR вызывают психотомиметические эффекты. Заместительная холинергическая терапия в значительной

степени была основана на использовании ингибиторов ацетилхолинэстеразы для предотвращения распада эндогенного ацетилхолина. Эти соединения продемонстрировали эффективность в отношении симптоматического снижения когнитивных функций в клинике, но приводили к дозолIMITИРУЮЩИМ побочным эффектам, возникающим в результате стимуляции периферических M_2 и M_3 mAChR, включая нарушение перистальтики желудочно-кишечного тракта, брадикардию, тошноту и рвоту (<http://www.Drugs.com/pro/donepezil.html>; <http://www.drugs.com/pro/rivastigmine.html>).

Дальнейшие исследования были направлены на идентификацию прямых агонистов M_1 mAChR в целях улучшения когнитивной функции. Эти исследования привели к идентификации ряда агонистов, примерами которых являются такие соединения, как ксаномелин, AF267B, сабкомелин, миламелин и цевимелин. Было показано, что многие из этих соединений высокоэффективны в доклинических когнитивных моделях на грызунах и/или отличных от человека приматах. Миламелин продемонстрировал эффективность против индуцированного скополамином дефицита рабочей и пространственной памяти у грызунов; сабкомелин продемонстрировал эффективность в задаче распознавания зрительных объектов у мармозеток, а ксаномелин инвертировал вызванный антагонистом mAChR дефицит когнитивной деятельности в тесте пассивного избегания.

Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием (26,6 миллиона человек во всем мире на 2006 г.), поражающим пожилых людей и приводящим к глубокой потере памяти и когнитивной дисфункции. Этиология заболевания является комплексной, но характеризуется двумя характерными последствиями для головного мозга: скоплениями амилоидных бляшек, в основном состоящих из β -амилоидного пептида ($A\beta$), и нейрофибриллярных клубков, образованных гиперфосфорилированными тау-белками. Накопление $A\beta$ считается основным признаком прогрессирования AD, и поэтому многие предполагаемые способы лечения AD в настоящее время направлены на ингибирование продукции $A\beta$. $A\beta$ образуется в результате протеолитического расщепления мембраносвязанного белка-предшественника амилоида (APP). Процессинг APP осуществляется двумя путями: неамилоидогенным и амилоидогенным. Расщепление APP γ -секретазой является общим для обоих путей, но в первом случае APP расщепляется α -секретазой с образованием растворимого APP α . Сайт расщепления находится внутри последовательности $A\beta$, что препятствует его образованию. Однако при амилоидогенном пути APP расщепляется β -секретазой с образованием растворимого APP β , а также $A\beta$. Исследования *in vitro* показали, что агонисты mAChR могут способствовать процессингу APP по неамилоидогенному пути, приводя к растворимой форме. Исследования *in vivo* показали,

что агонист mAChR, AF267B, изменяет AD-подобную патологию у трансгенных мышей 3xTgAD на модели различных компонентов болезни Альцгеймера (Caccamo et al., 2006 Neuron). Наконец, было показано, что агонист mAChR цевимелин вызывает небольшое, но значительное снижение уровня A β в спинномозговой жидкости у пациентов с болезнью Альцгеймера, таким образом демонстрируя потенциальную эффективность в отношении изменения заболевания (Nitsch et al., 2000 Neurol).

Кроме того, доклинические исследования дают основания предполагать, что агонисты mAChR демонстрируют атипичный антипсихотический профиль в ряде доклинических моделей. Агонист mAChR, ксаномелин, инвертирует ряд форм поведения, обусловленных дофамином, в том числе: двигательную активность у крыс, индуцированную амфетамином; вскарабкивание у мышей, индуцированное апоморфином; вызванное агонистом дофамина вращение у крыс с односторонним поражением 6-OH-DA, и индуцированное амфетамином двигательное беспокойство у обезьян (без предрасположенности к EPS). Также было показано, что он ингибирует A10, но не A9, возбуждение дофаминовых клеток и условное избегание, а также индуцирует экспрессию c-fos у крыс в префронтальной коре и прилежащем ядре, но не в полосатом теле. Все эти данные свидетельствуют об атипичном антипсихотически-подобном профиле (Mirza et al., 1999 CNS Drug Rev). Мускариновые рецепторы также вовлечены в нейробиологию наркотической зависимости. Подкрепляющие эффекты кокаина и других вызывающих привыкание веществ опосредованы мезолимбической дофаминовой системой, причем поведенческие и нейрхимические исследования показали, что подтипы холинергических мускариновых рецепторов играют важную роль в регуляции дофаминергической нейротрансмиссии. Например, мыши M(4)(-/-) в результате воздействия кокаина продемонстрировали значительно усиленную поведенческую реакцию на вознаграждение (Schmidt et al Psychopharmacology (2011) Aug; 216(3):367-78). Кроме того, на этих моделях было показано, что ксаномелин блокирует действие кокаина.

Мускариновые рецепторы также участвуют в контроле движения и потенциально могут представлять собой новые методы лечения двигательных расстройств, таких как болезнь Паркинсона, СДВГ, болезнь Хантингтона, синдром Туретта и другие синдромы, связанные с дофаминергической дисфункцией в качестве основного патогенетического фактора, вызывающего заболевание.

Ксаномелин, сабкомелин, миламелин и цевимелин находятся на различных стадиях клинических исследований, касающихся лечения болезни Альцгеймера и/или шизофрении. Вторая фаза клинических исследований ксаномелина продемонстрировала его эффективность в отношении различных блоков когнитивных расстройств, включая

поведенческие нарушения и галлюцинации, связанные с болезнью Альцгеймера (Bodick et al., 1997 Arch Neurol). Это соединение также оценивали в небольшом исследовании фазы II с участием шизофреников, и оно показало значительное уменьшение положительных и отрицательных симптомов по сравнению с контролем - плацебо (Shekhar et al., 2008 Am J Psych). Однако во всех клинических исследованиях ксаномелин и другие родственные агонисты mAChR продемонстрировали неприемлемый профиль безопасности в отношении холинергических побочных эффектов, включая тошноту, желудочно-кишечные боли, диарею, диафорез (повышенное потоотделение), гиперсаливацию (повышенное слюноотделение), обмороки и брадикардию.

Мускариновые рецепторы вовлечены в процесс формирования центральной и периферической боли. Боль можно разделить на три различных типа: острую, воспалительную и невропатическую. Острая боль выполняет важную защитную функцию, защищая организм от воздействий, которые могут привести к повреждению тканей, однако послеоперационную боль необходимо снимать. Воспалительная боль может возникать по многим причинам, включая повреждение тканей, аутоиммунный ответ и инвазию патогенов, и вызывается действием медиаторов воспаления, таких как нейропептиды и простагландины, которые приводят к воспалению нейронов и боли. Нейропатическая боль связана с аномальными болевыми реакциями в ответ на неболевые раздражители. Нейропатическая боль связана с рядом различных заболеваний/травм, таких как повреждение спинного мозга, рассеянный склероз, диабет (диабетическая невропатия), вирусная инфекция (например, ВИЧ или герпес). Она также обычно встречается при раке, как в результате заболевания, так и в результате химиотерапии. Было показано, что активация мускариновых рецепторов оказывает анальгетическое действие при ряде болевых состояний за счет активации рецепторов в спинном мозге и высших центрах боли в головном мозге. Было показано, что повышение эндогенного уровня ацетилхолина с помощью ингибиторов ацетилхолинэстеразы, прямая активация мускариновых рецепторов агонистами или аллостерическими модуляторами оказывает обезболивающее действие. Напротив, блокада мускариновых рецепторов антагонистами или использование мышей с нокаутом увеличивает болевую чувствительность. Доказательства роли рецептора M_1 в боли представлены в обзоре DF Fiorino и M. Garcia-Guzman, 2012.

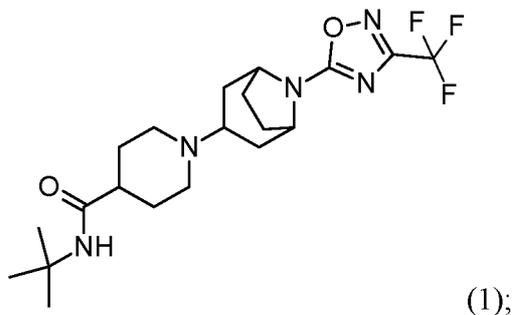
Совсем недавно было идентифицировано небольшое количество соединений, которые демонстрируют улучшенную селективность в отношении подтипа M_1 mAChR по сравнению с периферически экспрессируемыми подтипами mAChR (Bridges et al., 2008 Bioorg Med Chem Lett; Johnson et al., 2010 Bioorg Med Chem Lett; Budzik et al., 2010 ACS

Med Chem Lett). Несмотря на повышенный уровень селективности по сравнению с подтипом M_3 mAChR, некоторые из этих соединений сохраняют значительную агонистическую активность как в отношении этого подтипа, так и в отношении подтипа M_2 mAChR. В данном документе авторы описывают ряд соединений, которые неожиданно демонстрируют высокие уровни селективности в отношении M_1 и/или M_4 mAChR по сравнению с подтипами рецепторов M_2 и M_3 .

Краткое раскрытие настоящего изобретения

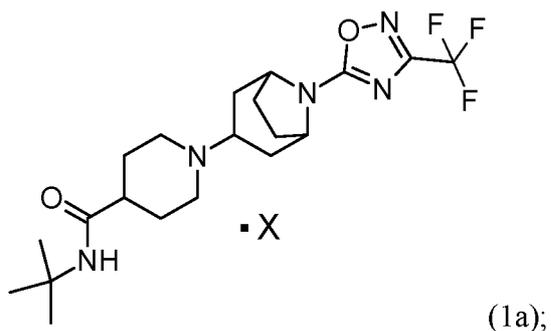
Настоящее изобретение относится к соединениям, обладающим активностью агонистов мускариновых M_1 и/или M_4 рецепторов. Более конкретно, изобретение относится к соединениям, которые проявляют селективность в отношении M_1 и/или M_4 рецепторов по сравнению с подтипами рецепторов M_2 и M_3 .

Соответственно, изобретение относится к соединению формулы (1):



или его соли.

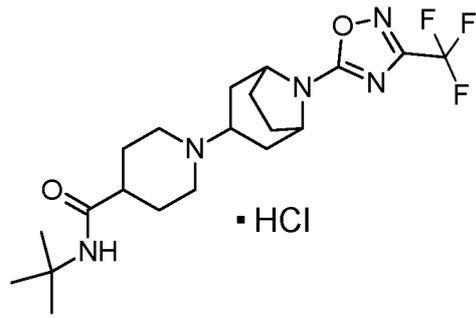
Изобретение также относится к соединению формулы (1a):



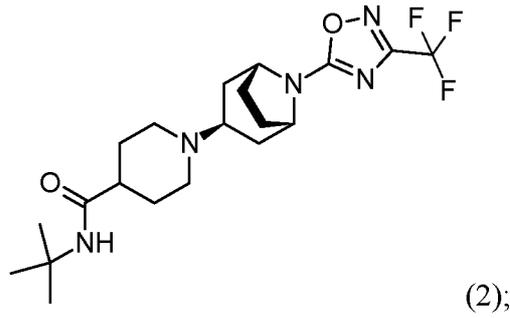
где X обозначает соль.

Изобретение также относится к соединению формулы (1b):

6

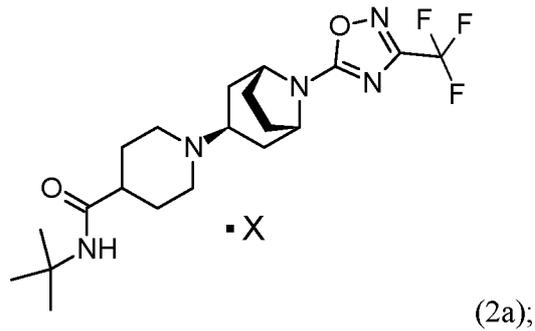


Изобретение также относится к соединению формулы (2):



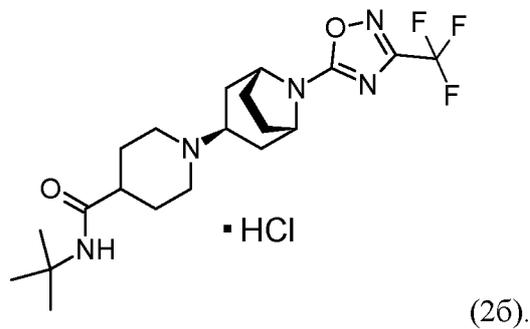
или его соли.

Изобретение также относится к соединению формулы (2a):

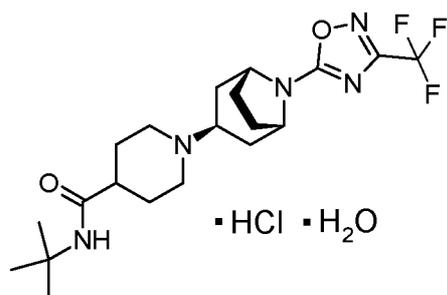


где X обозначает соль.

Изобретение также относится к соединению формулы (2b):



Изобретение также относится к соединению формулы (2c):



Соединение формулы (1) или формулы (2) может представлять собой фармацевтически приемлемую соль.

Соединение формулы (1) или формулы (2) может представлять собой кислотно-аддитивную соль.

Соединение формулы (1) или формулы (2) может представлять собой гидрохлорид.

Соединение формулы (1) или формулы (2) может представлять собой моногидрохлорид.

Соединение формулы (1) или формулы (2) может представлять собой моногидрат моногидрохлорида.

В соединениях формулы (1a) или формулы (2a) X может представлять собой фармацевтически приемлемую соль.

В соединениях формулы (1a) или формулы (2a) X может представлять собой кислотно-аддитивную соль.

В соединениях формулы (1a) или формулы (2a) X может представлять собой гидрохлорид.

В соединениях формулы (1a) или формулы (2a) X может представлять собой моногидрохлорид.

Соединение формулы (1) или формулы (2) может представлять собой гидрохлорид.

X может представлять собой гидрохлорид. X может представлять собой моногидрохлорид. X может представлять собой моногидрат моногидрохлорида.

Соединение может представлять собой *N*-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил}пиперидин-4-карбоксамид.

Соединение может представлять собой *N*-трет-бутил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил}пиперидин-4-карбоксамид.

Соединение может представлять собой соль *N*-трет-бутил-1-{8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил}пиперидин-4-карбоксамид.

Соединение может представлять собой соль *N-трет*-бутил-1- $\{(1R,3r,5S)$ -8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида.

Соединение может представлять собой фармацевтически приемлемую соль *N-трет*-бутил-1- $\{8$ -[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил}-пиперидин-4-карбоксамида.

Соединение может представлять собой фармацевтически приемлемую соль *N-трет*-бутил-1- $\{(1R,3r,5S)$ -8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида.

Соединение может представлять собой *N-трет*-бутил-1- $\{8$ -[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида гидрохлорид.

Соединение может представлять собой *N-трет*-бутил-1- $\{(1R,3r,5S)$ -8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида гидрохлорид.

Соединение может представлять собой *N-трет*-бутил-1- $\{8$ -[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида моногидрохлорид.

Соединение может представлять собой *N-трет*-бутил-1- $\{(1R,3r,5S)$ -8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида моногидрохлорид.

Соединение может представлять собой *N-трет*-бутил-1- $\{8$ -[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида моногидрохлорида моногидрат.

Соединение может представлять собой *N-трет*-бутил-1- $\{(1R,3r,5S)$ -8-[3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил]-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил} пиперидин-4-карбоксамида моногидрохлорида моногидрат.

Определения

В настоящей заявке, если не указано иное, применяются следующие определения.

Термин «лечение» в отношении применения соединений формулы (1), формулы (1a), формулы (1b), формулы (2), формулы (2a), формулы (2b) или формулы (2c) используется для описания любой формы вмешательства, когда соединение вводят субъекту, страдающему от, или подверженному риску заболевания, или потенциально подверженному риску заболевания или расстройства, о котором идет речь. Таким

образом, термин «лечение» охватывает как превентивное (профилактическое) лечение, так и лечение в случае, когда присутствуют измеримые или обнаруживаемые симптомы заболевания или расстройства.

Термин «терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего документа (например, в отношении способов лечения заболевания или состояния), относится к количеству соединения, которое является эффективным для получения желаемого терапевтического эффекта. Например, если состояние представляет собой боль, то эффективное терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для обеспечения желаемого уровня облегчения боли. Желаемым уровнем облегчения боли может быть, например, полное устранение боли или снижение интенсивности боли.

Соли

Описанные в настоящем документе соединения могут существовать в форме солей, например кислотно-аддитивных солей или, в некоторых случаях, солей органических и неорганических оснований, таких как карбоксилаты, сульфонаты и фосфаты. Все такие соли входят в объем настоящего изобретения, и ссылки на соединения формулы (1) и формулы (2) включают соединения в форме солей, как определено в настоящем документе.

Соли обычно представляют собой кислотно-аддитивные соли.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, с помощью обычных химических методов, таких как методы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 стр, Август 2002. Как правило, такие соли могут быть получены реакцией свободных кислых или основных форм этих соединений с подходящим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе или в их смеси; обычно используют неводные среды, такие как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил.

Кислотно-аддитивные соли могут быть образованы с широким набором различных кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей, входящих в объем настоящего изобретения, включают моно- или дисоли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)камфорной,

камфоро-сульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, fumarовой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогеноводородных кислот (например, бромоводородной, хлороводородной, йодоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (\pm)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Амино-группы в описанных здесь соединениях могут образовывать соли четвертичных аммониевых оснований, например, посредством реакции с алкилирующим агентом в соответствии со способами, хорошо известными специалисту в данной области техники. Такие соединения четвертичных аммониевых оснований входят в объем настоящего изобретения.

Соединения по изобретению могут существовать в виде моно- или дисолей в зависимости от рКа кислоты, из которой образована соль.

Соли соединений по изобретению обычно представляют собой фармацевтически приемлемые соли, примеры фармацевтически приемлемых солей обсуждаются в Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," *J. Pharm. Sci.*, Vol. 66, pp. 1-19. Однако соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут быть получены, как промежуточные формы, которые затем могут быть преобразованы в фармацевтически приемлемые соли. Такие фармацевтически неприемлемые формы солей, которые могут быть полезны, например, при очистке или разделении соединений по изобретению, также составляют часть изобретения.

Стереоизомеры

Ссылки на соединения формулы (1), (1a) и (1b) включают все возможные стереоизомерные формы этих соединений (например, энантиомеры, эпимеры и диастереоизомеры, включая эндо-экзо изомеры), либо в виде отдельных изомеров, либо в

виде смесей (например, рацемических смесей), или двух или более изомеров, если иное не следует из контекста.

Соответственно, изобретение относится к соединению формулы (1), которое содержит хиральные центры.

Изомеры могут быть охарактеризованы с точки зрения их абсолютной стереохимии с использованием «R и S» номенклатуры, разработанной Каном, Ингольдом и Прелогом, см. *Advanced Organic Chemistry* by Jerry March, 4th Edition, John Wiley & Sons, New York, 1992, стр. 109-114, и также см. Cahn, Ingold & Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1966, 5, 385-415. Стереоизомеры можно разделить с помощью ряда методик, включая хиральную хроматографию (хроматографию на хиральном носителе), такие методики хорошо известны специалистам в данной области техники. В качестве альтернативы хиральной хроматографии стереоизомеры можно разделить путем получения диастереоизомерных солей с хиральными кислотами, такими как (+)-винная кислота, (-)-пироглутаминовая кислота, (-)-дитолуоил-L-винная кислота, (+)-миндальная кислота, (-)-яблочная кислота и (-)-камфорсульфоновая кислота, разделяя диастереоизомеры с помощью избирательной кристаллизации, а затем диссоциации солей с получением отдельного энантиомера в виде свободного основания.

Когда соединения по изобретению могут существовать в виде двух или более стереоизомерных форм, один диастереомер в паре диастереомеров может демонстрировать преимущества по сравнению с другим диастереомером, например, с точки зрения биологической активности. Таким образом, при определенных обстоятельствах может быть желательным использовать в качестве терапевтического средства только один из нескольких диастереоизомеров.

Соответственно, изобретение относится к композициям, содержащим соединение, имеющее один или несколько хиральных центров, в которых по меньшей мере 55% (например, по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%) соединения присутствует в виде единственного изомера (например, диастереоизомера).

В одном общем варианте осуществления изобретения 99% общего количества соединения или более (например, по существу все соединение) (или соединения для применения) присутствует в виде единственного изомера.

Например, в одном из вариантов осуществления изобретения соединение присутствует в виде одного диастереомера, и соединение имеет плоскость симметрии.

Изотопы

Соединения по изобретению могут содержать одну или несколько изотопных замен, и ссылка на конкретный элемент включает в себя все изотопы этого элемента. Например, ссылка на водород включает в себя ^1H , ^2H (D) и ^3H (T). Аналогично ссылки на углерод и кислород включают в себя соответственно ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C и ^{16}O и ^{18}O .

Аналогичным образом ссылка на конкретную функциональную группу также включает в себя ее изотопные варианты, если в контексте не указано иное. Например, ссылка на алкильную группу, такую как трет-бутильная группа, также охватывает варианты, в которых один или несколько атомов водорода в группе находятся в форме изотопа дейтерия или трития, например, как в трет-бутильной группе, в которой все девять атомов водорода представляют собой изотоп дейтерий (пердейтеро-трет-бутильная группа).

Изотопы могут быть радиоактивными или нерадиоактивными. Соединения могут не содержать радиоактивных изотопов. Такие соединения предпочтительны для терапевтического применения. Однако соединение может содержать один или несколько радиоизотопов. Соединения, содержащие такие радиоизотопы, могут быть полезны в диагностическом контексте.

Сольваты

Соединения по изобретению могут образовывать сольваты. Предпочтительными сольватами являются сольваты, образованные путем включения в структуру твердого тела (например, кристаллическую структуру) соединений по изобретению молекул нетоксичного фармацевтически приемлемого растворителя (называемого далее сольватирующим растворителем). Примеры таких растворителей включают воду, спирты (такие как этанол, изопропанол и бутанол) и диметилсульфоксид. Сольваты могут быть получены перекристаллизацией соединений по изобретению с растворителем или смесью растворителей, содержащей сольватирующий растворитель. Образовался или нет сольват в любом конкретном случае, можно определить, подвергая кристаллы соединения анализу с использованием хорошо известных и стандартных методов, таких как термогравиметрический анализ (TGA), дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) и рентгеновская кристаллография. Сольваты могут быть стехиометрическими или нестехиометрическими сольватами. Особенно предпочтительными сольватами являются гидраты, примеры гидратов включают гемигидраты, моногидраты и дигидраты.

Соответственно, изобретение относится к:

Соединению в форме сольвата.

Соединению, в котором сольват представляет собой гидрат.

Соединению, в котором сольват представляет собой моногидрат.

Для более подробного обсуждения сольватов и методов, используемых для их получения и описания, см. Bryn et al., *Solid-State Chemistry of Drugs, Second Edition*, published by SSCI, Inc of West Lafayette, IN, USA, 1999, ISBN 0-967-06710-3.

Альтернативно, вместо того, чтобы существовать в виде гидрата, соединение по изобретению может быть безводным. Таким образом, изобретение относится к соединению по изобретению в безводной форме (например, в безводной кристаллической форме).

Кристаллические и аморфные формы

Соединения могут существовать в кристаллическом или некристаллическом (например, аморфном) состоянии. Существование соединения в кристаллическом состоянии можно легко определить стандартными методами, такими как порошковая рентгеновская дифракция (XRPD). Кристаллы и их кристаллическая структура могут быть охарактеризованы с помощью ряда методов, включая рентгеновскую кристаллографию монокристалла, порошковую рентгеновскую дифракцию (XRPD), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) и инфракрасную спектроскопию, например, инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (FTIR). Поведение кристаллов в условиях различной влажности можно изучать с помощью гравиметрической сорбции паров, а также с помощью XRPD. Определение кристаллической структуры соединения может быть выполнено с помощью рентгеновской кристаллографии, которая может быть осуществлена в соответствии с обычными методами, такими как описаны в настоящем документе, и описанных в *Fundamentals of Crystallography*, C. Giacovazzo, H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Scordari, G. Gilli, G. Zanotti and M. Catti, (International Union of Crystallography/Oxford University Press, 1992 ISBN 0-19-855578-4 (p/b), 0-19-85579-2 (h/b)). Указанная методика включает анализ и интерпретацию рентгеновской дифракции монокристалла. В аморфном твердом теле отсутствует трехмерная структура, которая обычно существует в кристаллической форме, и положения молекул относительно друг друга в аморфной форме по существу случайны, см., например, Hancock *et al. J. Pharm. Sci.* (1997), 86, 1).

Соответственно, изобретение относится к:

Соединению в кристаллической форме.

Соединению, которое является:

(a) на 50%-100% кристаллическим, и предпочтительно, является по меньшей мере на 50% кристаллическим, или по меньшей мере на 60% кристаллическим, или по меньшей мере

на 70% кристаллическим, или по меньшей мере на 80% кристаллическим, или по меньшей мере на 90% кристаллическим, или по меньшей мере на 95% кристаллическим, или по меньшей мере на 98% кристаллическим, или по меньшей мере на 99% кристаллическим, или по меньшей мере на 99,5% кристаллическим, или по меньшей мере на 99,9% кристаллическим, например на 100% кристаллическим.

Соединению, которое находится в аморфной форме.

Комплексы и клатраты

Комплексы соединений по изобретению (например, комплексы включения или клатраты с соединениями, такими как циклодекстрины, или комплексы с металлами) также входят в объем изобретения.

Соответственно, изобретение относится к соединению в форме комплекса или клатрата.

Биологическая активность и терапевтическое использование

Соединения по настоящему изобретению обладают активностью в качестве агонистов мускариновых рецепторов M_1 и M_4 . Мускариновая активность соединений может быть определена с помощью анализа Phospho-ERK1/2, описанного в примере А ниже.

Существенным преимуществом соединений по изобретению является то, что они обладают высокой селективностью в отношении рецепторов M_1 и M_4 по сравнению с рецепторами подтипов M_2 и M_3 . Соединения по изобретению не являются агонистами рецепторов подтипов M_2 и M_3 . Например, тогда как соединения по изобретению обычно имеют значения pEC_{50} по меньшей мере 6 (предпочтительно по меньшей мере 6,5) и значения E_{max} более 80 (предпочтительно более 90 по отношению к рецептору M_1 в функциональном анализе, описанном в примере А), они могут иметь значения pEC_{50} менее 5 и значения E_{max} менее 20% при тестировании против подтипов M_2 и M_3 в функциональном анализе, описанном в примере А.

Что касается соединений по изобретению, изобретение также относится к:

Соединению для применения в медицине.

Соединению для применения в качестве агониста мускариновых рецепторов M_1 и/или M_4 .

Соединению, которое представляет собой агонист мускаринового рецептора M_1 , имеющий pEC_{50} более 6,9 и E_{max} , составляющее по меньшей мере 80 в отношении

рецептора M_1 в анализе, описанном в примере А настоящего документа, или анализе, по существу аналогичном ему.

Соединению, которое является агонистом мускаринового рецептора M_1 и имеет pEC_{50} более 7,0.

Соединению, имеющему E_{max} по меньшей мере 90 в отношении рецептора M_1 .

Соединению, которое представляет собой агонист мускариновых рецепторов M_1 и M_4 , имеющий pEC_{50} более 6,0 по отношению к рецептору M_4 в анализе, описанном в примере А настоящего документа, или анализе, по существу аналогичном ему.

Соединению, которое является селективным в отношении рецепторов M_1 и M_4 по сравнению с мускариновыми рецепторами M_2 и M_3 .

Соединению, которое имеет pEC_{50} менее 5 и E_{max} менее 30 в отношении мускариновых рецепторов подтипов M_2 и M_3 .

Соединению для применения при лечении заболевания или состояния, опосредованного мускариновым рецептором M_1 и/или M_4 .

Благодаря своей агонистической активности в отношении мускариновых рецепторов M_1 и M_4 , соединения по изобретению могут применяться для лечения болезни Альцгеймера, деменции с тельцами Леви, шизофрении и других психотических расстройств, когнитивных расстройств и других заболеваний, опосредованных мускариновыми рецепторами M_1 и/или M_4 , и могут также применяться при лечении различных видов боли.

Соответственно, что касается соединений по изобретению, изобретение также относится к:

Соединению для лечения когнитивного расстройства или психотического расстройства.

Соединению для применения при лечении когнитивного расстройства или психотического расстройства, где когнитивное расстройство или психотическое расстройство включает, возникает в результате или связано с состоянием, выбранным из когнитивного нарушения, легкого когнитивного нарушения (МСІ) (включая амнестическое МСІ и неамнестическое МСІ и включая легкие когнитивные нарушения вследствие болезни Альцгеймера и/или продромальной формы болезни Альцгеймера), лобно-височной деменции, сосудистой деменции, деменции с тельцами Леви, пресенильной деменции, сенильной деменции, атаксии Фридериха, синдрома Дауна, хореи Гентингтона, гиперкинезии, мании, синдрома Туретта, болезни Альцгеймера (включая продромальную болезнь Альцгеймера и 1, 2 и 3 стадии ранней болезни Альцгеймера, согласно определению Управления по санитарному надзору за качеством

пищевых продуктов и медикаментов США: «Ранняя болезнь Альцгеймера: разработка лекарств для лечения», доступного на сайте [fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM596728.pdf](https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM596728.pdf)), прогрессирующего надъядерного паралича, нарушения когнитивных функций, включая внимание, ориентацию, расстройства обучения, памяти (например, расстройства памяти, амнезию, амнестические расстройства, синдром транзиторной глобальной амнезии и возрастное ухудшение памяти) и языковой функции; когнитивных нарушений в результате инсульта, болезни Гентингтона, болезни Пика, деменции, связанной со СПИДом, или других видов деменции, таких как деменция с множественными инфарктами, алкогольная деменция, деменция, связанная с гипотиреозом, и деменция, связанная с другими дегенеративными расстройствами, такими как атрофия мозжечка и амиотрофический боковой склероз; других острых или подострых состояний, которые могут вызвать снижение когнитивных функций, таких как делирий или депрессия (состояния псевдодеменции), травма, травма головы, возрастное снижение когнитивных функций, инсульт, нейродегенерация, состояний, вызванных приемом лекарств, нейротоксических агентов, возрастных когнитивных нарушений, когнитивных нарушений, связанных с аутизмом, синдрома Дауна, когнитивного дефицита, связанного с психозом, и когнитивных расстройств, связанных с электросудорожным лечением; когнитивных расстройств из-за злоупотребления наркотиками или отмены наркотиков, включая никотин, каннабис, амфетамин, кокаин, синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) и дискинетических расстройств, таких как болезнь Паркинсона, нейролептический паркинсонизм и поздние дискинезии, шизофрении, шизофреноподобных заболеваний, психотической депрессии, мании, острой мании, параноидальных, галлюциногенных и бредовых расстройств, расстройств личности, обсессивно-компульсивных расстройств, шизотипических расстройств, бредовых расстройств, психозов, вызванных злокачественными новообразованиями, нарушениями обмена веществ, эндокринными заболеваниями или нарколепсией, психозов, вызванных злоупотреблением наркотиками или их отменой, биполярных расстройств и шизоаффективных расстройств.

Соединению для лечения болезни Альцгеймера.

Соединению для лечения деменции с тельцами Леви.

Соединению для лечения шизофрении.

Способу лечения когнитивного расстройства у субъекта (например, пациента-млекопитающего, такого как человек, например нуждающегося в таком лечении

человека), который включает введение терапевтически эффективной дозы соединения по изобретению.

Способу лечения когнитивного расстройства у субъекта (например, пациента-млекопитающего, такого как человек, например, нуждающегося в таком лечении человека), который включает введение терапевтически эффективной дозы соединения по изобретению, при этом когнитивное расстройство включает, возникает в результате или связано с состоянием, определенным выше.

Способу лечения когнитивного расстройства у субъекта (например, пациента-млекопитающего, такого как человек, например, нуждающегося в таком лечении человека), который включает введение терапевтически эффективной дозы соединения по изобретению, при этом когнитивное расстройство возникает в результате болезни Альцгеймера или связано с ней.

Способу лечения когнитивного расстройства у субъекта (например, пациента-млекопитающего, такого как человек, например, человека, нуждающегося в таком лечении), который включает введение терапевтически эффективной дозы соединения по изобретению, при этом когнитивное расстройство представляет собой деменцию с тельцами Леви.

Способу лечения когнитивного расстройства у субъекта (например, пациента-млекопитающего, такого как человек, например, нуждающегося в таком лечении человека), который включает введение терапевтически эффективной дозы соединения по изобретению, при этом когнитивное расстройство представляет собой шизофрению.

Применению соединения по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения когнитивного расстройства.

Применению соединения по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения когнитивного расстройства, где когнитивное расстройство включает, возникает в результате или связано с определенным выше состоянием.

Применению соединения по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения когнитивного расстройства, где когнитивное расстройство включает болезнь Альцгеймера, возникает из-за нее или связано с ней.

Применению соединения по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения когнитивного расстройства, где когнитивное расстройство включает деменцию с тельцами Леви, возникает из-за нее или связано с ней.

Применению соединения по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения когнитивного расстройства, где когнитивное расстройство включает шизофрению, возникает из-за нее или связано с ней.

Соединению для лечения или уменьшения тяжести острой, хронической, невропатической или воспалительной боли, артрита, мигрени, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общей невралгии, висцеральной боли, боли при остеоартрите, постгерпетической невралгии, диабетической невропатии, корешковой боли, воспаления седалищного нерва, боли в спине, боли головы или шеи, сильной или неустранимой боли, ноцицептивной боли, прорывной боли, послеоперационной боли или боли при раке.

Способу лечения или уменьшения тяжести острой, хронической, невропатической или воспалительной боли, артрита, мигрени, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общей невралгии, висцеральной боли, боли при остеоартрите, постгерпетической невралгии, диабетической невропатии, корешковой боли, воспаления седалищного нерва, боли в спине, боли головы или шеи, сильной или неустранимой боли, ноцицептивной боли, прорывной боли, послеоперационной боли или боли при раке, включающему введение терапевтически эффективной дозы соединения по изобретению.

Соединению для лечения периферических расстройств, таких как снижение внутриглазного давления при глаукоме и лечение сухости глаз и сухости во рту, включая синдром Шегрена.

Способу лечения периферических расстройств, таких как снижение внутриглазного давления при глаукоме и лечению сухости глаз и сухости во рту, включая синдром Шегрена, включающему введение терапевтически эффективной дозы соединения по изобретению.

Применению соединения по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения или уменьшения тяжести острой, хронической, невропатической или воспалительной боли, артрита, мигрени, кластерных головных болей, невралгии тройничного нерва, герпетической невралгии, общей невралгии, висцеральной боли, боли при остеоартрите, постгерпетической невралгии, диабетической невропатии, корешковой боли, воспаления седалищного нерва, боли в спине, боли головы или шеи, сильной или неустранимой боли, ноцицептивной боли, прорывной боли, послеоперационной боли или боли при раке или для лечения периферических расстройств, таких как снижение внутриглазного давления при глаукоме и лечения сухости глаз и сухости во рту, включая синдром Шегрена.

Применению соединения по изобретению для лечения поражений кожи, например, вызванных обыкновенной пузырчаткой, герпетиформным дерматозом, пемфигоидом и другими состояниями кожи, связанными с образованием пузырей.

Применению соединения по изобретению для лечения, предотвращения, облегчения или обращения вспять состояний, связанных с измененной функцией и перистальтикой желудочно-кишечного тракта, таких как функциональная диспепсия, синдром раздраженного кишечника, гастроэзофагеальный кислотный рефлюкс (GER) и нарушение моторики пищевода, симптомы гастропареза и хроническая диарея.

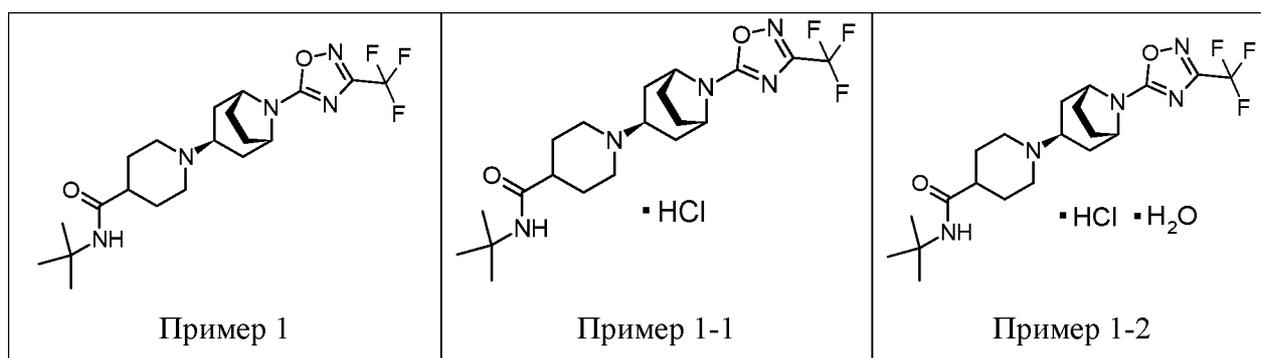
Применению соединения по изобретению для лечения обонятельной дисфункции, такой как синдром Босма-Хенкина-Кристиансена, отравление химическими веществами (например, селеном и серебром), гипопитуитаризм, синдром Каллмана, переломы черепа, терапия опухолей и гипофункция щитовидной железы.

Применению соединения по изобретению для лечения зависимости.

Применению соединения по изобретению для лечения двигательных нарушений, таких как болезнь Паркинсона, СДВГ, болезнь Хантингтона, синдром Туретта и другие синдромы, связанные с дофаминергической дисфункцией в качестве основного патогенетического фактора, вызывающего заболевание.

Применению соединения по изобретению для лечения поведенческих и психологических симптомов деменции (BPSD, включая агитацию, вербальную агрессивность, физическую агрессивность, депрессию, тревогу, аномальное двигательное поведение, приподнятое настроение, раздражительность, апатию, расторможенность, импульсивность, мании, галлюцинации, изменения сна и изменения аппетита).

Соединения по изобретению включают Пример 1, Пример 1-1 и Пример 1-2, приведенные ниже.

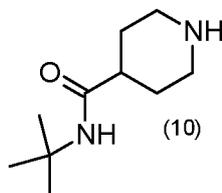


Способы получения соединений по изобретению

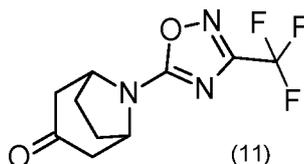
Соединения по изобретению могут быть получены в соответствии с синтетическими методами, хорошо известными специалисту в данной области техники, и как описано в настоящем документе.

Также предложен способ получения соединения, определенного выше, который может включать любую реакцию, выбранную из А, В или С:

(А) реакция соединения формулы (10):

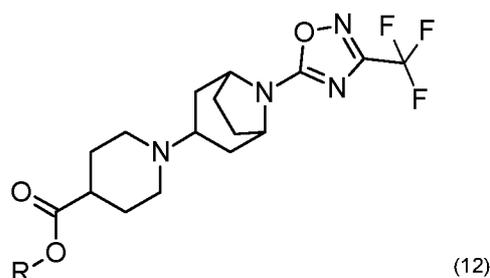


с соединением формулы (11):



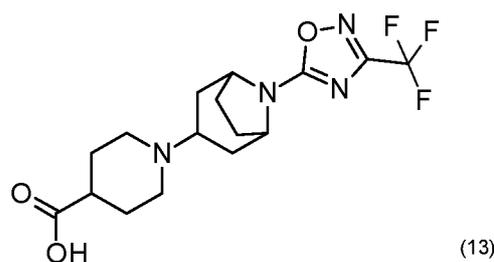
в условиях восстановительного аминирования; или

(В) реакция соединения формулы (12):



с амином формулы $(\text{CH}_3)_3\text{CNH}_2$, где R представляет собой подходящую группу, такую как метил или этил; или

(С) реакция соединения формулы (13):



с амином формулы $(\text{CH}_3)_3\text{CNH}_2$.

Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники. Примеры синтетических процедур для превращения одной функциональной группы в другую функциональную группу изложены в стандартных методиках, таких как *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 7th Edition, Michael B. Smith, John Wiley, 2013, (ISBN: 978-0-470-46259-1), *Organic Syntheses*, Online Edition, www.orgsyn.org, (ISSN 2333-3553) и *Fiesers' Reagents for Organic Synthesis*, Volumes 1-17, John Wiley, edited by Mary Fieser (ISBN: 0-471-58283-2).

В реакциях, описанных выше, может быть необходимо защитить одну или несколько групп, чтобы предотвратить протекание реакции в нежелательном участке молекулы. Примеры защитных групп, а также способы защиты и снятия защиты функциональных групп можно найти в *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fifth Edition*, Editor: Peter G. M. Wuts, John Wiley, 2014, (ISBN: 9781118057483).

Соединения, полученные вышеуказанными способами, могут быть выделены и очищены любым из множества способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, и примеры таких способов включают перекристаллизацию и хроматографические методы, такие как колоночная хроматография (например, флэш-хроматография), ВЭЖХ и SFC.

Фармацевтические композиции

Хотя активное соединение можно вводить отдельно, предпочтительно представлять его в виде фармацевтической композиции (например, лекарственной формы).

Соответственно, предложена фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно соединение по настоящему изобретению, как определено выше, вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым эксципиентом.

Композиция может представлять собой композицию таблетки.

Композиция может представлять собой композицию капсулы.

Фармацевтически приемлемый эксципиент(ы) может быть выбран, например, из носителей (например, твердый, жидкий или полутвердый носитель), адъювантов, разбавителей (например, твердых разбавителей, таких как наполнители или объемообразующие агенты, и жидких разбавителей, таких как растворители и соразтворители), гранулирующих агентов, связующих веществ, добавок для повышения текучести, покрывающих агентов, агентов, контролирующих высвобождение (например, полимеров или восков, замедляющих или задерживающих высвобождение), связывающих агентов, разрыхлителей, буферных агентов, лубрикантов, консервантов, противогрибковых и антибактериальных агентов, антиоксидантов, буферных агентов, агентов, регулирующих тоничность, загустителей, ароматизаторов, подсластителей, пигментов, пластификаторов, агентов, маскирующих вкус, стабилизаторов или любых другие эксципиентов, обычно используемых в фармацевтических композициях.

Термин «фармацевтически приемлемый» в контексте настоящего документа, означает соединения, материалы, композиции и/или лекарственные формы, которые, с медицинской точки зрения, подходят для использования в контакте с тканями субъекта

(например, человека) не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, в соответствии с разумным соотношением риск/польза. Каждое вспомогательное вещество также должно быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения по изобретению, могут быть получены в соответствии с известными методиками, см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA.

Фармацевтические композиции могут быть представлены в любой форме, подходящей для перорального, парентерального, местного, интраназального, внутривенного, сублингвального, офтальмологического, глазного, ректального, интравагинального или трансдермального введения.

Фармацевтические лекарственные формы, подходящие для перорального введения, включают таблетки (с покрытием или без покрытия), капсулы (с твердой или мягкой оболочкой), капли, пилюли, леденцы, сиропы, растворы, порошки, гранулы, эликсиры и суспензии, сублингвальные таблетки, облатки или пластыри, такие как буккальные пластыри, патчи.

Композиции таблеток могут содержать стандартную дозу активного соединения вместе с инертным разбавителем или носителем, таким как сахар или сахарный спирт, например; лактоза, сахароза, сорбит или маннит; и/или разбавитель, не содержащий сахара, такой как карбонат натрия, фосфат кальция, карбонат кальция или целлюлоза или ее производное, такое как микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и крахмалы, такие как кукурузный крахмал. Таблетки также могут содержать такие стандартные ингредиенты, как связующие и гранулирующие агенты, такие как поливинилпирролидон, разрыхлители (например, набухающие сшитые полимеры, такие как сшитая карбоксиметилцеллюлоза), лубриканты (например, стеараты), консерванты (например, парабены), антиоксиданты (например, ВНТ), буферные агенты (например, фосфатный или цитратный буферы) и шипучие агенты, такие как цитрат/бикарбонатные смеси. Такие эксципиенты хорошо известны и не нуждаются в подробном обсуждении.

Таблетки могут быть предназначены для высвобождения лекарственного средства либо при контакте с желудочными жидкостями (таблетки с немедленным высвобождением), либо для контролируемого высвобождения (таблетки с контролируемым высвобождением) в течение длительного периода времени или в определенной области желудочно-кишечного тракта.

Фармацевтические композиции обычно содержат от приблизительно 1% (масс./масс.) до приблизительно 95%, предпочтительно % (масс./масс.) активного ингредиента и от 99% (масс./масс.) до 5% (масс./масс.) фармацевтически приемлемого эксципиента (например, как определено выше) или комбинации таких эксципиентов. Предпочтительно композиции содержат от приблизительно 20% (масс./масс.) до приблизительно 90% (масс./масс.) активного ингредиента и от 80% (масс./масс.) до 10% фармацевтического эксципиента или комбинации эксципиентов. Фармацевтические композиции содержат от приблизительно 1% до приблизительно 95%, предпочтительно от приблизительно 20% до приблизительно 90% активного ингредиента. Фармацевтические композиции по изобретению могут быть представлены, например, в виде стандартных дозированных форм, таких как ампулы, флаконы, суппозитории, предварительно заполненные шприцы, драже, порошки, таблетки или капсулы.

Таблетки и капсулы могут содержать, например, 0–20% разрыхлителей, 0–5% лубрикантов, 0–5% добавок для повышения текучести и/или 0–99% (масс./масс.) наполнителей/или объемобразующих агентов (в зависимости от дозы лекарственного средства). Они также могут содержать 0–10% (масс./масс.) полимерных связующих веществ, 0–5% (масс./масс.) антиоксидантов, 0–5% (масс./масс.) пигментов. Таблетки с медленным высвобождением, кроме того, обычно содержат 0–99% (масс./масс.) контролирующих высвобождение (например, замедляющих его) полимеров (в зависимости от дозы). Пленочные покрытия таблетки или капсулы обычно содержат 0–10% (масс./масс.) полимеров, 0–3% (масс./масс.) пигментов и/или 0–2% (масс./масс.) пластификаторов.

Парентеральные составы обычно содержат 0–20 % (масс./масс.) буферов, 0–50 % (масс./масс.) соразтворителей и/или 0–99 % (масс./масс.) воды для инъекций (WFI) (в зависимости от дозы и того, была ли проведена лиофилизация). Составы для внутримышечных депо могут также содержать 0–99% (масс./масс.) масел.

Фармацевтические композиции могут быть представлены пациенту в «упаковках для пациентов», содержащих полный курс лечения в одной упаковке, обычно в блистерной упаковке.

Соединения по изобретению, как правило, представлены в виде стандартной лекарственной формы и, как таковые, обычно содержат достаточное количество соединения для обеспечения желаемого уровня биологической активности. Например, композиция может содержать от 1 нанограмма до 2 граммов активного ингредиента, например, от 1 нанограмма до 2 миллиграммов активного ингредиента. В этих диапазонах конкретные поддиапазоны соединения составляют от 0,1 мг до 2 г активного ингредиента

(обычно от 10 мг до 1 г, например, от 50 мг до 500 мг) или от 1 микрограмма до 20 мг (например, от 1 микрограмма до 10 мг, например от 0,1 миллиграмма до 2 миллиграммов активного ингредиента).

Для пероральных композиций стандартная лекарственная форма может содержать от 1 миллиграмма до 2 граммов, как правило, от 10 миллиграммов до 1 грамма, например, от 50 миллиграммов до 1 грамма, например, от 100 миллиграммов до 1 грамма активного соединения.

Активное соединение будет вводиться нуждающемуся в этом пациенту (например, человеку или животному) в количестве, достаточном для достижения желаемого терапевтического эффекта (эффективном количестве). Точное количество вводимого соединения может быть определено лечащим врачом в соответствии со стандартными процедурами.

Общие процедуры

Когда стадии получения не включены, соответствующий промежуточный продукт коммерчески доступен. Коммерческие реагенты использовали без дополнительной очистки. Комнатная температура (rt) означает приблизительно 22-30°C. Спектры ¹H ЯМР регистрировали при 400 МГц на приборе Bruker. Значения химических сдвигов, т.е. (δ)-значения, выражены в миллионных долях (ppm). Следующие сокращения используются для обозначения мультиплетных сигналов ЯМР: s = синглет, br = уширенный, d = дублет, t = триплет, q = квартет, quint = квинтет, td = триплет дублетов, tt = триплет триплетов, qd = квартет дублетов, ddd = дублет дублетов дублетов, ddt = дублет дублетов триплетов, m = мультиплет. Константы спин-спинового взаимодействия указаны как значения J, измеренные в Гц. Результаты ЯМР и масс-спектропии были скорректированы для учета фоновых пиков.

ЖХ-МС анализ

ЖХ-МС анализ соединений проводили при условиях электрораспыления с использованием приборов и методов, приведенных в таблицах ниже:

Система	Название прибора	ЖК-детектор	Детектор массы
1	Agilent 1290 RRLC	Детектор диодной матрицы	Agilent 6120
2	Shimadzu Nexera	Фотодиодная матрица	MS-2020

Препаративная очистка при помощи ВЭЖХ

Обозначение способа	Система растворителей	Используемая колонка	Градиент (растворитель А:В)	УФ-диапазон	Массовый диапазон	Темп. колонки, °С	Скорость потока мл/мин
А	(А) 5 мМ ацетата аммония и 0,1% муравьиной кислоты в воде	ВЕН С-18, 2,1 x 50 мм, 1,7 мкм или эквивалент	98:2 с 0,01 мин до 0,50 мин,	200-400 нм	60-1000 а.е.м.	Температура окружающей среды	0,45
	10:90 с 5,00 мин, 5:95 с 6,00 мин до 7,00 мин, 98:2 с 7,01 мин до 8,00 мин						
В	(А) 0,1% раствор аммиака в воде	X-BRIDGE С-18, 50 x 4,6 мм, 3,5 мкм или эквивалент	95:5 с 0,01 мин,	200-400 нм	60-1000 а.е.м.	Температура окружающей среды	1,00
	(В) 0,1% раствор аммиака в ацетонитриле		10:90 с 5,00 мин, 5:95 с 5,80 мин до 7,20 мин, 95:5 с 7,21 мин до 10,00 мин				

Препаративную очистку при помощи ВЭЖХ проводили с использованием бинарной системы Shimadzu LC-20AP с УФ-детектором SPD-20A. Метод очистки: [фаза (описание колонки, длина колонки × внутренний диаметр, размер частиц), скорость

потока растворителя, градиент – указывается в % подвижной фазы В в подвижной фазе А (с течением времени), подвижная фаза (А), подвижная фаза (В)].

Препаративная ВЭЖХ, способ А

Препаративная ВЭЖХ: [Обращенная фаза (X-BRIDGE C-18, 250 × 50 мм, 5 мкм), 85 мл/мин, градиент 35 % – 70 % (более 26 мин), 100 % (более 2 мин), 100 % – 35 % (более 6 мин), подвижная фаза (А): 5 мМ бикарбоната аммония в воде + 0,1 % аммиака в воде, (В): 100 % ацетонитрил].

Препаративная ВЭЖХ, способ В

Препаративная ВЭЖХ: [Обращенная фаза (X-BRIDGE C-18, 250 × 50 мм, 5 мкм), 85 мл/мин, градиент 40 % – 60 % (более 26 мин), 60 % (более 4 мин), 100 % (более 2 мин), 100 % – 40 % (более 7 мин), подвижная фаза (А): 5 мМ бикарбоната аммония в воде + 0,1 % аммиака в воде, (В): 100 % ацетонитрил].

Сокращения

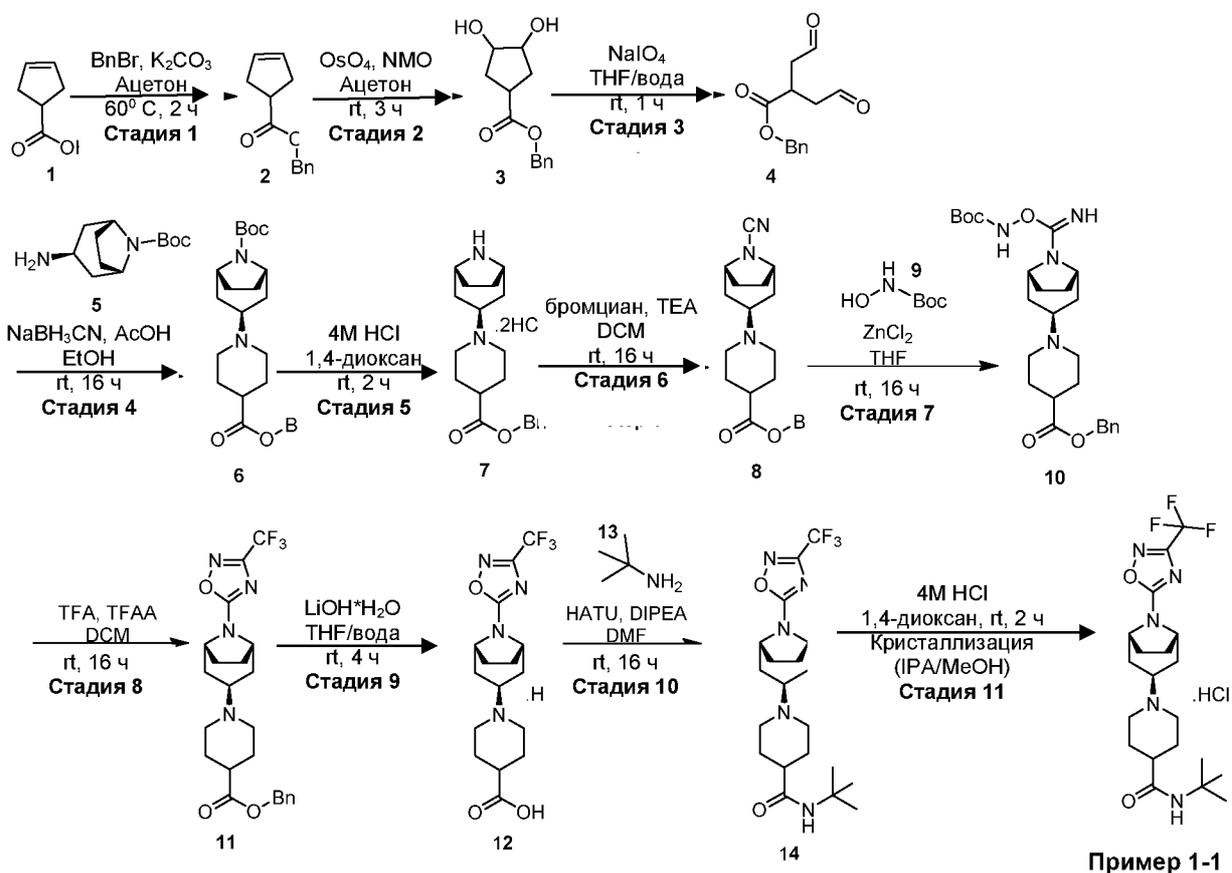
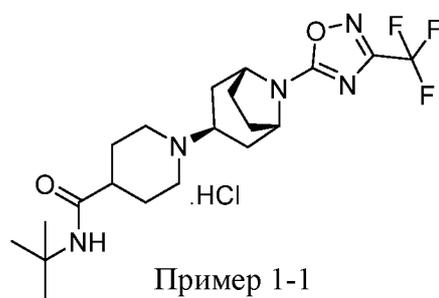
AcOH	=	уксусная кислота
Bn	=	бензил
<i>t</i> -BuOH	=	<i>трет</i> -бутиловый спирт
CPM	=	циклопентилметилловый эфир
DCM	=	дихлорметан
DIPEA	=	<i>N,N</i> -диизопропилэтиламин
DMF	=	диметилформамид
DMSO	=	диметилсульфоксид
ESI	=	ионизация электрораспылением
EtOH	=	этанол
ч	=	часов
HATU	=	гексафторфосфат азабензотриазолтетраметилурония
ВЭЖХ	=	высокоэффективная жидкостная хроматография
IPA	=	пропан-2-ол
ЖХ-МС	=	жидкостная хроматография/масс-спектрометрия
MeOH	=	метанол
мин	=	минут
2-MTHF	=	2-метилтетрагидрофуран
нм	=	нанометр
NMO	=	4-метилморфолин 4-оксид
ЯМР	=	ядерный магнитный резонанс

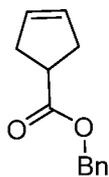
rt	=	комнатная температура
RT	=	время удерживания
TEA	=	триэтиламин
TFA	=	трифторуксусная кислота
TFAA	=	ангидрид трифторуксусной кислоты
THF	=	тетрагидрофуран

Префиксы *n*-, *s*-, *i*-, *t*- и *tert*- имеют свои обычные значения: нормальный, вторичный, *изо* и третичный.

ПРИМЕРЫ

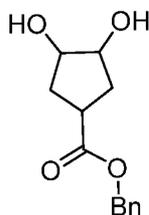
Синтез *N*-(*tert*-бутил)-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксиамида гидрохлорида (Пример 1-1)



Стадия 1:Синтез бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилата (промежуточное соединение 2)

К смеси циклопент-3-ен-1-карбоновой кислоты (CAS: 7686-77-3, Промежуточное соединение 1) (25,0 г, 223 ммоль) и K_2CO_3 (61,5 г, 446 ммоль) в ацетоне (375 мл) по каплям добавляли (бромметил)бензол (CAS: 100-39-0) (29,1 мл, 245 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 2 ч и затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Полученную смесь фильтровали, и затем фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией [нормальная фаза (нейтральный Al_2O_3), 0-10% (этилацетат в гексане)] с получением бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилата (промежуточное соединение 2) (40,1 г, 89,0 %).

ЖХ-МС (система 1, метод А): (ESI) m/z 203 $[M+H]^+$ RT 5,10 мин, 254 нм.

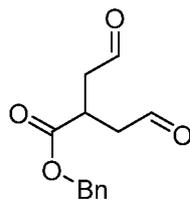
Стадия 2: Синтез бензил-3,4-дигидроксициклопентан-1-карбоксилата (промежуточное соединение 3)

Смесь бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилата (Промежуточное соединение 2) (43,8 г, 217 ммоль), OsO_4 (2% в *t*-BuOH, 12,0 мл, 0,94 ммоль) и 4-метилморфолин-4-оксида (30,44 г, 260 ммоль) в ацетоне (431 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Смесь обрабатывали насыщенным водным раствором Na_2SO_3 (500 мл) и затем экстрагировали DCM (3×400 мл). Объединенные органические слои сушили (Na_2SO_4) и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией [нормальная фаза (диоксид кремния), 0-50% (этилацетат в гексане)] с получением бензил-3,4-дигидроксициклопентан-1-карбоксилата (Промежуточное соединение 3) (30,4 г, 59,4%).

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) m/z 237 $[M+H]^+$ RT 2,38 мин, 224 нм.

Стадия 3:

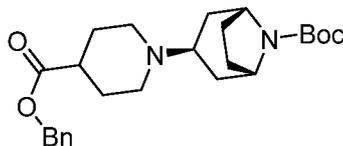
Синтез бензил-4-оксо-2-(2-оксоэтил)бутаноата (Промежуточное соединение 4)



Смесь бензил-3,4-дигидроциклопентан-1-карбоксилата (Промежуточное соединение 3) (36,0 г, 153 ммоль) и NaIO_4 (48,7 г, 229 ммоль) в THF (1800 мл) и воде (144 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляли воду (1500 мл) пока осадок не растворялся, затем смесь экстрагировали DCM (3 x 500 мл). Объединенные органические слои сушили (Na_2SO_4) и концентрировали при пониженном давлении с получением бензил-4-оксо-2-(2-оксоэтил)бутаноата (Промежуточное соединение 4) (35,8 г, 100,0%). Неочищенный продукт использовали без дополнительной очистки.

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) m/z 233 $[\text{M}]^-$ RT 2,33 мин и 2,74 мин, 202 нм.

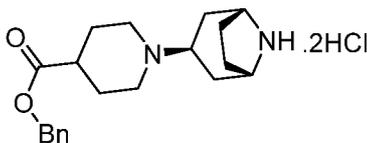
Стадия 4: Синтез *трет*-бутил(1*R*,3*r*,5*S*)-3-(4-((бензилокси)карбонил)пиперидин-1-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилата (Промежуточное соединение 6)



Раствор *трет*-бутил(1*R*,3*r*,5*S*)-3-амино-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилата (CAS: 207405-68-3, Промежуточное соединение 5) (34,6 г, 153 ммоль) и бензил-4-оксо-2-(2-оксоэтил)бутаноата (Промежуточное соединение 4) (35,8 г, 153 ммоль) в EtOH (1400 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем к нему добавляли NaBH_3CN (9,64 г, 153 ммоль) и AcOH (3,0 мл, 52,5 ммоль) и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (1000 мл) и экстрагировали DCM (3 x 500 мл). Объединенные органические слои сушили (Na_2SO_4) и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией [нормальная-фаза (диоксид кремния), 0-30% (этилацетат в гексане)] с получением *трет*-бутил-(1*R*,3*r*,5*S*)-3-(4-((бензилокси)карбонил)пиперидин-1-ил)-8-азабицикло-[3.2.1]октан-8-карбоксилата (Промежуточное соединение 6) (41,0 г, 62,6%).

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) m/z 429 $[\text{M}+\text{H}]^+$ RT 4,28 мин, 202 нм.

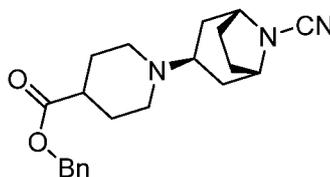
Стадия 5: Синтез дигидрохлорида бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 7)



К раствору *tert*-бутил-((1*R*,3*r*,5*S*)-3-(4-((бензилокси)карбонил)пиперидин-1-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилата (Промежуточное соединение 6) (41,0 г, 96,0 ммоль) в 1,4-диоксане (82,0 мл) при 0 °С по каплям добавляли HCl в 1,4-диоксане (4M, 410 мл, 10 объемов). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и затем концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали азеотропной перегонке с гексаном (2 x 50 мл), а затем растирали с гексаном (2 x 50 мл) с получением дигидрохлорида бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-азабицикло [3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 7) (38,4 г, 100,0%).

ЖХ-МС (система 1, метод В): (ESI) m/z 329 [M+H]⁺ RT 3,10 мин, 202 нм.

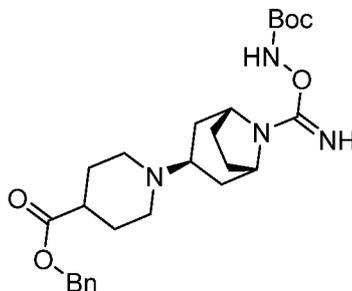
Стадия 6: Синтез бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-циано-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)-пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 8)



К раствору дигидрохлорида бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 7) (38,4 г, 96,0 ммоль) в DCM (314 мл) при -20°С по каплям добавляли триэтиламин (39,8 мл, 287 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру в диапазоне от -20°С до 0°С. Затем реакционную смесь перемешивали при этой температуре в течение 30 мин. Затем к смеси по каплям добавляли бромциан (15,1 г, 144 ммоль) в виде раствора в DCM (31,0 мл), поддерживая внутреннюю температуру в диапазоне от -20°С до 0°С. Затем смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляли насыщенным водным раствором NaHCO₃ (700 мл) и экстрагировали DCM (3x300 мл). Объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄) и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией [нормальная-фаза (нейтральный Al₂O₃), 0-30% (этилацетат в гексане)] с получением бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-циано-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 8) (16,0 г, 47,4%).

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) m/z 354 $[M+H]^+$ RT 3,69 мин, 202 нм.

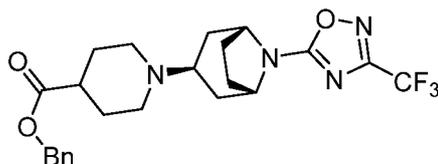
Стадия 7: Синтез бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(((*трет*-бутоксикарбонил)амино)окси)-(имино)-метил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 10)



К раствору бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-суано-8-циано-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 8) (16,0 г, 45,3 ммоль) в THF (160 мл) при 0° С добавляли *трет*-бутилгидроксикарбамат (CAS: 36016-38-3, Промежуточное соединение 9) (6,63 г, 49,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0° С в течение 20 мин. Затем к этому раствору при 0° С медленно добавляли хлорид цинка в 2-МТНФ (1,9 М, 47,7 мл, 90,6 ммоль) и затем перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь гасили водой (300 мл) и экстрагировали этилацетатом (3 × 400 мл). Объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄) и концентрировали при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт растирали с гексаном (2 × 50 мл) с получением бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(((*трет*-бутоксикарбонил)амино)окси)-(имино)метил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 10) (22,0 г, 100,0%). Неочищенный продукт использовали без дополнительной очистки.

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) m/z 487 $[M+H]^+$ RT 3,10 мин, 202 нм.

Стадия 8: Синтез бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 11)

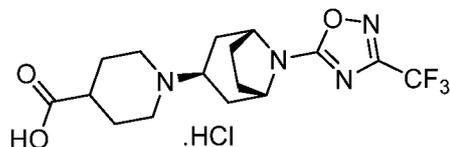


К раствору бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(((*трет*-бутоксикарбонил)амино)окси)-(имино)метил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 10) (22,0 г, 45,3 ммоль) в DCM (220 мл) по каплям добавляли TFA (110

мл, 5 объемов) при температуре от 0° С до 5° С. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 40 минут и затем охлаждали до температуры от 0° С до 5° С. Затем к ней добавляли по каплям TFAA (28,7 мл, 203,7 ммоль) и перемешивали в течение 30 минут перед тем, как дать нагреться до комнатной температуры, затем перемешивали в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляли толуолом (220 мл) и концентрировали при пониженном давлении. Добавляли насыщенный раствор NaHCO₃ (800 мл) и реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (3×500 мл). Объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄) и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией [нормальная-фаза (нейтральный Al₂O₃), 0-30% (этилацетат в гексане)] с получением бензил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 11) (12,4 г, 59,0%) .

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) *m/z* 465 [M+H]⁺ RT 4,40 мин, 240 нм.

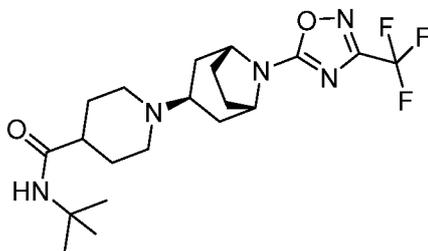
Стадия 9: Синтез гидрохлорида 1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоновой кислоты (Промежуточное соединение 12)



К раствору бензил 1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (Промежуточное соединение 11) (12,3 г, 26,5 ммоль) в THF (123 мл) и воде (24,6 мл) порциями добавляли моногидрат гидроксида лития (2,78 г, 66,3 ммоль) при комнатной температуре, а затем перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (100 мл), охлаждали от 0° С до 10° С и рН доводили до рН = 5-6 с помощью 1М раствора HCl (приблизительно 70-80 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, затем водный слой отделяли и лиофилизировали с получением гидрохлорида 1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоновой кислоты (Промежуточное соединение 12) (15,1 г, неочищенный). Неочищенный продукт использовали без дополнительной очистки.

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) *m/z* 375 [M+H]⁺ RT 2,10 мин, 236 нм.

Стадия 10: Синтез *N*-(*трет*-бутил-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксамида (Промежуточное соединение 14)

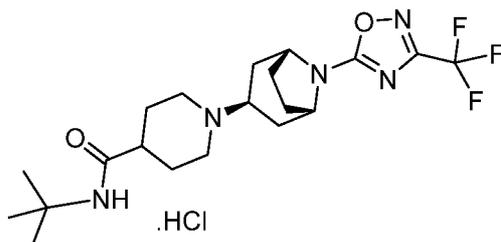


К раствору гидрохлорида 1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоновой кислоты (Промежуточное соединение 12) (5,8 г, 14,1 ммоль) (использовали 8 г неочищенного продукта, выделенного на стадии 9) в DMF (80,0 мл) порциями добавляли НАТУ (12,2 г, 32,0 ммоль) при температуре от 0° С to 10° С. Реакционную смесь перемешивали при температуре от 0° С до 10° С в течение 40 мин. Затем к ней добавляли 2-метилпропан-2-амин (CAS: 75-64-9, Промежуточное соединение 13) (6,8 мл, 64,2 ммоль) и DIPEA (11,4 мл, 64,2 ммоль). Полученной реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 часов. Добавляли ледяную воду (500 мл), перемешивали в течение 20 мин и образовавшийся осадок отфильтровывали. Осадок на фильтре промывали холодной водой (500 мл), а затем гексаном (500 мл) с получением неочищенного продукта (2,5 г). Водный слой экстрагировали этилацетатом (2 x 200 мл), объединенные органические слои сушили (Na₂SO₄) и концентрировали при пониженном давлении, получая дополнительное количество неочищенного продукта (4,5 г). Неочищенные продукты объединяли и очищали колоночной хроматографией [нормальная-фаза(диоксид кремния), 0-50% (этилацетат в гексане)] с получением двух партий продукта разной чистоты (2,0 г и 3,8 г). Затем каждую партию брали отдельно и дополнительно очищали препаративной ВЭЖХ, методами А и В, соответственно. Полученные продукты объединяли и кристаллизовали, используя IPA (10 объемов) и MeOH (1 объем), и осадок на фильтре промывали холодным IPA (2 объема), получая *N*-(*трет*-бутил)-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксамида (Промежуточное соединение 14) (1,9 г, 31,4%).

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) *m/z* 430 [M+H]⁺ RT 3,54 мин, 240 нм.

¹H ЯМР (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.31 (br. s, 1H), 4.39 – 4.25 (m, 2H), 3.26 – 3.15 (m, 2H), 2.27 – 1.80 (m, 10H), 1.71 – 1.44 (m, 6H), 1.22 (s, 9H).

Стадия 11: Синтез *N*-(*трет*-бутил)-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксиамида гидрохлорида (Пример 1-1)

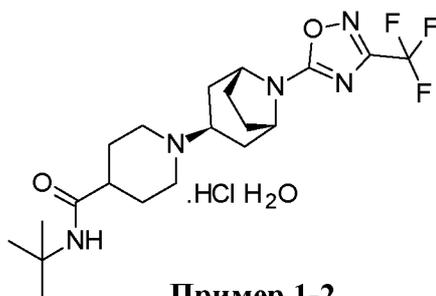


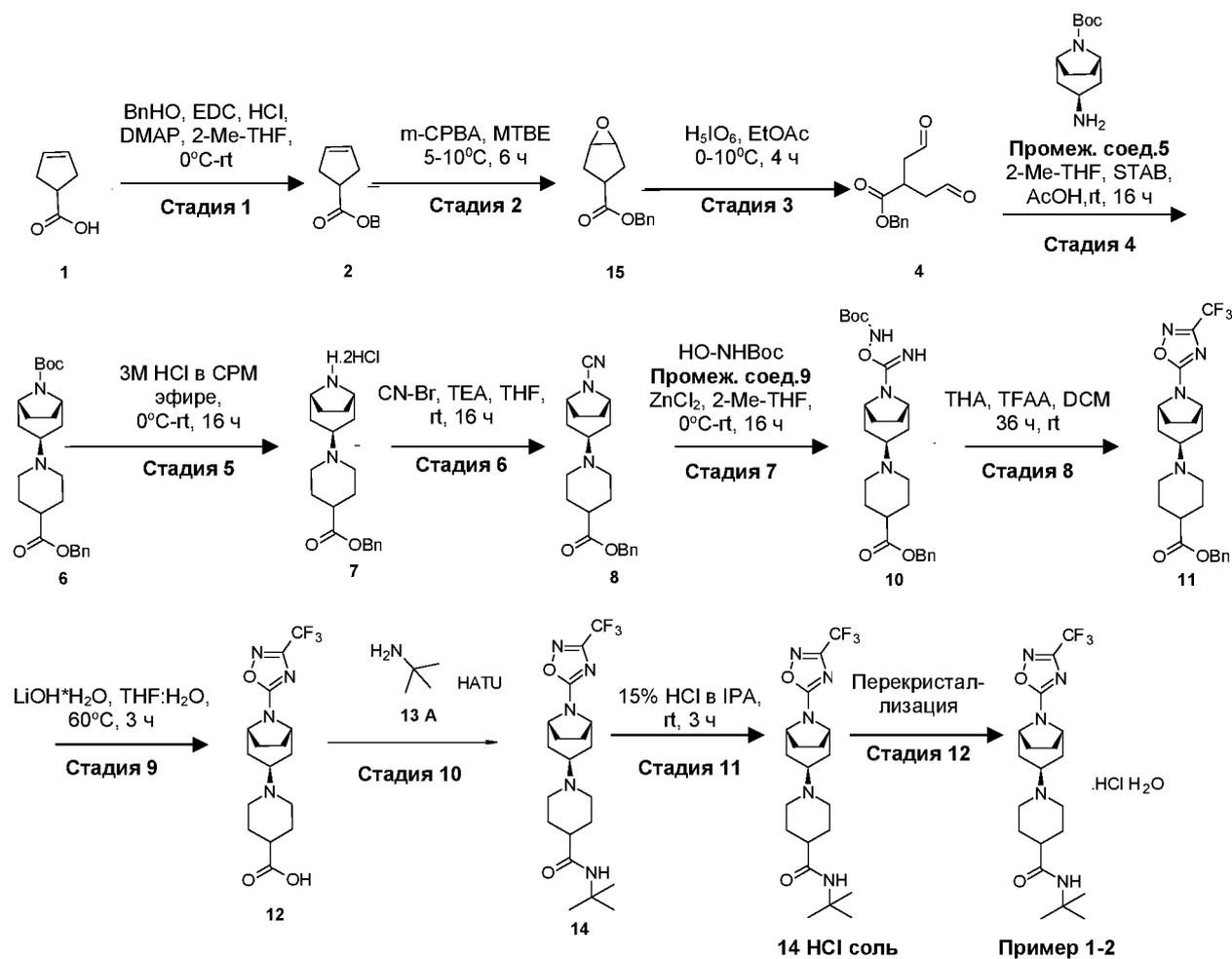
К раствору *N*-(*трет*-бутил)-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксиамида (Промежуточное соединение 14) (1,9 г, 4,4 ммоль) в 1,4-диоксане (3,8 мл) при 0° С добавляли HCl в 1,4-диоксане (4 М, 19,0 мл, 10 объемов). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч и затем концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали азеотропной перегонке с 1,4-диоксаном (2×10 мл) и затем растирали с 1,4-диоксаном (10 мл). Осадок отфильтровывали и промывали на фильтре 1,4-диоксаном (2×5 мл), *n*-пентаном (10 мл) и сушили при пониженном давлении. Осадок кристаллизовали, используя IPA (10 объемов) и MeOH (1 объем), а затем осадок промывали на фильтре холодным IPA (2 объема), получая *N*-(*трет*-бутил)-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксиамида гидрохлорид (Пример 1-1) (1,8 г, 87,9%).

ЖХ-МС (система 2, метод В): (ESI) m/z 430 [M+H]⁺ RT 3,55 мин, 240 нм.

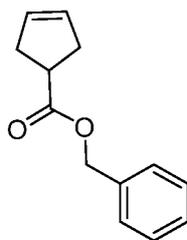
¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 10.78 – 10.24 (m, 1H), 7.58 – 7.46 (m, 1H), 4.62 – 4.50 (m, 2H), 3.54 – 3.43 (m, 2H), 3.32 – 3.06 (m, 2H), 2.85 – 2.64 (m, 4H), 2.37 – 2.20 (m, 1H), 2.13 – 2.00 (m, 2H), 1.93 – 1.69 (m, 7H), 1.23 (s, 9H).

Масштабирование синтеза *N*-(*трет*-бутил)-1-((1*R*,3*r*,5*S*)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксиамида моногидрохлорида моногидрата (Пример 1-2)





Стадия 1: Синтез бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилата (2)



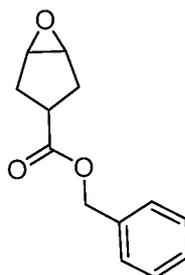
В чистую и сухую 5-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра, в атмосфере азота при комнатной температуре (22-25°C) помещали 2-метил-THF (2550 мл), циклопент-3-ен-1-карбоновую кислоту (150 г), EDC·HCl (308,72 г) и бензиловый спирт (137,25 г). Реакционную смесь охлаждали до 0-5°C. К реакционной смеси добавляли DMAP (196,10 г) и триэтиламин (205 мл) при 0-5°C в течение более 5 минут. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и непрерывно перемешивали при комнатной температуре (24-25°C) в течение 18-20 часов. Течение реакции контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ до ее завершения. При комнатной температуре (24-25°C) добавляли деминерализованную воду

(3000 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре (24-25°C) в течение 30 минут. Органический слой отделяли, добавляли 1 н. HCl (1500 мл) при 0-5°C и перемешивали в течение 30 минут. Органический слой отделяли и при комнатной температуре (24-25°C) добавляли 10% водный раствор NaHCO₃ (1500 мл) и перемешивали в течение 15-20 минут. Органический слой отделяли, при комнатной температуре (22-25°C) добавляли соляной раствор (750 мл) и перемешивали в течение 15-20 минут. Органический слой отделяли и органический слой отгоняли при пониженном давлении при 45-47°C с получением неочищенного соединения.

Масса неочищенного продукта: 248 г, выход неочищенного продукта = 91 %, вид неочищенного продукта: жидкость фиолетового цвета.

Полученный неочищенный продукт непосредственно использовали для следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 2: Синтез Синтез бензил-6-оксабицикло[3.1.0]гексан-3-карбоксилата (15):



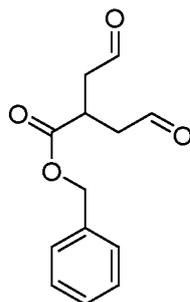
В чистую и сухую 5-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота загружали МТВЕ (2450 мл) и бензилциклопент-3-ен-1-карбоксилат (Промежуточное соединение 2, 245 г) при комнатной температуре (22–25 °С), затем реакционную смесь охлаждали до 5-10°C. Добавляли m-CPBA (362,6 г) в виде 5 отдельных порций, при этом цвет менялся от темно-коричневого до желтого. Реакционную смесь медленно нагревали до 15-20°C, непрерывно перемешивали при 15-20°C в течение 16-20 часов. Протекание реакции отслеживали с помощью ВЭЖХ до ее завершения. Медленно добавляли 20 % водный раствор бисульфита натрия (3675 мл, 15 объемов) в течение 15-20 минут и перемешивали при 20-25°C в течение 30 минут. Органический слой отделяли, добавляли 10% водный раствор Na₂CO₃ (2450 мл, 10 объемов) и перемешивали при 20-25°C в течение 15 минут. Органический слой отделяли и добавляли 20% водный раствор бисульфита натрия (2450 мл, 10 объемов) и перемешивали, пока не достигалось содержание пероксида <3 мг/л, что определяли по тест-полоске. Органический слой отделяли и сушили над сульфатом

натрия, фильтровали, органический слой отгоняли под давлением при 37-40°C с получением бензил-6-оксабицикло[3.1.0]гексан-3-карбоксилата.

Масса неочищенного продукта: 234 г. Выход неочищенного продукта: 88 %, Вид неочищенного продукта- жидкость бледно-желтого цвета.

Полученный неочищенный продукт непосредственно использовали для следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия-03: Синтез бензил-4-оксо-2-(2-оксоэтил)бутаноата (4):

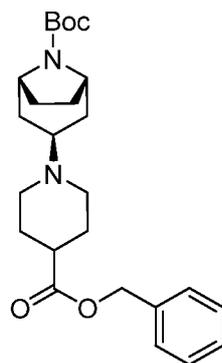


В чистую и сухую 2-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота загружали при комнатной температуре (22–25 °С) этилацетат (380 мл) и иодную кислоту (87,41 г), затем белую суспензию охлаждали до 0–10 °С. Добавляли бензил-6-оксабицикло[3.1.0]гексан-3-карбоксилат (Промежуточное соединение 15, 76 г в 380 мл раствора этилацетата) и наблюдали изменение цвета с темно-коричневого на желтый. Реакционную смесь медленно нагревали до 15-20°C и непрерывно перемешивали в течение 3-4 часов. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ до ее завершения. Добавляли деминерализованную воду (760 мл, 10 объемов) и перемешивали при 20-25°C в течение 15-20 минут три раза. Органический слой отделяли, промывали соляным раствором (380 мл, 5 объемов) и перемешивали при 20-25°C в течение 5-10 минут. Органический слой отделяли и сушили над сульфатом натрия, фильтровали, отгоняли органический слой под давлением при 37-40°C с получением бензил-4-оксо-2-(2-оксоэтил)бутаноата.

Масса неочищенного продукта: 82 г., вид неочищенного продукта: жидкость бледно-желтого цвета.

Полученный неочищенный продукт использовали непосредственно для следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия-04: Синтез трет-бутил-(1R,3R,5S)-3-(4-((бензилокси)карбонил)пиперидин-1-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилата (6):



В чистую и сухую 2-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота загружали при комнатной температуре (22–23 °С) 2-метил-THF (570 мл) и бензил-4-оксо-2-(2-оксоэтил)бутаноат (Промежуточное соединение 4, 57 г, *Фактическая масса неочищенного продукта со стадии 3 составляла 82 г). Добавляли Промежуточное соединение 5 (эндоамин) (49,54 г), реакцию смесь охлаждали до 5-10°С и перемешивали в течение 30 минут. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (56,78 г) и ледяную уксусную кислоту (5,7 мл), реакцию смесь нагревали до комнатной температуры (22-23°С) и перемешивали в течение 10-12 часов. Протекание реакции контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ, по завершении добавляли насыщенный раствор бикарбоната (400 мл, 7 объемов) и перемешивали при 20-25°С в течение 15-20 минут. Органический слой отделяли и сушили над сульфатом натрия, фильтровали, отгоняли органический слой под давлением при 37-40°С и получали трет-бутил-(1R,3R,5S)-3-(4-((бензилокси)карбонил)пиперидин-1-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-8-карбоксилат.

Масса неочищенного продукта: 115 г, вид неочищенного продукта: густая жидкость светло-бордового цвета.

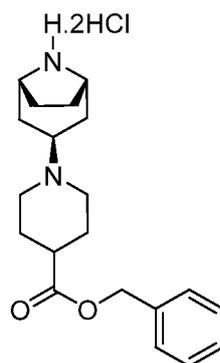
Очистка посредством образования соли щавелевой кислоты:

В чистую и сухую 500 мл 4-горлую колбу RB с термометром и холодильником помещали неочищенный продукт (25 г) и ацетон (150 мл, 6 объемов) и охлаждали до 5–10 °С. Добавляли щавелевую кислоту (10 г, 2,0 экв.) и нагревали реакцию массу до комнатной температуры при перемешивании в течение 2 часов. Реакционную массу перегоняли при 40°С, получая неочищенный продукт массой 35 г, затем загружали 10 объемов МТВЕ при 25-30°С и перемешивали в течение 30 минут. Реакционную массу фильтровали, промывали слой МТВЕ (1,0 объем), с получением влажного осадка (оксалатной соли): 26 г. Осадок суспендировали в насыщенном растворе бикарбоната (30 объемов, 780 мл) и этилацетата (25 объемов, 650 мл) и перемешивали в течение 15 минут.

Органический слой отделяли, сушили над Na_2SO_4 , перегоняли под вакуумом при $37-40^\circ\text{C}$ с получением продукта. Масса продукта: 8,0 г

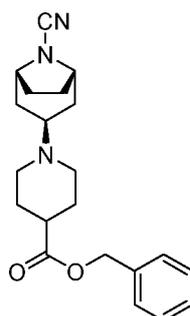
Необязательно этот продукт может быть дополнительно очищен колоночной хроматографией с использованием смеси гексан:этилацетат, адсорбцией на нейтральном оксиде алюминия (Source-SDFCL). Градиент колонки: 5->10->12% Этилацетат: гексан.

Стадия-05: Синтез бензил-1-((1R,3R,5S)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата гидрохлорида (7):



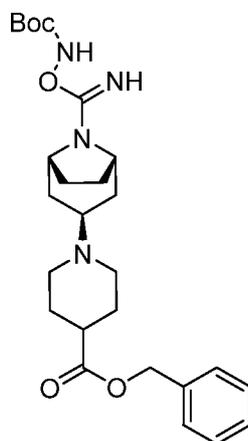
В чистую и сухую 5-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота загружали циклопентилметилэфир (452 мл, 4,0 объема) и Промежуточное соединение 6 (113 г, 1,0 экв.), затем реакционную смесь охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$. Очень медленно добавляли 3М HCl в циклопентилметилэфире (904 мл, 8,0 В) при $0-5^\circ\text{C}$, затем реакционную смесь медленно нагревали до $22-25^\circ\text{C}$ и перемешивали в течение 16 часов. Реакцию контролировали с помощью ВЭЖХ до ее завершения. Реакционную смесь фильтровали в атмосфере N_2 , промывали слой МТВЕ (2,0 объема), извлекали влажный осадок продукта в атмосфере N_2 и сушили при пониженном давлении при $45-47^\circ\text{C}$ с получением неочищенного продукта, который непосредственно использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия-06: Синтез бензил-1-((1R,3R,5S)-8-циано-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)-пиперидин-4-карбоксилата (8):



В чистую и сухую 5-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота загружали дихлорметан (1860 мл, 10 объемов), Промежуточное соединение 7 (186,0 г, 1,0 экв.) и триэтиламин (355 мл, 5,0 экв.) при 22–25°C в течение 10-15 минут, и затем дополнительно перемешивали реакционную смесь в течение 30-45 минут. Реакционную смесь охлаждали до 0-5 °С и добавляли бромциан (92 г, 1,7 экв.) в DCM (372 мл, 2,0 объема) при 0-5°C, затем реакционную смесь медленно нагревали до 22-25°C и перемешивали при 22-25 °С в течение 3-4 часов. За ходом реакции следили с помощью ВЭЖХ до ее завершения. Реакционную смесь разбавляли DCM (1860 мл, 10 объемов), подщелачивали, используя насыщенный раствор NaHCO₃ (930 мл, 5 объемов). Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали DCM (1860 мл, 10 объемов). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄ и отгоняли при пониженном давлении, получая 190 г неочищенного соединения. Неочищенное соединение очищали колоночной хроматографией с нейтральным оксидом алюминия с использованием 15% этилацетата в гексане. Чистые фракции собирали и концентрировали при пониженном давлении с получением 75 г чистого соединения. (Выход: 46%).

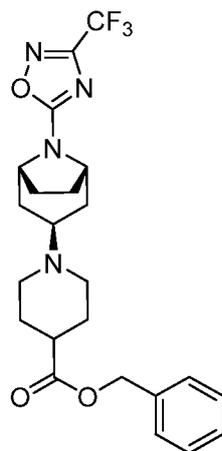
Стадия-07: Синтез бензил-1-((1R,3R,5S)-8-(((третбутоксикарбонил)амино)окси)-(имино)метил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин -4-карбоксилата (10):



В чистую и сухую 3-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота загружали 2-метил-ТНФ (800 мл, 10 объемов) и Промежуточное соединение 8 (80 г, 1,0 экв.), затем реакционную смесь охлаждали до 0-5 °С. Добавляли раствор ZnCl₂ (2,2 экв., 1,9 М раствор в 2-метил-ТНФ) и перемешивали реакционную смесь при 0°C в течение 30 минут, затем добавляли N-Вос-гидроксиламин (Промежуточное соединение 9) (1,2 экв.), медленно нагревали реакционную смесь до 23-25 °С и перемешивали в течение 16 часов. Протекание реакции

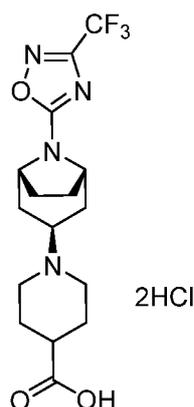
контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ до ее завершения. Реакционную смесь гасили водой (800 мл, 10,0 объемов), а затем продукт экстрагировали этилацетатом (2×800 мл). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали при пониженном давлении, получая 110 г (количественный выход) неочищенного соединения. Этот продукт непосредственно использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

Стадия-08: Синтез бензил-1-((1R,3R,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксилата (11):



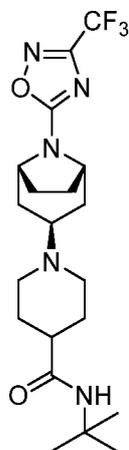
В чистую и сухую 3-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота загружали DCM (1150 мл, 10,0 объемов) и Промежуточное соединение 10 (115,0 г, 1,0 экв.), затем реакционную смесь охлаждали до 0-5 °С. Смесь трифторуксусной кислоты (271 мл, 15,0 экв.) и TFAA (164 мл, 5,0 экв.) добавляли по каплям 3-мя отдельными порциями при 0-5 °С с интервалом 3-4 часа в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч, а затем еще 16 ч, до завершения реакции (контролировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ). После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до 0 °С, доводили pH (7-8) с помощью насыщенного водного раствора NaHCO₃ и перемешивали реакционную смесь в течение 15 мин. Слои разделяли и водный слой экстрагировали DCM (2×100 мл). Объединенный органический слой сушили над Na₂SO₄ и упаривали при пониженном давлении, получая 145 г неочищенного соединения, которое очищали колоночной хроматографией с использованием нейтрального оксида алюминия, а также гексана и этилацетата в качестве элюента, получали 49 г чистого продукта.

Стадия-09: Синтез 1-((1R,3R,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоновой кислоты (12):



В чистую и сухую 5-литровую четырехгорлую колбу RB, снабженную холодильником и гильзой для термометра в атмосфере азота при комнатной температуре (22-25°C) загружали THF (2250 мл), деминерализованную воду (450 мл) и Промежуточное соединение 11 (225 г). При комнатной температуре (22-25°C) добавляли моногидрат гидроксида лития (30,5 г, 2,0 экв.), и реакционную смесь перемешивали при 60 °С в течение 4 часов. Протекание реакции контролировали при помощи ТСХ и ВЭЖХ, и после завершения реакции реакционную смесь охлаждали до 0-5 °С. С помощью 1 н. раствора HCl доводили pH до 4-5 и перемешивали смесь в течение 15 минут. Растворитель выпаривали и неочищенный продукт очищали, добавляя МТВЕ (10,0 объемов) к неочищенному соединению при комнатной температуре и перемешивая при комнатной температуре в течение 2 часов. Осадок отфильтровывали, промывали МТВЕ (1,0 объемов). Осадок сушили в вакууме с получением 245 г (*фактически продукт представляет собой 216 г Промежуточного соединения 12, а оставшиеся приблизительно 29,0 г - это соль хлорида лития) продукта в виде грязновато-белого твердого вещества.

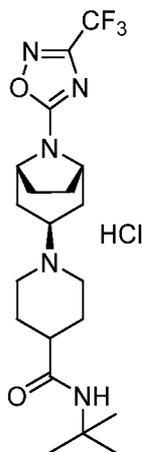
Стадия 10: Синтез N-(трет-бутил)-1-((1R,3г,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло [3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксамид



Процедура:

В чистую и высушенную трехгорлую круглодонную колбу объемом 1 л, снабженную механической мешалкой и входом для азота, загружали ацетонитрил (20,0 объемов) и Промежуточное соединение 12 (1,0 экв.) одной порцией, затем перемешивали реакционную массу в течение 10 мин. Реакционную смесь охлаждали до 0 °С, затем добавляли НАТУ, и затем медленно добавляли трет-бутиламин (1,5 экв.), DIPEA (4,0 объема) в течение 15 мин. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. За протеканием реакции следили с помощью ТСХ, и после ее завершения избыток ацетонитрила отгоняли при пониженном давлении. Реакцию гасили деминерализованной водой (40,0 объемов), твердое вещество выпадало в осадок, и смесь перемешивали в течение 60 мин. Осадок промывали деминерализованной водой (5,0 объемов) и сушили отгонкой воды. Твердое соединение сушили в вакууме и получали 56,0 г продукта в виде твердого вещества грязновато-белого цвета.

Стадия 11: Синтез гидрохлорида N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло [3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксамид



В колбу помещали Промежуточное соединение 14 в виде свободного основания (56,0 г, 1,0 экв.) в ацетоне (10,0 объемов) и перемешивали реакционную смесь в течение 10 мин. Затем реакционной смеси давали остыть до 0 °С и по каплям добавляли 15% раствор HCl в IPA при 0 °С. Затем реакционной смеси давали нагреться до 25-30°С и перемешивали в течение 2 часов при 25-30°С. Растворитель полностью выпаривали при пониженном давлении и 2 раза проводили совместную перегонку с 10,0 объемами н-гептана. Твердое соединение сушили в вакууме, получали 59,0 г продукта в виде твердого вещества грязновато-белого цвета.

Стадия 12: Перекристаллизация: Синтез N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксамид моногидрохлорида моногидрата (пример 1-2)

В колбу загружали гидрохлорид Промежуточного соединения 14 (IPA (10,0 объемов) и нагревали реакционную смесь с обратным холодильником до температуры кипения в течение 1 часа, однако осадок при нагревании с обратным холодильником растворился не полностью. При непрерывном нагревании в течение 1 часа добавляли MeOH (1,0 объем) и получали раствор. Горячий раствор пропускали через фильтровальную бумагу для удаления нерастворимых частиц. Растворитель (примерно 8 объемов из 11 объемов растворителя) удаляли при пониженном давлении. Оставляли приблизительно 3 объема растворителя, давали ему остыть до 0 °C и перемешивали в течение 1 ч при той же температуре. Затем осадок отфильтровывали, промывали минимальным количеством охлажденного IPA и сушили отсасыванием. Осадок сушили в вакууме, с получением 93,5 г продукта в виде грязновато-белого твердого вещества.

Для определения состава партии проводили анализ. Вывод состоит в том, что эта партия представляет собой моногидрохлорида моногидрат.

Формула моногидрохлорида моногидрата: $C_{20}H_{33}N_5O_3ClF_3$, молекулярная масса: 483,96

N-(трет-бутил)-1-((1R,3r,5S)-8-(3-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)-8-азабицикло[3.2.1]октан-3-ил)пиперидин-4-карбоксамид моногидрохлорида моногидрат			
	% теоретически	% измерено	измерено /теоретически
Углерод	49,64%	49,56%	99,85%
Водород	6,87%	6,89%	100,25%
Азот	14,47%	14,45%	99,86%
Хлор	7,33%	7,28%	99,38%
Вода	3,72%	4,33%	116,40%

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Пример А: Анализ фосфо-ERK1/2

Функциональные анализы проводили с использованием набора Alphascreen Surefire для анализа фосфо-ERK1/2 (Crouch & Osmond, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2008). Фосфорилирование ERK1/2 является следствием активации связанных с Gq/11 и Gi/o белками рецепторов, что делает этот процесс значительно более подходящим для

оценки рецепторов M₁, M₃ (связанных с Gq/11) и рецепторов M₂, M₄ (связанных с Gi/o), чем использование разных форматов анализа для разных подтипов рецепторов. Клетки СНО, стабильно экспрессирующие человеческий мускариновый рецептор M₁, M₂, M₃ или M₄, высевали в 96-луночные планшеты для тканевых культур (25К/лунку) в MEM-альфа + 10% диализированного FBS. После адгезии клетки оставляли в условиях сывороточного голодания на ночь. Стимуляцию агонистом проводили путем добавления к клеткам 5 мкл агониста в течение 5 мин (37 °С). Среду удаляли и добавляли 50 мкл лизирующего буфера. Через 15 минут 4 мкл образца переносили в 384-луночный планшет и добавляли 7 мкл детектирующей смеси. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при осторожном встряхивании в темноте, а затем считывали на планшет-ридере PHERAstar. Значения pEC₅₀ и E_{max} рассчитывали, исходя из полученных данных, для каждого подтипа рецептора, результаты представлены в Таблице 1 ниже.

Таблица 1

Пример №	Мускариновая активность			
	pEC ₅₀ M1 (% E _{max} по сравнению с ACh)	pEC ₅₀ M2 (% E _{max} по сравнению с ACh)	pEC ₅₀ M3 (% E _{max} по сравнению с ACh)	pEC ₅₀ M4 (% E _{max} по сравнению с ACh)
Ацетилхолин (ACh)	8,05 (96)	7,73 (106)	8,27 (102)	8.00 (108)
1-1	7,17 (92)	< 4,70 (7)	< 4,70 (3)	6,92 (32)

Пример В: CLint (гепатоциты *in vitro*) (Пример 1)

Анализы стабильности гепатоцитов проводили с использованием объединенных криоконсервированных гепатоцитов (Bioreclamation). Тестируемые соединения, приготовленные в DMSO, инкубировали при начальной концентрации 1 мкМ (конечная концентрация в DMSO 0,25%, n=2) с гепатоцитами при плотности клеток 1,0 миллион клеток/мл при 37 °С. Спустя 0,5, 5, 10, 15, 30, 60 и 120 минут отбирали аликвоты для остановки реакции и экстракции соединения ацетонитрилом, содержащим аналитический внутренний стандарт (0,5 мкМ карбамазепин). Образцы центрифугировали и анализировали фракции супернатанта на наличие исходного соединения с помощью масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Количество оставшегося соединения (выраженное в %) определяли по результатам МС в каждом образце по сравнению с таковым в образцах при T=0 (нормализованными по внутреннему стандарту). Логарифмические графики %

оставшегося вещества использовали для определения периода полужизни расходуемого соединения с использованием уравнения:

$$\text{Период полужизни (мин)} = -0,693/\lambda ,$$

(где λ — наклон логарифмической кривой зависимости % оставшегося вещества от времени).

Внутренний клиренс *in vitro* (CLint) в мкл/мин/миллион клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{CLint (мкл/мин/миллион клеток)} = (0,693/\text{период полужизни (мин)}) \times (1000/\text{миллион инкубируемых клеток на мл})$$

Мышь = 7 мкл/мин/ миллион

Крыса 8 мкл/мин/миллион

Собака 8 мкл/мин/миллион

Обезьяна <5 мкл/мин/миллион

Человек <5 мкл/мин/миллион

Пример С: проницаемость/эффлюкс MDCK клеток (Пример 1)

Клетки MDR1-MDCK (Solvo Biotechnology) высевали на 24-луночные планшеты Transwell по $2,35 \times 10^5$ клеток на лунку и использовали в виде конфлюэнтных монослоев после 3-дневного культивирования при 37°C и 5% CO₂. Для типов клеток тестируемые и контрольные соединения (пропранолол, винбластин) добавляли (1 мкМ, конечный 0,1% ДМСО, n=2) в донорные камеры планшета Transwell в буфере для анализа (сбалансированный солевой раствор Хэнкса с добавлением 25 мМ HEPES, и pH, доведенном до значения 7,4) как для апикально-базолатеральных (A>B), так и для базолатерально-апикальных (B>A) измерений. Инкубацию проводили при 37 °C, как из донорной, так и из акцепторной камер образцы удаляли в периоды времени T=0 и 1 час, и анализировали соединение с помощью масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС), с учетом аналитического внутреннего стандарта.

Значения кажущейся проницаемости (Papp) определяли по уравнению:

$$\text{Papp} = (\text{Соединение-акцептор} = T_{\text{конечное}} / (\text{Соединение-донор} \times V_{\text{донора}}) / \text{Время инкубации}) \times V_{\text{донора}} \times \text{Площадь} \times 60 \times 10^{-6} \text{ см/сек},$$

где V представляет собой объем одной камеры планшета Transwell (апикальный 125 мкл, базолатеральный 600 мкл), а концентрации представляют собой относительные результаты МС для соединения (нормализованные по внутреннему стандарту) в донорной камере до инкубации и в акцепторной камере в конце инкубации. Площадь = площадь

слоя клеток, подвергшихся переносу лекарственного средства ($0,33 \text{ см}^2$). Коэффициент эффлюкса ($\text{Papp } B>A$)/($\text{Papp } A>B$) рассчитывали, исходя из средних значений Papp в каждом направлении. Клеточная линия MDR1-MDCK была сконструирована для сверхэкспрессии эффлюксного транспортера, MDR1 (P-гликопротеина), и обнаружение хорошей проницаемости в направлении $B>A$, но плохой проницаемости в направлении $A>B$ свидетельствует о том, что соединение является субстратом для этого транспортера. Во все лунки к апикальному буферу добавляли люцифер желтый (LY) для оценки жизнеспособности клеточного слоя. Поскольку LY не может свободно проникать через липофильные барьеры, высокая степень транспорта LY указывает на нарушение целостности клеточного слоя, и лунки с $\text{Papp (LY)} > 10 \times 10^{-6} \text{ см/сек}$ не учитывали. Следует обратить внимание, что нарушение целостности в одной лунке не влияет на достоверность других лунок на планшете. Извлечение соединения в лунках определяли по результатам МС (нормализованным по внутреннему стандарту) в донорной и акцепторной камерах в конце инкубации по сравнению с результатом в донорной камере до инкубации. Извлечение $< 50\%$ указывает на проблемы с растворимостью, стабильностью или связыванием соединения в анализе, которые могут снизить надежность результата.

$$A-B = 66 \times 10^{-6} \text{ см/сек.}$$

$$B-A = 77 \times 10^{-6} \text{ см/сек}$$

$$\text{Коэффициент эффлюкса } B-A/A-B = 1,2$$

Пример D: данные по растворимости (Пример 1)

Растворимость в воде (термодинамическая) – метод ЖХ-МС/МС

Готовили 10 мМ стоковый раствор тестируемого образца (в DMSO). Из 10 мМ стокового раствора готовили 1 мкМ рабочий раствор путем разведения тестируемого образца раствором подвижной фазы (обычно метанол: 2 мМ ацетат аммония, содержащий подходящий внутренний стандарт (ВС) – карбамазепин/любой другой подходящий ВС). Далее рабочий раствор последовательно разводили раствором подвижной фазы до 5-6 линейных точек, чтобы получить стандартные растворы для построения калибровочной кривой. Площадь для каждого стандартного образца анализировали синглетно с использованием ЖХ-МС/МС. Нормализованные значения площади наносили на график зависимости от концентрации, чтобы получить калибровочную кривую для определения неизвестного образца. Для определения термодинамической (TD) растворимости тестируемого соединения в воде 1 мг соединения (в виде порошка) добавляли к 1 мл каждого буфера и биорелевантной среды, указанных в таблице ниже, до достижения

теоретической концентрации, эквивалентной 1 мг/мл. Тестируемое соединение диспергировали в буферном растворе с помощью вортекса.

Номер серии	Название реагента	
1	SGF (Искусственный желудочный сок)	pH – 1.2
2	FaSSIF натошак (водн. буфер)	pH – 6.5
3	FaSSIF	pH – 6.5

Затем полученный раствор выдерживали на RotoSpin (шейкере) при 50 об/мин в течение 4 часов для определения TD растворимости при комнатной температуре (25°C). После периода инкубации раствор фильтровали с использованием 0,45-микронных инъекторных фильтров из PVDF (поливинилидендифторида), чтобы удалить нерастворимую фракцию соединения. Фильтрат разбавляли подвижной фазой, а затем определяли AUC для разбавленных образцов с помощью ЖХ-МС/МС. На основании AUC тестируемого образца рассчитывали соответствующую концентрацию с использованием 5-6-точечного линейного графика/калибровочной кривой.

Все числа указаны в мкМ.

FaSSIF натошак, pH 6,5 (n = 4)	FaSSIF, pH 6,5 (n = 4)	SGF, pH 1,2 (n = 4)
1743	2008	2079
1941	2448	1988
1937	1713	1702
2022	2104	2039

Пример E: H₂REL (пример 1)

После получения 96-луночных планшетов H₂REL human Pool™ для совместного культивирования гепатоцитов среду заменяли и клеткам давали возможность акклиматизироваться при 37 °C в течение ~20 часов. Для инициирования реакции в 96-луночную систему совместного культивирования H₂REL® (конечное число клеток - 30000 клеток на лунку) добавляли среду для инкубации H₂REL® (без сыворотки) и тестируемое соединение (конечная концентрация субстрата 1 мкМ; конечная концентрация DMSO 0,1%). Итоговый объем для инкубации составлял 80 мкл на контрольный момент времени. В анализ были включены два контрольных соединения. Все инкубации проводили отдельно для каждого тестируемого соединения.

Каждое соединение инкубировали в течение 0, 2, 6, 24, 48 и 72 часов (0, 120, 360, 1440, 2880 и 4320 минут). Реакции останавливали переносом 60 мкл инкубационной смеси в 180 мкл ацетонитрила, содержащего внутренний стандарт, в соответствующие

временные точки. Полученные планшеты центрифугировали при 3000 об/мин при 4 °С в течение 20 мин для осаждения всех остаточных белков.

Количественный анализ

После осаждения белка супернатанты образцов объединяли в кассеты, содержащие до 4 соединений, и анализировали с использованием обычных условий Cyprotex ЖХ-МС/МС.

Анализ данных

Наклон линии определяли по логарифмическому графику зависимости площади пика (площадь пика соединения/площадь пика внутреннего стандарта) от времени. После этого рассчитывали время полужизни ($t_{1/2}$) и собственный клиренс (CL_{int}) с использованием приведенных ниже уравнений:

Константа скорости элиминации (k) = (- градиент),

$$\text{Время полужизни } (t_{1/2}) (\text{мин}) = \frac{0.693}{k},$$

$$\text{Собственный клиренс } (CL_{int}) (\text{мкл/мин/миллион клеток}) = \frac{V \times 0.693}{t_{1/2}},$$

(где V = объем инкубационной смеси(мкл)/количество клеток).

$$CL_{int} < 0,143 \text{ мкл/мин/млн}$$

Пример F: Прогнозируемое связывание с мишенью эффективной дозы для человека

(Пример 1)

Ожидаемое условие при наблюдении агонистической эффективности M_1 у людей составляет 6 часов воздействия несвязанного вещества на головной мозг по сравнению с EC_{50} для рекомбинантного M_1 . Предполагали, что в случае Примера 1 воздействие несвязанного вещества на головной мозг, необходимое для эффективности агониста M_1 , будет достигнуто в дозе приблизительно 22 мг, а прогнозируемое время полужизни у человека составит 15 часов (Фиг. 1).

Параметры, используемые при прогнозировании занятости рецептора (связывание с мишенью).

$$MW = 429.48$$

$$M_1 \text{ p}EC_{50} = 7.17$$

$$Fu = 0.682$$

$$K_{ru} = 1$$

$$\text{Время полужизни (прогнозируемое)} = 15 \text{ часов}$$

$$F = 0.61$$

$$Cl = 4.4 \text{ мл/мин/кг}$$

$$V = 5.9 \text{ мл/мин/кг}$$

$K_a = 1$

Определения:

F_u – доля несвязанного соединения в гомогенате плазмы или ткани головного мозга

F – биодоступность; процент введенной дозы, которая достигает системного кровотока (плазмы)

K_{pu} – отношение концентрации несвязанного вещества в головном мозге к концентрации несвязанного вещества в плазме. Позволяет количественно оценивать чистый поток лекарств через гематоэнцефалический барьер, с учетом количественной роли транспортеров, без искажения за счет неспецифического связывания в плазме и тканях головного мозга. Gupta et al, DMD, 2006; Hammarlund-Udenaes et al, PharmRes, 2008

Пример G: Ослабление субхронического дефицита, индуцированного РСР, в задаче оперантного реверсивного обучения (переделки навыка) у самок капюшонных крыс Листера (Пример 1)

ЗАДАЧА И РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучить способность Примера 1 (1, 3, 10 и 30 мг/кг, перорально, 1 час до лечения (prt)) ослаблять нарушение когнитивной задачи, вызванное субхроническим лечением фенциклидином (scPCP) у самок капюшонных крыс Листера (Lister Hooded rats).

Отмечалось значительное ($P < 0,01$) снижение процента правильных ответов на реверсивной фазе задания в группе scPCP по сравнению с носителем (Фиг. 2). Лечение препаратом Примера 1 в самой низкой и двух средних дозах (1, 3 и 10 мг/кг) значительно ($P < 0,05$, $P < 0,05$ и $P < 0,01$, соответственно) увеличивало процент правильных ответов по сравнению с группой scPCP в реверсивной фазе (Фиг. 2).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для этого эксперимента использовали самок капюшонных крыс Листера. Средний вес крыс на момент тестирования составил 294 ± 29 г. Крыс содержали группами по 3-5 животных в стандартных лабораторных условиях при 12-часовом цикле день:ночь (свет включается в 07:00) и корме, ограниченном до 90%, при свободном доступе к корму (12 г корма на крысу в день). Тестирование проводилось в легкой фазе. Крыс случайным образом распределяли по двум группам лечения, и они получали носитель, $n=8$ (0,9% солевой раствор, внутривентрикулярно) или РСР, $n=48$ (2 мг/кг, внутривентрикулярно два раза в день в течение 7 дней). В день тестирования крыс случайным образом распределяли по семи группам лечения ($n=6-8$ в группе) для получения краткосрочного лечения

соединением Примера 1 (1, 3, 10 и 30 мг/кг, перорально, 1 ч ptt) или носителем. Соединение Примера 1 растворяли в 1% метилцеллюлозе и вводили перорально (р.о.) в объеме 5 мл/кг за 1 час до тестирования. Исследование проводилось в соответствии с Законом о научных процедурах в отношении животных (Великобритания, 1986 г.) и было одобрено Манчестерским университетом AWERB (Орган по защите животных и этике).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

После привыкания к оперантным камерам крыс обучали реагировать на пищу в соответствии с режимом подкрепления FR1 (фиксированное соотношение 1) с двумя активными рычагами. Когда реагирование стабилизировалось, крыс обучали нажимать либо на левый, либо на правый рычаг для подачи пищи, причем активный рычаг меняли изо дня в день. Каждая сессия длилась 20 минут, и для каждого рычага регистрировалось число нажатий. Затем крыс обучали реагировать на пищу в соответствии с положением визуальной подсказки (светящийся светодиод). Чтобы получить награду в виде еды, половина была обучена нажимать на рычаг, когда светодиод горит, а другая половина была обучена противоположному варианту (нажимать на рычаг, когда светодиод не горит). Экспериментальная сессия была прекращена после 128 нажатий на рычаги, что заняло примерно 30 минут. В дальнейшем крыс обучали до тех пор, пока они снова не достигали критерия по противоположному варианту.

За день до каждого сеанса переделки навыка проводилось полное 30-минутное оперантное обучение (как описано выше) для обеспечения стабильной реакции. Для задачи реверсивного обучения животных сначала подвергали 5-минутному периоду, в течение которого ситуация (положение сигнала относительно активного рычага) была такой же, как и для сеанса оперантного обучения. В течение этого периода регистрировали нажатия как на правильные, так и на неправильные рычаги. Эту часть сеанса обозначали, как начальную фазу. В следующие 5 минут ситуацию меняли. Снова регистрировали нажатия на правильные и неправильные рычаги. Этот второй период обозначали, как реверсивную фазу. На этой стадии обучение прекращали и крыс обрабатывали РСР (2 мг/кг, внутривентрикулярно) или носителем (0,9% солевой раствор, внутривентрикулярно) в течение 7 дней с последующим по меньшей мере 7-дневным периодом вымывания. Крыс рандомизировали таким образом, чтобы все крысы в клетке получали лечение различными препаратами.

Данные представлены в виде процента правильного ответа (\pm стандартная ошибка среднего) со значениями для начальной и реверсивной фаз для различных групп медикаментозного лечения (Фиг. 2). Данные о проценте правильных ответов

использовались для определения того, насколько значительно влияло лекарственное средство на точность ответов (например, это может отражать когнитивную дисфункцию); Статистическую значимость принимали при $P < 0,05$ и определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA для того, чтобы определить основной эффект медикаментозного лечения в начальной и обратной фазах. Общее количество нажатий на рычаг, зарегистрированное как в начальной, так и в реверсивной фазах, существенно не отличалось после лечения либо носителем, либо соединением Примера 1 (Таблица 2), что подтверждает отсутствие неспецифических эффектов на общий ответ в этом исследовании.

Таблица 2. Влияние краткосрочного лечения соединением Примера 1 (1,0, 3,0, 10,0 и 30,0 мг/кг, перорально) на общую производительность в задаче переделки навыка у крыс, получавших scPCP (2 мг/кг, внутривентрикулярно два раза в день в течение семи дней, с последующим по меньшей мере 7-дневным периодом вымывания). Данные представлены как среднее общее количество нажатий на рычаг в начальной и реверсивной фазах задачи переделки навыка \pm SEM ($n = 6-9$).

Медикаментозное лечение	Начальная фаза	Реверсивная фаза
scСолевой раствор + носитель	27,0 \pm 0,2	27,3 \pm 0,2
scPCP + носитель	26,5 \pm 0,2	26,0 \pm 0,5
scPCP + 1,0 мг/кг Примера 1	27,4 \pm 0,2	27,5 \pm 0,3
scPCP + 3,0 мг/кг Примера 1	27,5 \pm 0,2	26,8 \pm 0,2
scPCP + 10,0 мг/кг Примера 1	27,0 \pm 0,3	26,6 \pm 0,5
scPCP + 30,0 мг/кг Примера 1	26,4 \pm 0,6	26,6 \pm 0,3

Краткое описание фигур

Фиг.1: На фиг.1 показано прогнозируемое целевое взаимодействие эффективной дозы соединения Примера 1 на основе аллометрического масштабирования для мышей, крыс, собак и обезьян после перорального введения. Данные представлены как функция рассчитанного % связывания M_1 -рецептора с мишенью, где 50% эквивалентны воздействию несвязанного вещества, равного рекомбинантному человеческому EC_{50} (86 нМ или 28 нг/мл). На основании измеренного эквивалентного профиля распределения

несвязанное вещество в плазме : несвязанное вещество в мозге ($K_{pi} = 1$), показанные воздействия представляют воздействия либо в плазме, либо в отделе головного мозга.

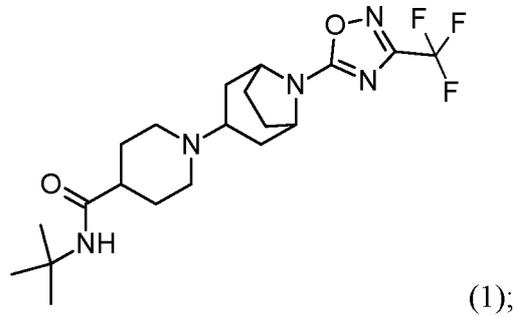
Фиг. 2 : На фиг. 2 показан эффект краткосрочного лечения препаратом Примера 1 (1,0, 3,0, 10,0 и 30,0 мг/кг, перорально) у крыс, получавших scPCP (2 мг/кг, внутривентрикулярно, два раза в день в течение семи дней, с последующим, по меньшей мере, 7-дневным периодом вымывания) на производительность в задаче переделки навыка. Данные представлены в виде среднего процента правильных ответов \pm стандартная ошибка среднего ($n=6-9$). Пунктирная линия отделяет начальную фазу задачи (слева) от реверсивной фазы (справа). Данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующим LSD тестом. $***P<0,001$; значительное снижение % правильных ответов в реверсивной фазе задания по сравнению с группой scSaline + носитель. $\#P<0,05$; $\#\#P=0,01$; $\#\#\#P<0,001$; значительное увеличение процента правильных ответов в реверсивной фазе задания по сравнению с группой scPCP + носитель.

Эквиваленты

Вышеприведенные примеры представлены с целью иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Очевидно, что в конкретные варианты осуществления изобретения, описанные выше и проиллюстрированные в примерах, могут быть внесены многочисленные модификации и изменения без отклонения от принципов, лежащих в основе изобретения. Подразумевается, что все такие модификации и изменения охватываются данной заявкой.

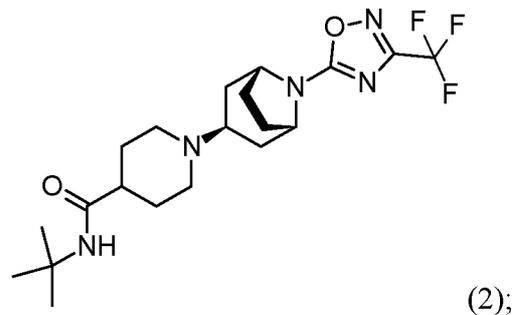
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (1):



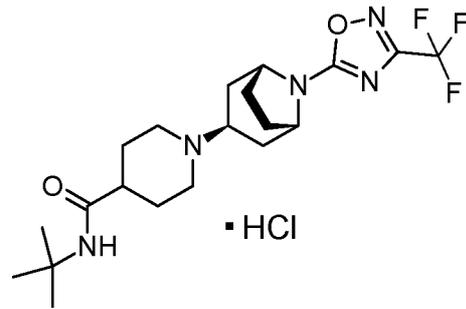
или его соль.

2. Соединение по п.1, имеющее формулу (2):

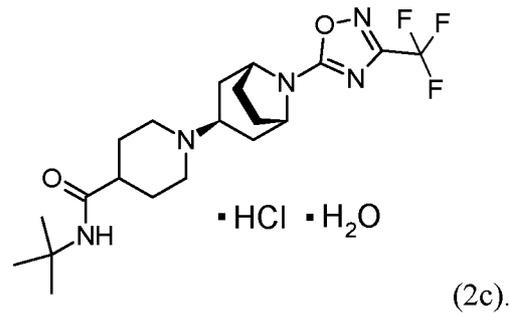


или его соль.

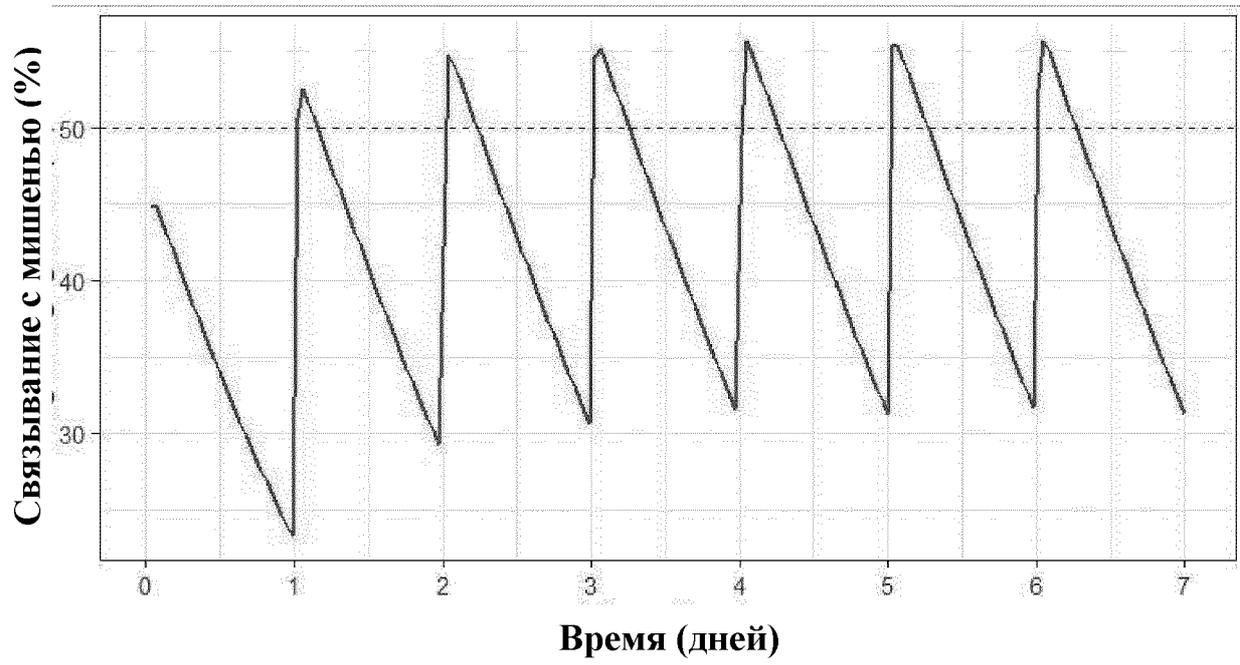
3. Соль соединения по п.1 или п.2.
4. Фармацевтически приемлемая соль соединения по п.1 или п.2.
5. Кислотно-аддитивная соль соединения по п.1 или п.2.
6. Гидрохлорид соединения по п.1 или п.2.
7. Моногидрохлорид соединения по п.1 или п.2.
8. Соединение по п.1, которое представляет собой соединение формулы (2b):



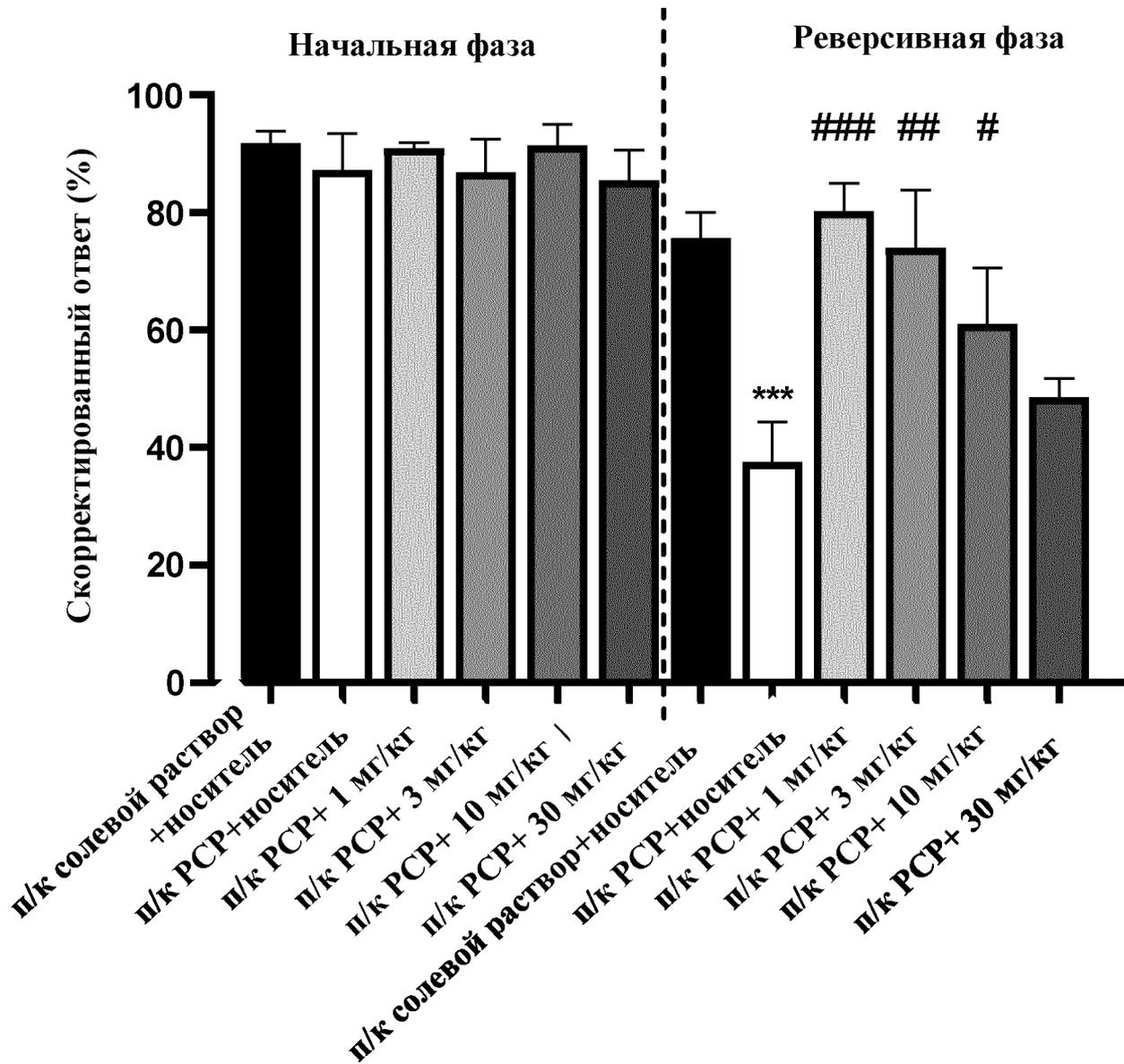
9. Соединение по п.1, которое представляет собой соединение формулы (2с):



10. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-9 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
11. Соединение по любому из пп.1-9, обладающее активностью агониста мускариновых рецепторов M_1 и M_4 .
12. Соединение или композиция по любому из пп. 1-10 для применения в медицине.
13. Соединение или композиция по любому из пп. 1-10 для применения при лечении когнитивного расстройства, или психотического расстройства, или для лечения или уменьшения тяжести острой, хронической, невропатической или воспалительной боли.
14. Соединение для применения по п. 13, где расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера.
15. Соединение для применения по п. 13, где расстройство представляет собой деменцию с тельцами Леви.
16. Соединение для применения по п. 13, где расстройство представляет собой шизофрению.



Фиг. 1



Фиг. 2