



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 130869

(13) C2

(51) МПК

A61K 31/4439 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

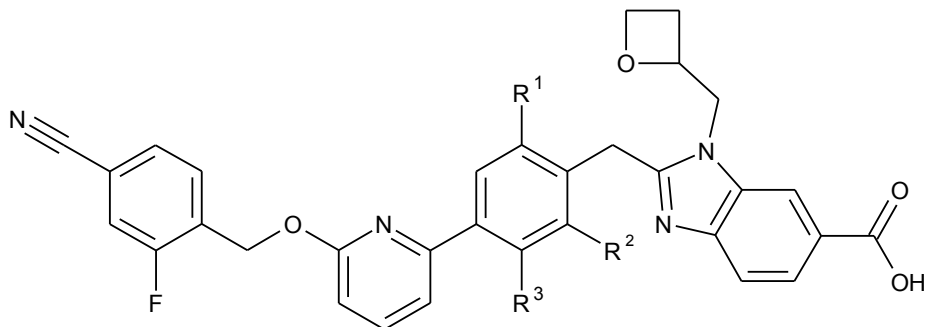
НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2021 06794	(72) Винахідник(и):	Коутс Дейвід Ендрю (US), Філдс Тодд (US), Хо Джозеф Даніель (US), Цюй Фучен (US)
(22) Дата подання заявки:	19.06.2020	(73) Володілець (володільці):	ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46206-6288, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	04.06.2026	(74) Представник:	Шляховецький Олександр Михайлович, реєстр. №21
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/868,117, 62/904,906	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2018/109607 A1, 21.06.2018
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	28.06.2019, 24.09.2019		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	09.03.2022, Бюл.№ 10		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	03.06.2026, Бюл.№ 22		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2020/038617, 19.06.2020		

(54) АГОНІСТИ РЕЦЕПТОРІВ ГЛЮКАГОНОПОДІБНОГО ПЕПТИДУ-1**(57) Реферат:**

В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули:



UA 130869 C2

або її фармацевтично прийнятна сіль, і способи застосування цієї сполуки для лікування цукрового діабету 2 типу.

Цей винахід стосується агоністів рецепторів глюкагоноподібного пептиду-1 і терапевтичних застосувань згаданих сполук для лікування цукрового діабету 2 типу.

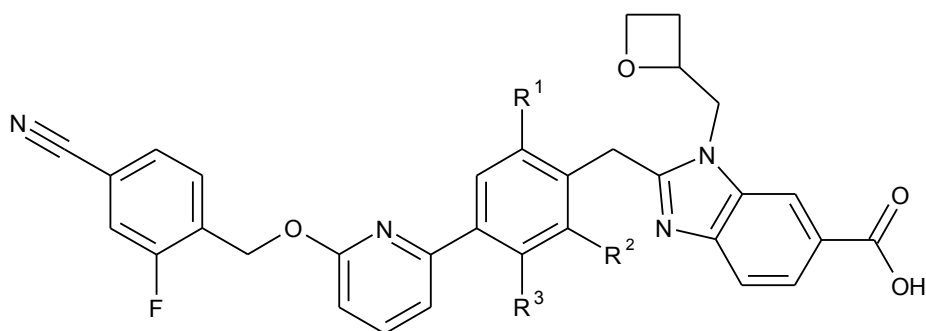
Глюкагоноподібний пептид-1 (GLP-1) є членом пептидних гормонів з родини інкретину, які виділяються ентероендокринними L-клітинами кишечника. GLP-1 спричинює вивільнення інсуліну з бета-клітин глюкозозалежним чином. Однак GLP-1 швидко метаболізується, тому лише невеликий відсоток GLP-1 може бути використаний для спричинення секреції інсуліну. Для компенсування цього, з метою посилення секреції інсуліну, були розроблені агоністи рецепторів GLP-1 (GLP-1R) як лікарський засіб для цукрового діабету 2 типу.

Більшість агоністів GLP-1R, які були схвалені для лікування цукрового діабету 2 типу, є ін'єкційними препаратами. Пацієнти часто віддають перевагу лікарським засобам, що вводяться пероральним шляхом, через недоліки, пов'язані з ін'єкцією, такі як незручність, біль і можливість подразнення в місці ін'єкції.

WO2018/109607 розкриває певні похідні бензimidазолу, які описано як агоністи GLP-1R.

Однак існує потреба в альтернативних агоністах GLP-1R. Зокрема, існує потреба в агоністах GLP-1R, які можуть бути введені пероральним шляхом. Існує особлива потреба в агоністах GLP-1R, які мають покращену дію, сприятливий токсикологічний профіль та/або фармакокінетичний профіль, який підтримує введення доз один раз на добу.

Відповідно, цим винаходом надана сполука Формули:



Формула I,

де

R^1 являє собою H або F;

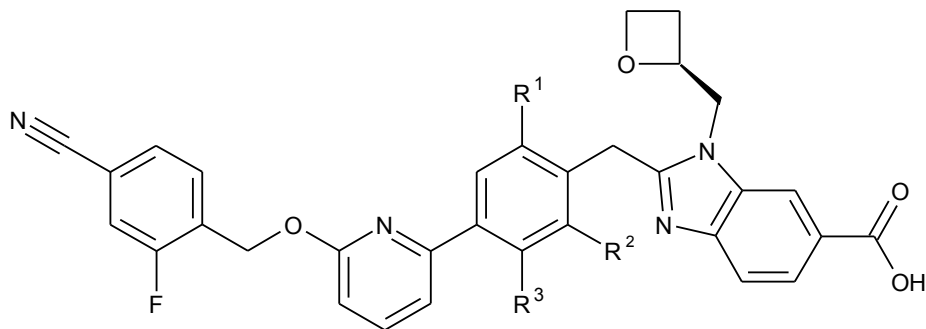
R^2 являє собою H або F; i

R^3 являє собою H або CH_3 ;

або її фармацевтично прийнятна сіль.

Формула I охоплює всі окремі енантіомери, їх суміші, так само як і рацемати, і їх фармакологічно прийнятні солі.

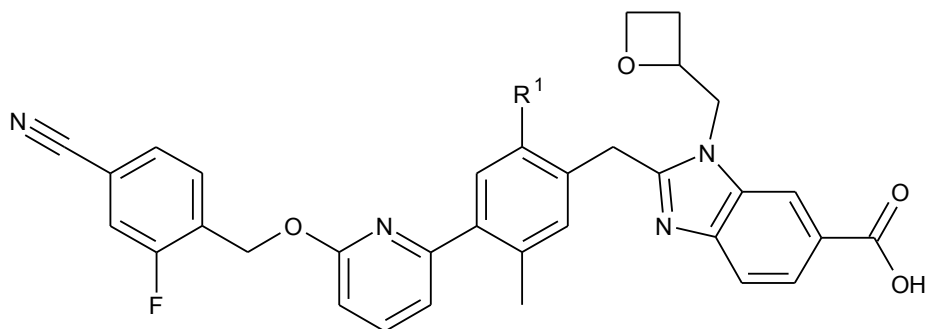
В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули:



Формула Ia,

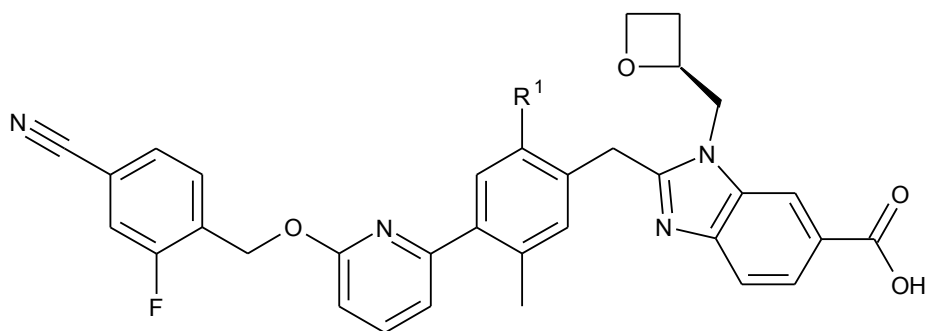
або її фармацевтично прийнятна сіль.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули:



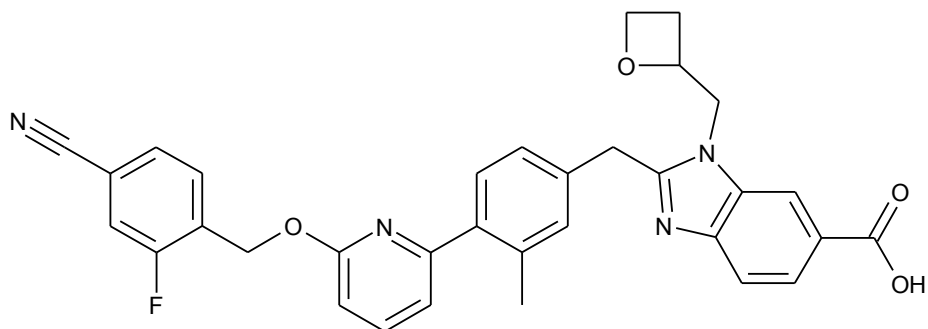
Формула II,

де R¹ являє собою H або F, або її фармацевтично прийнятна сіль.
В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули:

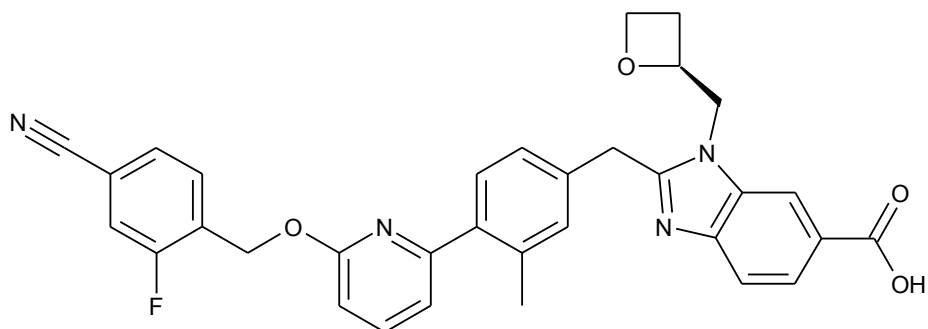


Формула IIa,

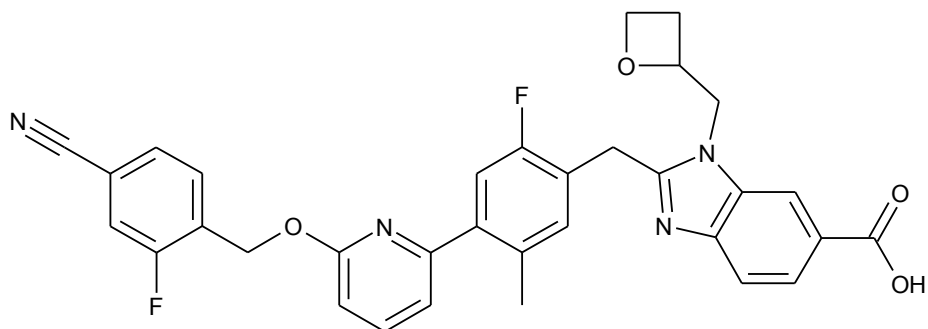
- 5 де R¹ являє собою H або F, або її фармацевтично прийнятну сіль.
В одному з варіантів здійснення цього винаходу згадана сполука являє собою сполуку Формули:



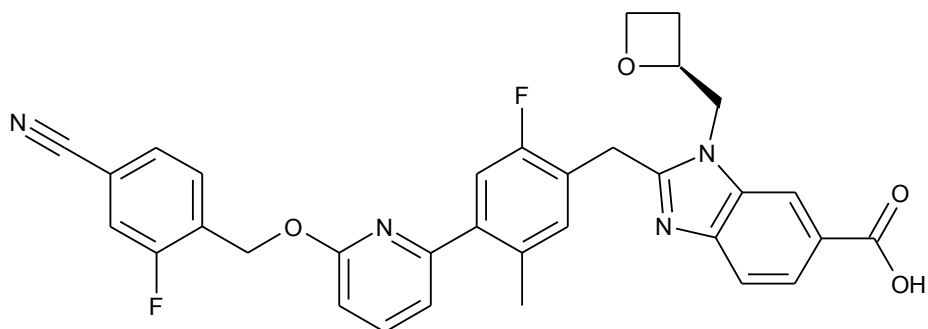
- 10 або її фармацевтично прийнятну сіль. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука являє собою сполуку Формули:



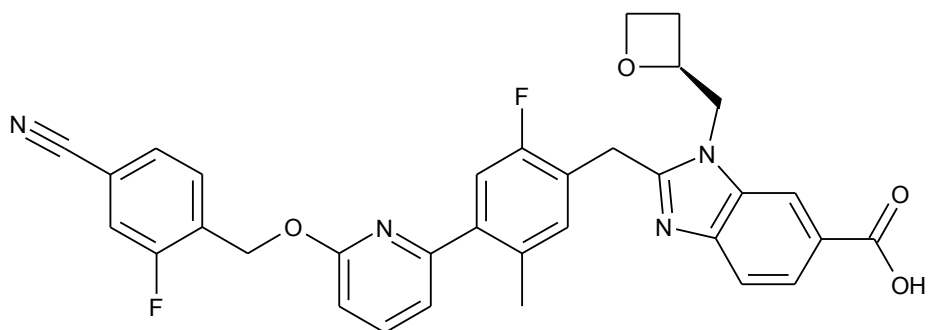
або її фармацевтично прийнятну сіль.
В одному з варіантів здійснення цього винаходу згадана сполука являє собою сполуку Формули:



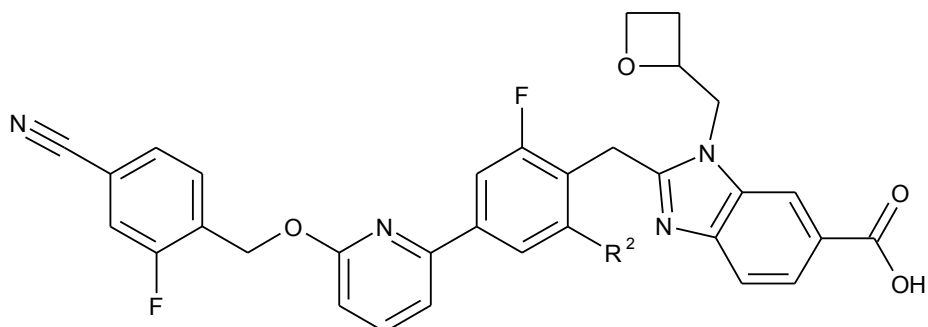
або її фармацевтично прийнятну сіль. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука являє собою сполуку Формули:



5 або її фармацевтично прийнятну сіль. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають особливу перевагу, надана трет-бутиламінова сіль (також відома як ербумінова сіль):

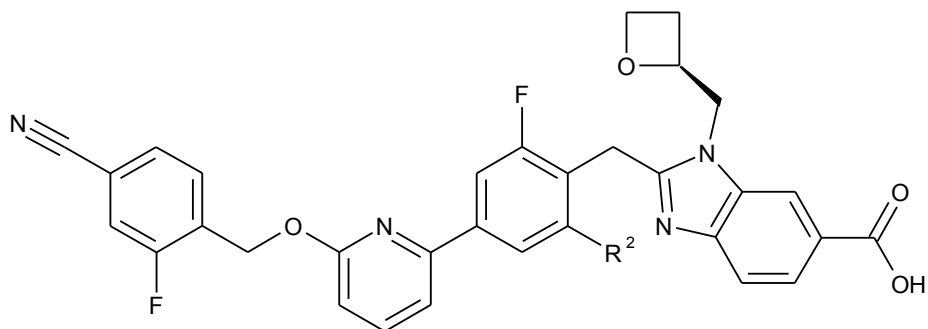


В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули:



Формула III,

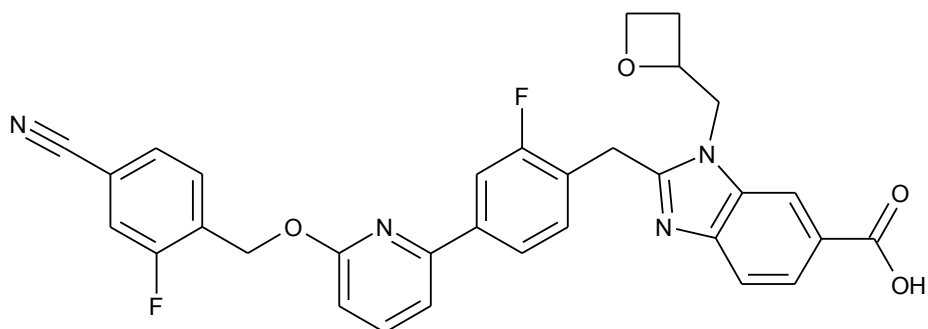
10 де R^2 являє собою H або F, або її фармацевтично прийнятна сіль.
В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули:



Формула IIIa,

де R^2 являє собою H або F, або її фармацевтично прийнятна сіль.

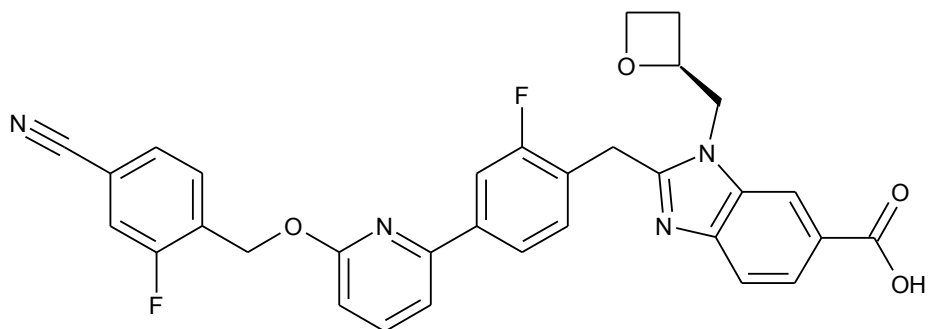
В одному з варіантів здійснення цього винаходу згадана сполука являє собою сполуку Формули:



5

або її фармацевтично прийнятну сіль.

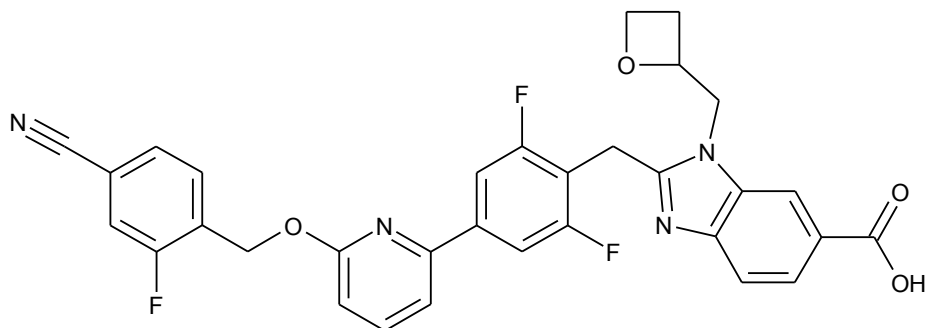
В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука являє собою сполуку Формули:



10

або її фармацевтично прийнятну сіль.

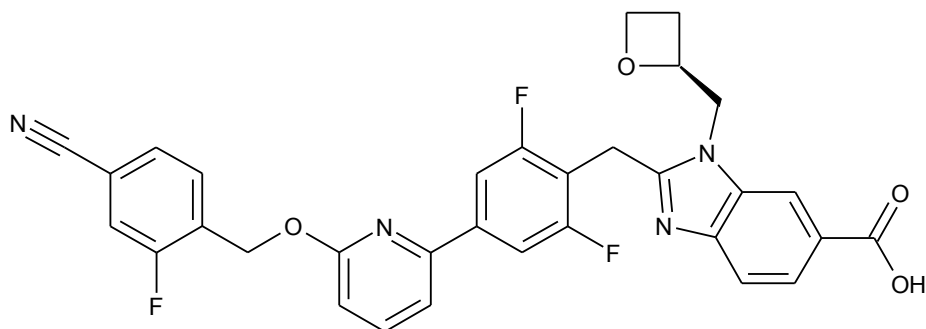
В одному з варіантів здійснення цього винаходу згадана сполука являє собою сполуку Формули:



15

або її фармацевтично прийнятну сіль.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згадана сполука являє собою сполуку Формули:



або її фармацевтично прийнятну сіль.

Формула I охоплює Формулу Ia, Формулу IIb, Формулу III, Формулу IIIa, Формулу IIIb, Формулу IIII, Формулу IIIIa і Формулу IIIIb, і посилання на наведену нижче Формулу I, наприклад, у способах лікування та терапевтичних застосуваннях, також слід читати як посилання на кожну і усі з цих підформул.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу надана фармацевтично прийнятна композиція, що містить сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль, і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, фармацевтично прийнятній композиції надана форма для перорального введення.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування ссавця від цукрового діабету 2 типу, при цьому згаданий спосіб включає введення ссавцю, що потребує лікування, фармацевтично прийнятної композиції, яка містить ефективну кількість сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач. В одному з варіантів здійснення цього винаходу фармацевтично прийнятній композиції надається форма для перорального введення. Переважно згаданим ссавцем є людина.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб лікування ссавця від цукрового діабету 2 типу, при цьому згаданий спосіб включає введення ссавцю, що потребує лікування, ефективною кількістю сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим ссавцем є людина.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб зниження рівня глюкози в крові ссавця, при цьому згаданий спосіб включає введення ссавцю, що потребує лікування, ефективною кількістю сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим ссавцем є людина.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу наданий спосіб зниження гіперглікемії у ссавця, при цьому згаданий спосіб включає введення ссавцю, що потребує лікування, ефективною кількістю сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданим ссавцем є людина.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в терапії.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в лікуванні цукрового діабету 2 типу.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в зниженні рівня глюкози в крові.

У іншому варіанті здійснення цього винаходу надана сполука Формули I або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування в лікуванні гіперглікемії.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу надане застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування цукрового діабету 2 типу.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу пропонується застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для зниження рівня глюкози в крові.

В одному з варіантів здійснення цього винаходу надане застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування гіперглікемії.

У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, сполуку Формули I вводять пероральним шляхом. У варіанті здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, сполуку Формули I вводять один раз на добу. У іншому варіанті здійснення цього винаходу, якому

віддають перевагу, терапевтичне застосування відбувається на людині.

Термін "фармацевтично прийнятна сіль" у значенні, вживаному у цьому описі, стосується солі сполуки за цим винаходом, яка вважається прийнятною для клінічного та/або ветеринарного застосування. Приклади фармацевтично прийнятних солей та загальних методологій їх одержання можна знайти в "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" P. Stahl, et al., 2nd Revised Edition, Wiley-VCH, 2011 та S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, 66(1), 1-19.

Приклади фармацевтичних композицій і способів їх одержання можна знайти у "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Loyd, V., et al. Eds., 22nd Ed., Mack Publishing Co., 2012. В одному з варіантів здійснення цього винаходу фармацевтичним композиціям може бути надана форма для перорального введення. Переважно фармацевтичним композиціям надана форма таблеток, капсул або розчину. Згадана таблетка, капсула або розчин може містити сполуку Формули I в кількості, ефективній для лікування пацієнта, що потребує лікування.

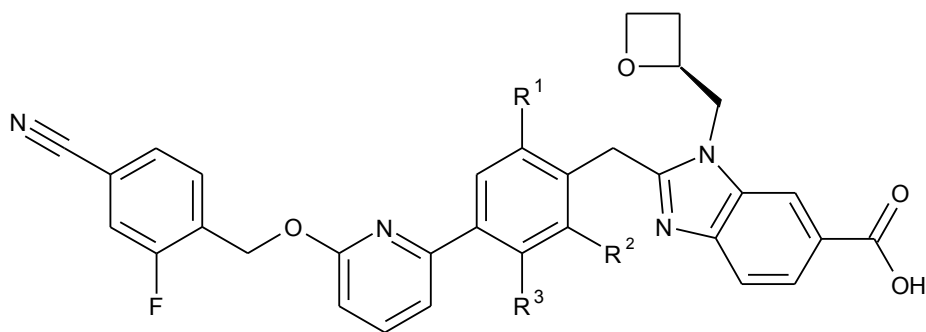
Термін "ефективна кількість" означає кількість або дозу сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі, яка при разовому або багаторазовому введенні дози пацієнту забезпечує бажаний ефект у пацієнта, якого піддають діагностуванню або лікуванню. Лікар, що здійснює лікування, як фахівець у цій галузі, може легко визначити ефективну кількість шляхом використання відомих методик і спостереження результатів, одержаних за аналогічних обставин. Фактори, що розглядаються при визначенні ефективної кількості або дози сполуки, охоплюють: введення згаданої сполуки або її солі; одночасне введення інших засобів, у разі їх застосування; вид ссавця, що підлягає лікуванню; його розмір, вік і загальний стан здоров'я; ступінь залучення або тяжкість захворювання; реакція конкретного ссавця; спосіб введення; характеристики біодоступності введеного лікарського засобу; вибрана схема приймання лікарського засобу; та інші відповідні обставини. Сполуки за цим винаходом є ефективними при дозі на добу, яка становить від приблизно 0,01 мг/кг до приблизно 15 мг/кг маси тіла.

У значенні, вживаному у цьому описі, терміни "лікування", "лікувати" або "курс лікування" означають уповільнення, зменшення або зміну напрямку розвитку на протилежний або тяжкість наявного симптому, розладу або стану, такого як гіперглікемія, що може включати підвищення секретування інсуліну.

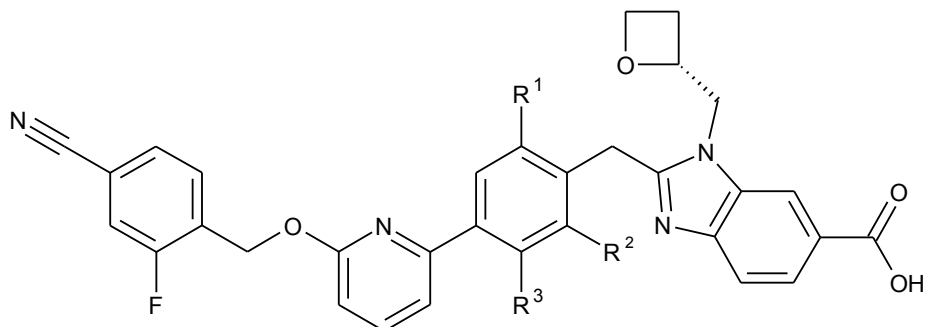
Сполуки Формули I можуть бути введені до складу фармацевтичних композицій, які вводяться будь-яким шляхом, що робить сполуку біодоступною. Переважно такі композиції призначені для перорального введення. Такі фармацевтичні композиції та способи їх одержання є добре відомими в цій галузі (Дивись, наприклад, Remington, J.P., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012).

Сполуки Формули I та їх фармацевтично прийнятні солі є корисними для терапевтичного застосування за цим винаходом, причому перевагу віддають певним конфігураціям.

Сполуки за цим винаходом включають:

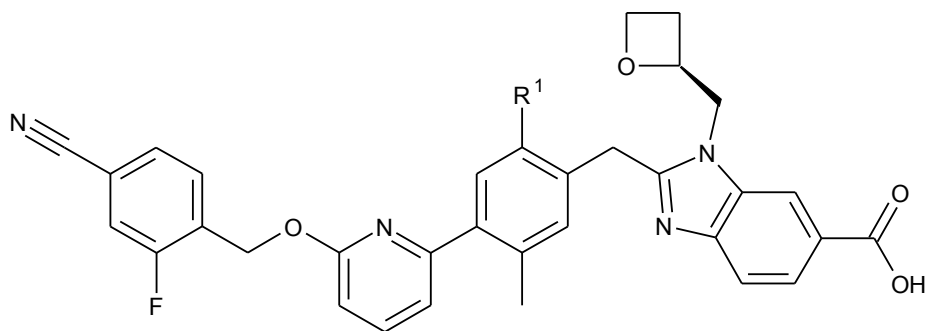


Формула Ia; та

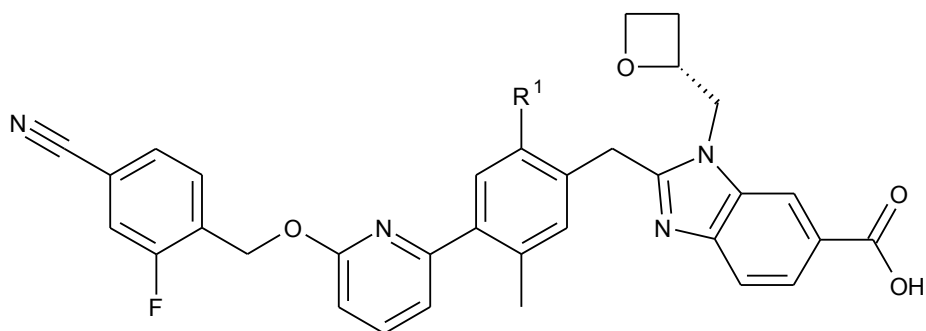


Формула Ib

або їх фармацевтично прийнятні солі.
Інші сполуки за цим винаходом включають:

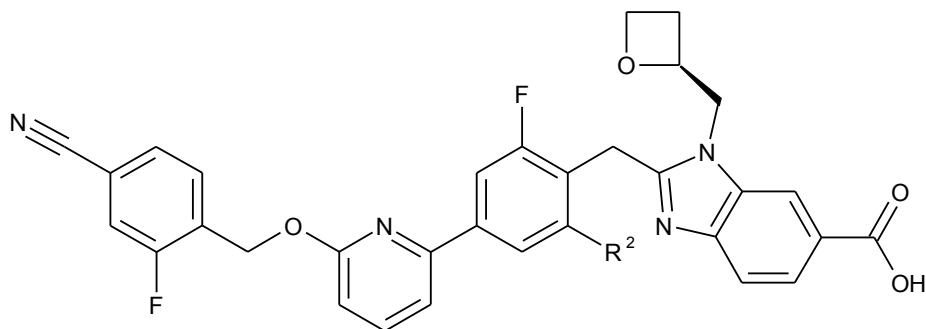


Формула IIa; та

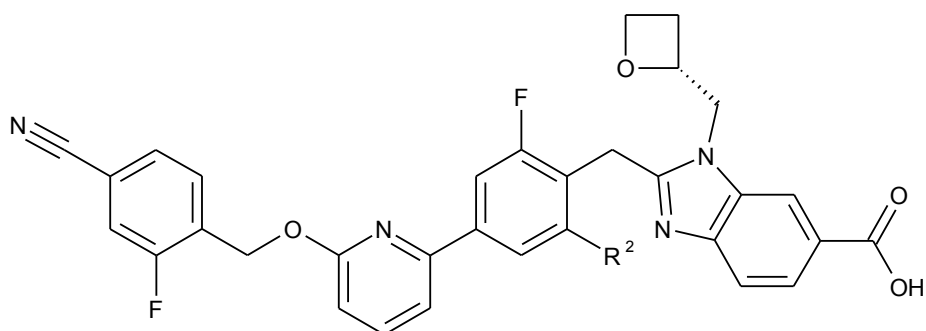


Формула IIb

5 або їх фармацевтично прийнятні солі.
Інші сполуки за цим винаходом включають:



Формула IIIa; та



Формула IIIb,

або їх фармацевтично прийнятні солі.

10 Незважаючи на те, що цей винахід передбачає всі окремі енантіомери, їх суміші та рацемати, особлива перевагу віддають сполукам Формули Ia, Формули IIa та Формули IIIa та їх фармацевтично прийнятним солям.

Окремі енантіомери можуть бути відокремлені або розділені фахівцем в цій галузі в будь-якій зручній точці у процесі синтезу сполук за цим винаходом відомими методами, такими як
15 методи селективної кристалізації, хіральної хроматографії (дивись, наприклад, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, та E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994), або надкритичної рідинної хроматографії (SFC) (дивись, наприклад, T.A. Berger; "Supercritical Fluid

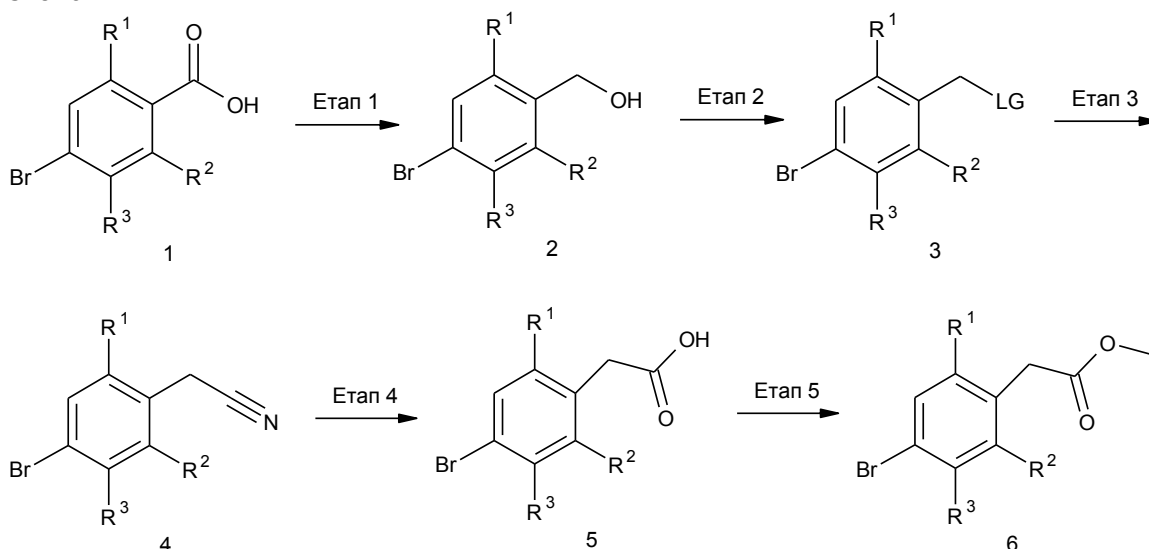
Chromatography Primer, " Agilent Technologies, July 2015).

Фармацевтично прийнятна сіль сполук за цим винаходом може бути одержана, наприклад, шляхом реакції сполуки Формули I та відповідної фармацевтично прийнятної основи у прийнятному розчиннику за стандартних умов, добре відомих в цій галузі (дивись, наприклад, Bastin, R.J., et al.; Org. Process. Res. Dev., 4, 427-435, 2000 та Berge, S.M., et al.; J Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977). Сіллю, якій віддають перевагу, є третбутиламінова (або ербумінова) сіль.

Деякі аббревіатури, вжиті у цьому описі, визначені відповідно до Daub G.H., et al., "The Use of Acronyms in Organic Chemistry" Aldrichimica Acta, 1984, 17(1), 6-23. Деякі аббревіатури визначені таким чином: "ACN" означає ацетонітрил; "ATP" означає аденозинтрифосфат; "BSA" означає бичачий сироватковий альбумін; "cAMP" означає циклічний аденозин-3',5'-монофосфат; "DCM" означає дихлорметан або метиленхлорид; "DIPEA" означає N, N-діізопропілетіламін; "DMF" означає N, N-диметилформамід; "DMSO" означає диметилсульфоксид; "EC₅₀" означає концентрацію засобу, яка викликає 50 % відповіді цільової активності у порівнянні з заздалегідь визначеною позитивною контрольною сполукою (абсолютна EC₅₀); "ES/MS" означає мас-спектрометрію з електророзпиленням; "EtOAc" означає етилацетат; "HATU" означає 1-[бис(диметиламіно)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридинію-3-оксид гексафторфосфату; "HEK" означає ембріональну нирку людини; "HEPES" означає 4-(2-гідрокіетил)-1-піперазинетансульфонову кислоту; "год." означає годину або години, відповідно; "MeOH" означає метанол або метиловий спирт; "хв." означає хвилину або хвилини; "Pd(dppf)Cl₂" означає [1,1'-бис(дифенілфосфіно)фероцен]дихлоропаладій(II); "RT" означає кімнатну температуру; і "THF" означає тетрагідрофуран.

Сполуки за цим винаходом можуть бути одержані із застосуванням різноманітних процедур, деякі з яких проілюстровані в наведених нижче Препаративних методиках і Прикладах. Для одержання сполук за цим винаходом або їх солей, конкретні етапи синтезу для кожного з описаних шляхів можуть бути скомбіновані різноманітними способами. Продукт кожного наведеного нижче етапу може бути виділений традиційними методами, у тому числі шляхом екстрагування, випарювання, осадження, хроматографування, фільтрування, розтирання в порошок та кристалізування. Реагенти та вихідні матеріали є легко доступними для фахівця в цій галузі. Окремі ізомери, енантіомери та діастереоізомери можуть бути відокремлені або розділені в будь-якій зручній точці у процесі синтезу такими методами, наприклад, як методи селективного кристалізування або хірального хроматографування (дивись, наприклад, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, та E.L. Eliel and S.H. Wilen, " Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Без обмеження обсягу цього винаходу, для додаткового ілюстрування винаходу надані наведені нижче Препаративні методики та Приклади.

Схема 1



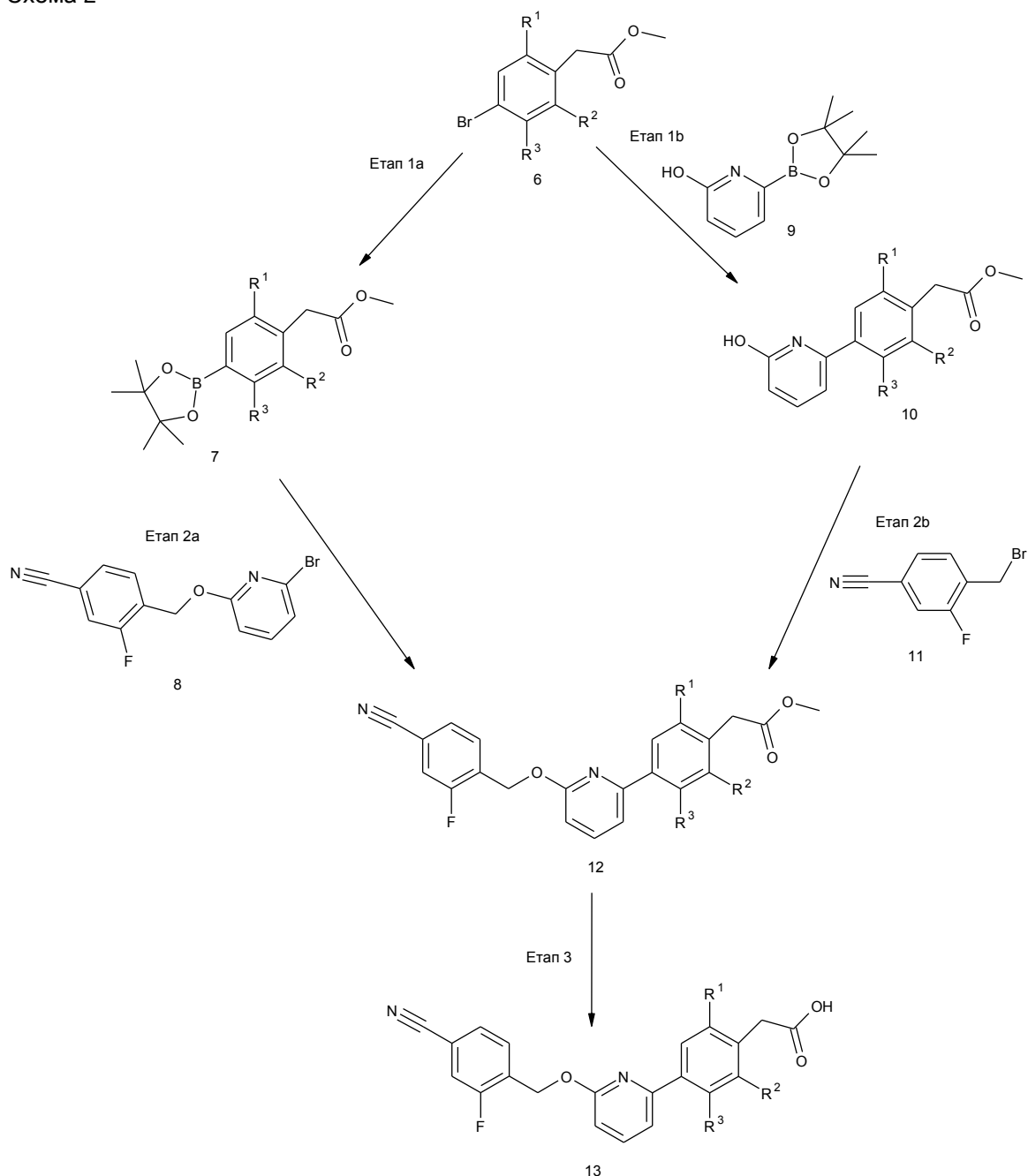
LG - рухома група

R¹, R² та R³ відповідають визначенню, наведеному для Формули I

На Схемі 1 показаний синтез проміжного продукту 6, який використовували для одержання сполук Формули I. Бензойну кислоту 1 спочатку піддавали відновленню комплексом диметилсульфіду борану на Етапі 1 для одержання спирту 2. Цей спирт перетворювали на

- рухому групу (LG, проміжний продукт 3). Наприклад, спирт у проміжному продукті 2 може бути перетворений на мезилатну групу з використанням метансульфонілхлориду при -15°C на Етапі 2 або може бути перетворений на бромід з використанням триброміду фосфору при 0°C . Проміжний продукт 3 реагував з NaCN на Етапі 3 для одержання нітрилу 4. Нітрил 4 перетворювали на KOH при підвищеній температурі на Етапі 4 для одержання кислоти 5, яку потім естерифікували на Етапі 5 для одержання проміжного продукту 6 з використанням оксалілхлориду, DMF та метанолу.

Схема 2

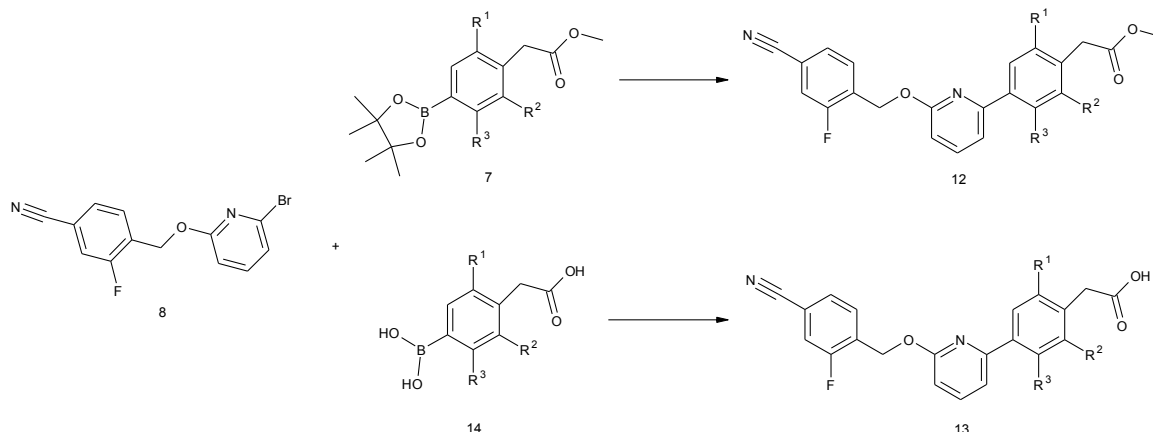


R^1 , R^2 та R^3 відповідають визначенню, наведеному для Формули I

На Схемі 2 показане одержання ключового проміжного продукту 12 для одержання сполук Формули I двома шляхами. За першим шляхом арилгалогенід 6 піддавали одноетапному борилуванню за реакцією Міяура/сполученню за реакцією Сузукі з використанням біс(пінаколато)дибору, Pd(dppf)Cl_2 та ацетату калію при підвищеній температурі; арилгалогенід 6 перетворювали на Етапі 1a на бороновий складний ефір 7, після чого до реакційної суміші (Етап 2a) додавали бромпіридин 8 і K_2CO_3 , що дає проміжний продукт 12. За другим шляхом використовували двоетапний процес: сполучення за реакцією Сузукі арилгалогеніду 6 з

- пінаколовим складним ефіром 6-гідроксипіридин-2-боронової кислоти 9 з використанням $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ і K_2CO_3 при підвищеній температурі (Етап 1b) забезпечувало одержання проміжного продукту 10, який потім алкілували 4-(бромметил)-3-фторбензонітрилом 6 з використанням Ag_2CO_3 при підвищеній температурі (Етап 2b), та одержували проміжний продукт 12. Гідроліз складного ефіру проміжного продукту 12 на Етапі 3 з використанням LiOH давав кислотний проміжний продукт 13.

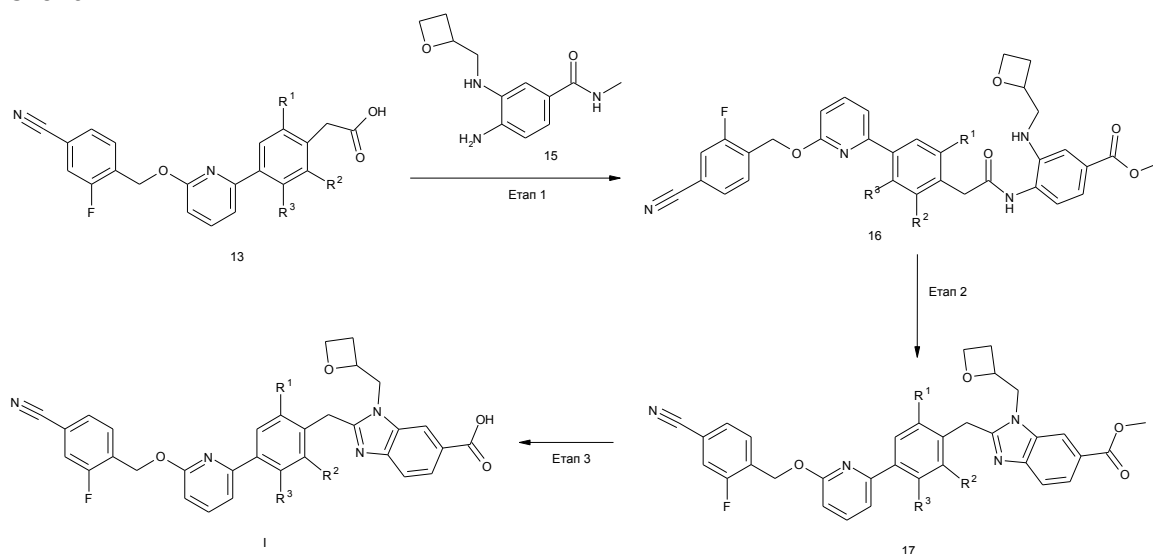
Схема 3



- 10 R^1 , R^2 та R^3 відповідають визначенню, наведеному для Формули I

Як альтернатива, ключові проміжні продукти 12 і 13 можна одержати за Схемою 3, шляхом сполучення бромпіридину 8 зі складним ефіром боронової кислоти 7 або з бороновою кислотою 14 з використанням $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ і карбонату калію при підвищеній температурі.

Схема 4



- 15

R^1 , R^2 та R^3 відповідають визначенню, наведеному для Формули I

- На Схемі 4 показано перетворення ключового проміжного продукту 13 на сполуки Формули I. Сполучення аміду на Етапі 1 з використанням HATU та діаніліну 15 давало проміжний продукт 16. Циклізацію (Етап 2) здійснювали нагріванням проміжного продукту 16 в оцтовій кислоті для одержання бензimidазолу 17. Нарешті, на Етапі 3 сполуки Формули I одержували шляхом гідролізу сполуки 17 з використанням LiOH .

Препаративні методики та Приклади

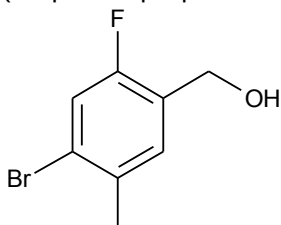
- LC-ES/MS виконували на системі для рідинної хроматографії AGILENT® HP1200. Вимірювання шляхом мас-спектрометрії з електророзпиленням (здійснювані в позитивному та/або негативному режимі) виконували на квадрупольному маспектрометрі з мас-селективним детектором, підключеним до системи HPLC, яка може мати або може не мати ELSD. Умови LC-ES/MS (низький pH): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C18, 2,0×50 мм, 3,0 мкм, 110 Å; градієнт: 5-95 % В протягом 1,5 хв, потім 95 % В протягом 0,5 хв, температура колонки: 50±10 °C; швидкість потоку: 1,2 мл/хв; 1 мкл об'єм ін'єкції; Розчинник А: деіонізована вода з

0,1 % HCOOH; Розчинник В: ACN з 0,1 % мурашиної кислоти; довжина хвилі 200-400 нм і 212-216 нм. У разі, якщо система HPLC споряджена ELSD, параметри є такими: температура випарника 45 °С, температура небулайзера 40 °С швидкість потоку газу 1,6 SLM (стандартний літр/хвилину). Альтернативні умови LC-MS (високий рН): колонка: Waters xBridge® C18, 2,1×50

мм, 3,5 мкм; градієнт: 5-95 % В протягом 1,5 хв, потім 95 % В протягом 0,50 хв; температура колонки: 50±10 °С; швидкість потоку: 1,2 мл/хв; 1 мкл об'єм ін'єкції; Розчинник А: 10 mM NH₄HCO₃, рН 9; Розчинник В: ACN; довжина хвилі: 200-400 нм і 212-216 нм; у разі ELSD: температура випарника 45 °С, температура небулайзера 40 °С і швидкість потоку газу 1,60 SLM.

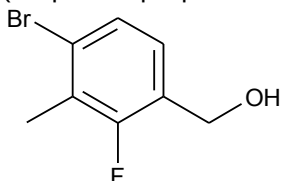
Порошкові рентгенограми (XRPD) кристалічних твердих речовин одержували із застосуванням порошкового рентгенівського дифрактометра Bruker D4 Endeavor, спорядженого джерелом CuKα і детектором Vantec, що працює при 35 кВ і 50 мА. Зразок сканували у межах 4-40° кута 2θ з величиною кроку, що дорівнює 0,008° кута 2θ°, при швидкості сканування 0,5 с/крок, з 1,0 мм розходженням, фіксованим рівнем антирозсіювання 6,6 мм та 11,3 мм діафрагмами детектора. Сухим порошком наповнювали кварцовий тримач зразка; поверхню розгладжували із застосуванням предметного скла. Дифрактограми кристалічної форми одержували при температурі і відносній вологості навколишнього середовища. Позиції піків кристалів визначали в MDI-Jade після зсуву всієї рентгенограми на основі внутрішнього стандарту NIST 675 з піками на 8,853° і 26,774° кута 2θ°. З кристалографії добре відомо, що для будь-якої заданої кристалічної форми відносна інтенсивність дифракційних піків може варіювати унаслідок переважної орієнтації, що є наслідком певних факторів, таких як морфологія і форма кристала. У разі присутності ефектів переважної орієнтації, інтенсивність піків може бути змінена, однак характеристичні позиції піків поліморфних модифікацій залишаються незмінними. Дивись, наприклад, The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995. Окрім того, з кристалографії також добре відомо, що для будь-якої заданої кристалічної форми кутові положення піків можуть дещо варіювати. Наприклад, положення піків можуть зсуватись унаслідок змін температури, при якій аналізують зразок, зміщення зразка або присутності чи відсутності внутрішнього стандарту. У даному разі, несталість положення піків ±0,2° кута 2θ° буде враховувати ці потенційні варіації без перешкоджання однозначній ідентифікації згаданої кристалічної форми. Підтвердження кристалічної форми може бути здійснене на основі будь-якої унікальної комбінації відмінних піків.

Препаративна методика 1
(4-Бром-2-фтор-5-метилфеніл)метанол



У колбу вносили: 4-бром-2-фтор-5-метилбензойну кислоту (100 г, 421 ммоль), THF (200 мл) і боран (диметилсульфідний комплекс, 2 моль/л розчин у THF, 210 мл, 10 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Реакційну суміш гасили HCl (1,0 N водний розчин, 50 мл), і фільтрували суміш. Фільтрат концентрували in vacuo, і розподіляли залишок між EtOAc (400 мл) і водою (400 мл). Органічну частину промивали насиченим водним розчином NaCl (400 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували, та одержували вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини (93,5 г, 99 %). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,29 (d, J=7,9 Гц, 1H), 7,26 (d, J=9,1 Гц, 1H), 4,69 (s, 2H), 2,38 (s, 3H).

Препаративна методика 2
(4-Бром-2-фтор-3-метилфеніл)метанол

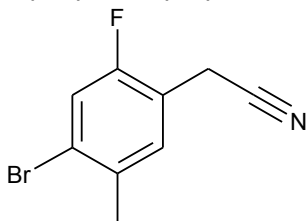


Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 1, із використанням 4-бром-2-фтор-3-метилбензойної кислоти. Продукт очищали хроматографією

на силікагелі із використанням градієнта від 10 % до 35 % EtOAc в гексанах. Час утримання піка LC-ES/MS: 1,01 хв.

Препаративна методика 3

2-(4-Бром-2-фтор-5-метилфеніл)ацетонітрил



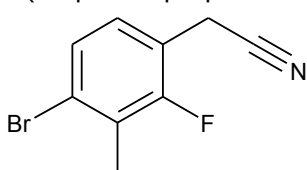
5

(4-Бром-2-фтор-5-метилфеніл)метанол (92 г, 420 ммоль) розчиняли у DCM (500 мл), і додавали триетиламін (120 мл, 861 ммоль). Суміш охолоджували до -15 °С, і до реакційної суміші краплями додавали розчин метансульфонілхлориду (40 мл, 517 ммоль) у DCM (30 мл). Суміш перемішували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Реакційну суміш розподіляли між DCM (500 мл) і водою (500 мл). Органічні речовини промивали насиченим водним розчином NaCl (500 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Залишок розчиняли у DMF (400 мл), і суміш охолоджували на льодяній бані. До реакційної суміші однією порцією додавали NaCN (21,0 г, 429 ммоль), і перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Суміш розподіляли між EtOAc (400 мл) і водою (500 мл). Органічні речовини промивали насиченим водним розчином NaCl (500 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Залишок очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 10 % до 30 % EtOAc в гексанах, та одержували вказану в заголовку сполуку (47,0 г, 48 %) у вигляді масла. ¹H-NMR (400 МГц, CDCl₃) δ 7,34 (d, J=8,7 Гц, 1H), 7,32 (d, J=8,1 Гц, 1H), 3,71 (s, 2H), 2,41 (s, 3H).

20

Препаративна методика 4

2-(4-Бром-2-фтор-3-метилфеніл)ацетонітрил



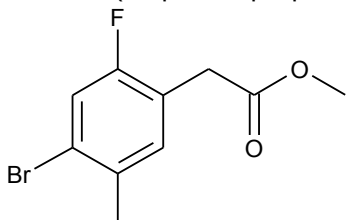
Змішували (4-бром-2-фтор-3-метилфеніл)метанол (1,90 г, 8,67 ммоль) і DCM (20 мл). Суміш охолоджували до 0 °С, потім краплями додавали трибромід фосфору (1,0 мл, 11 ммоль). Суміш перемішували при 0 °С протягом 15 хв, після чого цю суміш підлговували насиченим водним розчином NaHCO₃ (10 мл). Суміш екстрагували DCM (40 мл). Органічні речовини промивали розсолем (30 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували для одержання твердої речовини. Тверду речовину розчиняли у DMSO (10 мл), потім додавали NaCN (0,60 г, 13,0 ммоль), і перемішували протягом 1 год. Суміш розподіляли між EtOAc (50 мл) і водою (50 мл). Органічні речовини промивали розсолем (50 мл), сушили над Na₂SO₄, фільтрували, концентрували, та одержували продукт у вигляді твердої речовини (1,3 г, 64 %). Час утримання шка LC-ES/MS: 1,17 хв.

25

30

Препаративна методика 5

Метил-2-(4-бром-2-фтор-5-метилфеніл)ацетат



35

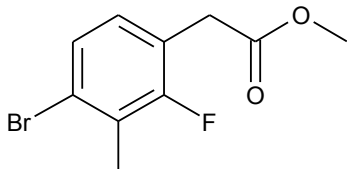
У колбу додавали: 2-(4-бром-2-фтор-5-метилфеніл)ацетонітрил (1,20 г, 5,10 ммоль), етанол (5 мл), воду (3 мл) і гідроксид калію (0,90 г, 16 ммоль). Суміш гріли при 90 °С протягом ночі. Суміш охолоджували на льодяній бані, і додавали 1,0 М розчин HCl для підкислювання до pH 4-5, після чого суміш розподіляли між EtOAc (30 мл) і водою (30 мл). Органічні речовини проминали насиченим водним розчином NaCl (30 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, концентрували, та одержували 2-(4-бром-2-фтор-5-метилфеніл)оцтову кислоту у вигляді

40

твердої речовини. Одержану тверду речовину розчиняли в DCM (10 мл), потім додавали DMF (0,05 мл, 0,6 ммоль) і оксалілхлорид (0,5 мл, 6 ммоль) при кімнатній температурі. Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв, потім краплями додавали MeOH (2 мл, 49,4 ммоль). Через 30 хв видаляли розчинник *in vacuo*, і розподіляли залишок між EtOAc (40 мл) і 5 % розчином NaHCO₃ (30 мл). Органічні речовини проминали насиченим водним розчином NaCl (40 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, концентрували, та одержували вказану в заголовку сполуку у вигляді масла (1,1 г, 80 %). ES/MS *m/z* (⁷⁹Br, ⁸¹Br) 278,280 (M+NH₄⁺).

Препаративна методика 6

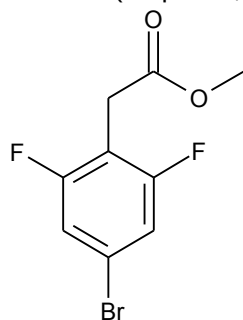
Метил-2-(4-бром-2-фтор-3-метилфеніл)ацетат



Вказану сполуку одержували по суті так, як описано у Препаративній методиці 5, із використанням 2-(4-бром-2-фтор-3-метилфеніл)ацетонітрилу. Час утримування піка LC-ES/MS: 1,22 хв.

Препаративна методика 7

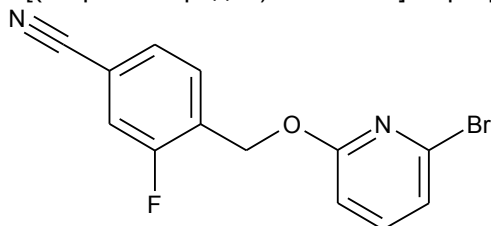
Метил-2-(4-бром-2,6-дифторфеніл)ацетат



Змішували 4-бром-2,6-дифторфенілоцтову кислоту (3,30 г, 12,5 ммоль), DCM (20 мл), DMF (0,05 мл, 0,6 ммоль) та оксалілхлорид (1,3 мл, 15 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв, потім краплями додавали MeOH (1,5 мл, 37 ммоль, 100 % (мас.)). Суміш концентрували, і розподіляли між EtOAc (30 мл) і насиченим водним розчином NaHCO₃ (15 мл). Органічні речовини промивали насиченим водним розчином NaCl (30 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, концентрували, та одержували вказану в заголовку сполуку у вигляді масла (3,41 г, кількісний вихід), яке використовували без додаткового очищення в Препаративній методиці 10. ES/MS *m/z* (⁷⁹Br, ⁸¹Br) 265,267 (M+H).

Препаративна методика 8

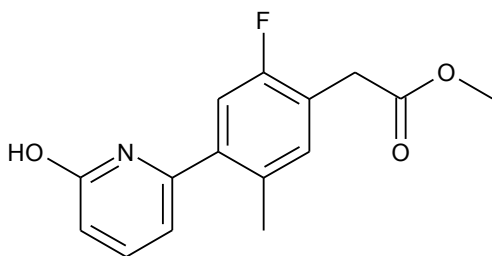
4-[(6-Бром-2-піридил)оксиметил]-3-фторбензонітрил



2-Бром-6-фторпіридин (2,50 г, 13,8 ммоль) і 3-фтор-4-(гідроксиметил)бензонітрил (2,15 г, 13,8 ммоль) розчиняли в 1,4-діоксані (25 мл), і краплями протягом 12 хв при кімнатній температурі додавали розчин трет-бутоксиду (20 % (мас.) у THF, 10,0 мл, 16,6 ммоль). Реакційну суміш гріли при 40 °C протягом 30 хв. Згадану суміш виливали у водний розчин K₂CO₃ (1M), і двічі екстрагували EtOAc. Органічні речовини промивали водою і насиченим водним розчином NaCl, висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Залишок висушували у вакуумній печі при 50 °C, та одержували вказану в заголовку сполуку (4,23 г, 95 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини. ES/MS *m/z* (⁷⁹Br, ⁸¹Br) 307,309 (M+H).

Препаративна методика 9

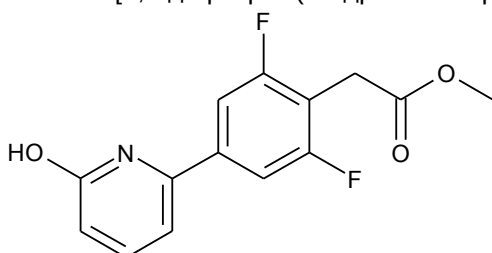
Метил-2-[2-фтор-4-(6-гідрокси-2-піридил)-5-метилфеніл]ацетат



У колбу додавали пінаколовий складний ефір 6-гідроксипіридин-2-боронової кислоти (1,6 г, 6,9 ммоль), метил-2-(4-бром-2-фтор-5-метилфеніл)ацетат (2,2 г, 8,4 ммоль), THF (15 мл), воду (1 мл) і карбонат калію (2,0 г, 14 ммоль). Суміш барботували азотом протягом 10 хв, потім додавали Pd(dppf)Cl₂ (0,26 г, 0,35 ммоль), і гріли при 75 °С протягом 2 год. Суміш розподіляли між EtOAc (30 мл) і водою (30 мл). Органічні речовини промивали насиченим водним розчином NaCl (30 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, концентрували, та одержували вказану в заголовку сполуку (1,4 г, 74 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS m/z 276 (M+H), 274 (M-H).

Препаративна методика 10

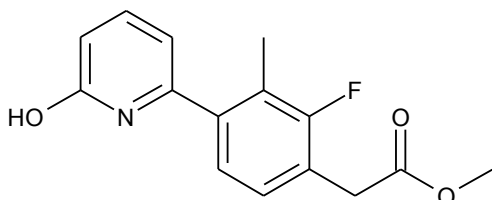
Метил-2-[2,6-дифтор-4-(6-гідрокси-2-піридил)феніл]ацетат



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 9, із використанням метил-2-(4-бром-2,6-дифторфеніл)ацетату та з нагріванням реакційної суміші при 75 °С протягом ночі. ES/MS m/z 280 (M+H).

Препаративна методика 11

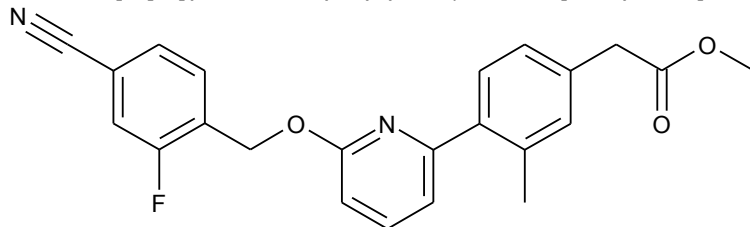
Метил-2-[2-фтор-4-(6-гідрокси-2-піридил)-3-метилфеніл]ацетат



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 9, із використанням метил-2-(4-бром-2-фтор-3-метилфеніл)ацетату та з нагріванням реакційної суміші при 75 °С протягом ночі (18 год.). ES/MS m/z 276 (M+H), 274 (M-H).

Препаративна методика 12

Метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-3-метилфеніл]ацетат

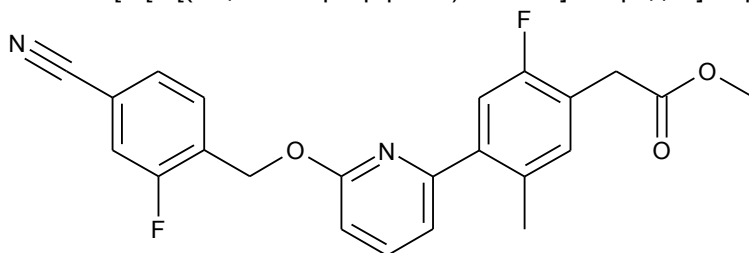


2-(4-бром-3-метилфеніл)оцтову кислоту (10,7 г, 45,8 ммоль) розчиняли у DCM (50 мл). Суміш охолоджували на водяній бані з льодом, шля чого додавали оксалілхлорид (4,8 мл, 55 ммоль) і DMF (0,1 мл). Водяну баню з льодом видаляли, і перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Краплями протягом 2 хв додавали MeOH (6,0 мл), і перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год. Реакційну суміш концентрували in vacuo, і залишок розчиняли в EtOAc. Органічні речовини промивали насиченим водним розчином NaHCO₃ і насиченим водним розчином NaCl. Органічні речовини висушували над Na₂SO₄, потім фільтрували, і концентрували. До залишку додавали біс(пінаколато)дибор (12,8 г, 50,4 ммоль) і

ацетат калію (13,6 г, 137 ммоль). Реакційну суміш барботують азотом протягом 15 хв, потім додавали Pd(dppf)Cl_2 (комплекс з DCM, 1,13 г, 1,37 ммоль). Реакційну суміш гріли у атмосфері азоту при 85 °C протягом 15 год. на масляній бані, потім реакційну колбу знімали з масляної бані. Розчиняли карбонат калію (9,49 г, 68,7 ммоль) у воді (60 мл), одержаний розчин барботували азотом протягом 10 хв, після чого до реакційної суміші додавали спочатку цей розчин, а потім 4-[(6-бром-2-піридил)оксиметил]-3-фторбензонітрил (14,1 г, 45,8 ммоль). Всю згадану реакційну суміш барботували азотом протягом 5 хв, і гріли у атмосфері азоту при 85 °C протягом 6 год. Реакційну суміш охолоджували до температури близької до кімнатної, і концентрували *in vacuo* для видалення більшої частини 1,4-діоксану. Цю суміш розбавляли EtOAc (200 мл), і промивали водою та насиченим водним розчином NaCl. Органічні речовини висушували над Na_2SO_4 , потім фільтрували, і концентрували. Неочищений продукт очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 5 % до 50 % EtOAc в гексанах, та одержували вказану в заголовку сполуку (13,3 г, 70 %) у вигляді світло-жовтого твердої речовини. ES/MS m/z 391 (M+H).

Препаративна методика 13

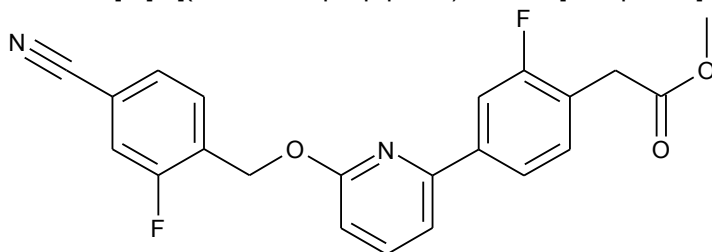
Метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]ацетат



У колбу додавали метил-2-[2-фтор-4-(6-гідрокси-2-піридил)-5-метилфеніл]ацетат (1,40 г, 5,09 ммоль), 1,4-діоксан (35 мл), карбонат срібла (1,7 г, 6,2 ммоль) і 4-(бромметил)-3-фторбензонітрил (1,4 г, 6,2 ммоль). Суміш гріли при 60 °C протягом ночі. Тверду речовину відфільтровували, і фільтрат концентрували. Залишок очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 12 % до 55 % EtOAc в гексанах, та одержували вказану в заголовку сполуку (1,60 г, 77 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS m/z 409 (M+H), 407 (M-H).

Препаративна методика 14

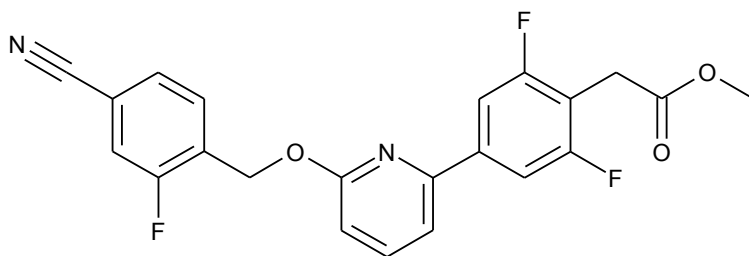
Метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фторфеніл]ацетат



У колбу вносили 4-[(6-бром-2-піридил)оксиметил]-3-фторбензонітрил (2,02 г, 6,58 ммоль), метил-2-(2-фтор-4-(4,4,5,5)-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)феніл]ацетат (2,99 г, 9,88 ммоль), K_2CO_3 (2,30 г, 16,5 ммоль), 1,4-діоксан (30 мл) і воду (10 мл). Суміш барботували азотом протягом 10 хв. До суміші додавали комплекс Pd(dppf)Cl_2 у DCM (492 мг, 0,658 ммоль), і нагрівали до 80 °C в атмосфері азоту протягом 5 год. Реакційну суміш охолоджували, розбавляли EtOAc (75 мл), і фільтрували через шар Celite®. Фільтрат промивали водою і насиченим водним розчином NaCl, висушували над Na_2SO_4 , фільтрували, і концентрували. Одержаний залишок очищали хроматографією на силікагелі з градієнтом від 5 % до 90 % EtOAc в гексанах, та одержували вказану в заголовку сполуку (2,68 г, 94 %). ES/MS m/z 395 (M+H).

Препаративна методика 15

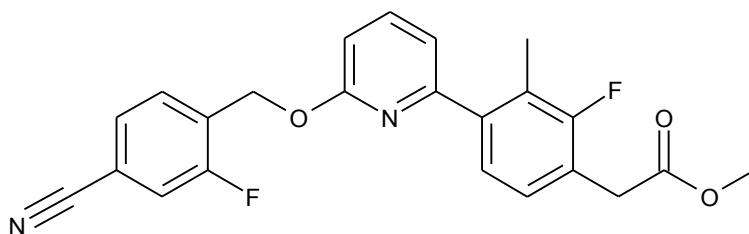
Метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2,6-дифторфеніл]ацетат



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 13, із використанням метил-2-[2,6-дифтор-4-(6-гідрокси-2-піридил)феніл]ацетату та з нагріванням реакційної суміші при 80 °С протягом ночі. ES/MS m/z 413 (M+H).

5 Препаративна методика 16

Метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-3-метилфеніл]ацетат

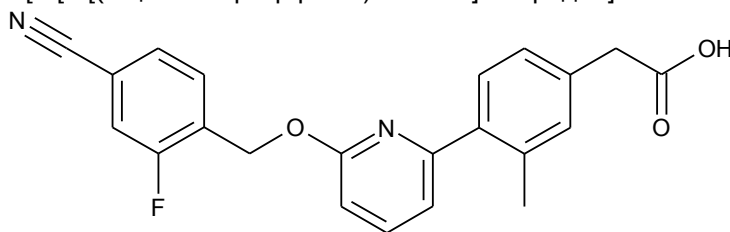


Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 13, із використанням метил-2-[2-фтор-4-(6-гідрокси-2-піридил)-3-метилфеніл]ацетату та з нагріванням реакційної суміші при 80 °С протягом 3 год. ES/MS m/z 409 (M+H).

10

Препаративна методика 17

2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-3-метилфеніл]оцтова кислота



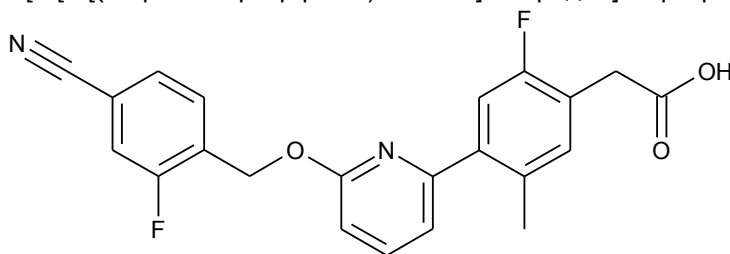
У колбу додавали метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-3-метилфеніл]ацетат (1,20 г, 3,07 ммоль), ACN (20 мл), воду (10 мл) і гідроксид літію (0,35 г, 15 ммоль). Суміш гріли при 45 °С протягом 3 год. Суміш охолоджували на льодяній бані, та із застосуванням 1,0 М розчину HCl підкислювали до pH=4-5. Суміш розподіляли між EtOAc (30 мл) і водою (30 мл). Органічні речовини проминали розсолон (30 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, концентрували, та одержували вказану в заголовку сполуку (1,1 г, 95 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS m/z 377 (M+H).

15

20

Препаративна методика 18

2-[4-[6-[(4-Ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]оцтова кислота



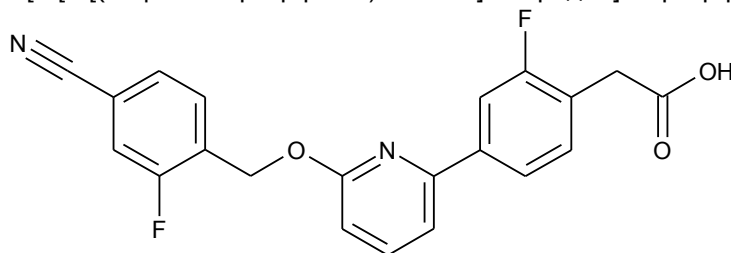
У флакон додавали метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]ацетат (1,6 г, 3,9 ммоль), ACN (20 мл), воду (6 мл) і гідроксид літію (0,45 г, 19 ммоль). Суміш гріли при 45 °С протягом 2 год., охолоджували на льодяній бані, та із застосуванням 1,0 М розчину HCl підкислювали до pH=4-5. Суміш розподіляли між EtOAc (50 мл) і водою (50 мл). Органічні речовини промивали насиченим водним розчином NaCl (50 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, концентрували, та одержували вказану в заголовку сполуку (1,55 г, 100 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS m/z 395 (M+H).

25

30

Препаративна методика 19

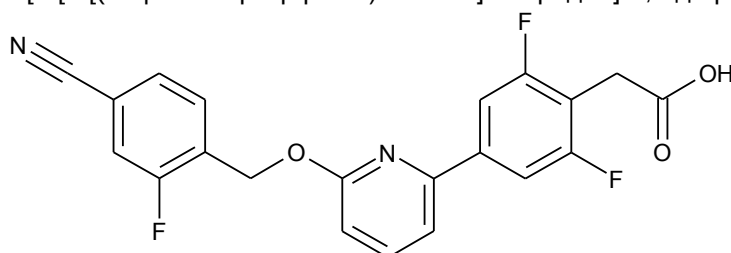
2-[4-[6-[(4-Ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фторфеніл]оцтова кислота



Метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фторфеніл]ацетат (2,68 г, 6,25 ммоль) розчиняли у THF (50 мл), потім додавали гідроксид літію (797 мг, 32,9 ммоль) і воду (20 мл). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 5 годин доводили рН реакційної суміші до 5 із застосуванням водного розчину HCl (1M). Леткі розчинники видаляли in vacuo, та одержували водну суспензію. Тверду речовину відфільтровували, висушували, та одержували вказану в заголовку сполуку (2,24 г, 88 %). ES/MS m/z 381 (M+H).

Препаративна методика 20

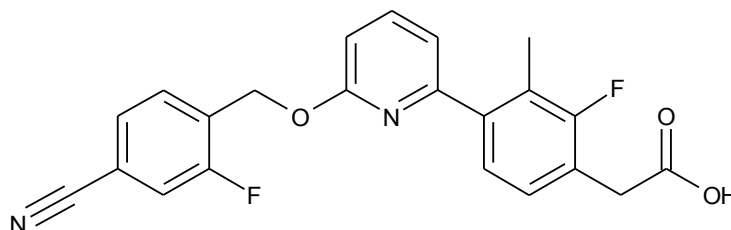
2-[4-[6-[(4-Ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2,6-дифторфеніл]оцтова кислота



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 18, із використанням метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2,6-дифторфеніл]ацетату. ES/MS m/z 399 (M+H).

Препаративна методика 21

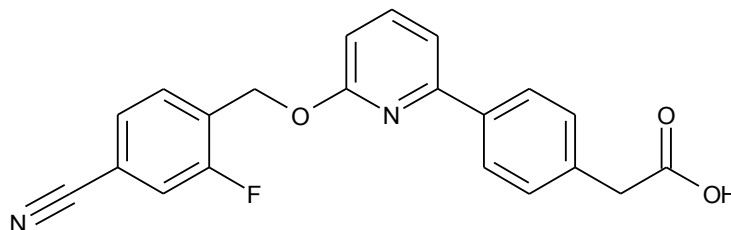
2-[4-[6-[(4-Ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-3-метилфеніл]оцтова кислота



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 17, із використанням метил-2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-3-метилфеніл]ацетату. ES/MS m/z 395 (M+H).

Препаративна методика 22

2-[4-[6-[(4-Ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]феніл]оцтова кислота

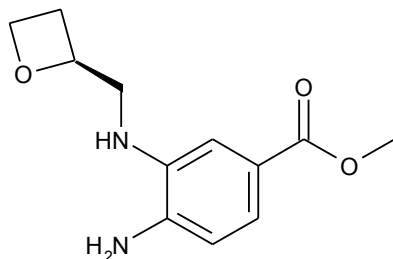


Змішували 4-[(6-бром-2-піридил)оксиметил]-3-фторбензонітрил (0,70 г, 2,3 ммоль) і 2-(4-борофеніл)оцтову кислоту (0,64 г, 3,4 ммоль), THF (15 мл), воду (5 мл) і карбонат калію (0,63 г, 4,6 ммоль). Суміш барботували азотом протягом 10 хв, потім додавали Pd(dppf)Cl₂ (0,085 г, 0,11 ммоль), і суміш гріли при 75 °C протягом 8 год. Суміш підкисляли до рН 4-5 водним розчином HCl (1 M). Суміш розподіляли між EtOAc (50 мл) і водою (50 мл). Органічні речовини проминали розсоллом (50 мл), висушували (Na₂SO₄), потім фільтрували, і концентрували. Залишок очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 25 % до 65 % EtOAc в гексанах, та

одержували вказану в заголовку сполуку (800 мг, вихід 97 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS m/z 363,0 (M+H).

Препаративна методика 23

Метил-4-аміно-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат



5

До розчину метил-3-фтор-4-нітробензоату (2,0 г, 10 ммоль) у THF (10 мл) і DMF (10 мл) при кімнатній температурі додавали триетиламін (3,1 мл, 22 ммоль). До злегка жовтого розчину додавали [(2S)-оксетан-2-іл]метанамін (Austin Chemical Company, 1,0 г, 11 ммоль), і розчин іржавого кольору перемішували протягом ночі. Реакційну суміш розбавляли EtOAc (100 мл) і водою (50 мл). Органічний шар відокремлювали, після чого водний шар знову екстрагували EtOAc (2×50 мл). Органічні речовини об'єднували, і промивали насиченим водним розчином NaCl. Органічні речовини висушували над Na_2SO_4 , фільтрували, концентрували, і залишок висушували під високим вакуумом. Це давало неочищений метил-4-нітро-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат (2,8 г, 10 ммоль) у вигляді жовтої твердої речовини (ES/MS m/z 267 (M+H)).

10

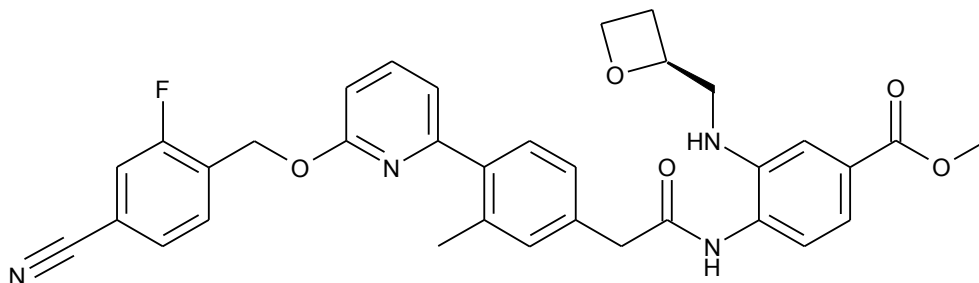
15

Далі метил-4-нітро-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат (2,8 г, 10 ммоль) розчиняли у THF (50 мл), і додавали паладій на вуглєці (5 % попередньо зволожений водою, 0,5 г). Реакційну суміш барботували in vacuo воднем, потім перемішували із застосуванням еластичної камери з воднем під тиском при кімнатній температурі протягом 2 год. Протягом цього часу жовтий колір зникає. Суміш фільтрували через Celite®, концентрували, та одержували вказану в заголовку сполуку (2,4 г, 99 %). ES/MS m/z 237 (M+H).

20

Препаративна методика 24

Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-3-метилфеніл]ацетил]аміно]-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат



25

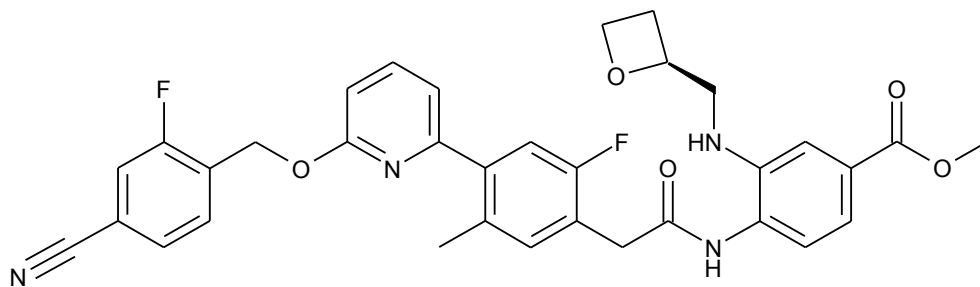
У флакон вносили 2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-3-метилфеніл]оцтову кислоту (1,10 г, 2,92 ммоль), DMF (10 мл), HATU (1,4 г, 3,6 ммоль), метил-4-аміно-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат (0,76 г, 3,2 ммоль) і DIPEA (1,5 мл, 8,6 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв, потім розподіляли між EtOAc (30 мл) і водою (30 мл). Органічні речовини проминали насиченим водним розчином NaCl (30 мл), потім висушували над Na_2SO_4 , фільтрували, і концентрували. Залишок очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 10 % до 35 % EtOAc в DCM, та одержували вказану в заголовку сполуку (1,2 г, 69 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS m/z 595 (M+1), 593 (M-1).

30

Препаративна методика 25

Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]ацетил]аміно]-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат

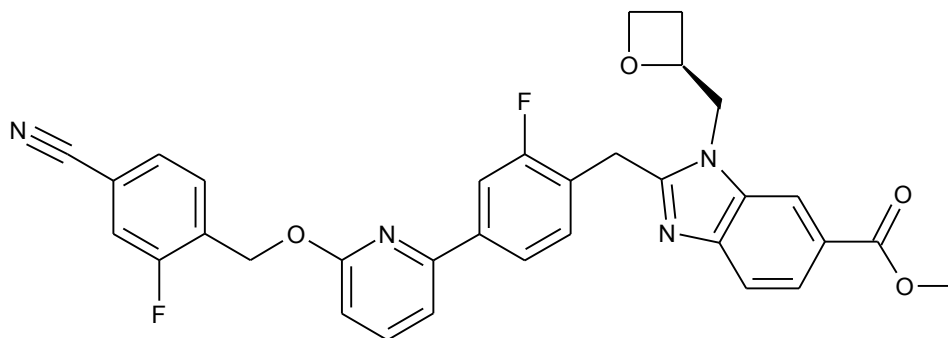
35



У колбу додавали: 2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]оцтову кислоту (1,20 г, 3,04 ммоль), DMF (15 мл), HATU (1,2 г, 3,1 ммоль), метил 4-аміно-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат (0,80 г, 3,4 ммоль) і DIPEA (1,5 мл, 8,6 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв, потім розподіляли між EtOAc (30 мл) і водою (30 мл). Органічні речовини проминали насиченим водним розчином NaCl (30 мл), потім висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Залишок очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 10 % до 35 % EtOAc в DCM, та одержували вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини (1,20 г, 64 %). ES/MS m/z 613 (M+1), 611 (M-H).

Препаративна методика 26

Метил-2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фторфеніл]метил]-3-[[[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбоксилат

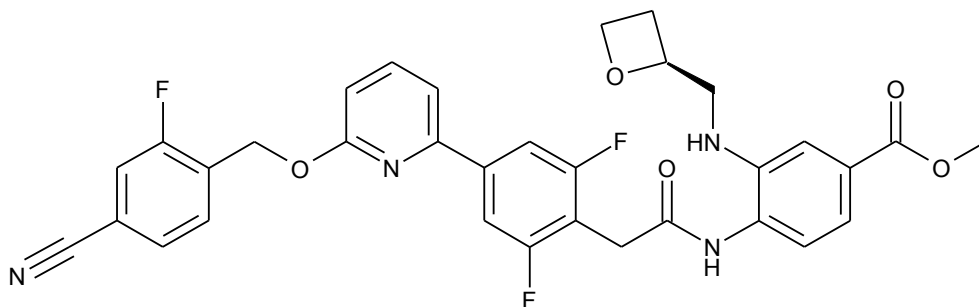


У круглодонну колбу вносили 2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фторфеніл]оцтову кислоту (205 мг, 0,540 ммоль), метил-4-аміно-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат (116 мг, 0,490 ммоль), HATU (224 мг, 0,589 ммоль), DIPEA (0,26 мл, 1,5 ммоль) та DMF (5 мл). Після перемішування при кімнатній температурі протягом 3,5 год. реакційну суміш розбавляли EtOAc (30 мл), і проминали водою та насиченим водним розчином NaCl. Органічні речовини висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Залишок очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 0 % до 10 % MeOH в DCM, та одержували проміжний амід (326 мг). ES/MS m/z 599 (M+H).

Одержаний проміжний амід нагршали з оцтовою кислотою (5 мл) при 50 °C протягом 15 год. Реакційну суміш концентрували in vacuo, і залишок розчиняли у EtOAc (25 мл). Органічні речовини промивали насиченим водним розчином NaHCO₃ і насиченим водним розчином NaCl. Органічні речовини висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Одержаний залишок очищали хроматографією на силікагелі із використанням градієнта від 20 % до 100 % EtOAc в гексанах, та одержували вказану в заголовку сполуку (152 мг, 52 %). ES/MS m/z 581 (M+H).

Препаративна методика 27

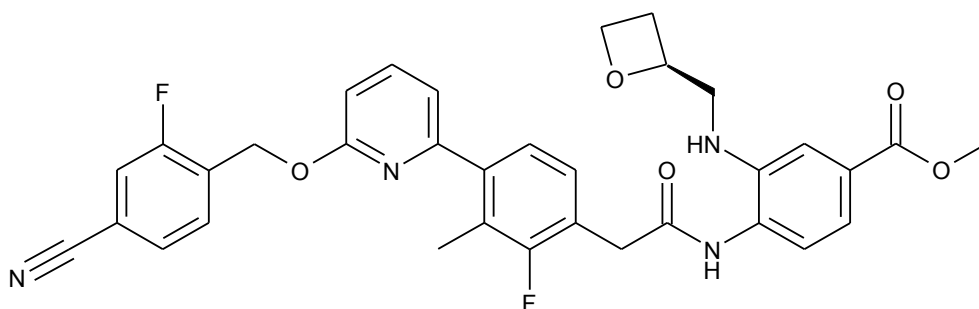
Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2,6-дифторфеніл]ацетил]аміно]-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 24, із використанням 2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2,6-дифторфеніл]оцтової кислоти. Продукт, який випадав в осад під час водної обробки, відфільтровували, і
5 використовували без подальшого очищення. ES/MS m/z 617 (M+H), 615 (M-H).

Препаративна методика 28

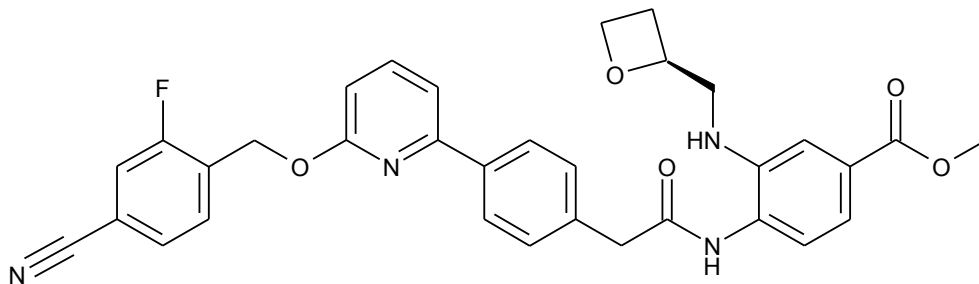
Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-3-метилфеніл]ацетил]аміно]-3-[[2(S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат



10 Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 24, із використанням 2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-3-метилфеніл]оцтової кислоти. ES/MS m/z 613 (M+H), 611 (M-H).

Препаративна методика 29

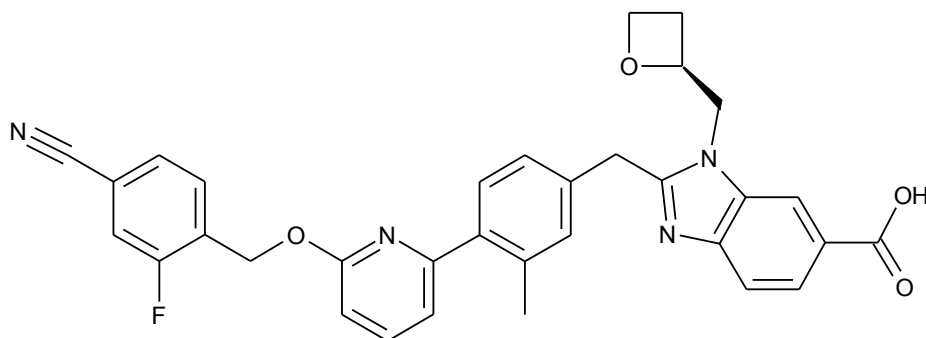
15 Метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]феніл]ацетил]аміно]-3-[[2(S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Препаративній методиці 25, із використанням 2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]феніл]оцтової кислоти. ES/MS m/z 581,0 (M+H), 579,0 (M-H).

20 Приклад 1

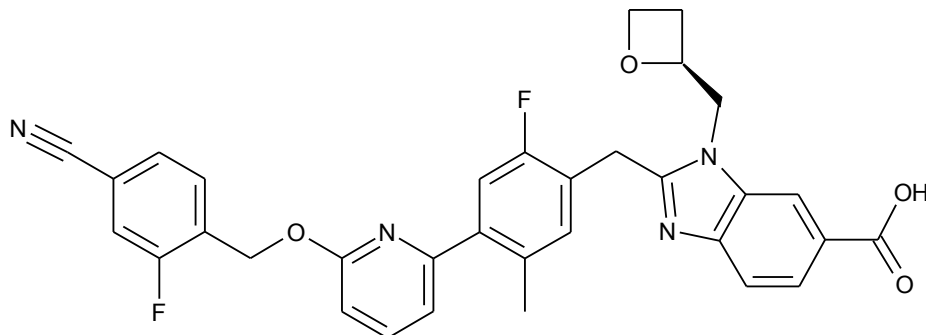
2-[[4-[6-[(4-Ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-3-метилфеніл]метил]-3-[[2(S)оксетан-2-іл]метил]бензимидазол-5-карбонова кислота



У флакон вносили метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-3-метилфеніл]ацетил]аміно]-3-[[2(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат (1,2 г, 2,0 ммоль) і оцтову кислоту (6 мл). Суміш гріли при 80 °С протягом 2 год., потім видаляли розчинник *in vacuo*.
 5 Залишок розділяли між EtOAc (30 мл) і водним розчином NaHCO₃ (5 %, 20 мл). Органічні речовини проминали насиченим водним розчином NaCl (30 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Залишок розчиняли в ACN (5 мл) і воді (3 мл), потім додавали до суміші LiOH (0,22 г, 9,2 ммоль), і перемішували при 50 °С протягом 2 год. Розчинник видаляли *in vacuo*. Залишок очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою із використанням градієнта від 20 % до 35 % ACN у 5 % водному розчині NH₄HCO₃, та одержували вказану в заголовку сполуку (900 мг, 79 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS *m/z* 563 (M+H), 561 (M-H).

Приклад 2

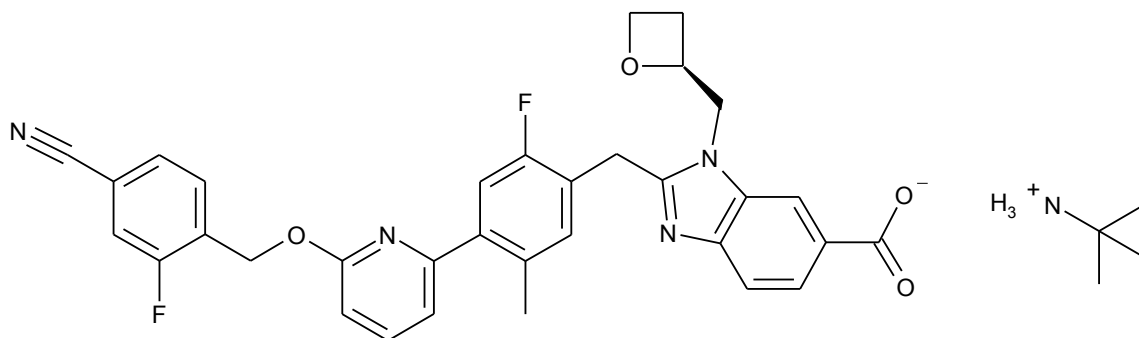
2-[[4-[6-[(4-Ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]метил]-3-[[2(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбонова кислота



У флакон вносили метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]ацетил]аміно]-3-[[2(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоат (1,20 г, 1,96 ммоль) і оцтову кислоту (15 мл), потім гріли суміш при 80 °С протягом 2 год. Розчинник видаляли *in vacuo*.
 20 Залишок розділяли між EtOAc (30 мл) і водним розчином NaHCO₃ (5 %, 20 мл). Органічні речовини проминали насиченим водним розчином NaCl (30 мл), висушували над Na₂SO₄, фільтрували, і концентрували. Залишок розчиняли в ACN (10 мл) і воді (4 мл), потім додавали до суміші LiOH (0,24 г, 10 ммоль), і перемішували при 50 °С протягом 2 год. Суміш підкисляли насиченим водним розчином лимонної кислоти до pH=4-5. Розчинник видаляли *in vacuo*. Залишок очищали флешхроматографією з оберненою фазою із використанням градієнта від 20 % до 35 % ACN у 5 % водному розчині NH₄HCO₃, та одержували вказану в заголовку сполуку (745 мг, 66 %) у вигляді твердої речовини. ES/MS *m/z* 581 (M+H), 579 (M-H).

Приклад 2а

трет-Бутиламоній-2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]метил]-3-[[2(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбоксилат



Метод 1 - Препаративна методика без кристалу-зародка

2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]метил]-3-[[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбонову кислоту (555 мг, 0,96 ммоль) суспендували в ацетоні (6 мл) при перемішуванні при 800 об/хв при 50 °С, та одержували суспензію білої твердої речовини. Додавали трет-бутиламін (115 мкл, 1,09 ммоль, 1,14 екв.), спостерігаючи за коротким освітленням суміші з подальшим осадженням білої твердої речовини. Цю суспензію перемішували при 50 °С протягом 1 год., потім припиняли нагрівання, залишали зразок при перемішуванні доти, доки він не досягне кімнатної температури. Тверду речовину відфільтровували вакуумним фільтруванням, і сушили на місці протягом 15 хв під струменем азоту, потім сушили in vacuo при 50 °С протягом 1 год., та одержували вказану в заголовку сполуку (612 мг, 98 %).

Метод 1 - Препаративна методика без кристалу-зародка

Змішували 2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]метил]-3-[[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбонову кислоту (50 г, 86,1 ммоль), ацетон (658 мл) і воду (42 мл), і суміш нагрівали до 50 °С. Суміш фільтрували через папір GF/F, і проминали сумішшю ацетон:вода (94:6 (у об'ємному відношенні), 25 мл). Одержаний розчин гріли при 50 °С. Готували розчин трет-бутиламіну (10 мл, 94,7 ммоль, 1,1 екв.) і суміші ацетон:вода (94:6 (у об'ємному відношенні), 25 мл). Додавали порцію розчину трет-бутиламіну (7 мл), після чого кристали-зародки трет-бутиламоній-2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]метил]-3-[[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбоксилату (50 мг).

Додавали решту розчину трет-бутиламіну протягом приблизно 1 год. із застосуванням шприцевого насоса зі швидкістю 0,47 мл/хв. Одержану суспензію гріли при 50 °С протягом 2 год., потім суміш охолоджували до температури навколишнього середовища протягом ночі. Суспензію фільтрували, і проминали ацетоном (2×100 мл). Вологий відфільтрований осад сушили при 50 °С in vacuo до постійної маси, та одержували вказану в заголовку сполуку (51,8 г, 92 %) у вигляді блідо-жовтої твердої речовини.

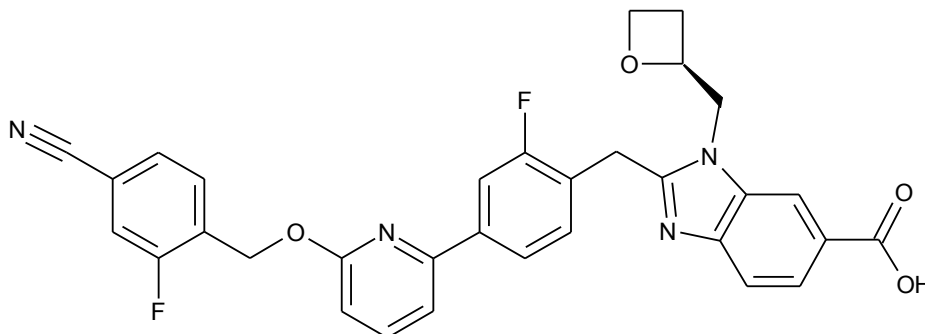
Підготовлений зразок вказаної в заголовку сполуки характеризували порошковою рентгенограмою з використанням CuKα-випромінювання як такий, що має дифракційні піки (значення 2-тета), як описано в наведеній нижче Таблиці 1, і, зокрема, має піки при 6,9 у поєднанні з одним або кількома піками, вибраними з групи, яку складають 16,3 і 22,5; з допуском на кути дифракції 0,2 градусу.

Таблиця 1

Піки порошкової рентгенограми трет-бутиламоній-2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-5-метилфеніл]метил]-3-[[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбоксилату

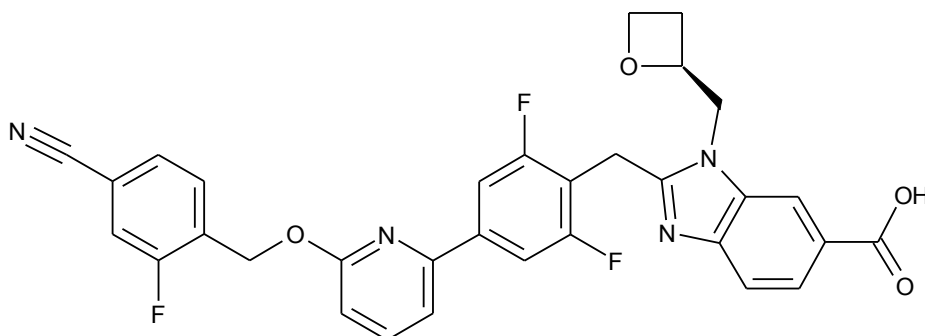
Пік	Кут (°2-тета) ±0,2°	Відносна інтенсивність (% найбільш інтенсивного піка)
1	5,5	26,20 %
2	6,9	64,90 %
3	11,2	49,20 %
4	16,3	100,00 %
5	17,1	34,70 %
6	19,6	53,00 %
7	21,8	43,10 %
8	22,5	93,80 %
9	27,3	41,10 %
10	28,0	37,90 %

Приклад 3
2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фторфеніл]метил]-3-[(2S)-оксетан-2-ілметил]бензimidазол-5-карбонова кислота



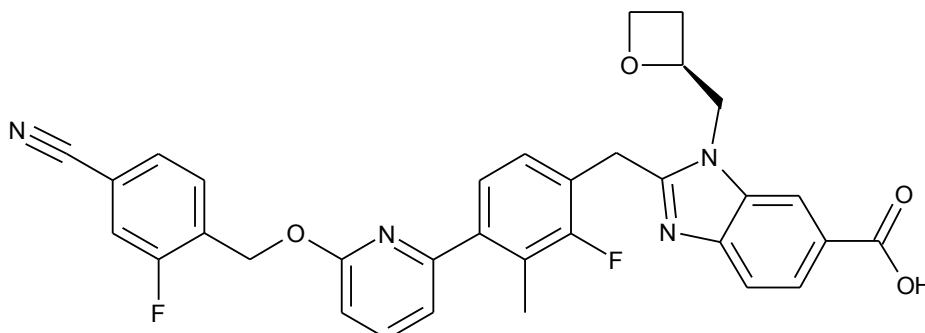
5 Метил-2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фторфеніл]метил]-3-[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбоксилат (152 мг, 0,256 ммоль) розчиняли у THF (6 мл), потім додавали гідроксид літію (31 мг, 1,26 ммоль) і воду (2 мл). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 16 год., потім pH доводили до 6 додаванням водного розчину HCl (1N). THF видаляли in vacuo, і решту твердої речовини відфільтровували. Очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою із використанням градієнта від 10 % до 40 % ACN у водному розчині NH_4HCO_3 (10 mM, pH 10), та одержували вказану в заголовку сполуку (60 мг, 41 %). ES/MS m/z 567 (M+H).

Приклад 4
2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2,6-дифторфеніл]метил]-3-[(2S)оксетан-2-ілметил]бензimidазол-5-карбонова кислота



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Прикладі 1 із використанням метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2,6-дифторфеніл]ацетил]аміно]-3-[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоату. Продукт очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою із використанням градієнта від 30 % до 50 % ACN у водному розчині NH_4HCO_3 (10 mM, pH 10). ES/MS m/z 585 (M+H), 583 (M-H).

Приклад 5
2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-3-метилфеніл]метил]-3-[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензimidазол-5-карбонова кислота

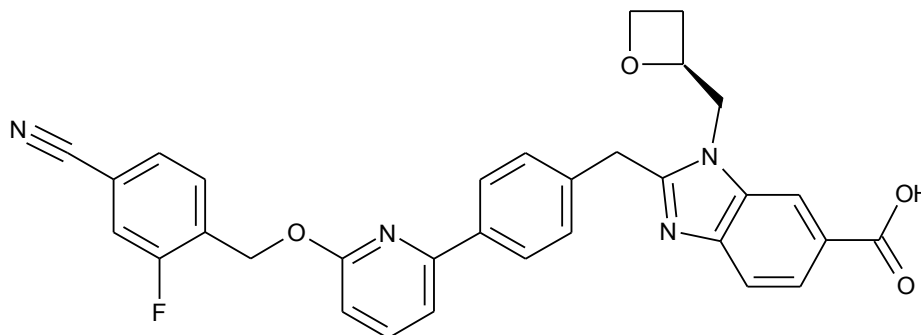


Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Прикладі 2 із використанням метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]-2-фтор-3-метилфеніл]ацетил]аміно]-3-[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоату. Продукт очищали флеш-

хроматографією з оберненою фазою із використанням градієнта від 5 % до 40 % ACN у 5 % водному розчині NH_4HCO_3 . ES/MS m/z 581 (M+H), 579 (M-H).

Приклад 6

2-[[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]феніл]метил]-3-[[[(2S)-оксетан-2-іл]метил]бензімідазол-5-карбонова кислота



Вказану в заголовку сполуку одержували по суті так, як описано в Прикладі 1 із використанням метил-4-[[2-[4-[6-[(4-ціано-2-фторфеніл)метокси]-2-піридил]феніл]ацетил]аміно]-3-[[[(2S)-оксетан-2-ілметил]аміно]бензоату. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією з оберненою фазою із використанням градієнта від 20 % до 35 % ACN у 5 % водному розчині NH_4HCO_3 . ES/MS m/z 549,0 (M+H), 547,1 (M-H).

Біологічні дослідження

Аналіз cAMP у клітинах лінії HEK293, що експресує рецептори GLP-1 людини

Функціональну активність рецептора GLP-1 визначали із використанням утворення cAMP в клональній клітинній лінії HEK293, що експресує людський GLP-1R (номер депонування NCBI NP_002053), при густині експресії 581 ± 94 фмоль/мг ($n=6$) і 104 ± 12 фмоль/мг ($n=5$) білка (визначено із використанням дослідження гомологічного конкурентного зв'язування [^{125}I]GLP-1(7-36) NH_2). Клітини, що експресують рецептор hGLP-1R, обробляли сполукою (20-точкова крива залежності "концентрація-ефект" у DMSO, 2,75-кратне пряме розведення Labcyte Echo, 384-лунковий планшет (Coming, номер за каталогом 3570) у DMEM (Gibco, номер за каталогом 31053), з додаванням 1X GlutaMAX™ (Gibco, номер за каталогом 35050), 0,1 % казеїну великої рогатої худоби (Sigma, C4765-10ML), 250 мкМ IBMX (3-ізобутил-1-метилксантин, Acros, номер за каталогом 228420010) і 20 мМ HEPES (Gibco, C15630) у 20 мл аналітичному об'ємі (кінцева концентрація DMSO 0,5 %). Після 30-хвилинного інкубування при 37 °C одержане збільшення внутрішньоклітинного cAMP кількісно визначали із застосуванням набору для дослідження CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Стисло, рівні cAMP в клітині визначають шляхом додавання спочатку кон'югату cAMP-d2 у буфер для лізису клітин (10 мкл), а потім антитіла проти cAMP-Eu $^{3+}$ -Cryptate, також у буфер для лізису клітин (10 мкл). Одержану суміш для конкурентного дослідження інкубували протягом щонайменше 60 хв при кімнатній температурі, потім детектували із застосуванням приладу PerkinElmer Envision® зі збудженням при 320 нм і випроміненням при 665 нм і 620 нм. Одиниці Envision (випромінення при 665 нм/620 нм $\cdot$ 10000) є обернено пропорційними кількості наявного cAMP, і її перетворювали на нМ cAMP на лунку з використанням стандартної кривої cAMP. Кількість утвореного cAMP (нМ) у кожній лунці перетворювали на відсоток від максимальної реакції, що спостерігалася з людським GLP-1(7-36) NH_2 . Відносне значення EC_{50} і відсоток верхньої межі (E_{max}) виводили із застосуванням нелінійного регресійного аналізу з використанням відсотка максимальної реакції в порівнянні з концентрацією доданої сполуки, підігнаного до чотирипараметричного логістичного рівняння. Дані EC_{50} і E_{max} , у разі тестування сполук Прикладів 1-6 в описаному вище дослідженні cAMP з використанням клітин HEK293, що експресують 581 фмоль/мг і 104 фмоль/мг GLP-1R, наведені в Таблиці 2 і Таблиці 3, відповідно. Ці дані вказують на те, що сполуки Прикладів 1-6 є агоністами рецептора GLP-1 людини.

Таблиця 2

Лінія клітин HEK293 з густиною експресії
GLP-1R 581 фмоль/мг, внутрішньоклітинна відповідь cAMP

Приклад	EC ₅₀ (нМ)±SEM (n)	E _{max} (%)±SEM (n)
1	9,33±1,36 (n=6)	99,5±2,53 (n=6)
2	1,14±0,315 (n=6)	104±4,35 (n=6)
3	3,08±0,379 (n=5)	99±3,69 (n=5)
4	3,99±0,378 (n=3)	99,2±4 (n=3)
5	6,45±0,934 (n=3)	105±2,43 (n=3)
6	20±6,51 (n=4)	101±3,42 (n=4)

Таблиця 3

Лінія клітин HEK293 з густиною експресії
GLP-1R 581 фмоль/мг, внутрішньоклітинна відповідь cAMP

Приклад	EC ₅₀ (нМ)±SEM (n)	E _{max} (%)±SEM (n)
1	20±3,25 (n=6)	71,4±2,26 (n=6)
2	3,97±0,61 (n=6)	79,2±3,2 (n=6)
3	10±2,3 (n=5)	81,7±3,86 (n=5)
4	9,59±2,36 (n=3)	78,3±5,1 (n=3)
5	23,6±5,43 (n=3)	76,7±3,88 (n=3)
6	47,7±17,9 (n=4)	80,3±3,1 (n=4)

5 Внутрішньоочеревинна проба на толерантність до глюкози *in vivo* у мишей, нокаутуваних за GLP-1R

Активність наведених у прикладах сполук щодо зниження концентрації глюкози в крові *in vivo* визначали з використанням мишей, які експресують людський GLP-1R (номер депонування NCBI NP_002053) з генетичного локусу Gdp-lr миші (Jun, L.S., et al., PLoS One. 2014 9:e93746). Мишам, які голодували протягом ночі, перорально вводили досліджувану сполуку, розчинену в 10 % Kolliphor® (HS15) у поліетиленгліколі 400 (PEG400). Через годину після введення дози тваринам вводили глюкозу шляхом внутрішньоочеревинної ін'єкції (2 г/кг), і рівень глюкози в крові періодично вимірювали протягом подальших двох годин із застосуванням глюкометрів. Визначали діапазон доз досліджуваної сполуки, для кожної групи доз визначали площу під кривою, і підганяли до чотирипараметричної логістичної моделі для обчислення активності *in vivo* як ED₅₀ з 95 % довірчим інтервалом. Під час тестування за описаною вище внутрішньоочеревинною пробою на толерантність до глюкози *in vivo*, сполуки Прикладів 1-3 демонстрували здатність знижувати концентрацію глюкози в крові у мишей, які експресують людський GLP-1R, зі значеннями ED₅₀ (і 95 % довірчим інтервалом), як показано в Таблиці 4, що свідчило про те, що ці сполуки являли собою доступні для перорального прийому сильнодіючі агоністи GLP-1R у мишей.

Таблиця 4

Ефективність зниження рівня глюкози в крові у мишей, що експресують людський GLP-1R

Приклад	ED ₅₀ , що знижує рівень глюкози у крові (мг/кг)	95 % довірчий інтервал
1	0,09	0,0301-0,2592
2	0,07	0,0246-0,1808
3	0,06	0,013-0,246

Фармакокінетика у приматів, які не є людиною (NHP)

25 Досліджувану сполуку вводили самицям макак-крабоїдів натщесерце внутрішньовенним шляхом (IV) у дозі 0,5 мг/кг (із використанням об'єму дози 1 мл/кг). Серійні зразки крові відбирали через 0,08 год., 0,25 год., 0,5 год., 1 год., 2 год., 4 год., 8 год., 12 год. та 24 год. після введення внутрішньовенного болюсу. Після обробки коагулянтном EDTA плазму одержували

- 5 шляхом центрифугування, і зберігали при -70°C до дослідження із застосуванням LC-MS/MS. Концентрацію досліджуваного препарату визначали у плазмі. Для обчислення плазматичного кліренсу та об'єму розподілу в рівноважному стані використовували некомпартментальний аналіз. У Таблиці 5 наведені фармакокінетичні дані для сполук Прикладів 1-3 у цьому дослідженні. Ці дані, частково, використовували для інформування людських механістичних прогнозів фармакокінетики, які припускають фармакокінетичний профіль для підтримки дозування людини один раз на добу.

Таблиця 5

Фармакокінетичні дані макак-крабоїдів

Приклад	Плазматичний кліренс (мл/хв/кг)	Об'єм розподілу (л/кг)	Носій*
1	13	1,2	A
2	11	1,1	A
3	6	1,1	B

* Носій A - 5 % DMSO і 95 % (20 % CAPTISOL® (у відношенні маси до об'єму) у воді; Носій B - 20 % CAPTISOL® (у відношенні маси до об'єму) у воді+1 моль еквіваленту NaOH)

- 10 Дослідження активності ферменту фосфодіестерази 10 (PDE10)
 Для одержання білка фосфодіестерази 10A1 (PDE10A1) непроцесований клон PDE10A1, що відповідає номеру депонування GenBank AAD32595.1, клонували в pFastBac1 (Invitrogen). Білок PDE10A1 з С-кінцевою міткою FLAG експресували бакуловірусною інфекцією клітин комах, очищали з використанням анти-FLAG M2-агарози (Sigma) та ексклюзивної гель-хроматографії за розміром молекул на колонці Superdex 200 (GE Healthcare), і зберігали при -80°C у невеликих аліквотах (20 мМ Трис-НCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 10 % гліцерину).
- 15 Активність ферменту PDE10A1 визначали із застосуванням сцинтиляційного аналізу з використанням МІПів (МІП - молекулярно імпринтований полімер) на основі силікату ітрію (SPA), який виявляє радіоактивні нуклеотидні монофосфати, але не циклічні монофосфати. Буфер для дослідження складався з 50 мМ Трис-НCl, pH 7,5, 8 мМ MgCl₂, 3,4 мМ EDTA і 0,1 % BSA (Sigma). Дослідження проводили у 384-лункових планшетах (3706, Corning) в загальному об'ємі 50 мкл: які вміщували 24 мкл ферменту PDE10A1, 1 мкл досліджуваної сполуки та 25 мкл циклічного нуклеотиду. Досліджувані сполуки розводили у чистому DMSO з використанням десятиточкової кривої залежності "концентрація-ефект" з 3-кратним коефіцієнтом розведення, і 1 мкл розливали у планшети для дослідження із застосуванням акустичної системи Echo555 (LabCytte). 24 мкл білка PDE10A1 інкубували з 1 мкл сполуки протягом 30 хв перед початком реакції шляхом додавання субстрату [8-³H]-cGMP (6,5 Кі/ммоль, Perkin Elmer). Кінцева концентрація компонентів становила 70 нМ PDE10A1, 80 нМ (³H-cGMP) і 2 % DMSO в буфері для дослідження. Максимальна концентрація сполуки в реакційній суміші становила 10 мкМ.
- 20 Реакційні суміші інкубували протягом 60 хв при кімнатній температурі перед гасінням і додаванням 400 мкг/лунка SPA-гранул (RPNQ0150, Perkin Elmer). Радіоактивність, зв'язану з гранулами (продукт), кількісно визначали через 12 год. із застосуванням лічильника Microbeta (Perkin Elmer). Дані нормалізували на % інгібування, а значення IC₅₀ обчислювали з використанням чотиріпараметричного логістичного рівняння, як описано (Campbell, R.M.; Dymshitz, J.; Eastwood, B.J.; et al. "Data Standardization for Results Management." In: Sittampalam, G.S.; Grossman, A.; Brimacombe, K.; et al.; eds. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.). У Таблиці 6 показана активність сполук Прикладів 1-4 у цьому дослідженні. Ці дані показали, що сполуки Прикладів 1-4 мали слабку спорідненість зв'язування з PDE10A, що вказувало на знижений ризик токсичності.
- 35
- 40

Таблиця 6

In vitro активність інгібування PDE10A1

Приклад	IC ₅₀ (мкМ), n=1
1	>10
2	7,43
3	>10
4	5,41

Дослідження афінності зв'язування радіоліганду з каналом hERG K⁺ людини

- Спорідненість сполук до K⁺-каналу hERG людини в трансфікованих клітинах HEK-293 оцінювали із застосуванням дослідження зв'язування радіоліганду, як описано нижче. Гомогенати клітинних мембран (приблизно 40 мкг білка) інкубували протягом 60 хв при 22 °C з 3 нМ [³H]дофетиліду за відсутності або у присутності досліджуваної сполуки в буфері, що містив 50 мМ Трис-НСІ (рН 7,4), 10 мМ КСІ і 1 мМ MgCl₂. Дослідження проводили у 96-лунковому планшеті з об'ємом 200 мкл, який містить максимум 1 % DMSO від початкової солюбілізації досліджуваної сполуки. Після інкубування зразки швидко фільтрували під вакуумом через скловолоконні фільтри (GF/B, Packard), попередньо зволожені 0,3 % PEI і декілька разів промиті крижаним 50 мМ TrisHCl, 10 мМ KCl і 1 мМ MgCl₂ із застосуванням харвестеру клітин на 96 зразків (Unifilter, Packard). Фільтри сушили, а потім підраховували радіоактивність сцинтиляційним щільником (Topcount, Packard) з використанням сцинтиляційного коктейлю (Microscint O, Packard). У Таблиці 7 показана активність сполук Прикладів 1-3 у цьому дослідженні, виражену у відсотках інгібування специфічного зв'язування контрольного радіоліганду. Ці дані показали, що сполуки Прикладів 1-3 мали слабку інгібіторну активність hERG, що вказувало на знижений ризик токсичності.

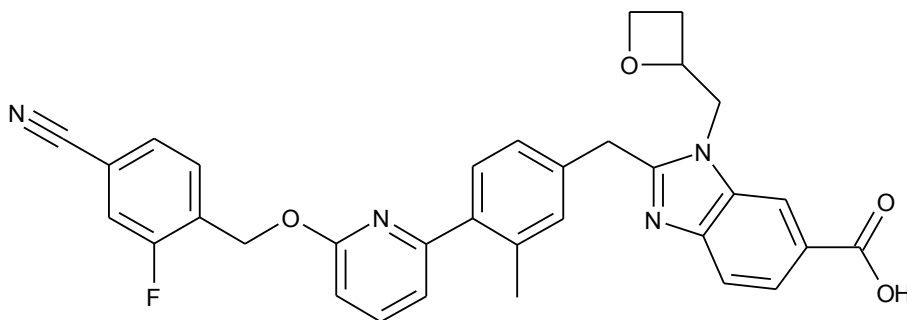
Таблиця 7

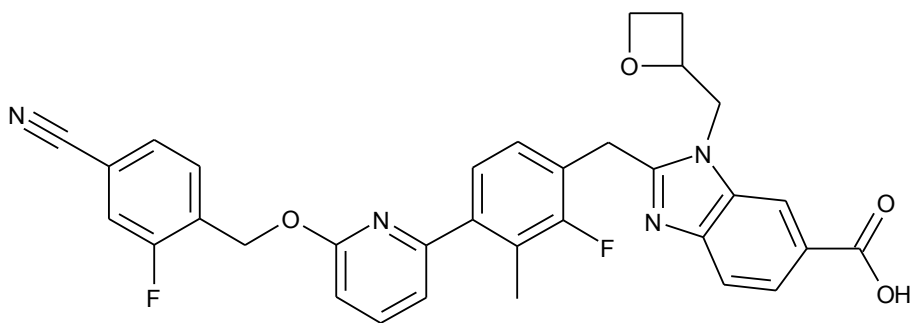
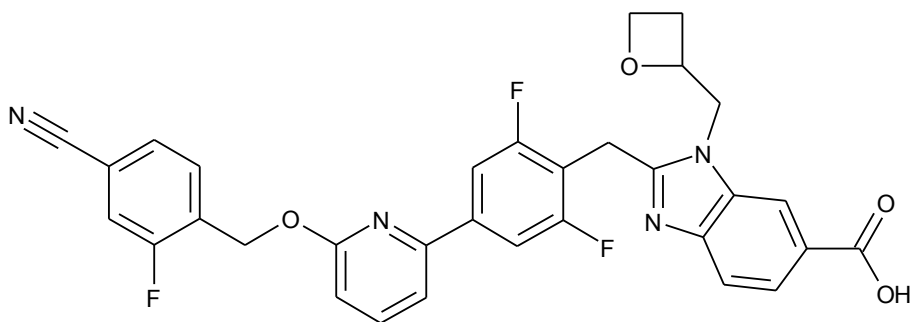
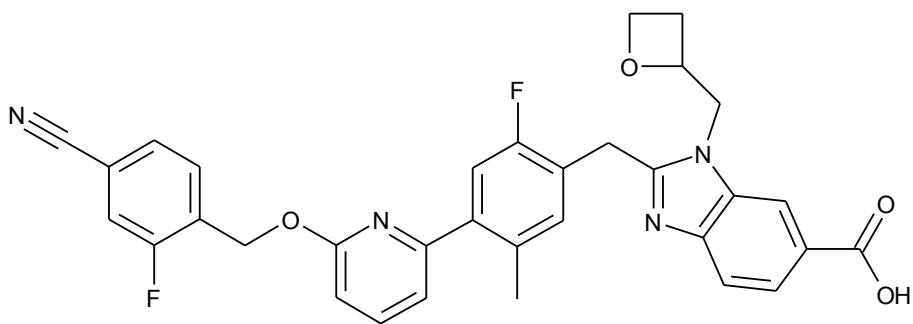
Відсоток інгібування спорідненості радіоліганду з K⁺ каналом hERG людини

Приклад	Відсоток інгібування (%) при 100 мкМ концентрації сполуки, n=1
1	0
2	54
3	37

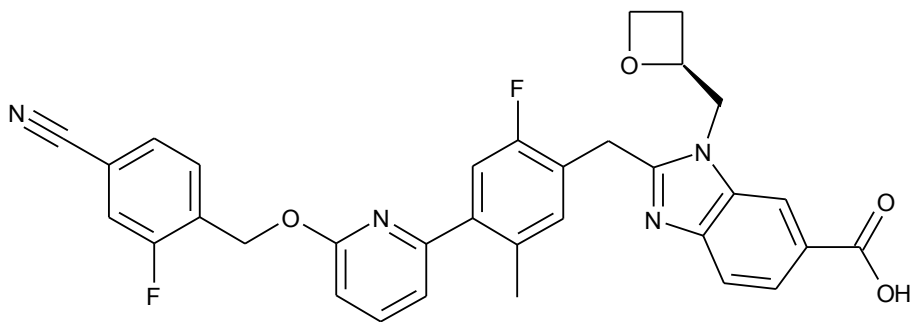
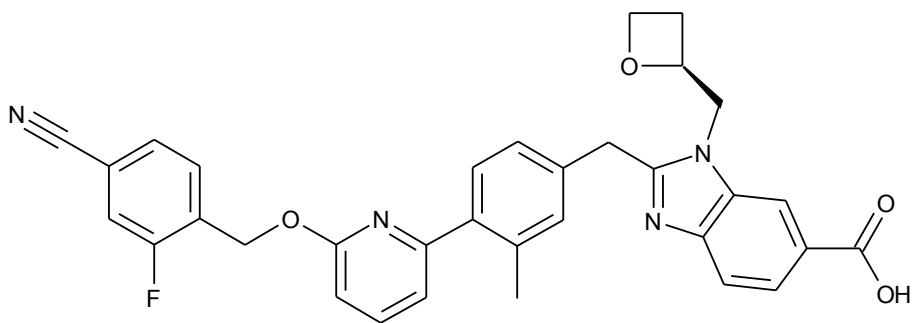
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

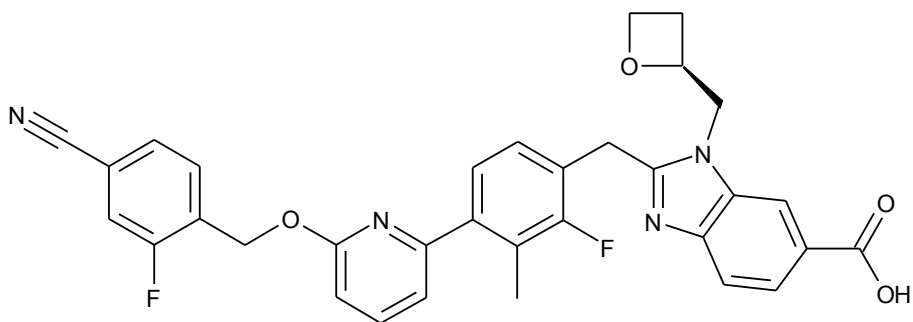
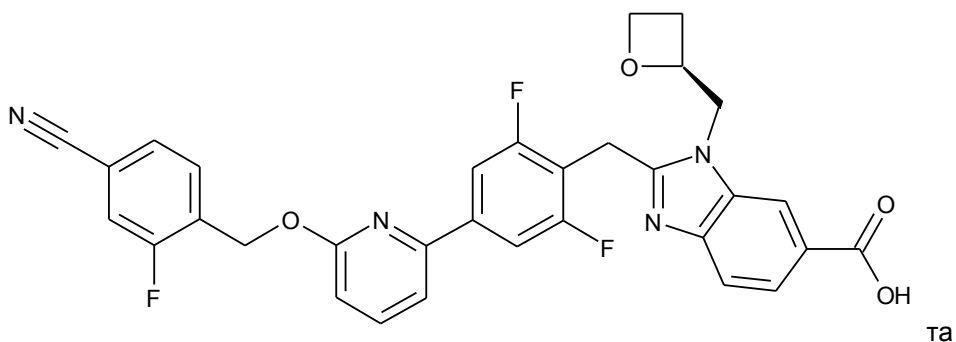
1. Сполука, вибрана з:





5 або її фармацевтично прийнятна сіль.
2. Сполука за п. 1, вибрана з:

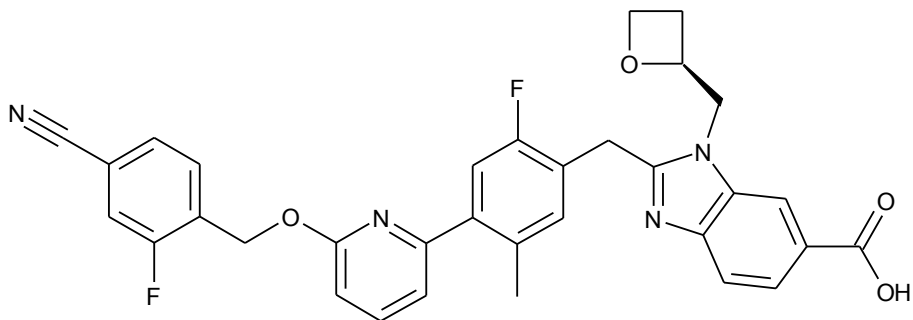




або її фармацевтично прийнятна сіль.

3. Сполука за п. 2, де згадана сполука являє собою:

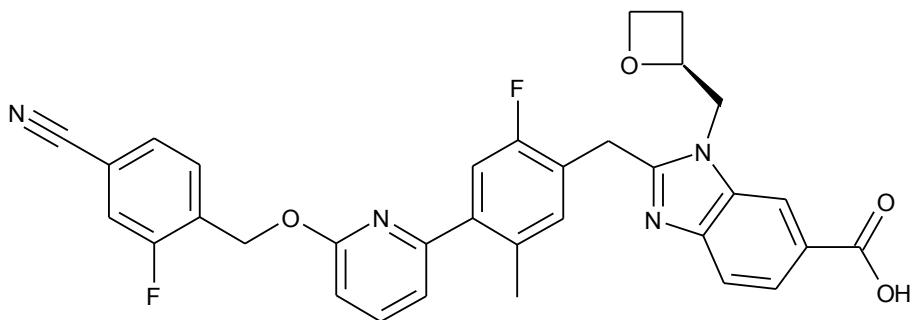
5



або її фармацевтично прийнятна сіль.

4. Сполука за п. 3, яка являє собою трет-бутиламінову сіль:

10



5. Фармацевтична композиція, що містить сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль за будь-яким із пп. 1-4 і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

15

6. Спосіб лікування цукрового діабету 2 типу у ссавця, який включає введення ссавцю ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-4 або її фармацевтично прийнятної солі.

7. Спосіб зниження рівня глюкози в крові у ссавців, який включає введення ефективної кількості сполуки за будь-яким із пп. 1-4 або її фармацевтично прийнятної солі.

8. Спосіб лікування гіперглікемії у ссавця, який включає введення ссавцю ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-4 або її фармацевтично прийнятної солі.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 6-8, який **відрізняється** тим, що згадану сполуку вводять пероральним шляхом.
- 5 10. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким із пп. 1-4 для застосування в терапії.
11. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким із пп. 1-4 для застосування в лікуванні цукрового діабету 2 типу.
12. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким із пп. 1-4 для застосування в
10 зниженні рівня глюкози в крові.
13. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за будь-яким із пп. 1-4 для застосування в лікуванні гіперглікемії.
14. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль для застосування за будь-яким з пп. 10-13, при цьому сполуку мають вводити пероральним шляхом.
- 15 15. Застосування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі за будь-яким із пп. 1-4 у виробництві лікарського засобу для лікування цукрового діабету 2 типу.
16. Застосування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі за будь-яким із пп. 1-4 у виробництві лікарського засобу для зниження рівня глюкози в крові.
17. Застосування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі за будь-яким із пп. 1-4 у
20 виробництві лікарського засобу для лікування гіперглікемії.