



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119576** (13) **C2**
(51) МПК

C07D 401/12 (2006.01)
C07D 413/12 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2017 04639</p> <p>(22) Дата подання заявки: 09.11.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.07.2019</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: РА201400648, РА201500447</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 10.11.2014, 07.08.2015</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: DK, DK</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.08.2017, Бюл.№ 15</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2019, Бюл.№ 13</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/EP2015/076015, 09.11.2015</p>	<p>(72) Винахідник(и): Юхль Карстен (DK), Тагмосе Лена (DK), Маріро Мауро (DK)</p> <p>(73) Власник(и): Х. ЛУННБЕК А/С, Ottiliavej 9, DK-2500 Valby, Denmark (DK)</p> <p>(74) Представник: Войтенко Олександр Петрович, реєстр. №23</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2012/168164 A1, 13.12.2012 WO 2011/154431 A1, 15.12.2011 HANS HILPERT ET AL, "[beta]-Secretase (BACE1) Inhibitors with High in Vivo Efficacy Suitable for Clinical Evaluation in Alzheimer's Disease", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, (20130416), vol. 56, no. 10, doi:10.1021/jm400225m, ISSN 0022-2623, pages 3980 - 3995 DANIEL OEHLRICH ET AL, "The evolution of amidine-based brain penetrant BACE1 inhibitors", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, AMSTERDAM, NL, (20140420), vol. 24, no. 9, doi:10.1016/j.bmcl.2014.03.025, ISSN 0960-894X, pages 2033 - 2045</p>
--	---

(54) 2-АМІНО-6-(ДИФТОРМЕТИЛ)-5,5-ДИФТОР-6-ФЕНІЛ-3,4,5,6-ТЕТРАГІДРОПІРИДИНИ ЯК ІНГІБИТОРИ BACE1

(57) Реферат:

Цей винахід належить до сполук формули (I), які є інгібіторами ферменту BACE1. Окремі аспекти цього винаходу належать до фармацевтичних композицій, які містять вказані сполуки, і до застосувань цих сполук для лікування порушень, при яких корисним є зниження відкладень Аβ, таких як хвороба Альцгеймера.

UA 119576 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Цей винахід відноситься до сполук, які діють як інгібітори BACE1. Окремі аспекти цього винаходу відносяться до фармацевтичних композицій, які містять вказані сполуки, і до застосувань цих сполук для лікування нейродегенеративних або когнітивних порушень.

5 Рівень техніки

Деменція є клінічним синдромом, що характеризується порушеннями в численних областях когнітивної діяльності, які не можна пояснити нормальним старінням, помітним зниженням функції і відсутністю делірію. Крім того, зазвичай присутні нейропсихіатричні симптоми і осередкові неврологічні прояви. Деменція також класифікується на основі етіології. Хвороба Альцгеймера (AD) є найбільш поширеною причиною деменції, за якою слідує змішаний випадок AD і судинної деменції, деменція з тельцями Леві (DLB) і лобно-скронева деменція. Вважається, що відкладення β -амілоїду і нейрофібрилярні клубки є основними патологічними характеристиками, пов'язаними з AD, яка характеризується втратою пам'яті, втратою здібностей до пізнання, мислення, міркування і орієнтації. Також при розвитку захворювання порушуються рухові, сенсорні та лінгвістичні здібності до тих пір, поки не відбудеться глобальне порушення численних когнітивних функцій. Відкладення β -амілоїду переважно є скупченням пептиду A β , що, у свою чергу, є продуктом протеолізу білка-попередника амілоїду (APP) як частини β -амілоїдогенного шляху. Пептид A β є результатом розщеплювання APP на C-кінці однією або декількома γ -секретазами і на N-кінці β -секретазою 1 (BACE1), також відомою як аспартилпротеаза 2. Активність BACE1 безпосередньо корелює з утворенням пептиду A β з APP.

Дослідження показують, що інгібування BACE1 перешкоджає продукуванню пептиду A β . Крім того, BACE1 локалізується спільно із своїм субстратом APP у апараті Гольджі і ендоцитичних компартментах [Willem M, et al. Semin. Cell Dev. Biol, 2009, 20, 175-182]. Дослідження на мишах методом нокауту показали відсутність утворення амілоїдного пептиду доти, поки тварини здорові і здібні до розмноження [Ohno M, et al. Neurobiol. Dis., 2007, 26, 134-145]. Генетична абляція BACE1 у мишей з надмірною експресією APP продемонструвала відсутність утворення бляшок і відновлення когнітивних функцій [Ohno M, et al. Neuron; 2004, 41, 27-33]. Рівні BACE1 є підвищеними в головному мозку пацієнтів із спорадичною формою AD [Hampel and Shen, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2009, 69, 8-12].

Такі конвергентні особливості указують на те, що інгібування BACE1 може бути терапевтичною мішенню для лікування AD, а також порушень, при яких корисне зменшення відкладень A β .

У жовтні 2012 року AstraZeneca оголосила про відкриття AZD3839 - ефективного інгібітору BACE1, як клінічного кандидата для лікування AD [Jeppsson, F., et al. J. Biol. Chem., 2012, 287, 41245-41257]. Спроба, яка привела до відкриття AZD3839, також описана в публікації Ginman, T., et al. J. Med. Chem., 2013, 56, 4181-4205. У публікації Гінмана (Ginman) описані проблеми, які були подолані у зв'язку з відкриттям і ідентифікацією AZD3839. Ці проблеми були пов'язані з поганим проникненням через гематоенцефалічний бар'єр і опосередкованим P-глікопротеїном відтоком сполук, що приводило до недостатньої кількості сполуки у головному мозку.

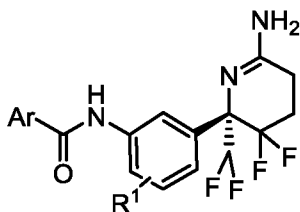
У статті Гінмана була висунута гіпотеза про те, що відмінності в дії на головний мозок можуть бути в значній мірі обумовлені будовою каркаса, і були наведені дані залежності активності від структури, при цьому властивості описуваних сполук *in vitro* представлені в чотирьох таблицях відповідно до підтипів каркасів. У таблиці 4 наведений ряд сполук, що містять амідин, які вважаються цікавими з точки зору активності. Але ці дані свідчать про те, що каркас, який містить амідин, не демонструє бажаний профіль проникнення через гематоенцефалічний бар'єр.

Дослідники із Hoffmann-LaRoche і Siena Biotech також повідомили про відкриття сполук, що містять амідин [Woltering, T.J., et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2013, 23, 4239-4243]. Було виявлено, що ці сполуки (сполуки 17 і 18 в статті) не мають ніякого ефекту *in vivo* (відсутність зменшення A β 40 у головному мозку мишей дикого типу).

Всупереч ідеям Ginman, et al. і Woltering, T. J., et al. автори цього винаходу виявили ряд амідинових сполук, які проникають в головний мозок. Отже, цей винахід відноситься до нових сполук, що мають інгібіторну активність відносно BACE1, до їх отримання, до їх медичного застосування і до лікарських препаратів, що їх містять.

55 Суть винаходу

Завданням цього винаходу є забезпечення сполуками, які інгібують BACE1. Отже, цей винахід відноситься до сполук формули I



Формула I

де Ar вибраний з групи, що складається з фенілу, піридилу, піримідилу, піразинілу, імідазолілу, піразолілу, тiazолілу, оксазолілу, ізоксазолілу, і де Ar необов'язково заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з галогену, CN, C₁-C₆ алкілу, C₂-C₆ алкенілу, C₂-C₆ алкінілу, C₁-C₆ фторалкілу або C₁-C₆ алкокси; і

R¹ являє собою водень, галоген, C₁-C₃ фторалкіл або C₁-C₃ алкіл; або до їх фармацевтично прийнятних солей.

Згідно з одним варіантом здійснення цей винахід відноситься до сполук формули I або до їх фармацевтично прийнятних солей для застосування в терапії.

Цей винахід, крім того, відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій.

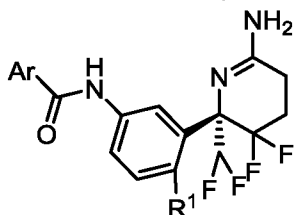
Згідно з одним варіантом здійснення цей винахід відноситься до застосування сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі у виготовленні лікарського препарату для лікування нейродегенеративного або когнітивного порушення.

Згідно з одним варіантом здійснення цей винахід відноситься до сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі для застосування в способі лікування нейродегенеративного або когнітивного порушення.

Згідно з одним варіантом здійснення цей винахід відноситься до способу лікування нейродегенеративного або когнітивного порушення, який передбачає введення терапевтично ефективної кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі пацієнтові, що потребує цього.

Нижче представлені наступні варіанти здійснення цього винаходу.

Згідно з одним варіантом здійснення сполука характеризується формулою Ia



Формула Ia;

або являє собою її фармацевтично прийнятну сіль.

Згідно з одним варіантом здійснення R¹ являє собою F або H, зокрема F.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag необов'язково заміщений одним або декількома з F, Cl, Br, CN, C₁-C₃ алкілу, C₁-C₃ фторалкілу або C₁-C₃ алкокси.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений феніл.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений піридил.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений піримідил.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений піразиніл.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений імідазоліл.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений піразоліл.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений тiazоліл.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений оксазоліл.

Згідно з одним варіантом здійснення Ag являє собою необов'язково заміщений ізоксазоліл.

Згідно з одним варіантом здійснення сполука вибрана з групи, що складається з

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-хлорпіколінамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-фторпіколінамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіразин-2-карбоксамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-2-метилоксазол-4-карбоксамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіколінамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(дифторметил)піразин-2-карбоксамід,

5 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-ціанопіколінамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-4-метилгіазол-2-карбоксамід,

10 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіримідин-2-карбоксамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метокси-3-метилпіразин-2-карбоксамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-ціано-3-метилпіколінамід,

15 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-бромпіколінамід,

(S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(метокси-d₃)піколінамід,

20 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(метокси-d₃)піразин-2-карбоксамід

або їх фармацевтично прийнятних солей.

Окремий варіант здійснення відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить сполуку з наведеного вище переліку і фармацевтично прийнятний носій.

25 Інший варіант здійснення відноситься до способу лікування нейродегенеративного або когнітивного порушення, який передбачає введення терапевтично ефективної кількості сполуки з наведеного вище переліку.

Ще один варіант здійснення відноситься до застосування сполуки з наведеного вище переліку для виготовлення лікарського препарату для лікування нейродегенеративного або когнітивного порушення.

30 Один варіант здійснення відноситься до сполуки з наведеного вище переліку для застосування в терапії.

Наступний варіант здійснення відноситься до сполуки з наведеного вище переліку для застосування в лікуванні нейродегенеративного або когнітивного порушення.

Докладний опис винаходу

35 Цей винахід ґрунтується на відкритті сполук формули I, які є інгібіторами BACE1 і, як такі, корисні для лікування пов'язаних порушень. Деякі аспекти цього винаходу пояснені детальніше нижче, але даний опис не призначений для докладного перелічення всіх різних шляхів, якими може бути реалізований цей винахід, або всіх ознак, які можуть бути додані до цього винаходу. У зв'язку з цим наступний опис призначений для ілюстрації деяких варіантів здійснення цього

40 винаходу, а не для того, щоб вичерпним чином вказати всі його зміни, комбінації і варіації.

У використовуваному тут значенні термін "C₁-C₆ алкіл" відноситься до насиченого вуглеводню з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що містить від одного до шести атомів вуглецю включно. Приклади C₁-C₆ алкілу включають без обмеження метил, етил, 1-пропіл, 2-пропіл, 1-бутил, 2-бутил, 2-метил-2-пропіл, 2-метил-1-пропіл, н-пентил і н-гексил. Так само, термін "C₁-C₃ алкіл" відноситься до насиченого вуглеводню з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що містить від одного до трьох атомів вуглецю включно. Приклади таких замісників

45 включають без обмеження метил, етил і н-пропіл.

Так само, термін "C₁-C₆ алкокси" відноситься до насиченої алкоксигрупи з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що містить від одного до шести атомів вуглецю включно, з відкритою валентністю на кисні. Приклади C₁-C₆ алкокси включають без обмеження метокси, етокси, н-бутокси, трет-бутокси і н-гексилокси. "C₁-C₆ алкокси" необов'язково заміщений одним або декількома атомами фтору.

50

Використовуваний в цьому описі винаходу термін "C₁-C₆ фторалкіл" відноситься до насиченого вуглеводню з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що містить від одного до шести атомів вуглецю включно, заміщеного одним або декількома атомами фтору. Приклади C₁-C₆ фторалкілу включають без обмеження трифторметил, пентафторетил, 1-фторетил, монофторметил, дифторметил, 1,2-дифторетил і 3,4-дифторгексил. Так само, термін "C₁-C₃ фторалкіл" відноситься до насиченого вуглеводню з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що містить від одного до трьох атомів вуглецю включно, заміщеного одним або декількома атомами

60 фтору на атом вуглецю.

Термін "галоген" відноситься до фтору, хлору, бромю, а також йоду.

Термін "C₂-C₆ алкеніл" відноситься до розгалуженої або нерозгалуженої алкенільної групи, що містить від двох до шести атомів вуглецю і один подвійний зв'язок, зокрема без обмеження до етенілу, пропенілу і бутенілу.

5 Термін "C₂-C₆ алкініл" означає розгалужену або нерозгалужену алкінільну групу, що містить від двох до шести атомів вуглецю і один потрійний зв'язок, зокрема без обмеження етиніл, пропініл і бутиніл.

10 Фраза "ефективна кількість" в даному контексті в застосуванні до сполуки даного винаходу призначена визначати кількість, достатню для того, щоб викликати необхідний біологічний ефект. Фраза "терапевтично ефективна кількість" при застосуванні до сполуки даного винаходу призначена визначати кількість сполуки, достатню для того, щоб поліпшити, пом'якшити, стабілізувати, обернути, уповільнити або відстрочити прогрес стадії порушення або захворювання або симптому порушення або захворювання. У варіанті здійснення способу цього винаходу запропоновано введення комбінацій сполук. У таких випадках "ефективною кількістю"

15 є кількість сполуки за цим винаходом в комбінації, що є достатньою для забезпечення передбачуваного біологічного ефекту.

Термін "лікування" або "лікувати", як використовується в даному описі винаходу, означає ослабити або обернути прогрес або тяжкість захворювання або порушення або ослабити або обернути один або декілька симптомів або побічних ефектів такого захворювання або порушення. Термін "лікування" або "лікувати", як використовується в даному описі винаходу, також означає інгібувати або блокувати в значенні затримувати, зупиняти, стримувати, перешкоджати або заважати прогресу системи, стану або стадії захворювання або порушення. Для цілей цього винаходу термін "лікування" або "лікувати" також означає підхід для отримання сприятливих або бажаних клінічних результатів, де "сприятливі або бажані клінічні результати"

25 включають, але не обмежуються тільки ними, полегшення симптому, зменшення ступеня порушення або захворювання, стабілізацію (тобто відсутність погіршення) стану захворювання або порушення, відстрочення або уповільнення стану захворювання або порушення, поліпшення або тимчасове полегшення стану захворювання або порушення і ремісію захворювання або порушення частково або повністю.

30 Цей винахід ґрунтується на відкритті того, що сполуки формули I є інгібіторами BACE1 і, як такі, застосовні для лікування порушень, патологічні характеристики яких передбачають відкладення β-амілоїду і нейрофібрилярні клубки, таких як нейродегенеративні або когнітивні порушення.

35 Передбачається, що сполуки цього винаходу, які обговорюються вище, корисні в лікуванні хвороби Альцгеймера завдяки їх впливу на відкладення β-амілоїду і нейрофібрилярні клубки. Це передбачає спадкову хворобу Альцгеймера, коли хворі несуть мутації в певних генах, безпосередньо залучених в продукування пептиду Aβ. Проте важливо відзначити, що скупчення пептиду Aβ не обмежуються спадковою формою хвороби Альцгеймера, але, так само, є важливими патофізіологічними характеристиками поширенішої спорадичної форми хвороби Альцгеймера [Mol Cell Neurosci, 66, 3-11, 2015].

40 Також вважають, що сполуки цього винаходу застосовні в лікуванні хвороби Альцгеймера на ранній стадії, тобто на стадіях захворювання, на яких біологічні і структурні зміни почалися, але клінічні прояви захворювання ще не стали очевидними або ще добре не розвинулися. Рання стадія хвороби Альцгеймера може, по суті, починатися роками раніше, ніж виявляється будь-який клінічний прояв захворювання. Рання стадія хвороби Альцгеймера включає продромальну стадію хвороби Альцгеймера, доклінічну стадію хвороби Альцгеймера і помірний когнітивний розлад. Хоча помірний когнітивний розлад може не бути пов'язаним з хворобою Альцгеймера, він часто є проміжною стадією хвороби Альцгеймера або наслідком хвороби Альцгеймера. Доклінічна і продромальна стадії хвороби Альцгеймера є безсимптомними стадіями, і, як правило, їх діагностують за наявністю пов'язаних з хворобою Альцгеймера біомаркерів. У цьому контексті вважають, що сполуки цього винаходу корисні для уповільнення прогресу хвороби Альцгеймера ранньої стадії, такої як від помірного когнітивного розладу до хвороби Альцгеймера. Також вважають, що сполуки цього винаходу застосовні в лікуванні втрати пам'яті, дефіцитів уваги і деменції, що асоціюється з хворобою Альцгеймера.

55 Інші хвороби, на додаток до континууму хвороби Альцгеймера, характеризуються відкладеннями β-амілоїду і нейрофібрилярними клубками. Вони включають, наприклад, трисомію 21, також відому як синдром Дауна. Пацієнти, страждаючі на синдром Дауна, мають зайву хромосому 21, при цьому дана хромосома містить ген білка-попередника амілоїду (APP). Зайва хромосома 21 приводить до надекспресії APP, що веде до підвищення рівнів пептиду Aβ, який зрештою викликає значно зростаючий ризик розвитку хвороби Альцгеймера, що

60

спостерігається у пацієнтів з синдромом Дауна [Alzheimer's & Dementia, 11, 700-709, 201]. Церебральна амілоїдна ангіопатія також характеризується відкладеннями β-амілоїду і нейрофібрилярними клубками в кровноносних судинах центральної нервової системи [Pharmacol Reports, 67, 195-203, 2015] і з цієї причини, як очікується, піддається лікуванню сполуками цього винаходу.

Згідно з одним варіантом здійснення цей винахід відноситься до способу лікування захворювання, вибраного з хвороби Альцгеймера (спадкової або спорадичної форми), доклінічної стадії хвороби Альцгеймера, продромальної стадії хвороби Альцгеймера, помірного когнітивного розладу, синдрому Дауна і церебральної амілоїдної ангіопатії, при цьому спосіб передбачає введення терапевтично ефективної кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі пацієнтові, що потребує цього.

Цей винахід, крім того, відноситься до способу інгібування BACE1 у пацієнта, який передбачає введення пацієнтові, що потребує цього, терапевтично ефективної кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

Цей винахід також відноситься до способу інгібування опосередкованого β-секретазою розщеплювання білка-попередника амілоїду, який передбачає введення пацієнтові при необхідності такого лікування терапевтично ефективної кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

Згідно з наступними варіантами здійснення цей винахід відноситься до застосування сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського препарату для лікування захворювання, вибраного з хвороби Альцгеймера (спадкової або спорадичної форми), доклінічної стадії хвороби Альцгеймера, продромальної стадії хвороби Альцгеймера, помірного когнітивного розладу, синдрому Дауна або церебральної амілоїдної ангіопатії.

Цей винахід також відноситься до застосування сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського препарату для інгібування BACE1. Цей винахід, крім того, відноситься до застосування сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського препарату для інгібування продукування або накопичення пептиду Aβ.

Згідно з одним варіантом здійснення цей винахід відноситься до сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі для застосування в способі лікування захворювання, вибраного з хвороби Альцгеймера (спадкової або спорадичної форми), доклінічної стадії хвороби Альцгеймера, продромальної стадії хвороби Альцгеймера, помірного когнітивного розладу, синдрому Дауна або церебральної амілоїдної ангіопатії.

Згідно з одним варіантом здійснення цей винахід відноситься до сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі для застосування в способі інгібування BACE1 або в способі інгібування продукування або накопичення пептиду Aβ.

Згідно з наступним варіантом здійснення цей винахід відноситься до фармацевтичного складу, адаптованого до будь-якого із згаданих вище методів лікування і застосувань.

Згідно з одним варіантом здійснення ссавцем є людина.

Згідно з одним варіантом здійснення пацієнтом є людина.

Цей винахід також відноситься до солей сполук цього винаходу, як правило, фармацевтично прийнятних солей. Такі солі включають фармацевтично прийнятні кислотно-адитивні солі. Кислотно-адитивні солі включають солі неорганічних кислот, а також органічних кислот.

Типові приклади відповідних неорганічних кислот включають хлористоводневу, бромистоводневу, йодистоводневу, фосфорну, сірчану, сульфамінову, азотну кислоти і т. п. Типові приклади відповідних органічних кислот включають мурашину, оцтову, трихлороцтову, трифтороцтову, пропіонову, бензойну, коричну, лимонну, фумарову, гліколеву, ітаконову, молочну, метансульфонову, малеїнову, яблучну, малонову, мигдалеву, оксалінову, пікринову, піровиноградну, саліцилову, бурштинову, метансульфонову, етансульфонову, винну, аскорбінову, памову, бісметиленсаліцилову, етандисульфонову, глюконову, цитраконову, аспарагінову, стеаринову, пальмітинову, EDTA, гліколеву, п-амінобензойну, глутамінову, бензолсульфонову, п-толуолсульфонову кислоти, теофілін-оцтові кислоти, а також 8-галогентеофіліни (наприклад, 8-бромтеофілін і т. п.). Додаткові приклади фармацевтично прийнятних адитивних солей неорганічних або органічних кислот включають фармацевтично прийнятні солі, перелічені в публікації S. M. Berge, et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 2.

Крім того, сполуки цього винаходу можуть існувати в несольватованій, а також в сольватованій формах з фармацевтично прийнятними розчинниками, такими як вода, етанол і т. п.

Сполуки цього винаходу можуть мати один або декілька асиметричних центрів, і

передбачається, що будь-які оптичні ізомери (тобто енантіомери або діастереомери) у вигляді розділених, очищених або частково очищених оптичних ізомерів і будь-які їх суміші, включаючи рацемічні суміші, тобто суміш стереоізомерів, включені до обсягу даного винаходу.

5 У даному контексті слід розуміти, що якщо вказується енантіомерна форма, то сполука знаходиться в енантіомерному надлишку, наприклад, по суті в чистій формі. Отже, один варіант здійснення цього винаходу відноситься до сполуки цього винаходу, яка характеризується енантіомерним надлишком у щонайменше 60 %, щонайменше 70 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 96 %, переважно щонайменше 98 %.

10 Рацемічні форми можуть бути розділені на оптичні антиподи за допомогою відомих способів, наприклад, розділенням їх діастереомерних солей з оптично активною кислотою і вивільненням оптично активної аміної сполуки шляхом обробки основою. Розділення таких діастереомерних солей можна виконати, наприклад, використовуючи фракційну кристалізацію. Оптично активні кислоти, придатні для цієї мети, можуть включати, але не обмежуватися тільки ними, d- або l-винну, мигдалеву кислоти або камфорсульфофосфатної кислоти. Інший спосіб розділення рацематів на оптичні антиподи заснований на хроматографії на оптично активній матриці. Сполуки цього винаходу можна також розділяти шляхом утворення і хроматографічного розділення діастереомерних похідних від хіральних дериватизуючих реагентів, таких як хіральні алкілюючі або ацилюючі реагенти, з подальшим відщепленням хіральної допоміжної частини. Будь-який з вищезгаданих способів можна застосовувати або для розділення оптичних антиподів сполук даного винаходу як таких, або для розділення оптичних антиподів синтетичних проміжних сполук, які потім можна перетворити за способами, описаними в даному описі винаходу, на оптично розділені кінцеві продукти, що є сполуками даного винаходу.

25 Можна використовувати додаткові способи розділення оптичних ізомерів, відомі фахівцям в даній галузі. Такі способи включають ті, які обговорюються J. Jaques, A. Collet і S. Wilen в публікації "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, New York, 1981. Оптично активні сполуки можна також отримувати з оптично активних початкових матеріалів.

30 Цей винахід, крім того, відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі і фармацевтично прийнятний носій. Цей винахід також передбачає фармацевтичну композицію, яка містить терапевтично ефективну кількість однієї з конкретних сполук, розкритих в "Експериментальному розділі", і фармацевтично прийнятний носій.

35 Сполуки цього винаходу можна вводити окремо або в комбінації з фармацевтично прийнятними носіями або ексципієнтами, однією або декількома дозами. Фармацевтичні композиції цього винаходу можна складати з фармацевтично прийнятними носіями або розріджувачами, а також з будь-якими іншими відомими ад'ювантами і ексципієнтами згідно із загальноприйнятими методиками, як, наприклад, методиками, розкритими в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 2013.

40 Фармацевтичні композиції для перорального введення включають тверді лікарські форми, такі як капсули, пігулки, драже, пілюлі, пігулки для розсмоктування, порошки і гранули. За необхідністю композиції можна отримувати з покриттями, такими як ентросолюбільні покриття, або ж їх можна складати так, щоб забезпечити контрольоване вивільнення активного інгредієнта, таке як сповільнене або пролонговане вивільнення, згідно зі способами, добре відомими в цій галузі. Рідкі лікарські форми для перорального введення включають розчини, емульсії, суспензії, сиропи і еліксири. Фармацевтичні композиції для парентерального введення включають стерильні водні і неводні ін'єкційні розчини, дисперсії, суспензії або емульсії, а також стерильні порошки, що підлягають ресуспендуванню в стерильних ін'єкційних розчинах або дисперсіях перед застосуванням. Інші відповідні форми введення включають без обмеження супозиторії, аерозолі, мазі, креми, гелі, інгалятори, шкірні пластири і імплантати.

50 Типові пероральні дозування варіюють від приблизно 0,01 до приблизно 100 мг/кг маси тіла на добу.

55 Сполуки цього винаходу, як правило, використовують у вигляді вільної основи або у вигляді її фармацевтично прийнятної солі. Фармацевтично прийнятну сіль сполуки формули I отримують, наприклад, за традиційним способом шляхом обробки розчину або суспензії вільної основи формули I молярним еквівалентом фармацевтично прийнятної кислоти. Вище описані типові приклади відповідних органічних і неорганічних кислот.

60 Відповідні фармацевтичні носії включають інертні тверді розріджувачі або наповнювачі, стерильні водні розчини і різні органічні розчинники. Приклади твердих носіїв включають лактозу, сульфат кальцію, сахарозу, циклодекстрин, тальк, желатин, агар, пектин, аравійську камедь, стеарат магнію, стеаринову кислоту і етери целюлози нижчих алкілів. Приклади рідких

носіїв включають без обмеження сироп, арахісову олію, оливкову олію, фосфоліпіди, жирні кислоти, аміни жирних кислот, поліоксіетилен і воду. Так само, носій або розріджувач може включати будь-який матеріал для сповільненого вивільнення, відомий у цій галузі, такий як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат, окремо або змішаний з воском. Потім

5 фармацевтичні композиції, утворені шляхом об'єднання сполук Формули I або їх фармацевтично прийнятних солей з фармацевтично прийнятним носієм, легко вводять в різних лікарських формах, відповідних для розкритих шляхів введення. Склади в цілях зручності можуть бути представлені в одиничній лікарській формі за допомогою відомих в галузі фармацевтики способів.

10 Якщо для перорального введення використовується твердий носій, то препарат може бути таблетованим, поміщеним в тверду желатинову капсулу, у формі порошку або пелети, або ж він може бути у формі пастилки або пігулки для розсмоктування. Кількість твердого носія може варіюватися в широких межах, але знаходиться в діапазоні від приблизно 25 мг до приблизно 1 г на дозовану одиницю. Якщо використовується рідкий носій, то препарат може бути у формі

15 сиропу, емульсії, м'якої желатинової капсули або стерильної ін'єкційної рідини, такої як водна або неводна рідка суспензія або розчин.

Експериментальний розділ

20 Сполуки цього винаходу, представлені загальною формулою I, де R¹ і Ag визначені вище, можуть бути отримані за способами, наведеними нижче в схемах реакцій 1-4 і в прикладах. У описаних способах можливо застосовувати варіанти або зміни, які самі по собі відомі хімікам-фахівцям в даній галузі техніки, або можуть бути очевидними звичайному фахівцеві в даній галузі техніки. Крім того, інші способи отримання сполук даного винаходу будуть легко зрозумілими фахівцеві в даній галузі в світлі наведених нижче схем реакцій і прикладів.

25 Наприклад, на схемі 2 описується використання селективних захисних груп при синтезі сполук даного винаходу. Фахівець в даній галузі зможе вибрати відповідну захисну групу для конкретної реакції. Крім того, може бути потрібним включити стратегії встановлення захисту і зняття захисту замісників, таких як аміно-, амідо-, кето- і гідроксильні групи, в способи синтезу, описані нижче, для синтезу сполук Формули I. Способи встановлення захисту і зняття захисту таких груп добре відомі в даній галузі, і їх можна знайти в публікації T. Green, et al., Protective

30 Groups in Organic Synthesis, 1991, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York. Для сполук, які можуть існувати у вигляді суміші або в рівноважному стані між двома або декількома таутомерами, в схемах представлений тільки один таутомер, хоча він може і не бути найбільш стабільним таутомером. Для сполук, які можуть існувати в енантіомерній, стереоізомерній формах або у формі геометричних ізомерів, вказана їх просторова конфігурація; у іншому випадку структура представляє суміш стереоізомерів.

Аналітичні дані PX-MS (LC-MS) отримували з використанням наступних способів.

Спосіб A

40 LC-MS виконували на приладі Waters Acquity UPLC-MS, що складається з Waters Acquity, що включає пристрій керування колонкою, пристрій керування подвійним розчинником, підставку для зразків, детектор з фотодіодною матрицею (PDA) (що функціонує при 254 нм), випарний детектор світлорозсіювання (ELS) і одноквадропольний мас-спектрометр (SQ-MS), обладнаний джерелом з фотоіонізацією при атмосферному тиску (APPI), що працює в режимі позитивних іонів.

45 Умови LC: колонкою була Acquity UPLC BEH C18, 1,7 мкм; 2,1 × 150 мм, що функціонує при 60 °C з витратою потоку 0,6 мл/хв. бінарного градієнта, що складається з води + 0,05 % трифтороцтової кислоти (A) і ацетонітрилу + 5 % води + 0,03 % трифтороцтової кислоти (B). Градієнт: 0,00 хв.: 10 % B; 3,00 хв.: 99,9 % B; 3,01 хв.: 10 % B; 3,60 хв.: 10 % B. Загальний час прогону: 3,60 хв.

Спосіб B

50 LC-MS виконували на Waters Acquity UPLC-MS, що складається з Waters Acquity, що включає пристрій керування колонкою, пристрій керування подвійним розчинником, підставку для зразків, детектор PDA (що функціонує при 254 нм), детектор ELS і тандемний квадрупольний мас-спектрометр (TQ-MS), обладнаний джерелом з фотоіонізацією при атмосферному тиску (APPI), що працює в режимі позитивних іонів.

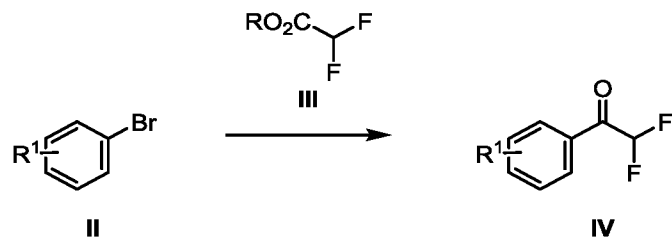
55 Умови LC: колонкою була Acquity UPLC BEH C18, 1,7 мкм; 2,1 × 50 мм, що функціонує при 60 °C з витратою потоку 1,2 мл/хв. бінарного градієнта, що складається з води + 0,05 % трифтороцтової кислоти (A) і ацетонітрилу + 5 % води + 0,05 % трифтороцтової кислоти (B). Градієнт: 0,00 хв.: 10 % B; 1,00 хв.: 100 % B; 1,01 хв.: 10 % B; 1,15 хв.: 10 % B. Загальний час прогону: 1,15 хв.

60 ¹H ЯМР спектри реєстрували при 600 МГц на приладі Bruker Avance AV-III-600 або при 400

МГц на приладі Bruker Avance AV-III-400 або приладі Varian 400. Значення хімічного зсуву виражали в м.д. (ppm) - відносних значеннях. Використовували наступні скорочення для мультиплетності сигналів ЯМР: с = синглет, д = дублет, т = триплет, к = кватрет, дд = дублет дублетів, ддд = дублет дублету дублетів, дт = дублет триплетів, шир. = широкий і м = мультиплет.

5

Як приклад, і де R¹ являє собою фтор в орто-положенні фенільного кільця, сполуки загальної формули IV можуть бути отримані, як показано на схемі 1.



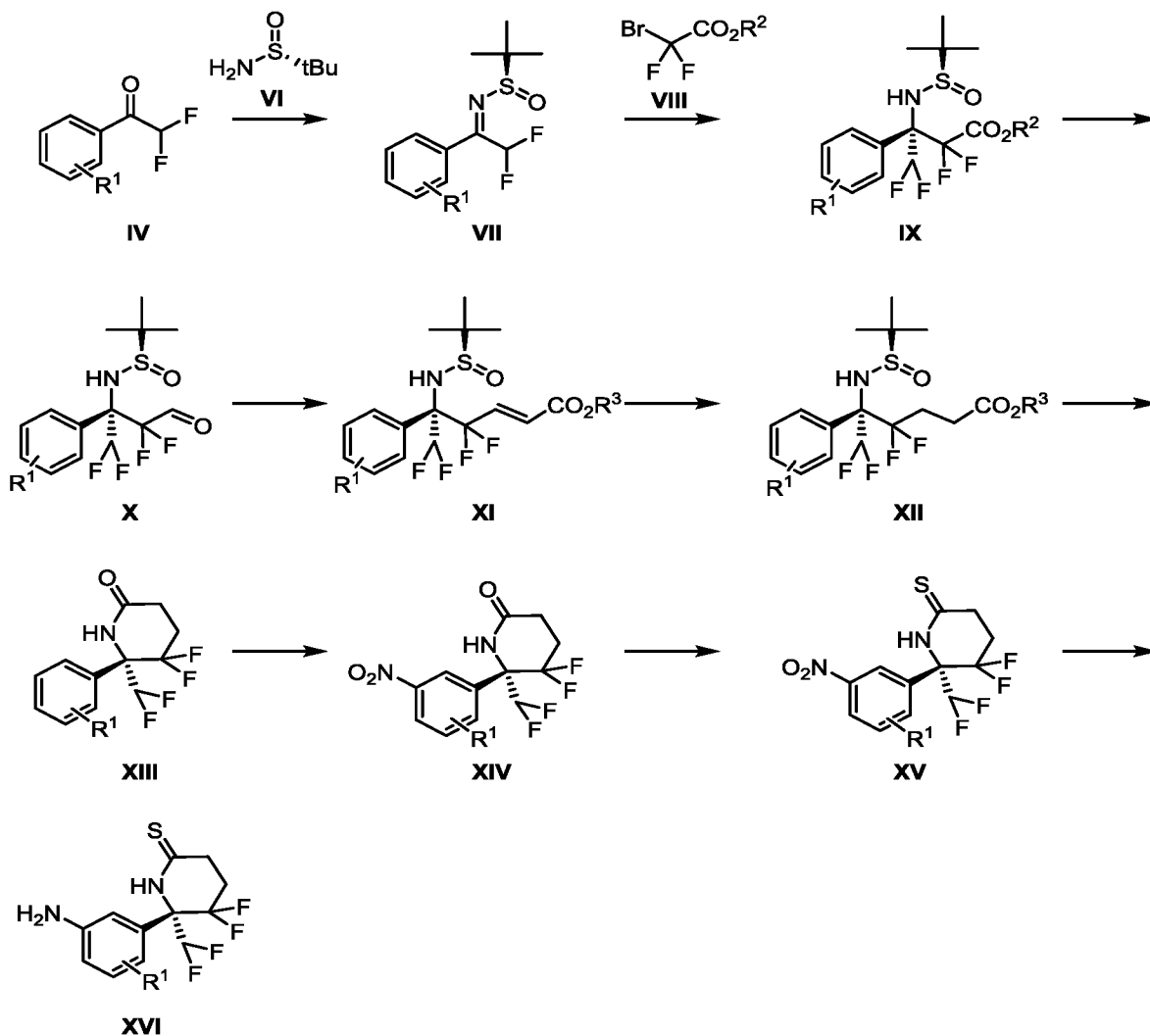
10

де R¹ визначений для формули I, а R являє собою алкільну групу, таку як метил або етил.

Сполуки загальної формули IV (схема 1) можуть бути отримані шляхом реагування сполук загальної формули II з реагентом обміну галоген-метал, таким як бутиллітій, з подальшим додаванням до естеру загальної формули III.

15

Як приклад, і де R¹ являє собою фтор в орто-положенні фенільного кільця, сполука загальної формули XVI може бути отримана, як показано на схемі 2.



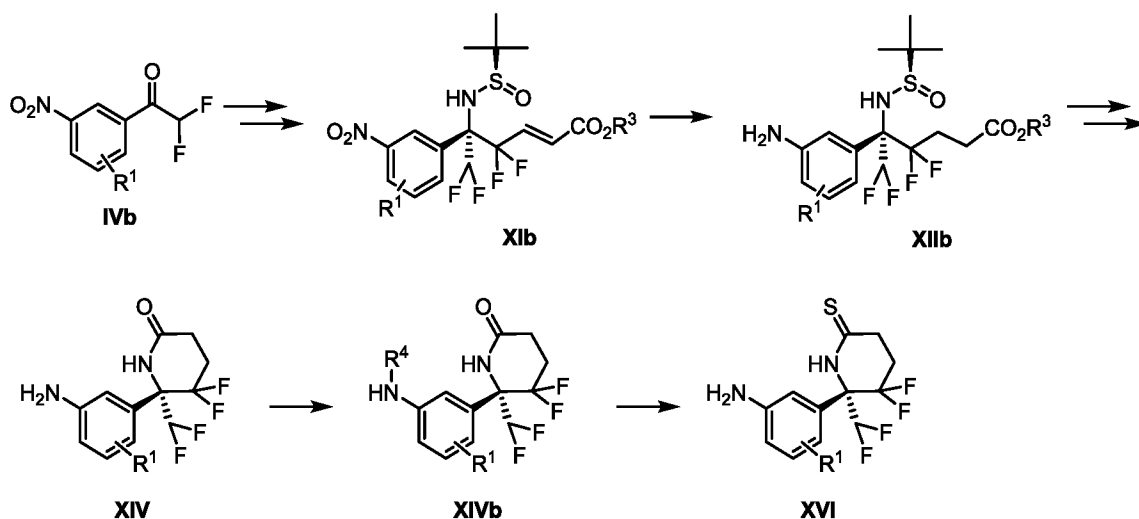
20

де R^2 і R^3 являють собою алкільну групу, таку як метил або етил.

Сполуки загальної формули VII (схема 2) можуть бути отримані шляхом реагування сполук загальної формули IV з сульфінамідом, таким як VI, у присутності кислоти Льюїса/осушника, такого як титану тетраоксид. Обробка сполук загальної формули VII сполуками загальної формули VIII, такими як етилбромдифторацетат, у присутності порошку Zn або у присутності діетилцинку і трис(трифенілфосфін)родію(I) хлориду дає сполуки загальної формули IX. Сполуки загальної формули X отримують із сполук загальної формули IX шляхом обробки відновником, таким як діізобутилалюмінію гідрид. В деяких випадках сполука X може знаходитися в рівновазі з гідратною формою. Обробка сполук загальної формули X з умовами, такими як метил-2-(диметоксифосфорил)-ацетат, у присутності літію хлориду і основи, такої як N, N-діізопропілетиламін, дає сполуки загальної формули XI. Сполуки загальної формули XII отримують шляхом гідрогенізації сполук загальної формули XI у присутності каталізатора, такого як паладій на вуглецевому носіїві. Сполуки загальної формули XIII отримують шляхом обробки сполук загальної формули XII кислотою, такою як хлористоводнева кислота, в метанолі з подальшою обробкою калію карбонатом в метанолі або нагріванням в розчиннику, такому як толуол. Сполуки загальної формули XIII можуть бути нітровані з використанням азотної кислоти з отриманням сполук загальної формули XIV. Обробка сполук загальної формули XIV реагентом, таким як реагент Лавессона (2,4-біс(4-метоксифеніл)-1,3,2,4-дитіадифосфетан-2,4-дисульфід), дає сполуки загальної формули XV. Відновлення нітрогрупи сполук загальної формули XV дає сполуки загальної формули XVI.

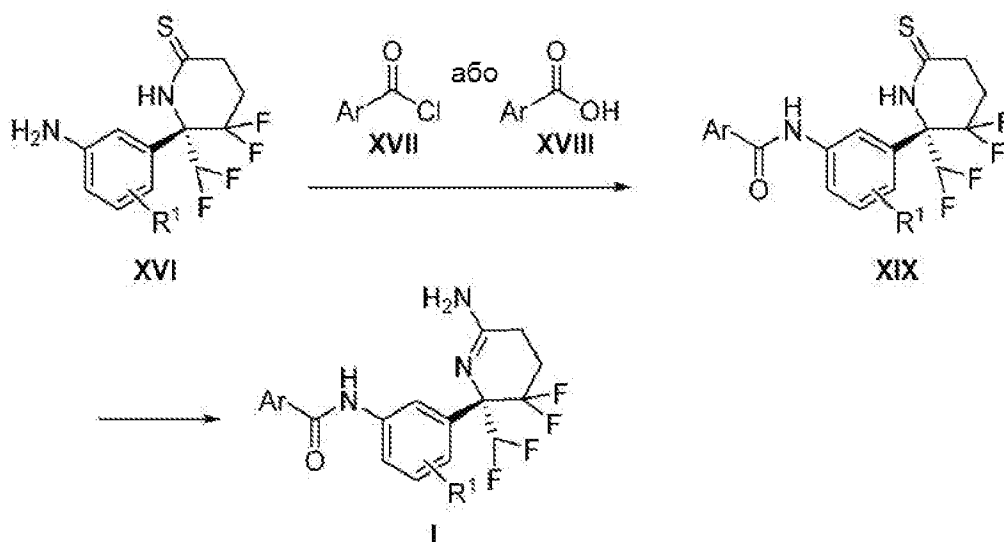
Сполуки загальної формули XIV також можуть бути отримані, як показано на схемі 3. Виходячи з нітро-заміщених ацетофенонів загальної формули IVb можуть бути отримані сполуки загальної формули XIb, як показано на схемі 2. Сполуки загальної формули XIIIb отримують шляхом гідрогенізації сполук загальної формули XIb у присутності каталізатора, такого як паладій на вуглецевому носіїві. Сполуки загальної формули XIV можуть бути отримані, як показано на схемі 2 для отримання сполук загальної формули XIII із сполук загальної формули XII. Захист анілінового фрагмента сполук загальної формули XIV дає сполуки загальної формули XIVb. Обробка сполук загальної формули XIVb реагентом, таким як реагент Лавессона (2,4-біс(4-метоксифеніл)-1,3,2,4-дитіадифосфетан-2,4-дисульфід), з подальшим зняттям захисту анілінового фрагмента дає сполуки загальної формули XVI.

Схема 3



де R^1 визначений для формули I, і R^3 являє собою алкільну групу, таку як метил або етил. Сполуки загальної формули I можуть бути отримані, як показано на схемі 4.

Схема 4

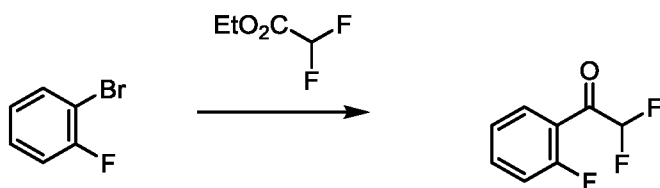


де R¹ і Ar є такими, як визначено для формули I.

Сполуки загальної формули XIX можуть бути отримані шляхом реагування сполук загальної формули XVI з хлорангідридом карбонової кислоти загальної формули XVII або шляхом реакції з карбоновою кислотою загальної формули XVIII з використанням процедур, відомих хімікам, що є фахівцями в даній галузі. Обробка сполук загальної формули XIX аміаком дає сполуки загальної формули I. В деяких випадках додавання окислювального реагенту, такого як трет-бутилгідропероксид, може бути необхідним, щоб полегшити перебіг реакції.

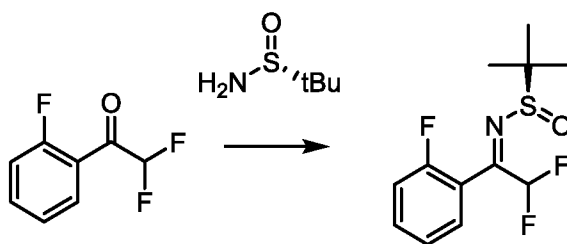
Отримання проміжних сполук

Проміжна сполука: 2,2-дифтор-1-(2-фторфеніл)етан-1-он



До розчину 1-бром-2-фторбензолу (10,00 г, 57,14 ммоль) в THF (200 мл) краплями додавали н-бутиллітій (2,5 М, 24,00 мл) при -78 °С протягом періоду у 15 хвилин в атмосфері N₂. Суміш перемішували при -78 °С протягом 30 хв. Краплями додавали етил-2,2-дифторацетат (10,64 г, 85,71 ммоль) при -78 °С і перемішували протягом 2 годин при -78 °С. Тонкошарова хроматографія (TLC) показувала відсутність початкового матеріалу. Насичений водний NH₄Cl (15 мл) краплями додавали при -78 °С. Реакційну суміш нагрівали до 25 °С, екстрагували етилацетатом (100 мл, три рази). Об'єднані органічні фази промивали сольовим розчином (30 мл), сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували під вакуумом. Залишок очищали колоночною хроматографією на силікагелі (петролейний ефір:етилацетат = 95:5) з отриманням 2,2-дифтор-1-(2-фторфеніл)етан-1-ону (5,60 г, вихід 47,8 %, чистота 85 %). ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,99-7,95 (м, 1H), 7,70-7,64 (м, 1H), 7,33 (т, J=7,6 Гц, 2H), 7,24 (дд, J=10,8, 8,4 Гц, 1H), 6,59-6,32 (м, 1H).

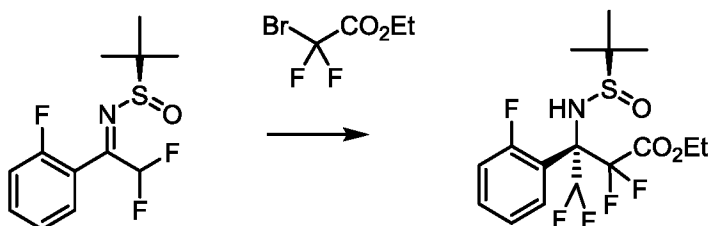
Проміжна сполука: (R)-N-(2,2-дифтор-1-(2-фторфеніл)етиліден)-2-метилпропан-2-сульфінамід



30

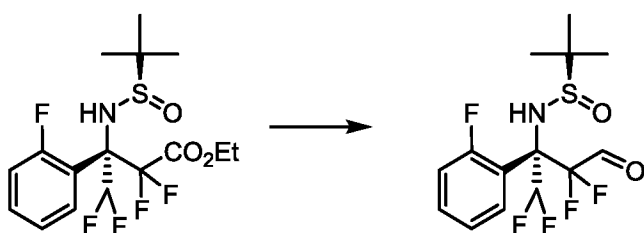
До розчину 2,2-дифтор-1-(2-фторфеніл)етан-1-ону (5,60 г, 32,16 ммоль) і (R)-2-метилпропан-2-сульфінамід (5,07 г, 41,81 ммоль) у THF (110 мл) додавали тетраетоксититан (14,67 г, 64,32 ммоль) однією порцією при 26 °С. Жовтий розчин перемішували при 80 °С протягом 2,5 години. TLC (петролейний ефір:етилацетат = 3:1) показувала відсутність початкового матеріалу. Суміш охолоджували до 26 °С. У суміш додавали воду (10 мл), фільтрували її і екстрагували етилацетатом (60 мл, три рази). Органічний шар промивали сольовим розчином, сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували, а потім очищали колоночною хроматографією на силікагелі (петролейний ефір:етилацетат = 91:9) з отриманням (R)-N-2,2-дифтор-1-(2-фторфеніл)етиліден)-2-метилпропан-2-сульфінамід (5,60 г, вихід 61,6 %, чистота 98,1 %).

Проміжна сполука: етил-(S)-3-(((R)-трет-бутилсульфініл)аміно)-2,2,4,4-тетрафтор-3-(2-фторфеніл)бутаноат



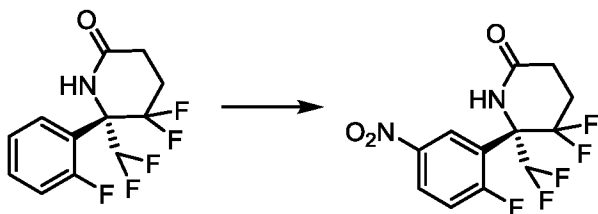
До розчину (R)-N-(2,2-дифтор-1-(2-фторфеніл)етиліден)-2-метилпропан-2-сульфінамід (4,60 г, 16,6 ммоль), етил-2-бром-2,2-дифторацетату (6,73 г, 33,18 ммоль) і Rh(PPh₃)₃Cl (469 мг, 498 мкмоль) в THF (90 мл) краплями додавали розчин діетилцинку (1 М в THF, 33 мл) при -78 °С протягом періоду у 20 хвилин в атмосфері Ar, в ході чого температуру підтримували нижче -65 °С. Реакційну суміш нагрівали до 0 °С протягом періоду у 10 хвилин і перемішували при 0 °С протягом 2 годин. TLC (петролейний ефір/етилацетат = 3:1) показувала повне витрачання початкового матеріалу. Темно-червоний розчин гасили водою (40 мл), а потім фільтрували. Фільтрат екстрагували етилацетатом (100 мл, двічі). Об'єднані органічні фази промивали насиченим сольовим розчином (30 мл), сушили над безводним Na₂SO₄, фільтрували і концентрували під вакуумом. Неочищений продукт очищали колоночною хроматографією на силікагелі (петролейний ефір/етилацетат = 4:1) з отриманням етил-(S)-3-(((R)-трет-бутилсульфініл)аміно)-2,2,4,4-тетрафтор-3-(2-фторфеніл)бутаноату (4,26 г, вихід 62,1 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц): δ 7,65-7,31 (м, 1H), 7,49-7,44 (м, 1H), 7,23-7,12 (м, 2H), 6,93-6,66 (м, 1H), 5,00 (с, 1H), 4,39-4,29 (м, 2H), 1,39 (с, 9H), 1,32 (т, J=8,0 Гц, 3H).

Проміжна сполука: (R)-2-метил-N-((S)-1,1,3,3-тетрафтор-2-(2-фторфеніл)-4-оксобутан-2-іл)пропан-2-сульфінамід



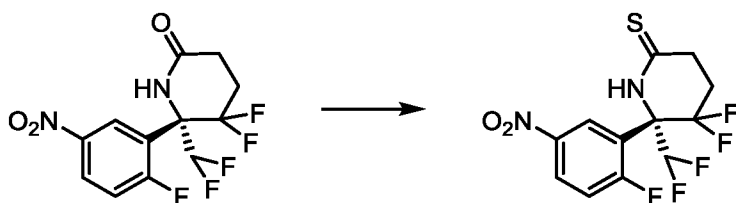
До розчину етил-(S)-3-(((R)-трет-бутилсульфініл)аміно)-2,2,4,4-тетрафтор-3-(2-фторфеніл)бутаноату (3,20 г, 7,97 ммоль) в сухому THF (35 мл) краплями додавали розчин DIBAL-H (діізобутилалюмінію гідрид) в толуолі (1,0 М, 16 мл, 16 ммоль) при -78 °С у атмосфері N₂. Суміш перемішували при -78 °С протягом 2 годин. Реакцію обережно гасили метанолом (3 мл) при -78 °С. Потім додавали воду (20 мл) і етилацетат (200 мл) і суміш нагрівали до 25 °С. Суміш витримували протягом 30 хвилин. Отриману суміш фільтрували через шар з целіту. Органічний шар промивали сольовим розчином і сушили над Na₂SO₄. Органічний шар концентрували з отриманням неочищеного продукту (R)-2-метил-N-((S)-1,1,3,3-тетрафтор-2-(2-фторфеніл)-4-оксобутан-2-іл)пропан-2-сульфінамід, який безпосередньо використовували на наступній стадії без додаткового очищення.

ПРОМПКНА СПОЛУКА: етил-(S)-5-(((R)-трет-бутилсульфініл)аміно)-4,4,6,6-тетрафтор-5-(2-фторфеніл)гекс-2-еноат



5 (S)-6-(Дифторметил)-5,5-дифтор-6-(2-фторфеніл)піперидин-2-он (880 мг, 3,15 ммоль) суспендували в трифтороцтовій кислоті (2,55 мл). Суміш охолоджували до 0 °С і додавали концентровану H₂SO₄ (2,46 г, 24,3 ммоль). Потім краплями додавали HNO₃ (661,61 мг, 6,30 ммоль). Після 2 годин перемішування при 25 °С реакційну суміш виливали на 100 г льоду і підлужували до pH > 11 з використанням 5 М NaOH (водн.). Суспензію екстрагували етилацетатом (150 мл). Фази розділяли, а водний шар екстрагували етилацетатом (2 × 70 мл). Об'єднані органічні фази промивали розчином насиченого водного NH₄Cl (30 мл) і води (30 мл), сушили над MgSO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням (S)-6-

10 (дифторметил)-5,5-дифтор-6-(2-фтор-5-нітрофеніл)піперидин-2-ону (1,00 г, неочищений).
Проміжна сполука: (S)-6-(дифторметил)-5,5-дифтор-6-(2-фтор-5-нітрофеніл)піперидин-2-тіон



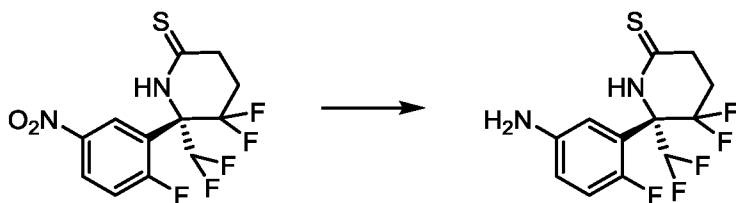
15

До розчину (S)-6-(дифторметил)-5,5-дифтор-6-(2-фтор-5-нітрофеніл)піперидин-2-ону (1,00 г, 3,08 ммоль) в толуолі (5 мл) додавали реагент Лавессона (2,4-біс(4-метоксифеніл)-1,3,2,4-дитіадифосфетан-2,4-дисульфід) (686 мг, 1,70 ммоль). Суміш перемішували при 100 °С протягом 2 годин. Аналіз TLC показував відсутність початкового матеріалу. Суміш концентрували і неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на силікагелі (петролейний ефір:етилацетат = 5:1) з отриманням (S)-6-(дифторметил)-5,5-дифтор-6-(2-фтор-5-нітрофеніл)піперидин-2-тіону (1,00 г, 2,94 ммоль, вихід 95,4 %).

20

Проміжна сполука: (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіон

25



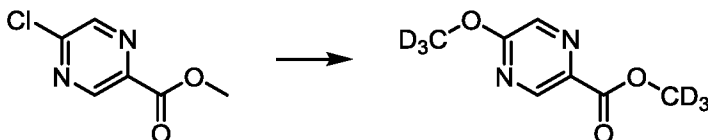
До суспензії (S)-6-(дифторметил)-5,5-дифтор-6-(2-фтор-5-нітрофеніл)піперидин-2-тіону (1,00 г, 2,94 ммоль) в етанолі (15 мл) і воді (4 мл) додавали порошок заліза (821 мг, 145 ммоль) і NH₄Cl (786 мг, 14,7 ммоль, 5,0 екв.). Чорну суміш перемішували при 60 °С протягом 18 годин. Після охолодження реакційної суміші до 25 °С неочищений продукт фільтрували і залишок промивали етанолом (100 мл). Об'єднані фільтрати концентрували і отриману тверду речовину диспергували в етилацетаті (100 мл). Суміш фільтрували і фільтрат промивали водою (30 мл), сольовим розчином (20 мл) і концентрували. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на діоксиді кремнію (петролейний ефір:етилацетат = 3:1~2:1) з отриманням (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону (819 мг, 2,51 ммоль, вихід 85,3 %). ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц): δ 10,97 (с, 1H), 7,03-6,90 (м, 2H), 6,64-6,55 (м, 2H), 5,19 (с, 2H), 3,19-3,15 (м, 1H), 3,03-2,94 (м, 1H), 2,35 – 2,24 (м, 2H).

30

35

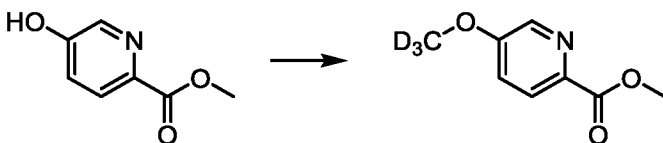
Проміжна сполука: метил-d₃-5-(метокси-d₃)піразин-2-карбоксилат

40



Натрій (0,094 г, 4,10 ммоль) додавали невеликими порціями до метанолу-d₄ (2,94 мл) і реакційну суміш перемішували до повного реагування натрію. Розчин додавали в інший розчин метил-5-хлорпіразин-2-карбоксилату (0,6 г, 3,48 ммоль) в метанолі-d₄ (0,98 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 1,5 години при кімнатній температурі. Реакційну суміш концентрували під вакуумом. Додавали 2 мл води. Суміш екстрагували етилацетатом. Органічну фазу промивали сольовим розчином, сушили над MgSO₄ і концентрували під вакуумом з отриманням метил-d₃-5-(метокси-d₃)піразин-2-карбоксилату.

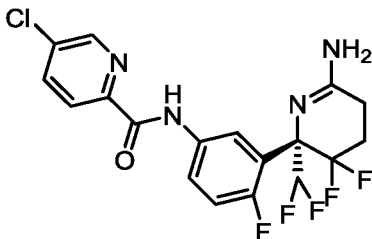
Проміжна сполука: метил-5-(метокси-d₃)піколінат



Метил-5-гідроксипіколінат (2,88 г, 18,8 ммоль) розчиняли в диметилформаміді (108 мл) в атмосфері аргону. Додавали калію карбонат (7,20 г, 52,1 ммоль) і оранжеву суспензію перемішували протягом 45 хвилин при кімнатній температурі. Додавали йодметан-d₃ (1,41 мл, 22,6 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин. Додавали воду. Суміш екстрагували етилацетатом. Органічну фазу промивали сольовим розчином, сушили над MgSO₄, концентрували під вакуумом і очищали колоночною хроматографією на силікагелі (гептан:етилацетат) з отриманням метил-5-(метокси-d₃)піколінату.

Отримання сполук цього винаходу

Приклад 1: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-хлорпіколінамід (сполука 1)

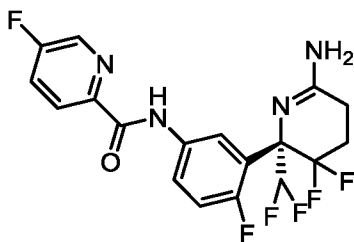


5-Хлорпіколінову кислоту (19 мг, 0,12 ммоль) і НАТУ (1-[біс(диметиламіно)метилен]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]піридинію 3-оксид гексафторфосфат) (67,4 мг, 0,177 ммоль) розчиняли в DMF (1 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 5 хвилин. Потім додавали (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіон (25 мг, 0,081 ммоль) і DIPEA (N, N-діізопропілетиламін) (52 мг, 0,07 мл, 0,4 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Додавали насичений водний NH₄Cl і суміш екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні фази промивали сольовим розчином, сушили над MgSO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Додавали аміак в метанолі (7M, 2 мл) і реакційну суміш перемішували при 55 °C в закупореній судині протягом ночі. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на діоксиді кремнію (гептан:етилацетат). Продукт розчиняли в етилацетаті і промивали 5 разів насиченим водним NaHCO₃/водою для видалення тіосечовинних побічних продуктів. Об'єднані органічні фази промивали сольовим розчином, сушили над MgSO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-хлорпіколінамід. ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 600 МГц): δ 10,78 (с, 1H), 8,79 (дт, J=2,4, 1,1 Гц, 1H), 8,20 (дд, J=8,4, 2,4 Гц, 1H), 8,16 (дд, J=8,4, 0,7 Гц, 1H), 7,96 – 7,90 (м, 1H), 7,88 (дд, J=6,8, 2,7 Гц, 1H), 7,20 (дд, J=11,6, 8,8 Гц, 1H), 6,74 (т, J=55,2 Гц, 1H), 6,38 (с, 2H), 2,51 (дт, J=3,7, 1,8 Гц, 2H), 2,19 – 1,98 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 433 (MH⁺); t_R=0,53 хвилини (Спосіб А)

Приклад 2: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-

фторфеніл)-5-фторпіколінамід (сполука 2)

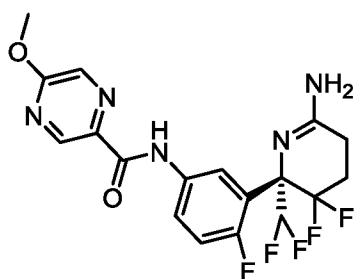


5 Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-фторпіколінової кислоти.

¹H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,72 (с, 1H), 8,74 (д, J=2,8 Гц, 1H), 8,24 (дд, J=8,7, 4,6 Гц, 1H), 7,99 (тд, J=8,7, 2,8 Гц, 1H), 7,95 – 7,91 (м, 1H), 7,88 (дд, J=6,8, 2,7 Гц, 1H), 7,20 (дд, J=11,6, 8,8 Гц, 1H), 6,74 (т, J=55,2 Гц, 1H), 6,38 (с, 2H), 2,56 – 2,50 (м, 2H), 2,22 – 1,98 (м, 2H).

10 LC-MS (маса/заряд) 417,1 (MH⁺); t_R=0,49 хвилини (Спосіб А)

Приклад 3: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіразин-2-карбоксамід (сполука 3)



15

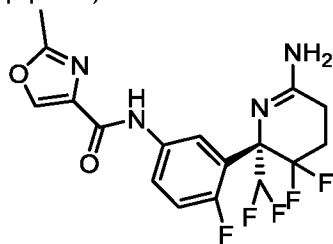
Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-метоксипіразин-2-карбонової кислоти.

¹H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,61 (с, 1H), 8,89 (д, J=1,3 Гц, 1H), 8,42 (д, J=1,3 Гц, 1H), 7,90 (м, 2H), 7,20 (дд, J=11,6, 8,9 Гц, 1H), 6,86 – 6,62 (м, 1H), 6,37 (с, 2H), 4,02 (с, 3H), 2,56 – 2,50 (м, 2H), 2,19 – 1,96 (м, 2H).

20

LC-MS (маса/заряд) 430,1 (MH⁺); t_R=0,48 хвилини (Спосіб А)

Приклад 4: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-2-метилоксазол-4-карбоксамід (сполука 4)



25

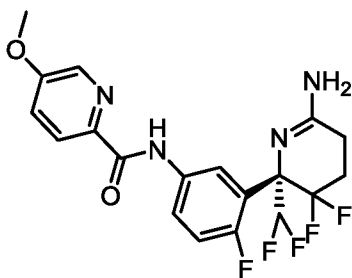
Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 2-метилоксазол-4-карбонової кислоти.

¹H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,25 (с, 1H), 8,64 (с, 1H), 7,82 (м, 2H), 7,16 (дд, J=11,6, 8,7 Гц, 1H), 6,73 (т, J=55,2 Гц, 1H), 6,36 (с, 2H), 3,01 (с, 1H), 2,59 – 2,41 (м, 5H), 2,19 – 1,96 (м, 2H).

30

LC-MS (маса/заряд) 403 (MH⁺); t_R=0,42 хвилини (Спосіб А)

Приклад 5: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіколінамід (сполука 5)

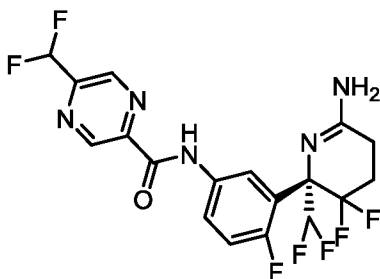


Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-метоксипіколінової кислоти.

5 ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,55 (с, 1H), 8,40 (д, $J=2,9$ Гц, 1H), 8,13 (д, $J=8,7$ Гц, 1H), 7,94 – 7,90 (м, 1H), 7,84 (дд, $J=6,7, 2,7$ Гц, 1H), 7,62 (дд, $J=8,7, 2,9$ Гц, 1H), 7,18 (дд, $J=11,6, 8,8$ Гц, 1H), 6,85 – 6,61 (м, 1H), 6,36 (с, 2H), 3,93 (с, 3H), 2,55 – 2,47 (м, 2H), 2,17 – 2,00 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 429,1 (MH^+); $t_{\text{R}}=0,5$ хвилини (Спосіб А)

10 Приклад 6: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(дифторметил)піразин-2-карбоксамід (сполука 6)

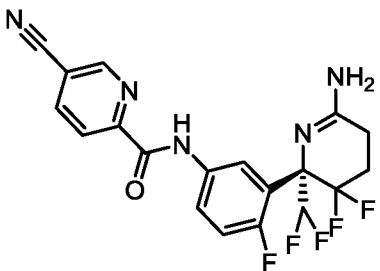


15 Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-дифторметилпіразин-2-карбонової кислоти.

^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 11,02 (с, 1H), 9,40 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 9,10 (с, 1H), 7,96 – 7,91 (м, 2H), 7,38 – 7,17 (м, 2H), 6,75 (т, $J=55,1$ Гц, 1H), 6,38 (с, 2H), 2,56 – 2,50 (м, 2H), 2,20 – 1,98 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 450,1 (MH^+); $t_{\text{R}}=0,48$ хвилини (Спосіб А)

20 Приклад 7: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-ціанопіколінамід (сполука 7)

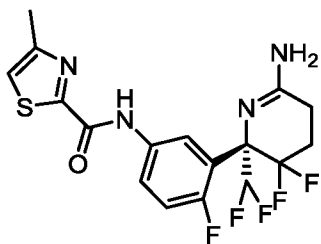


25 Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-ціанопіколінової кислоти.

^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,94 (с, 1H), 9,21 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 8,59 (дд, $J=8,2, 1,9$ Гц, 1H), 8,29 (д, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,96 – 7,88 (м, 2H), 7,22 (дд, $J=11,5, 8,8$ Гц, 1H), 6,74 (т, $J=55,0$ Гц, 1H), 6,37 (с, 2H), 2,57 – 2,48 (м, 2H), 2,07 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 424,5 (MH^+); $t_{\text{R}}=0,45$ хвилини (Спосіб В)

30 Приклад 8: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-4-метилтіазол-2-карбоксамід (сполука 8)

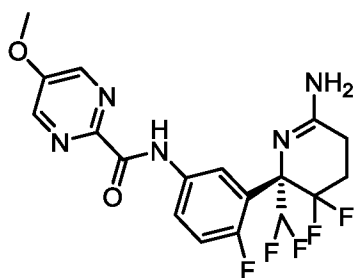


Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 4-метилтіазол-2-карбонової кислоти.

5 ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,84 (с, 1H), 7,90 (дд, $J=6,7, 2,5$ Гц, 1H), 7,88 – 7,83 (м, 1H), 7,70 (с, 1H), 7,19 (дд, $J=11,5, 8,9$ Гц, 1H), 6,74 (т, $J=55,1$ Гц, 1H), 6,38 (с, 2H), 2,59 – 2,46 (м, 5H), 2,18 – 1,95 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 419,4 (MH⁺); $t_R=0,47$ хвилини (Спосіб В)

10 Приклад 9: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіримідин-2-карбоксамід (сполука 9)

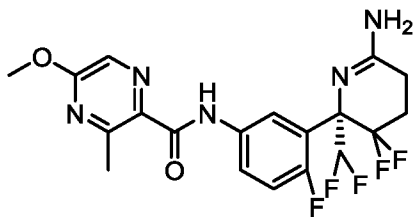


Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-метоксипіримідин-2-карбонової кислоти.

15 ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,73 (с, 1H), 8,73 (с, 2H), 7,95 – 7,91 (м, 1H), 7,82 (дд, $J=6,7, 2,5$ Гц, 1H), 7,22 – 7,18 (м, 1H), 6,74 (т, $J=55,2$ Гц, 1H), 6,37 (с, 2H), 4,03 (с, 3H), 2,58 – 2,50 (м, 2H), 2,18 – 1,99 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 430,5 (MH⁺); $t_R=0,39$ хвилини (Спосіб В)

20 Приклад 10: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метокси-3-метилпіразин-2-карбоксамід (сполука 10)

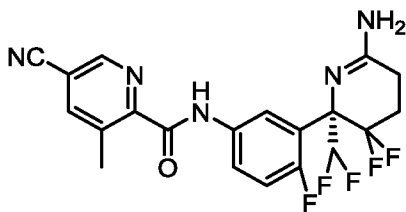


Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-метокси-3-метилпіразин-2-карбонової кислоти.

25 ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,52 (с, 1H), 8,24 (д, $J=0,6$ Гц, 1H), 7,91 (ддд, $J=8,8, 4,1, 2,8$ Гц, 1H), 7,74 (дд, $J=6,8, 2,7$ Гц, 1H), 7,18 (дд, $J=11,7, 8,8$ Гц, 1H), 6,85 – 6,62 (м, 1H), 6,38 (с, 2H), 3,99 (с, 3H), 2,76 (д, $J=0,5$ Гц, 3H), 2,55 – 2,49 (м, 2H), 2,18 – 1,99 (м, 2H).

30 LC-MS (маса/заряд) 444,5 (MH⁺); $t_R=0,52$ хвилини (Спосіб В)

Приклад 11: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-ціано-3-метилпіколінамід (сполука 11)

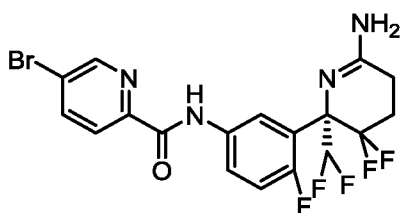


Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-ціано-3-метилпіколінової кислоти.

5 ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,80 (с, J=27,6 Гц, 1H), 8,99 (д, J=1,2 Гц, 1H), 8,40 (с, 1H), 7,99 – 7,87 (м, 1H), 7,82 – 7,69 (м, 1H), 7,36 – 7,13 (м, 1H), 6,73 (т, J=55,0 Гц, 1H), 6,36 (с, 2H), 2,56 – 2,47 (м, 2H), 2,21 – 1,97 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 438,1 (MH⁺); t_R =0,49 хвилини (Спосіб В)

10 Приклад 12: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-бромпіколінамід (сполука 12)

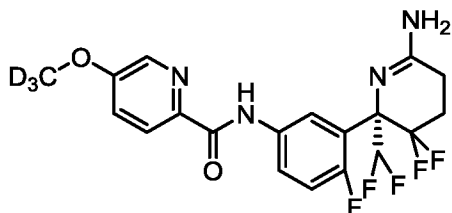


Отримували як в прикладі 1 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-бромпіколінової кислоти.

15 ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,78 (с, 1H), 8,87 (дд, J=2,3, 0,7 Гц, 1H), 8,33 (дд, J=8,4, 2,3 Гц, 1H), 8,09 (дд, J=8,4, 0,6 Гц, 1H), 7,94 (ддд, J=8,8, 4,1, 2,8 Гц, 1H), 7,89 (дд, J=6,8, 2,7 Гц, 1H), 7,21 (дд, J=11,6, 8,8 Гц, 1H), 6,88 – 6,62 (м, 1H), 6,39 (с, 2H), 2,60 – 2,49 (м, 2H), 2,19 – 1,96 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 479,1 (MH⁺); t_R =0,53 хвилини (Спосіб В)

20 Приклад 13: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(метокси-d₃)піколінамід (сполука 13)

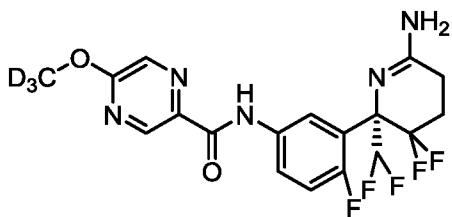


25 (S)-6-(5-Аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіон (25 мг, 0,081 ммоль) розчиняли в дихлорметані (1 мл) в атмосфері аргону. Поволі додавали триметилалюміній (52 мкл, 0,105 ммоль, 2 молярний, толуол), потім додавали метил(метокси-d₃)піколінат (18 мг, 0,11 ммоль) в 0,5 мл дихлорметану. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Реакційну суміш виливали в охолоджену 4 н HCl (водн.). Суміш екстрагували етилацетатом. Органічну фазу промивали сольовим розчином, сушили над сульфатом магнію і концентрували під вакуумом. Додавали 7 М аміак в метанолі (4 мл) і реакційну суміш перемішували в закупореній судині при 50 °С протягом ночі. Реакційну суміш концентрували під вакуумом і очищали флеш-хроматографією на силікагелі (гептан/етилацетат), а потім очищали препаративною HPLC з отриманням вказаної в заголовку сполуки у вигляді солі трифтороцтової кислоти.

30 ^1H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 11,13 (с, 1H), 10,75 (с, 1H), 9,98 (с, 1H), 9,10 (с, 1H), 8,40 (дд, J=2,9, 0,5 Гц, 1H), 8,21 (ддд, J=8,9, 4,1, 2,6 Гц, 1H), 8,15 (дд, J=8,7, 0,5 Гц, 1H), 8,09 (дд, J=6,8, 2,6 Гц, 1H), 7,64 (дд, J=8,7, 2,9 Гц, 1H), 7,40 (дд, J=11,9, 9,0 Гц, 1H), 7,20 (т, J=53,0 Гц, 1H), 3,17 – 3,01 (м, 2H), 2,48 – 2,38 (м, 2H).

40 LC-MS (маса/заряд) 432 (MH⁺); t_R =0,49 хвилини (Спосіб А)

Приклад 14: (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(метокси-d₃)піразин-2-карбоксамід (сполука 14)



Отримували як в прикладі 13 з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і метил-5-(метокси-d₃)піколінату.

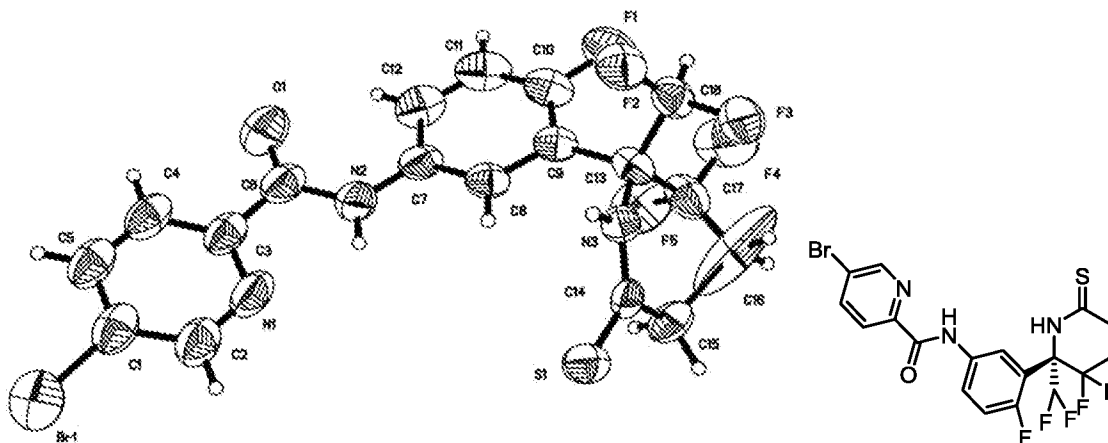
¹H ЯМР (600 МГц, DMSO) δ 10,61 (с, 1H), 8,89 (д, J=1,2 Гц, 1H), 8,42 (д, J=1,2 Гц, 1H), 7,91 – 7,86 (м, 2H), 7,19 (дд, J=11,5, 8,9 Гц, 1H), 6,84 – 6,61 (м, 1H), 6,36 (с, 2H), 2,53 – 2,49 (м, 2H), 2,16 – 1,96 (м, 2H).

LC-MS (маса/заряд) 433,1 (MH⁺); t_R=0,49 хвилини (Спосіб А)

Сtereохімія

Кристали отримували повторною кристалізацією (S)-5-бром-N-(3-(2-(дифторметил)-3,3-дифтор-6-тіоксопіперидин-2-іл)-4-фторфеніл)піколінаміду з суміші гептану і етилацетату. Структуру

(S)-5-бром-N-(3-(2-(дифторметил)-3,3-дифтор-6-тіоксопіперидин-2-іл)-4-фторфеніл)піколінаміду з'ясовували за допомогою рентгенівської кристалографії вказаних кристалів. Структура показувала абсолютну і відносну конфігурацію (S)-5-бром-N-(3-(2-(дифторметил)-3,3-дифтор-6-тіоксопіперидин-2-іл)-4-фторфеніл)піколінаміду. (S)-5-Бром-N-(3-(2-(дифторметил)-3,3-дифтор-6-тіоксопіперидин-2-іл)-4-фторфеніл)піколінамід отримували, як описано в прикладі 1, виходячи з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону і 5-бромпіколінової кислоти.



Фігура 1. Рентгенівська структура (S)-5-бром-N-(3-(2-(дифторметил)-3,3-дифтор-6-тіоксопіперидин-2-іл)-4-фторфеніл)піколінаміду

Абсолютні конфігурації типових сполук цього винаходу можуть бути, таким чином, обґрунтовані. (S)-5-Бром-N-(3-(2-(дифторметил)-3,3-дифтор-6-тіоксопіперидин-2-іл)-4-фторфеніл)піколінамід отримували з (S)-6-(5-аміно-2-фторфеніл)-6-(дифторметил)-5,5-дифторпіперидин-2-тіону, який є початковим матеріалом для всіх типових сполук цього винаходу.

Фармакологічне тестування

Аналіз зв'язування з BACE1

Аналіз зв'язування проводили у вигляді аналізу на основі SPA, використовуючи біотиніловану форму людської BACE1, рекомбінантно експресованої, а потім очищеної від клітин Freestyle HEK293. Аналіз зв'язування проводили в 50 мМ натрій-ацетатного буфера, pH 4,5, що містить 50 мМ NaCl і 0,03 % Tween-20 в білих 384-коміркових планшетах з прозорим дном (Coming #3653). 10 нМ (кінцева концентрація) радіоліганду ([³H]-N-((1S, 2R)-1-бензил-3-циклопропіламіно-2-гідроксипропіл)-5-(метансульфоніл-метил-аміно)-N-((R)-1-феніл-етил)-ізофталамід) (TRQ11569, придбаного у компанії GE Healthcare) змішували з досліджуваною сполукою при заданій концентрації, 6 нМ (кінцева концентрація) людської BACE1 і 25 мкг кульок для SPA з серцевиною з PVT і з покриттям із стрептавідину (RPNQ0007, GE Healthcare Life Sciences) в загальному об'ємі 40 мкл. У аналізі випробовували декілька концентрацій кожної з

5 випробовуваних сполук з метою визначення IC₅₀. Ці планшети інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі і підраховували, використовуючи лічильник Wallac Trilux. Загальне і неспецифічне зв'язування визначали, використовуючи буфер і високоафінний еталонний інгібітор BACE1 - (S)-6-[3-хлор-5-(5-проп-1-ініл-піридин-3-іл)-тіофен-2-іл]-2-іміно-3,6-диметил-тетрагідро-піримідин-4-он - з концентрацією 1 мкМ (кінцева концентрація), відповідно. Для кожної випробовуваної сполуки значення IC₅₀ (концентрацію, що викликає 50 %-ве інгібування специфічного зв'язування радіоліганду) визначали за кривою залежності концентрація-відповідь, яке використовували для обчислення K_i за рівнянням $K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$, де L і K_d є кінцевою концентрацією радіоліганду, використовованого в аналізі, і константою дисоціації радіоліганду, відповідно. K_d радіоліганду визначали з експериментів насиченого зв'язування.

Таблиця 1

Афінність зв'язування вибраних сполук

Сполука №	BACE1 K _i (нМ)
1	18
2	23
3	8,5
4	20
5	6,7
6	20
7	7,4
8	71
9	6,9
10	16
11	7,8
12	6,1
13	14
14	18

Аналіз ефективності по відношенню до BACE1

15 Аналіз ефективності проводили на основі FRET-аналізу з використанням комерційно доступного набору BACE1 (Life Technologies, P2985). 2 мкл випробовуваної сполуки при концентрації 10 мкМ (кінцева концентрація) і 15 мкл ферменту BACE1 з набору (кінцева концентрація 3 нМ) попередньо інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі перед додаванням 15 мкл субстрату з набору (кінцева концентрація 250 нМ) і інкубували протягом 20 додаткових 90 хвилин при кімнатній температурі. Аналітичні планшети потім піддавали зчитуванню, використовуючи пристрій Pherastar (Ex540/Em590). Активність ферменту, спостережувану у присутності випробовуваної сполуки, нормалізували відносно активності ферменту, спостережуваної у присутності буфера і високоафінного еталонного інгібітору BACE1 - (S)-6-[3-хлор-5-(5-проп-1-ініл-піридин-3-іл)-тіофен-2-іл]-2-іміно-3,6-диметил-тетрагідропіримідин-4-ону - з концентрацією 10 мкМ (кінцева концентрація), відповідно. 25 Ефективність випробовуваних сполук оцінювали при концентрації 10 мкМ (кінцева концентрація) і визначали як відсоток інгібування активності ферменту, використовуючи рівняння:
 % інгібування = 100 % - нормалізована активність ферменту у відсотках.

Таблиця 2

Активність вибраних сполук по відношенню до BACE1

Сполука №	Інгібування BACE1 при 10 мкМ (%)
1	106
2	100
3	103
4	104
5	101
6	103
8	102
9	103
10	106
13	103
14	108

30 Здійснення оцінки рівнів Aβ у головному мозку і плазмі крові щура після інгібування BACE1 Тварини

Весь догляд за щурами і експериментальні процедури були схвалені Ветеринарною службою компанії Lundbeck відповідно до законодавства Данії. Щури містилися в захищеній споруді з 12/12-годинним циклом світло/темрява і необмеженим доступом до корму і води.

Обробка необроблених щурів.

5 Молодих дорослих самців щурів Sprague Dawley з масою приблизно 250 г придбали в Charles River і давали їм 0-30 мг/кг наповнювача (10 % NP betaCD+1 M MeSO₄, pH 2,5) або тільки досліджувані сполуки (розчинені в наповнювачі) за допомогою перорального зонда (p.o). Дозування сполук складало 5 мл/кг. Для кожної з умов обробки створювали групу з 5-10 тварин.

10 За тваринами, що проходили обробку, уважно спостерігали співробітники ветеринарної служби з метою виявлення будь-яких ознак інтоксикації. Параметри, за якими проводили спостереження, включали масу, фізичний стан, зміни в зовнішньому вигляді шерсті, поява неспровокованої поведінки і притуплені або перебільшені реакції на зовнішні подразники.

Збір тканин

15 У момент T=180 хвилин після первинного введення дози тварин оглушали і обезголовлювали за допомогою гільйотини. Після обезголовлювання тварини кров з тушки відбирали в пробірки з покриттям з EDTA. Кров центрифугували при 2200 G і температурі 4 °C протягом 15 хвилин і плазму відбирали і заморожували при -80 °C. Для аналізів Aβ за допомогою ELISA і DMPK брали аліквоти крові. Негайно після убивання виймали головний мозок і ділили на 2 половини. Праві півкулі швидко заморожували на сухому льоду і зберігали при -80 °C. Ліву половину препарували; передню частину переднього мозку використовували для аналізу Aβ за допомогою ELISA, а решту аналізували за допомогою аналізу DMPK. Ці зразки також швидко заморожували на сухому льоду і зберігали при -80 °C до застосування в аналізі.

Обробка тканин

25 Зразки кори головного мозку злегка розморожували на вологому льоду перед гомогенізацією їх в диспергуючому пристрої невеликого об'єму (T10 basic ULTRA-TURRAX®), який встановлювали на швидкість "5", протягом приблизно 5-7 секунд. Тканину обробляли в 10-кратному об'ємі відносно маси, наприклад, 100 мг тканини гомогенізували в 1000 мкл буфера для гомогенізації. Буфер для гомогенізації: 50 мл води Milli Q+50 nM NaCl+0,2 % дітиламіну (DEA) + 1 пігулка суміші інгібіторів протеази (Complete Protease Inhibitor Cocktail) + 1 nM необоротного інгібітору серинпротеази 4-(2-аміноетил)бензолсульфоніл фториду гідрохлориду (AEBSF).

35 Після гомогенізації відбирали аліквоти зразків у 450 мкл в 1,5-мл пробірку Еппендорфа (Eppendorf) і поміщали на вологий лід, до всіх зразків додавали 0,5 % NP-40 (50 мкл), а потім їх інкубували на льоду протягом 30 хвилин. Після цього всі зразки обробляли ультразвуком, використовуючи ультразвуковий гомогенізатор з однорідним звуком з частотою 20 кГц (SONOPLUS HD2070, Bandelin Electronic), встановленим на 10 імпульсів при 12-13 % потужності для екстрагування всіх видів Aβ. Потім зразки центрифугували (мікроцентрифуга Ole Dich 157 MPRF Micro) при 20000 G протягом 20 хвилин при 4 °C. Після центрифугування піпеткою 40 переносили 285 мкл надосадової рідини в мікропробірки об'ємом 600 мкл і нейтралізували, використовуючи 15 мкл 1 M буфера Tris-HCL.

Протокол ELISA

45 Використовували набір з людським/щурячим Абета амілоїдом (Human/Rat Abeta amyloid (40)) WAKO 294-62501 для всіх аналізів ELISA. 30 мкл зразків плазми крові або 30 мкл супернатантів від кори головного мозку, отриманих як описано вище, поміщали в 600-мкл мікропробірки на вологому льоду. До них додавали 30 мкл 8 M сечовини (AppliChem A1049, 9025) для отримання 2-кратного розведення. Плазму крові і супернатанти від кори головного мозку інкубували на льоду протягом 30 хвилин. Отримували стандартні ряди із стандартного початкового пептиду, що надається в наборі, і стандартного розріджувача, що містить 1,6 M сечовину (200 мкл 8 M сечовини + 800 мкл стандартного розріджувача) і 0,8 M сечовину (400 мкл 8 M сечовини + 3600 мкл стандартного розріджувача). Для аналізу отримували серійне 2-кратне розведення Aβ40 від 100 пмоль/мл до 0 пмоль/л.

55 Після інкубації з сечовиною всі зразки додатково розбавляли, вносячи 5-кратну кількість стандартного розріджувача з набору. Процедуру виконували шляхом додавання 240 мкл стандартного розріджувача до 60 мкл суміші зразка і сечовини, що потім ретельно перемішували. 100 мкл кожного з розбавлених зразків піпеткою переносили в призначені для нього комірки планшета для ELISA в двох повторях. Потім планшет накривали і інкубували протягом ночі при 4 °C. Наступного дня набору для ELISA дозволяли нагрітися до кімнатної температури перед використанням. Інкубований планшет промивали 5 разів 20x розведеним водою Milli Q промивальним розчином. До кожної комірки додавали 100 мкл HRP-кон'югата і

планшет накривали і інкубували при 4 °С протягом 1 години. Процедуру промивки знову повторювали 5 разів. 100 мкл розчину 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМВ) поміщали в кожну комірку планшета, який накривали і інкубували в темряві при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Потім в кожну комірку вносили 100 мкл STOP-розчину і на спектрофотометрі (Labsystems Multiscan Ascent) з планшета знімали показання при довжині хвилі 450 нм протягом 30 хвилин з моменту додавання STOP-розчину до комірок.

Концентрацію Аβ у зразках визначали на основі стандартної кривої, отриманої за стандартами, що містять відомі концентрації синтетичного Аβ40. Фахівці в даній галузі розуміють, що при екстракціях діетиламіном (DEA) і сечовиною вивільняються розчинні Аβ і нерозчинні Аβ, відповідно. Оскільки набір для ELISA є затвердженим і широко використовується, то прийнятою практикою є те, що за одних і тих же умов обробки і умов аналізу для кожної випробовуваної сполуки цей аналіз випробовуваних сполук обов'язково буде давати стійкі повторювані результати з мінімальними відхиленнями.

Аналіз даних

Для визначення концентрації Аβ40 в зразках інтерпольовані значення для зразків, завантажених на планшети, помножували на 20 з урахуванням розведень, виконаних при додаванні об'ємних кількостей DEA, сечовини і нейтралізуючого розчину. Значення обчислювали як зміну Аβ40 у відсотках в порівнянні з показниками для тварин, яким вводили наповнювач.

Біоаналіз зразків головного мозку і плазми крові

ТС визначали в плазмі крові і гомогенаті головного мозку з використанням хроматографії UltraPerformance LC® (UPLC®) з подальшим детектуванням за допомогою тандемної MS (MS/MS).

Апаратура

Tecan Genesis RSP 200; Biomek NXP, Beckman Coulter; центрифуга Sigma 4K15; Acquity UPLC, Waters; Sciex API4000 TQ, Applied Biosystems; програмне забезпечення MS: Analyst версії 1.4.1.

Хімічні реактиви

Ацетонітрил, ступінь чистоти для HPLC, Fluka № 34967N; метанол, ступінь чистоти для HPLC, Sigma-Aldrich, Lot 9003S; мурашина кислота, ступінь чистоти для HPLC, Riedel-de Haën, Lot 51660; очищена вода, Millipore Synergy UV.

Приготування зразків

Гомогенат головного мозку отримували шляхом гомогенізації головного мозку з розчином вода:2-пропанол:DMSO (50:30:20 об'єм/об'єм/об'єм) при співвідношенні 1:4 (об'єм/об'єм) з подальшим центрифугуванням і збором супернатанту. Калібрувальні стандарти і зразки QC отримували з використанням робота-маніпулятора Hamilton. 150 мкл ISTD в ацетонітрилі (1 нг/мл ISTD) додавали до 25 мкл калібрувальних стандартів, зразків QC і випробовуваних зразків (плазма крові і гомогенат головного мозку) з використанням робота-маніпулятора Biomek. Після центрифугування (6200 g, 4 °С, 20 хв.) 100 мкл супернатанту з кожного зразка переносили до нового планшета і змішували з 100 мкл води з 0,1 % мурашиної кислоти з використанням робота-маніпулятора Biomek (спосіб передачі файлу InVivo). Після швидкого центрифугування (6200 g, 4 °С, 5 хв.) зразки поміщали в автодозатор.

Аналіз UPLC-MS/MS

Детектування MS/MS виконували на пристрої Applied Biosystems Sciex API 4000 в режимі іонізації електророзпилюванням позитивних іонів. ТС і ISTD виявляли при відношенні маси до заряду (m/z) іона-попередника > іона-продукту. Азот використовували для розпилювача і газів для зіткнення. Площа піку корелювала лінійно з концентрацією аналітів в плазмі крові і головному мозку в діапазоні 1,00-1000 нг/мл плазми і 5,00-5000 нг/г головного мозку (з поправкою на розведення). Якщо концентрація лікарського засобу в зразку плазми/головного мозку перевищувала 1000 нг/мл або 5000 нг/г, то зразок розводили відповідно в пустій плазмі/пустому гомогенаті головного мозку перед аналізом.

Хроматографічна система

Аналітичні колонки:

Waters Acquity UPLC HSS C18 SB (pH 2-8), 1,8 мкм, 2,1 × 30 мм.

Рухома фаза А: 0,1 % водн. розчин мурашиної кислоти або 0,1 % водн. розчин амонію гідроксиду.

Рухома фаза В: ацетонітрил з 0,1 % водн. розчином мурашиної кислоти або 0,1 % водн. розчином амонію гідроксиду.

Слабке промивання: метанол.

Сильне промивання: ацетонітрил/ізопропанол/мурашина кислота (50/50/2,

об'єм/об'єм/об'єм).

Витрата потоку: 0,6 мл/хв.

Час виконання: 3 хв.

На скидання: 0-0,5 хв.

5 Температура: 40 °С.

Гradient:

Час (хв.) % А % В

0 98 2

0,01 98 2

10 1,5 5 95

2 5 95

2,2 98 2

3 98 2

15 Сполуки 3 і 5 вводили дозами у 10 мг/кг р.о., і брали зразки головного мозку і плазми через 3 години після введення дози, і вимірювали наступні кількості сполук так, як описано вище.

Таблиця 3

Результати для сполуки 3

	Доза (мг/кг)	Кількість сполуки (нг/г)	Співвідношення головний мозок/плазма крові	Зменшення Аβ40 (%)
Головний мозок щура	10	511	0,30	24
Плазма крові щура		1682		39
Головний мозок щура	30	2284	0,32	38
Плазма крові щура		7056		42

Таблиця 4

Результати для сполуки 5

	Доза (мг/кг)	Кількість сполуки (нг/г)	Співвідношення головний мозок/плазма крові	Зменшення Аβ40 (%)
Головний мозок щура	10	187	0,28	5
Плазма крові щура		660		40
Головний мозок щура	30	959	0,29	36
Плазма крові щура		3348		49

20 Як показано в таблицях 3 і 4, сполуки цього винаходу здатні долати гематоенцефалічний бар'єр і демонструють ефективність в CNS.

Аналіз з використанням MDCK-MDR1

25 Проникаючу здатність випробовуваних сполук вимірювали на клітинах MDCK-MDR1, які культивували до конфлюентності (4-6 днів) в 96-комірковому планшеті Transwell. Випробовувані сполуки розводили буфером для перенесення (HBSS+1 % BSA) до концентрації 0,5 мкМ і вносили на апікальну або базолатеральну сторону клітинного моношару. Проникнення випробовуваних сполук в напрямі від А до В або в напрямі від В до А визначали в трьох повторах протягом 60-хвилинної інкубації при 37 °С і 5 % CO₂ з відносною вологістю 95 %.

30 Визначали кількість випробовуваних сполук за допомогою аналізу LC-MS/MS на основі відношення площі піку аналіту/IS як в приймальних, так і в донорних комірках планшета Transwell.

Коефіцієнт позірної проникної здатності Papp (см/с) обчислювали з використанням рівняння:

$$Papp = (dCr/dt) \times Vr / (A \times C0),$$

35 де dCr/dt являє собою сумарну концентрацію сполуки в приймальній камері як функцію за часом (мкМ/с); Vr являє собою об'єм розчину в приймальній камері (0,05 мл на апікальній стороні; 0,25 мл на базолатеральній стороні); А являє собою площу поверхні для перенесення, тобто 0,0804 см² для площі моношару; C0 являє собою початкову концентрацію в донорній камері (мкМ).

Сполуки класифіковані як субстрати Pgp, якщо коефіцієнт відтоку (Papp BA/Papp AB) ≥ 2.

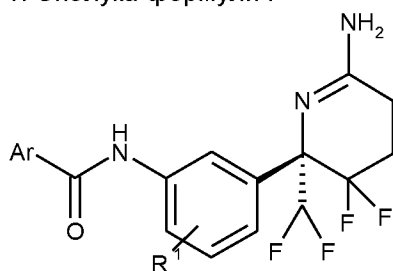
Активність вибраних сполук відносно VACE1

Сполука	Коефіцієнт відтоку через шар MDCK-MDR1
1	1,16
2	1,75
3	1,22
4	4,01
5	0,99
6	1,36
7	2,43
8	0,92
9	10,99
10	0,98
11	2,68
12	1,31
13	0,83

5 Як показано в таблиці 5, більша частина типових сполук цього винаходу мають коефіцієнти відтоку через шар MDCK-MDR1 нижче 2 і, таким чином, ймовірно, здатні проникати через гематоенцефалічний бар'єр (E Kerns, L Di, Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods (2008) Elsevier).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

10 1. Сполука формули I



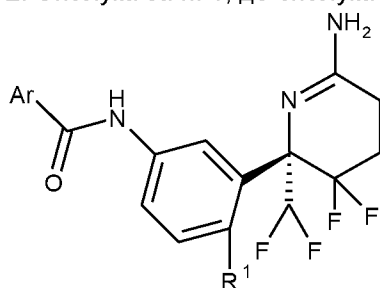
(I),

де Ar вибраний з групи, що складається з фенілу, піридилу, піримідилу, піразинілу, імідазолілу, піразолілу, тiazолілу, оксазолілу, ізоксазолілу, і де Ar необов'язково заміщений одним або декількома замісниками, вибраними з галогену, CN, C₁-C₆алкілу, C₂-C₆алкенілу, C₂-C₆алкінілу, C₁-C₆фторалкілу або C₁-C₆алкокси; і

15

R¹ являє собою водень, галоген, C₁-C₃фторалкіл або C₁-C₃алкіл, або її фармацевтично прийнятна сіль.

2. Сполука за п. 1, де сполука характеризується формулою Ia



(Ia),

20

або її фармацевтично прийнятна сіль.

3. Сполука за п. 1 або п. 2, де R¹ являє собою F або H.

4. Сполука за п. 1 або п. 2, де Ar необов'язково заміщений одним або декількома з F, Cl, Br, CN, C₁-C₃ алкілу, C₁-C₃ фторалкілу або C₁-C₃ алкокси.

5. Сполука за будь-яким з пп. 1-4, де Ar являє собою необов'язково заміщений піридил.

25

6. Сполука за будь-яким з пп. 1-4, де Ar являє собою необов'язково заміщений піримідил.

7. Сполука за будь-яким з пп. 1-4, де Ar являє собою необов'язково заміщений піразиніл.

8. Сполука за будь-яким з пп. 1-4, де Ar являє собою необов'язково заміщений оксазоліл.

9. Сполука за будь-яким з пп. 1-4, де Ar являє собою необов'язково заміщений тiazоліл.

10. Сполука за п. 1, де сполука вибрана з групи, що складається з
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-хлорпіколінамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-фторпіколінамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіразин-2-карбоксамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-2-метилоксазол-4-карбоксамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіколінамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(дифторметил)піразин-2-карбоксамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-ціанопіколінамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-4-метилтіазол-2-карбоксамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метоксипіримідин-2-карбоксамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-метокси-3-метилпіразин-2-карбоксамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-ціано-3-метилпіколінамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-бромпіколінамід,у,
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(метокси-d₃)піколінамід,у і
 (S)-N-(3-(6-аміно-2-(дифторметил)-3,3-дифтор-2,3,4,5-тетрагідропіридин-2-іл)-4-фторфеніл)-5-(метокси-d₃)піразин-2-карбоксамід,у
 або їх фармацевтично прийнятних солей.
 11. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким з пп. 1-10 і фармацевтично прийнятний носій.
 12. Спосіб лікування захворювання, вибраного з хвороби Альцгеймера (спадкової або спорадичної форми), доклінічної стадії хвороби Альцгеймера, продромальної стадії хвороби Альцгеймера, помірного когнітивного розладу, синдрому Дауна і церебральної амілоїдної ангіопатії, при цьому спосіб передбачає введення терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-10 пацієнтові, що потребує цього.
 13. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-10 для виготовлення лікарського препарату для лікування захворювання, вибраного з хвороби Альцгеймера (спадкової або спорадичної форми), доклінічної стадії хвороби Альцгеймера, продромальної стадії хвороби Альцгеймера, помірного когнітивного розладу, синдрому Дауна і церебральної амілоїдної ангіопатії.
 14. Сполука за будь-яким з пп. 1-10 для застосування в терапії.
 15. Сполука за будь-яким з пп. 1-10 для застосування в лікуванні захворювання, вибраного з хвороби Альцгеймера (спадкової або спорадичної форми), доклінічної стадії хвороби Альцгеймера, продромальної стадії хвороби Альцгеймера, помірного когнітивного розладу, синдрому Дауна і церебральної амілоїдної ангіопатії.

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601