



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **127357** (13) **C2**
(51) МПК (2023.01)
C07D 405/14 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61P 35/00

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

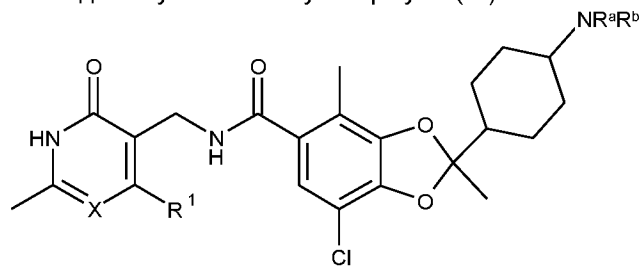
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2020 06100</p> <p>(22) Дата подання заявки: 17.04.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 27.07.2023</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/659,408</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 18.04.2018</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 17.02.2021, Бюл.№ 7</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 26.07.2023, Бюл.№ 30</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2019/027932, 17.04.2019</p>	<p>(72) Винахідник(и): Коте Александр (US), Гелінг Віктор С. (US), Кханна Авінаш (US), Муан Людівін (US), Стакі Якоб І. (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): КОНСТЕЛЛАТІОН ФАРМАЦЕУТИКАЛС, ІНК., 215 First Street, Suite 200, Cambridge, MA 02142, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2017/073335 A1, 16.03.2017 PRIYANKA L GAIKWAD ET AL, "The Use of Bioisosterism in Drug Design and Molecular Modification", AMERICAN JOURNAL OF PHARMTECH RESEARCH AM. J. PHARMTECH RES, (2012-01-01), vol. 2, no. 4, pages 1-23 VENKATESAN N., "BIOISOTERISM REVIEW - AN BIOLOGICAL MODIFICATION", WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES, (2017-09-01), doi:10.20959/wjpps20179-10126, pages 1918-1949</p>
---	---

(54) МОДУЛЯТОРИ МЕТИЛМОДИФІКУЮЧИХ ФЕРМЕНТІВ, КОМПОЗИЦІЇ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується сполук Формули (VI):



які є корисними для лікування раку.

, (VI)

UA 127357 C2

ПОВ'ЯЗАНІ ЗАЯВКИ

Ця заявка заявляє пріоритет на основі попередньої заявки США № 62/659,408, що подана 18 квітня 2018 р., повний зміст якої включений в даний документ через посилання.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

5 Еукаріотичний хроматин складається з високомолекулярних комплексів, які називаються нуклеосомами. Нуклеосома містить 147 пар основ ДНК, обмотаних білком-октамером, що має дві субодиниці кожного з гістонових білків H2A, H2B, H3 і H4. Білки гістону піддаються посттрансляційним модифікаціям, які в свою чергу впливають на структуру хроматину та експресію генів. Одним із типів посттрансляційних модифікацій, виявлених на гістонах, є метилювання залишків лізину та аргініну. Метилювання гістону відіграє вирішальну роль у регуляції експресії генів у еукаріотів. Метилювання впливає на структуру хроматину і пов'язане як з активацією, так і з репресією транскрипції (Zhang and Reinberg, Genes Dev. 15:2343-2360, 2001). Ферменти, що каталізують приєднання та видалення метильних груп з гістонів, беруть участь у затиранні генів, ембріональному розвитку, проліферації клітин та інших процесах.

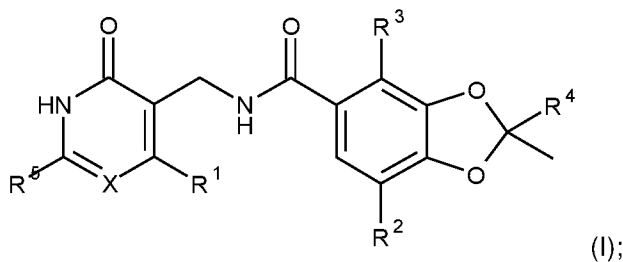
15 Один з класів гістонових метилаз характеризується наявністю домену SET, що включає близько 130 амінокислот. EZH2 є прикладом людського SET-домену, що містить метилазу. EZH2 асоціюється з PEE (Розвиток Ембріональної Ектодерми) та SUZ12 (суп ресор гомолога zeste 12) для утворення комплексу, відомого як PRC2 (Полікомбний репресивний комплекс 2), що має здатність триметилювати гістон H3 при лізині 27 (Cao and Zhang, Mol. Cell 15:57-67, 2004). Комплекси PRC2 можуть також включати субодиниці RBAP46 і RBAP48. Іншим прикладом є споріднена метилаза EZH1.

Онкогенна активність EZH2 була показана в ряді досліджень різних типів раку. ~15-20 % GCB-DLBCL містять мутацію посилення функції в EZH2 (залишок Y641), і ці клітини є гіперчутливими до інгібування EZH2 як *in vitro*, так і *in vivo* (McCabe et al, 2012; Bradley et al, 2014). В експериментах на клітинних лініях надмірна експресія EZH2 індукує інвазію клітин, ріст м'якого агару та рухливість, тоді як нокадаун EZH2 інгібує клітинну проліферацію та інвазію клітин (Kleer et al., 2003, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100:11606-11611; Varambally et al., (2002), "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer," Nature 419, 624-629). Було показано, що EZH2 пригнічує експресію декількох супресорів пухлини, включаючи E-кадгерин, DAB2IP та RUNX3 серед інших. У моделях ксенотрансплантата нокадаун EZH2 пригнічує ріст пухлини та метастазування. Було показано, що даун модуляція EZH2 в мишачих моделях блокує метастазування раку передміхурової залози (Min et al., "An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor- kappaB," Nat Med. 2010 Mar; 16(3):286-94). Нещодавно було продемонстровано, що EZH2 надмірно експресується у нейроендокринних пухлинах, а інгібування EZH2 у пухлинах мишей відновлює андрогенну залежність (Ku et al, Science, 355, 2017). Надмірна експресія EZH2 асоціюється з агресивністю деяких видів раку, таких як рак молочної залози (Kleer et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100:11606-11611, 2003). Недавні дослідження також дозволяють припустити, що специфічний онкогенний злитий ген раку простати TMPRSS2-ERG викликає репресивні епігенетичні програми шляхом прямої активації EZH2 (Yu et al., "An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression," Cancer Cell. 2010 May 18;17(5):443-454).

Враховуючи їх роль у регуляції різноманітних біологічних процесів, метилмодифікуючі ферменти, зокрема EZH2 та його мутантні форми, є привабливими мішенями для модуляції.

КОРОТКИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

45 Було встановлено, що описані в цьому документі сполуки та їх фармацевтично прийнятні композиції модулюють активність EZH2 (див., наприклад, Таблицю 5). Такі сполуки включають сполуки структурної Формули I:



або їх фармацевтично прийнятну сіль, де кожен з R¹, R², R³, R⁴, R⁵ та X є визначеним в цьому документі.

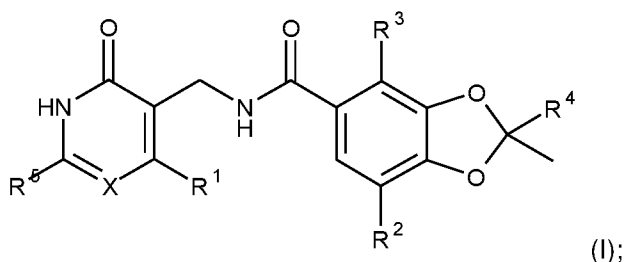
В одному з аспектів, також було виявлено, що деякі сполуки, описані в цьому документі, мають збільшений час перебування (наприклад, >100 годин) і підвищену проникність. Встановлено, що збільшення часу перебування (тобто, зменшення швидкості відключення) та/або проникності корелює з поліпшенням клітинної потенції.

Описані сполуки, фармацевтично прийнятні солі та фармацевтично прийнятні композиції корисні для лікування різноманітних станів, пов'язаних з метилмодифікуючими ферментами. Ці умови включають, наприклад, один або більше видів раку.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС

1. Загальний опис Сполук

Пропонуються сполуки Формули I:



або їх фармацевтично прийнятна сіль, де:

R¹ являє собою галоген, -S(C₁-C₄)алкіл, -S(C₃-C₇)циклоалкіл або -S[галоген(C₁-C₄)алкіл];

X являє собою CH або N;

R² являє собою гідроген, галоген, (C₁-C₄)алкіл або галоген(C₁-C₄)алкіл;

R³ являє собою галоген, (C₁-C₄)алкіл або галоген(C₁-C₄)алкіл;

R⁴ являє собою (C₃-C₇)циклоалкіл або 4-7-членний гетероцикліл, кожен з яких необов'язково заміщений 1-3 групами, вибраними з галогену, (C₁-C₄)алкілу, галоген(C₁-C₄)алкілу, (C₁-C₄)алкокси, галоген(C₁-C₄)алкокси та -NR^aR^b;

R^a являє собою гідроген, (C₁-C₄)алкіл або галоген(C₁-C₄)алкіл;

R^b являє собою (C₁-C₄)алкіл, галоген(C₁-C₄)алкіл або 4-7-членний гетероцикліл, де зазначений гетероцикліл необов'язково заміщений 1-3 групами, вибраними з галогену, (C₁-C₄)алкілу, галоген(C₁-C₄)алкілу, (C₁-C₄)алкокси та галоген(C₁-C₄)алкокси; або

R^a і R^b разом з атомом нітрогену, до якого вони приєднані, утворюють 4-7-членний гетероцикліл, необов'язково заміщений 1-3 групами, вибраними з галогену, (C₁-C₄)алкілу, галоген(C₁-C₄)алкілу та -OR^c;

R^c являє собою (C₁-C₄)алкіл, галоген(C₁-C₄)алкіл або (C₃-C₇)циклоалкіл; і

R⁵ являє собою галоген, (C₁-C₄)алкіл або галоген(C₁-C₄)алкіл.

2. Визначення

При використанні для опису хімічної групи, яка може мати кілька точок приєднання, дефіс (-) позначає точку приєднання цієї групи до змінної, для якої вона визначена. Наприклад, -S(C₃-C₇)циклоалкіл та -S[галоген(C₁-C₄)алкіл] означають, що точка приєднання для цієї групи знаходиться на атомі сірки.

Терміни "гало" і "галоген", як використовуються в цьому документі, стосуються атома, вибраного з флуору (флуор, -F), хлору (хлор, -Cl), бромю (бром, -Br) та йоду (йод, -I).

Термін "алкіл", як використовується в цьому документі, відноситься до одновалентного насиченого вуглеводневого радикала з прямим або розгалуженим ланцюгом, що має, якщо не зазначено інше, 1-10 атомів карбону. Приклади алкільних радикалів включають, але не обмежуючись ними, метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізо-бутил, втор-бутил, втор-пентил, ізо-пентил, трет-бутил, н-пентил, неопентил, н-гексил, втор-гексил і т.і.

Термін "галогеналкіл" включає моно-, полі- та пергалогеналкільні групи, де галогени незалежно вибирають із флуору, хлору, бромю та йоду.

"Алкокси" являє собою алкільну групу, яка приєднана до іншого фрагменту за допомогою оксигенового лінкера (-O(алкіл)). Необмежуючі приклади включають метокси, етокси, пропокси та бутокси.

"Галогеналкокси" являє собою галогеналкільну групу, яка приєднана до іншої частини через атом оксигену, такий як, наприклад, але не обмежується -OCHF₂ або -OCF₃.

Термін "циклоалкіл" відноситься до 3-12-членної (наприклад, 3-7-членної) моноциклічної, біциклічної (наприклад, місткованого або спіро-біциклічного кільця) або поліциклічної (наприклад, трициклічної) вуглеводневої кільцевої системи, яка повністю насичена. Моноциклічні циклоалкільні групи включають, без обмеження, циклопропіл, циклобутил,

циклопентил, циклогексил, циклогептил та циклооктил. Містковані біциклічні циклоалкільні групи включають, без обмежень, біцикло[3.2.1]октан, біцикло[2.2.1]гептан, біцикло[3.1.0]гексан, біцикло[1.1.1]пентан і т.і. Спіро-біциклічні циклоалкільні групи включають, наприклад, спіро[3.6]декан, спіро[4.5]декан і т.і. Конденсовані циклоалкільні кільця включають, наприклад, декагідронафталін, октагідропентален і т.і. Зазначені як необов'язково заміщені або заміщені, замісники циклоалкілу (наприклад, у разі необов'язково заміщеного циклоалкілу) можуть бути присутніми в будь-якому положенні придатному для заміщення і включати, наприклад, положення, в якому приєднана циклоалкільна група.

Термін "гетероцикліл" означає 3-12-членне (наприклад, 4-, 5-, 6- і 7-членне) насичене або частково ненасичене гетероциклічне кільце, що містить від 1 до 4 гетероатомів, незалежно вибраних з N, O і S. Він може бути моноциклічним, біциклічним (наприклад, містковане, конденсоване або спіробіциклічне кільце) або трициклічним. Терміни "гетероцикл", "гетероцикліл", "гетероциклільне кільце", "гетероциклічна група", "гетероциклічний фрагмент" і "гетероциклічний радикал" використовуються в цьому документі як взаємозамінні. Гетероциклільне кільце може бути приєднане до своєї бічної групи по будь-якому гетероатому або атому карбону, що призводить до стабільної структури. Приклади таких насичених або частково ненасичених гетероциклічних радикалів включають, без обмеження, тетрагідрофураніл, тетрагідротієніл, терагідропіраніл, піролідініл, піридиніл, піролідоніл, піперидиніл, оксазолідиніл, піперазиніл, діоксаніл, діоксиланіл, дигідропіралін, дифлуоргідрапіл, дигідропіран, дигідропіран, дигідропеніл, дигідропеніл, дигідропіран, дигідропіран, дигідрогідралін азетидиніл та тетрагідропіримідиніл. Гетероциклічна група може бути моно- або біциклічною. Термін "гетероцикліл" також включає, наприклад, ненасичені гетероциклічні радикали, конденсовані з іншим ненасиченим гетероциклічним радикалом або арильним або гетероарильним кільцем, такі як, наприклад, тетрагідронафтиридин, індолінон, дигідропіролотріазол, імідазопіримідин, хінолінон, діоксаспіродекан. Зазначені як необов'язково заміщені або заміщені, замісники на гетероциклілі (наприклад, у разі необов'язково заміщеного гетероциклілу) можуть бути присутніми в будь-якому положенні придатному для заміщення і включати, наприклад, положення, в якому приєднана гетероциклічна група.

Термін "спіро" відноситься до двох кілець, які мають один атом кільця (наприклад, карбон).

Термін "конденсований" відноситься до двох кілець, що ділять між собою два сусідні атоми кільця.

Термін "місткований" відноситься до двох кілець, які ділять між собою три або більше кільцевих атомів.

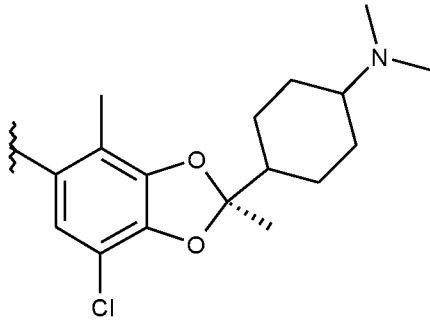
Застосовуваний у цьому документі термін "геометричний ізомер" відноситься до ізомерів, які відрізняються орієнтацією атомів-замісників щодо циклоалкільного кільця, тобто цис- або транс-ізомерів. Коли описану сполуку називають або зображують за структурою, не вказуючи конкретну цис- або транс-геометричну ізомерну форму, слід розуміти, що назва або структура охоплює один геометричний ізомер, вільний від інших геометричних ізомерів, суміш геометричних ізомерів або суміш, збагачених одним геометричним ізомером щодо відповідного йому геометричного ізомеру.

Якщо не вказано інше, коли стереохімія розкритої сполуки названа або зображена за структурою, названий або зображений стереоізомер становить щонайменше 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 % по масі чистого відносно всіх інших стереоізомерів. Коли один енантіомер названий або зображений за структурою, зображений або названий енантіомер має оптичну чисту принаймні 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 % за масою. Відсоток оптично чистого по масі це відношення маси енантіомера до маси енантіомера плюс маса його оптичного ізомеру. Енантіомери можуть бути розділені способами, відомими фахівцям в даній галузі, наприклад утворенням діастереоізомерних солей, які можуть розділятися, наприклад, кристалізацією; утворення діастереоізомерних похідних або комплексів, які можуть бути розділені, наприклад, кристалізацією, надкритичною рідиною або рідинною хроматографією; селективна реакція одного енантіомеру з енантіомер-специфічним реагентом, наприклад, ферментативна етерифікація; або надкритична рідинна або рідинна хроматографія в хіральному середовищі, наприклад, на хіральному носії, наприклад, на діоксиді кремнію з зв'язаним хіральним лігандом, або в присутності хірального розчинника. Конкретні енантіомери також можуть бути синтезовані шляхом асиметричного синтезу з використанням оптично активних реагентів, субстратів, каталізаторів або розчинників або шляхом перетворення одного енантіомеру в інший шляхом асиметричного перетворення.

Якщо не вказано інше, коли описана сполука названа або зображена за структурою без зазначення стереохімії, і сполука має принаймні один хіральний центр або принаймні один

геометричний ізомер, або обидва, назва або структура охоплює один енантіомер або геометричний ізомер сполуки, вільної від відповідного оптичного ізомеру або геометричного ізомеру, рацемічну суміш сполуки та суміш, збагачену одним енантіомером або геометричним ізомером щодо відповідного оптичного ізомеру або геометричного ізомеру.

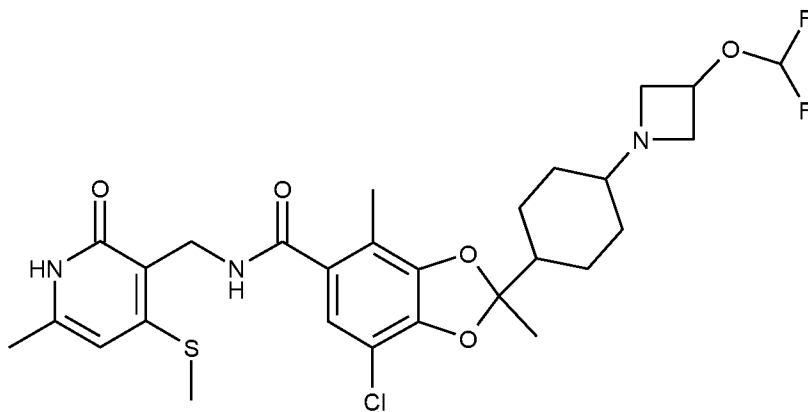
- 5 Якщо не вказано інше, коли лише деякі зі стереохімічних центрів у описаній сполуці зображені або названі за структурою, названа або зображена конфігурація збагачується щодо решти конфігурацій, наприклад, молярний надлишок щонайменше 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 %. Наприклад, підструктура:



10

означає, що конфігурація щодо хірального карбону стереохімічно збагачена як R (наприклад, молярний надлишок принаймні 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 %) і що геометрія циклогексилу може бути цис-, або транс-, або їх сумішшю.

- 15 У деяких випадках розкрита сполука зображена за структурою без позначення стереохімії, але ідентифікована як збагачена стереохімічно (наприклад, "окремий енантіомер; окремий геометричний ізомер" або "окремий енантіомер" у випадках, коли геометричні ізомери неможливі). Наприклад, якщо не вказано інше,



Приклад 1

- 20 (індивідуальний енантіомер; індивідуальний геометральний ізомер), означає, що конфігурація щодо хірального діоксоланільного карбону стереохімічно збагачена як R (наприклад, молярний надлишок принаймні 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 %) або стереохімічно збагачений як S (наприклад, молярний надлишок принаймні 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 %) і що геометрична конфігурація щодо циклогексильного кільця збагачена як цис (наприклад, молярний надлишок принаймні 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 %) або збагачений як транс (наприклад, молярний надлишок принаймні 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % або 99,9 %).

Термін "пацієнт", як використовується в даному описі, означає тварину, таку як ссавець, та таку як людина. Терміни "суб'єкт" та "пацієнт" можуть використовуватися як взаємозамінні.

- 30 Термін "фармацевтично прийнятний носій" відноситься до нетоксичного носія, ад'юванта або носія, який не руйнує фармакологічної активності сполуки, з якою він сформований. Фармацевтично прийнятні носії, ад'юванти або носії, які можуть бути використані в композиціях, описаних в цьому документі, включають, але не обмежуються ними, іонообмінники, оксид алюмінію, стеарат алюмінію, лецитин, сироваткові білки, такі як людський сироватковий альбумін, буферні речовини, такі як фосфати, гліцин, сорбінова кислота, сорбат калію, часткові суміші гліцеридів насичених рослинних жирних кислот, вода, солі або електроліти, такі як

35

сульфат протаміну, гідрофосфат динатрію, гідрофосфат калію, хлорид натрію, солі цинку, колоїдний діоксид кремнію, трисилікат магнію, полівінілпіролідон, речовини на основі целюлози, поліетиленгліколь, натрію карбоксиметилцелюлоза, поліакрилати, віск, поліетилен-поліоксипропілен-блок-полімери, поліетиленгліколь та шерстяний жир.

5 Терміни "лікування", та "терапія" стосуються скасування, пом'якшення або гальмування прогресу захворювання або розладу, або одного або декількох їх симптомів, як описано в цьому документі. Лікування також можна продовжувати після зникнення симптомів, наприклад, щоб затримати рецидив.

Хвороба, розлад та стан використовуються в цьому документі як взаємозамінні.

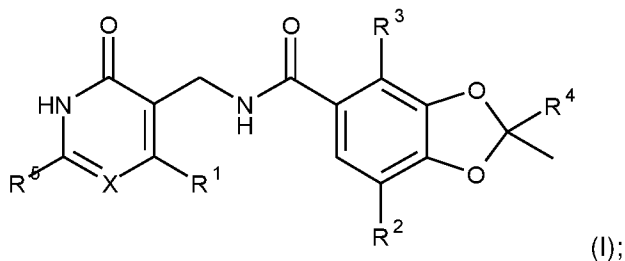
10 Термін "ефективна кількість" або "терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості сполуки, описаної в цьому документі, яка буде викликати біологічну або медичну реакцію суб'єкта, наприклад, дозування від 0,01 до 100 мг/кг маси тіла/добу. Терміни "суб'єкт" і "пацієнт" можуть використовуватися як взаємозамінні, і означають ссавців, які потребують лікування, наприклад, тварин-компаньйонів (наприклад, собак, котів і т.і.), сільськогосподарських тварин (наприклад, корови, свині, коні, вівці, кози і т.і.) та лабораторних тварин (наприклад, щури, миші, морські свинки і т.і.). Як правило, суб'єктом є людина, яка потребує лікування.

Термін "інгібування" включає зниження базової активності біологічної активності або процесу.

20 Описані в цьому документі сполуки можуть бути присутніми у формі фармацевтично прийнятних солей. Для використання в лікарських засобах солі сполук, описані в цьому документі, відносяться до нетоксичних "фармацевтично прийнятних солей". Фармацевтично прийнятні сольові форми включають фармацевтично прийнятні кислотні/аніонні або основно/катионні солі. Придатні фармацевтично прийнятні кислотні-адитивні солі описаних в цьому документі сполук включають, наприклад, солі неорганічних кислот (таких як хлорводнева кислота, бромводнева, фосфорна, нітратна та сульфатна кислоти) та органічних кислот (таких як оцтова кислота, бензолсульфонова, бензойна, метансульфонова і п-толуолсульфонова кислоти).

3. Опис Прикладів сполук

30 У першому варіанті реалізації представлений опис забезпечує сполуку Формули I:



35 або її фармацевтично прийнятну сіль, де перемінні є такими, як зазначено вище для Формули I.

У другому варіанті реалізації, в сполуках Формули I,

R¹ являє собою галоген або -(C₁-C₄)алкіл;

R² являє собою галоген;

R³ являє собою (C₁-C₄)алкіл;

40 R⁴ являє собою (C₃-C₇)циклоалкіл або (C₄-C₇)гетероцикліл, кожен з яких необов'язково заміщений 1-2 групами, вибраними з галоген(C₁-C₄)алкілу та -NR^aR^b;

R^a являє собою гідроген або (C₁-C₄)алкіл;

R^b являє собою (C₁-C₄)алкіл або (C₄-C₇)гетероцикліл, де зазначений гетероцикліл необов'язково заміщений галоген(C₁-C₄)алкілом; або

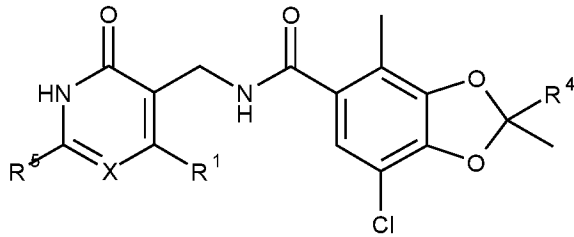
45 R^a і R^b разом з атомом нітрогену, до якого вони приєднані, утворюють 4-7-членний нітрогенвмісний гетероцикл, необов'язково заміщений 1-3 групами, вибраними з галогену і -OR^c;

R^c являє собою (C₁-C₄)алкіл, галоген(C₁-C₄)алкіл або (C₃-C₇)циклоалкіл; і

R⁵ являє собою галоген або (C₁-C₄)алкіл.

У третьому варіанті реалізації, сполука Формули I є Формулою II:

50



(II);

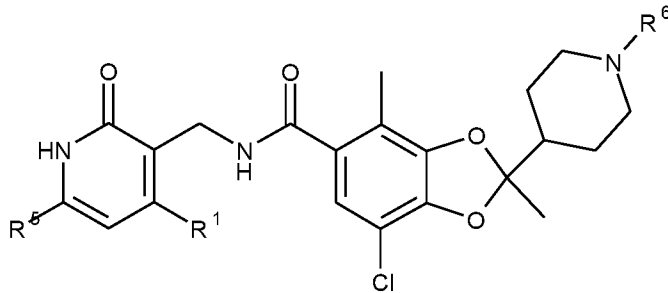
або її фармацевтично прийнятна сіль, де інші перемінні є такими, як описано вище для Формули I або другого варіанту реалізації.

5 У четвертому варіанті реалізації R¹ у сполучі Формули I або Формули II являє собою хлор, де інші перемінні є такими, як описано вище для Формули I або другого варіанту реалізації.

У п'ятому варіанті реалізації R¹ у сполучі Формули I або Формули II являє собою -SCH₃, де інші перемінні є такими, як описано вище для Формули I або другого варіанту реалізації.

10 У шостому варіанті реалізації R⁴ у сполучі Формули I або Формули II являє собою циклогексил або піперидиніл, кожен з яких необов'язково заміщений 1-2 групами, вибраними з галоген(C₁-C₄)алкілу та -NR^aR^b, де інші перемінні є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого або п'ятого варіанту реалізації.

У сьомому варіанті реалізації сполука Формули I або Формули II являє собою Формулу III:

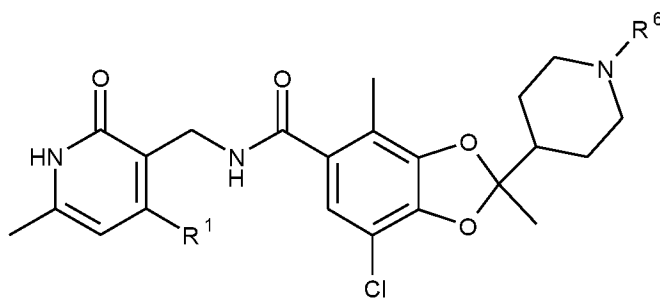


15

(III);

або її фармацевтично прийнятну сіль, де R⁶ являє собою галоген(C₁-C₄)алкіл, і де інші перемінні є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого або п'ятого варіанту реалізації.

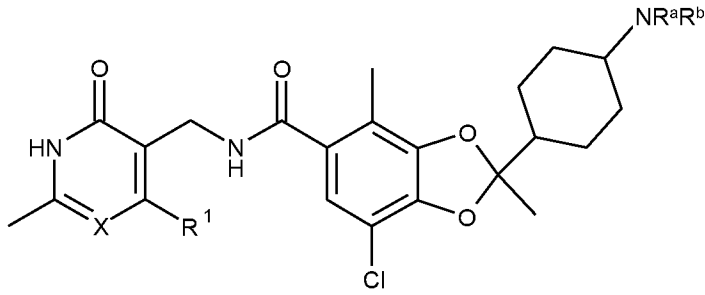
20 У восьмому варіанті реалізації сполука Формули I, Формули II або Формули III являє собою Формулу IV:



(IV);

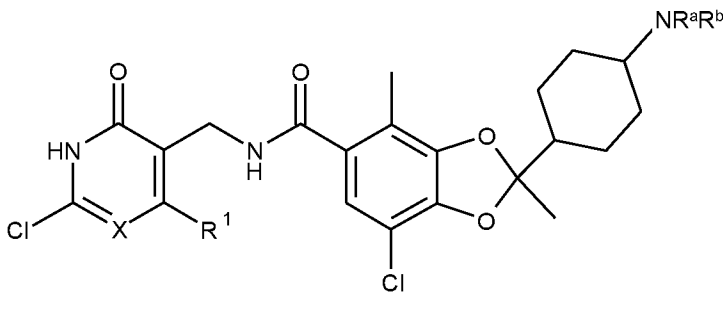
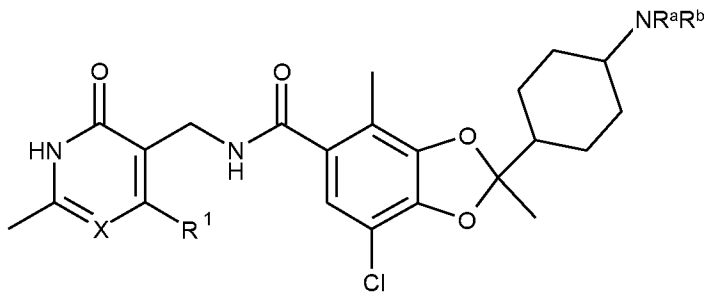
25 або її фармацевтично прийнятну сіль, де інші перемінні є такими, як описано вище для формули I або другого, четвертого, п'ятого або сьомого варіанту реалізації.

У дев'ятому варіанті реалізації сполука Формули I або Формули II являє собою Формулу V:



або її фармацевтично прийнятну сіль, де інші перемінні є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого або п'ятого варіанту реалізації.

5 У десятому варіанті реалізації сполука Формули I, Формули II або Формули V являє собою Формулу VI або VII:



або її фармацевтично прийнятну сіль, де інші перемінні та ознаки є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого або п'ятого варіанту реалізації.

15 В одинадцятому варіанті реалізації R^b у сполуках Формули I, Формули II, Формули V, Формули VI та Формули VII являє собою (C_1 - C_4)алкіл або оксетаніл, де зазначений оксетаніл необов'язково заміщений галогеном(C_1 - C_4)алкілом; або R^a і R^b разом з атомом нітрогену, до якого вони приєднані, утворюють азетидиніл, необов'язково заміщений галогеном або $-OR^c$, де інші перемінні та ознаки є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого або п'ятого варіанту реалізації.

20 У дванадцятому варіанті реалізації R^a у сполуках Формули I, Формули II, Формули V, Формули VI та Формули VII являють собою гідроген або метил; і R^b являє собою метил або оксетаніл, де зазначений оксетаніл необов'язково заміщений $-CH_2F$ або $-CF_3$, де інші перемінні та ознаки є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого, п'ятого або одинадцятого варіанту реалізації.

25 У тринадцятому варіанті реалізації R^a і R^b у сполуках Формули I, Формули II, Формули V, Формули VI та Формули VII разом з атомом нітрогену, до якого вони приєднані, утворюють азетидиніл, необов'язково заміщений 1 до 2 флуорами або $-OR^c$; і R^c являє собою $-CH_3$, $-CHF_2$ або циклопропіл, де інші перемінні та ознаки є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого, п'ятого або одинадцятого варіанту реалізації.

30 У чотирнадцятому варіанті реалізації конфігурація 1,3-діоксоланілу та NR^aR^b групи в будь-якій з Формул I, II, V, VI та VII має транс орієнтацію щодо циклогексилу, де решта ознак є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого, п'ятого, шостого, одинадцятого, дванадцятого або тринадцятого варіантів реалізації. Альтернативно, конфігурація 1,3-діоксоланілу та NR^aR^b групи Формул I, II, V, VI та VII має цис орієнтацію щодо

циклогексилу, де решта ознак є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого, п'ятого, шостого, одинадцятого, дванадцятого або тринадцятого варіанту реалізації.

У п'ятнадцятому варіанті реалізації стереохімічна конфігурація хірального центру 1,3-діоксоланілу в будь-якій із Формул I, II, III, IV, V, VI та VII являє собою R, де інші ознаки є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого, п'ятого, шостого, одинадцятого, дванадцятого, тринадцятого або чотирнадцятого варіанту реалізації. Альтернативно, стереохімічна конфігурація хірального центру 1,3-діоксоланілу в будь-якій з Формул I, II, III, IV, V, VI та VII являє собою S, де інші ознаки є такими, як описано вище для Формули I або другого, четвертого, п'ятого, шостого, одинадцятого, дванадцятого, тринадцятого або чотирнадцятого варіанту реалізації.

Конкретні приклади сполук наводяться в розділі ВИКОРИСТАННЯ і включаються як частина чотирнадцятого варіанту реалізації цього винаходу. Також включені фармацевтично прийнятні солі, а також нейтральні форми цих сполук. В одному з аспектів представлений опис включає рацемічні форми будь-якої сполуки, описаної в цьому документі.

4. Використання, формулювання та призначення

В деяких варіантах реалізації представлений винахід забезпечує композицію, що містить сполуку, описану в цьому документі, або її фармацевтично прийнятне похідне та фармацевтично прийнятний носій. Кількість сполуки у запропонованій композиції є такою, що є ефективною для вимірюваної модуляції гістон-метилмодифікуючого ферменту або його мутанта в біологічному зразку або у пацієнта.

У деяких варіантах реалізації описана в цьому документі композиція сформована для введення пацієнту, який потребує такої композиції. Композиції, описані в цьому документі, можуть вводитися перорально, парентерально, за допомогою інгаляції спрею, місцево, ректально, назально, букально, вагінально або через імплантований резервуар. Термін "парентеральний", як використовується в даному описі, включає підшкірні, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньосуглобові, внутрішньо-синовіальні, внутрішньо-грудні, інтратекальні, внутрішньопечінкові, внутрішньочеревні та внутрішньочерепні ін'єкції або інфузійні методи. В деяких варіантах реалізації композиції вводять перорально, внутрішньочеревно або внутрішньовенно. Стерильні ін'єкційні форми композицій, описаних у цьому документі, можуть бути водною або олійною суспензією. Ці суспензії можуть бути приготовані згідно з методами, відомими в даній області техніки, з використанням відповідних диспергуючих або змочувальних агентів та суспендуючих агентів.

В деяких варіантах реалізації композиції вводять перорально.

Конкретна схема дозування та лікування для конкретного пацієнта залежатиме від різноманітних факторів, включаючи активність використовуваної конкретної сполуки, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать, дієту, час прийому, швидкість виведення, комбінація препаратів, а також рішення лікаря та тяжкість конкретного захворювання, яке лікується. Кількість описаної в цьому документі сполуки в композиції також буде залежати від конкретної сполуки в композиції.

Описані в цьому документі сполуки та композиції, як правило, корисні для модуляції активності одного або декількох ферментів, що беруть участь в епігенетичній регуляції, і, зокрема, EZH1 та EZH2 і, ще більш конкретно, EZH2 та їх мутантних форм. У деяких варіантах реалізації, описані в цьому документі сполуки регулюють або пригнічують активність EZH2. У деяких варіантах реалізації сполуки, описані в цьому документі, є антагоністами активності EZH2. В деяких варіантах реалізації, описані в цьому документі сполуки регулюють або пригнічують активність EZH1. В деяких варіантах реалізації, описані в цьому документі сполуки є антагоністами активності EZH1.

В деяких варіантах реалізації сполуки та композиції, описані в цьому документі, корисні для лікування захворювань та/або розладів, пов'язаних із надмірною експресією EZH1 або EZH2 та/або експресією мутантної форми EZH2, таких як ті мутантні форми, які змінюють активність субстрату EZH2. Дослідження делецій, пропусків і зсувів рамки зчитування EZH2 свідчать про те, що EZH2 діє як супресор пухлини при захворюваннях крові, таких як мієлодиспластичні синдроми (МДС) та мієлоїдні злоякісні пухлини (Ernst et al., Nat Genet. 2010 Aug; 42(8):722-6; Nikoloski et al., Nat Genet. 2010 Aug; 42(8):665-7). В деяких варіантах реалізації сполуки та композиції, описані в цьому документі, корисні для лікування захворювань та/або розладів, пов'язаних з наявністю EZH2, що має мутацію Y641N, Y641C, Y641F, Y641H, Y641S, A677G або A687. У конкретному аспекті цього втілення EZH2 має мутацію Y641N.

В деяких варіантах реалізації представлений винахід забезпечує спосіб лікування суб'єкта, який страждає на захворювання та/або розлад, пов'язаний з надмірною експресією EZH1 або EZH2 та/або експресією мутантної форми EZH2, що включає стадію введення сполуки, описаної

в цьому документі, або її фармацевтично прийнятної солі або її композиції. В деяких варіантах реалізації вищезазначений спосіб додатково включає попередню стадію визначення, чи суб'єкт надмірно експресує EZH2 або експресує мутантну форму EZH2.

У деяких варіантах реалізації захворюванням або розладом, пов'язаним з наявністю мутантної форми EZH2, є В-клітинна лімфома людини. У деяких варіантах реалізації захворюванням і/або розладом, пов'язаним з наявністю Y641N EZH2, є фолікулярна лімфома або дифузна великоклітинна лімфома. В деяких варіантах реалізації сполуки або композиції, описані в цьому документі, корисні для лікування розладів крові, таких як мієлодиспластичні синдроми, лейкемія, анемія та цитопенія. Sneeringer et al., "Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas," Sneeringer et al., Proc. Natl Acad. Sci. 2010 Dec; 109(48):20980-20985.

В деяких варіантах реалізації сполуки та композиції, описані в цьому документі, корисні для лікування захворювань та/або розладів, пов'язаних з клітинною проліферацією. В деяких варіантах реалізації сполуки та композиції, описані в цьому документі, корисні для лікування захворювань та/або розладів, пов'язаних з неправильною регуляцією клітинного циклу або відновленням ДНК. В деяких варіантах реалізації сполуки та композиції, описані в цьому документі, корисні для лікування раку.

В одному з аспектів, рак, який може лікуватися сполуками, композиціями та способами, описаними в цьому документі, включають, але не обмежуються ними, Серце: саркома (ангіосаркома, фібросаркома, рабдоміосаркома, ліпосаркома), міксосома, рабдоміома, фіброма, ліпома та тератома; Легені: бронхогенна карцинома (плоскоклітинна, недиференційована дрібноклітинна, недиференційована великоклітинна, аденокарцинома), альвеолярна (бронхіолярна) карцинома, аденома бронхів, саркома, лімфома, хондроматозна гамартома, мезотеліома; Шлунково-кишковий тракт: стравохід (плоскоклітинний рак, аденокарцинома, лейоміосаркома, лімфома), шлунок (карцинома, лімфома, лейоміосаркома), підшлункова залоза (протокова аденокарцинома, інсулінома, глюкагонома, гастринома, карциноїдні пухлини, віпома), тонка кишка (аденокарцинома, лімфома, карциноїдні пухлини, саркома Капоші, лейоміома, гемангіома, ліпома, нейрофіброма, фіброма), товста кишка (аденокарцинома, каналцева аденома, ворсинчаста аденома, гамартома, лейоміома); Сечостатеві шляхи: нирки (аденокарцинома, пухлина Вільма (нефробластома), лімфома, лейкемія), сечовий міхур та уретра (плоскоклітинний рак, перехідно-клітинний рак, аденокарцинома), простата (аденокарцинома, саркома), яєчка (сеїнома, тератома, ембріональна карцинома, тератома, хоріокарцинома, саркома, інтерстиціально-клітинний рак, фіброма, фіброаденома, аденоматоїдні пухлини, ліпома); Печінка: гепатома (гепатоцелюлярна карцинома), холангіокарцинома, гепатобластома, ангіосаркома, гепатоцелюлярна аденома, гемангіома; Кістки: остеогенна саркома (остеосаркома), фібросаркома, злоякісна фіброзна гістіоцитома, хондросаркома, саркома Юїнга, злоякісна лімфома (саркома клітин ретикулуму), множинна мієлома, злоякісна гігантсьоклітинна пухлина, хордома, остеохондрома (остеохрящово-хорондомангіальна хобондогенна хомоброброма остеома та гігантоклітинні пухлини); Нервова система: череп (остеома, гемангіома, гранульома, ксантома, деформантний остеїт), мозкові оболонки (менінгіома, менінгіосаркома, гліоматоз), мозок (астроцитотома, медуллобластома, гліома, епендимотома, гермінома (пінеалома), гліобластома мультиформна вроджені пухлини), нейрофіброма спинного мозку, менінгіома, гліома, саркома); Гінекологічний: матка (карцинома ендометрію), шийка матки (карцинома шийки матки, передпухлинна дисплазія шийки матки), яєчники (карцинома яєчників (серозна цистаденокарцинома, муциозна цистаденокарцинома, явноклітинна карцинома, некласифікована карцинома), гранульозно-клітинні пухлини, ракові клітини Сертолі-Лейдига, дисгермінома, злоякісна тератома), вульва (плоскоклітинний рак, інтраепітеліальна карцинома, аденокарцинома, фібросаркома, меланома), піхва (прозороклітинна карцинома, плоскоклітинний рак, ботріоїдна саркома (ембріональна рабдоміосаркома), халопієві труби (карцинома); Гематологічний: кров (мієлоїдний лейкоз (гострий та хронічний), гострий лімфобластний лейкоз, хронічний лімфолейкоз, мієлопроліферативні захворювання, множинна мієлома, мієлодиспластичний синдром), хвороба Ходжкіна, неходжкінська лімфома (злоякісна лімфома); Шкіра: злоякісна меланома, карцинома базальних клітин, саркома Капоші, диспластичні невуси родимок, ліпома, ангіома, дерматофіброма, келоїди, псоріаз; і надниркові залози: нейробластома.

В одному з аспектів, рак, що лікують описаними в цьому документі сполуками, композиціями та способами, вибирають із раку надниркових залоз, ацинозної клітинної карциноми, акустичної невроми, акральної-лентигозної меланоми, акроспіроми, гострого еозинофільного лейкозу, гострого еритроїдного лейкозу, гострого лімфобластного лейкозу, гострого мегакаріобластичного лейкозу, гострого моноцитарного лейкозу, гострого промієлоцитарного

лейкозу, аденокарциноми, аденоїдної кістозної карциноми, аденоми, аденоматоїдної одонтогенної пухлини, аденосквामозної карциноми, новоутворення жирової тканини, адренкортикальної карциноми, лейкемії/лімфоми Т-клітин дорослих, агресивної NK-клітинної лейкемії, СНІД-залежної лімфоми, алвеолярної рабдоміосаркоми, саркоми м'якої частини альвеоли, амелобластичної фіброми, анапластичної великоклітинної лімфоми, анапластичного раку щитовидної залози, ангіоімунобластної Т-клітинної лімфоми, ангіоміоліптоми, ангіосаркоми, астроцитомі, атипової тератоїдно рабдоїдної пухлини, хронічної В-клітинної лімфоцитної лейкемії, В-клітинної лімфоцитної лейкемії, В-клітинної лімфоми, карциноми базальних клітин, раку жовчовивідних шляхів, раку сечового міхура, бластоми, раку кісток, пухлини Бреннера, пухлини Броуна, лімфоми Буркітта, раку молочної залози, раку головного мозку, карциноми, карцинома *in situ*, карциносаркоми, пухлини хряща, цементомі, мієлоїдної саркоми, хондроми, хордоми, хоріокарциноми, папіломи судинного сплетіння, ясноклітинної саркоми нирки, краніофарингіоми, Т-клітинної лімфоми шкіри, раку шийки матки, колоректального раку, хвороби Дегоса, десмопластичної дрібноокруглоклітинної пухлини, дифузної великої В-клітинної лімфоми, дісембріопластичної нейроекспітеліальної пухлини, дисгерміноми, ембріональної карциноми, новоутворення ендокринної залози, ендодермальної синусової пухлини, пов'язаної з ентеропатією Т-клітинної лімфоми, раку стравоходу, плід у плоді, фіброми, фібросаркоми, фолікулярної лімфоми, фолікулярного раку щитовидної залози, гангліоневроми, раку шлунково-кишкового тракту, пухлини статевих клітин, гестаційної хоріокарциноми, гігантськоклітинної фібробластоми, гігантськоклітинної фібробластоми кістки, гліальної пухлини, мультиформної гліобластоми, гліоми, гліоматозу головного мозку, гліомагоми, гонадобластоми, гранульозотекаклітинної пухлини, гіандробластоми, раку жовчного міхура, раку шлунку, лейкозу ворсинчастих клітин, гемангіобластоми, раку голови та шиї, гемангіоперицитомі, гематологічного злроякісного утворення, гепатобластоми, гепатоспленічної Т-клітинної лімфоми, лімфоми Ходжкіна, неходжкінової лімфоми, інвазивного долькового раку, раку кишечника, раку гортані, злроякісного лентіго, летальна срединної карциноми, лейкемії, пухлини лейдигових клітин, ліпосаркоми, раку легень, лімфангіоми, лімфангіосаркоми, лімфоепітеліоми, лімфоми, гострого лімфоцитарного лейкозу, гострого мієлогенного лейкозу, хронічного лімфоцитного лейкозу, раку печінки, дрібноклітинного раку легень, недрібноклітинного раку легень, MALT-лімфома, злроякісної фіброзної гістіоцитомі, злроякісної пухлини оболонки периферичного нерву, злроякісної пухлини тритону, лімфоми мантійних клітин, лімфоми крайньої зони В-клітин, пухлини тучних клітин, медіастенальної гоноцитомі, медулярної карциноми молочної залози, медулярного раку щитовидної залози, медуллобластоми, меланоми, менінгіоми, раку клітин Меркеля, мезотеліоми, метастатичної уротеліальної карциноми, змішаної пухлини Мюллера, муцинозної пухлини, множинної мієломи, новоутворення м'язової тканини, мікозу фунгідес, міксоїдної ліпосаркоми, міксоми, міксосаркоми, носоглоткової карциноми, невриноми, нейробластоми, нейрофіброми, нейроми, вузловий меланоми, раку ока, алігоастроцитомі, олігодендрогліоми, онкоцитомі, менінгіоми оболонки зорового нерву, пухлина зорового нерву, раку ротової порожнини, остеосаркоми, раку яєчників, пухлини Панкоуста, папілярного раку щитовидної залози, парагангліоми, пінеалобластоми, пінеоцитомі, гіпофізоми, аденоми гіпофіза, пухлини гіпофіза, плазмацитомі, поліембріоми, первинної Т лімфобластичної лімфоми, первинної лімфоми центральної нервової системи, первинної випітної лімфоми, первинного раку очеревини, раку передміхурової залози, раку підшлункової залози, раку глотки, псевдоміксомної перитонеї, нирково-клітинної карциноми, нирково-мозкової карциноми, ретинобластоми, рабдоміоми, рабдоміосаркоми, трансформації Ріхтера, раку прямої кишки, саркоми, шванноматозу, семіноми, пухлини клітин Сертолі, пухлини статевого канатику-гонадаль-стромальна, перстневидно-клітинного раку, раку шкіри, дрібних синьо-круглоклітинних пухлин, дрібноклітинного раку, саркоми м'яких тканин, соматостатиноми, раку трубочистів, пухлини хребта, лімфоми маргінальної зони селезінки, карциноми сквामозних клітин, синовіальної саркоми, хвороби Сезарі, дрібного раку кишечника, сквामозної карциноми, раку шлунка, Т-клітинної лімфоми, раку яєчок, текоми, раку щитовидної залози, перехідно-клітинного раку, раку горла, рак урача, уrogenітального раку, уротеліальної карциноми, увеальної меланоми, раку матки, веррукозної карциноми, гліоми зорового шляху, раку вульви, вагінального раку, макроглобулінемії Вальденстрема, пухлини Уортіна та пухлини Вільмса.

В одному з аспектів рак, що лікується описаними в цьому документі сполуками, композиціями та способами, вибирають з аденокарциноми, Т-клітинного лейкозу/лімфоми дорослих, раку сечового міхура, бластоми, раку кісток, раку молочної залози, раку мозку, карциноми, мієлоїдної саркоми, раку шийки матки, раку прямої кишки, раку стравоходу, рак шлунково-кишкового тракту, мультиформної гліобластоми, гліоми, раку жовчного міхура, раку шлунку, раку голови та шиї, лімфома Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, раку кишечника, раку

нирок, рак гортані, лейкемії, раку легень, лімфоми, раку печінки, дрібноклітинного раку легень, недрібноклітинного раку легень, мезотеліоми, множинної мієломи, гострого мієлоїдного лейкозу (ОМЛ), дифузної великої В-клітинної лімфоми (DLBCL), очного раку, пухлини зорового нерву, раку порожнини рота, раку яєчників, пухлини гіпофіза, первинної лімфоми центральної нервової системи, раку передміхурової залози, раку підшлункової залози, раку глотки, раку ниркових клітин, раку прямої кишки, саркоми, раку шкіри, пухлини хребта, раку тонкої кишки, раку шлунку, Т-клітинної лімфоми, раку яєчок, раку щитовидної залози, раку горла, сечостатевого раку, уротеліальної карциноми, раку матки, вагінального раку та пухлина Вільмса.

В одному з аспектів, рак, який лікують описаними в цьому документів сполуками, композиціями та способами, вибирають із раку молочної залози, раку простати, раку товстої кишки, нирково-клітинної карциноми, мультиформної гліобластоми, раку сечового міхура, меланоми, раку бронхів, лімфоми та раку печінки.

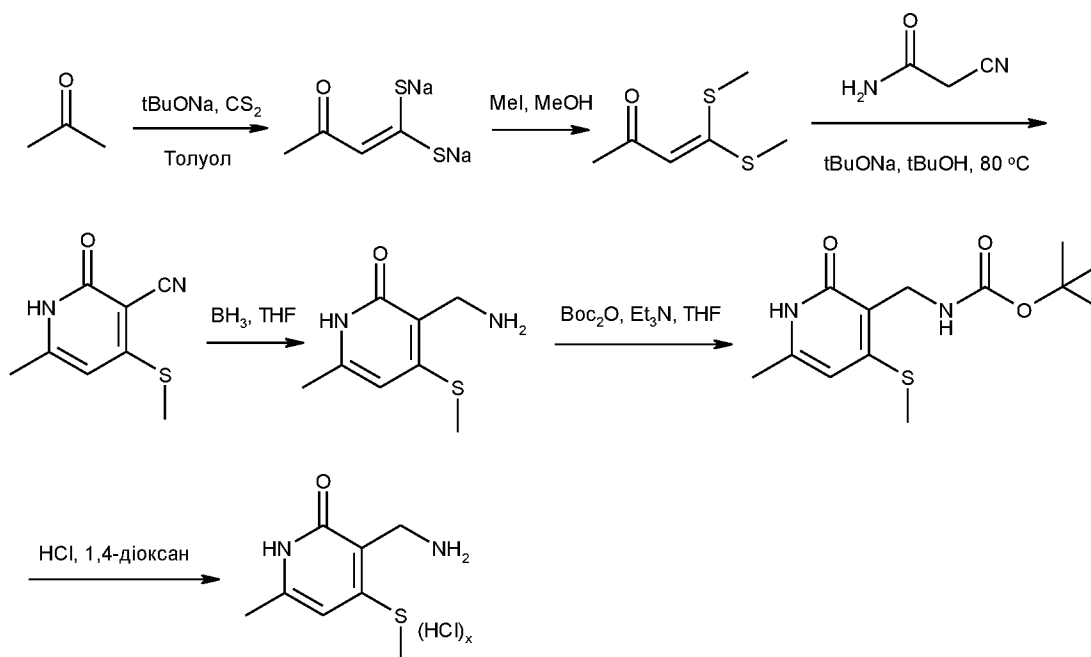
Також передбачається використання сполуки, описаної в цьому документі, або її фармацевтично прийнятної солі, або композиції, що містить описану сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль, для виготовлення лікарського засобу для лікування стану, описаного в цьому документі. Також забезпечується сполука, описана в цьому документі, або її фармацевтично прийнятна сіль, або композиція, що містить описану сполуку або її фармацевтично прийнятну сіль, для використання при лікуванні стану, описаного в цьому документі.

Приклад

Репрезентативні приклади, що наводяться далі, призначені, щоб допомогти проілюструвати винахід, і не призначені, а також не повинні тлумачитися як обмеження рамок винаходу.

Одержання проміжних сполук

Проміжна сполука 1: 3-(амінометил)-6-метил-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-он (гідрохлоридна сіль)



Проміжна сполука 1

Стадія 1: Синтез 3-оксобут-1-ен-1,1-біс(тіолату) натрію

Суміш трет-бутоксиду натрію (16,6 г, 172 ммоль) у толуолі (30 мл) дегазували під вакуумом і продували нітрогеном (3 цикли). Потім при 0 °C додавали ацетон (5,0 г, 6,4 мл, 86 ммоль) з подальшим повільним додаванням сірковуглецю (6,6 г, 5,24 мл, 86 ммоль). Отриману суміш перемішували при 0 °C протягом 4 год. і потім фільтрували. Осадок на фільтрі сушили під вакуумом, отримуючи вказану в заголовку сполуку (15,4 г, неочищена) у вигляді твердої речовини жовтого кольору, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення.

Стадія 2: Синтез 4,4-біс(метилтіо)бут-3-ен-2-ону

До розчину 3-оксобут-1-ен-1,1-біс(тіолату) натрію (15,4 г, 86,4 ммоль) у метанолі (90 мл) повільно додавали йодометан (24,5 г, 10,7 мл, 173 ммоль). Суміш перемішували при 70 °C

протягом 1 години і потім концентрували досуха. Додавали воду (30 мл) і бажаний продукт екстрагували етилацетатом (60 мл × 3). Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію і концентрували при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (6,8 г, вихід 42 %) у вигляді коричневої олії, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення.

5 РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 163,0; знайдено 163,0. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ d) δ 6,02 (с, 1H), 2,45 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 2,15 (с, 3H).

Стадія 3: Синтез 6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрилу

10 До розчину 4,4-біс(метилтіо)бут-3-ен-2-ону (2,9 г, 18 ммоль) та 2-ціаноацетаміду (1,5 г, 18 ммоль) у трет-бутанолі (50 мл) додавали трет-бутоксид натрію (1,9 г, 20 ммоль). Суміш перемішували при 80 °С протягом 12 годин (на цій стадії було проведено та об'єднано дві партії реакції). Додавали воду (20 мл) і доводили рН до 5-6 за допомогою 10 % соляної кислоти. Отриману суміш фільтрували і осад на фільтрі промивали петролейним ефіром (20 мл × 2), потім осад сушили під вакуумом, отримуючи вказану в заголовку сполуку (4,8 г, вихід 74 %) у вигляді білувато-твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення.

15 РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 181,0; знайдено 181,0. ¹H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d₆) δ 6,27 (с, 1H), 2,56 (с, 3H), 2,25 (с, 3H).

Стадія 4: Синтез 3-(амінометил)-6-метил-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-ону

20 Суміш 6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрилу (3,6 г, 20 ммоль) в тетрагідрофурані (50 мл) дегазували під вакуумом і продували нітрогеном (3 цикли). Потім повільно додавали диметилсульфідний комплекс борану (10 М, 8,0 мл, 80 ммоль) при 0 °С і потім реакційну суміш нагрівали до 70 °С і перемішували протягом 2 годин. Метанол (15 мл) повільно додавали при 0 °С для гасіння реакції і потім суміш концентрували при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (3,8 г, неочищена) у вигляді світло-жовтої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення.

25 РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 185,1; знайдено 185,0.

Стадія 5: Синтез трет-бутил ((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамату

30 До розчину 3-(амінометил)-6-метил-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-ону (3,6 г, 20 ммоль) в тетрагідрофурані (80 мл) додавали триетиламін (5,9 г, 8,1 мл, 59 ммоль). Суміш перемішували протягом 30 хв і потім додавали ди-трет-бутилдикарбонат (6,4 г, 29 ммоль), і реакційну суміш перемішували при 25 °С протягом 12 годин. Потім реакційну суміш концентрували насуху при зниженому тиску і потім додавали воду (35 мл) і бажаний продукт екстрагували сумішшю 5:1 петролейний ефір/етилацетат (30 мл × 3). Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію і концентрували, отримуючи вказану в заголовку сполуку (5,8 г, неочищена) у вигляді білої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення.

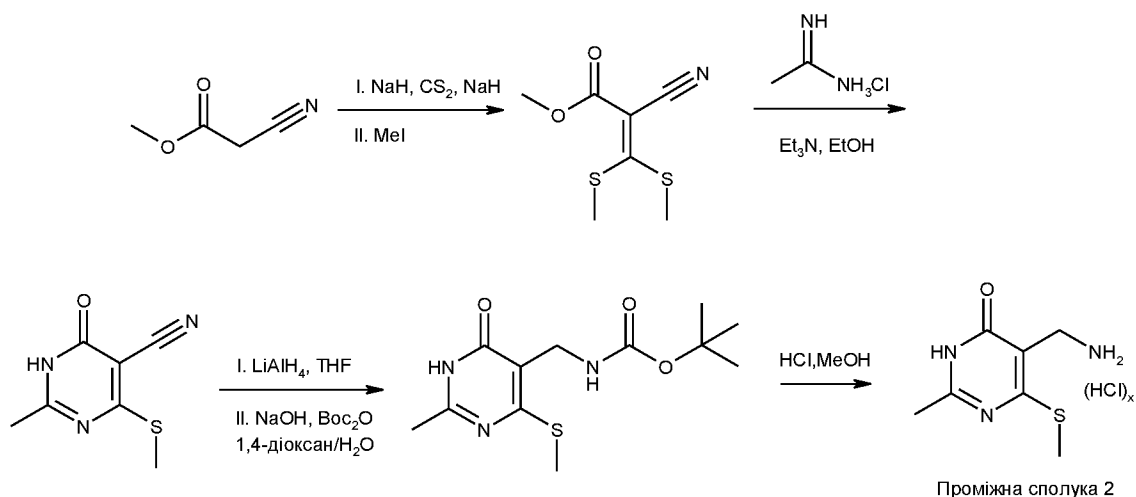
35 РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 285,12; знайдено 284,9. ¹H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d₆) δ 6,05 (с, 1H), 4,03-4,00 (м, 2H), 2,42 (с, 3H), 2,15 (с, 3H), 1,39 (с, 9H).

Стадія 6: Синтез 3-(амінометил)-6-метил-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-ону (гідрохлоридна сіль)

40 До розчину хлориду водню в 1,4-діоксані (4 М, 100 мл, 400 ммоль) додавали при 25 °С трет-бутил ((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамат (5,0 г, 17,6 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 25 °С протягом 2 год., потім концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок промивали дихлорметаном (30 мл × 2) та етилацетатом (30 мл), отримуючи вказану в заголовку сполуку (4,5 г, неочищена, HCl сіль) у вигляді твердої речовини жовтого кольору, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення.

45 РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 185,1; знайдено 185,0. ¹H ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 6,31 (с, 1H), 4,03 (с, 2H), 2,41 (с, 3H), 2,18 (с, 3H).

Проміжна сполука 2: 5-(амінометил)-2-метил-6-(метилтіо)піримідин-4(3H)-он (гідрохлоридна сіль)



Стадія 1: Синтез метил 2-ціано-3,3-біс(метилтіо)акрилату

Суспензію гідриду натрію (60 % дисперсія в мінеральній олії) (4,23 г, 106 ммоль) у тетрагідрофурані (400 мл) охолоджували до 0 °С і потім по краплям додавали метилціаноацетат (8,90 мл, 101 ммоль). Реакційну суміш енергійно перемішували протягом 15 хвилин і потім по краплях додавали дисульфід карбону (6,1 мл, 101 ммоль), підтримуючи температуру реакції нижче 20 °С (білий напівтвердий продукт ставав жовтим). Потім по краплях додавали йодометан (15,7 мл, 252 ммоль) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Потім реакційну суміш концентрували при зниженому тиску і залишок виливали в крижану воду. Отриманий осад фільтрували і сушили під вакуумом, отримуючи вказану в заголовку сполуку (11,9 г, вихід 58 %) у вигляді твердої речовини жовто-коричневого кольору, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ d) δ 3,83 (с, 3H), 2,76 (с, 3H), 2,61 (с, 3H).

Стадія 2: Синтез 2-метил-4-(метилтіо)-6-оксо-1,6-дигідропіримідин-5-карбонітрилу

Метил 2-ціано-3,3-біс(метилтіо)акрилат (11,9 г, 58,5 ммоль) розчиняли в етанолі (1000 мл). До суміші додавали гідрохлорид ацетамідину (5,53 г, 58,5 ммоль) і триетиламін (36,7 мл, 263 ммоль) і перемішували зі зворотним холодильником протягом ночі. Потім реакційну суміш концентрували при зниженому тиску і залишок промивали 10 % соляною кислотою. Осад відфільтровували, а осад на фільтрі промивали водою та діетиловим ефіром перед висушуванням у вакуумі, отримуючи вказану в заголовку сполуку (5 г, вихід 47 %) у вигляді твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 182,03; знайдено 182,10. ¹H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d₆) δ 2,57 (с, 3H), 2,37 (с, 3H).

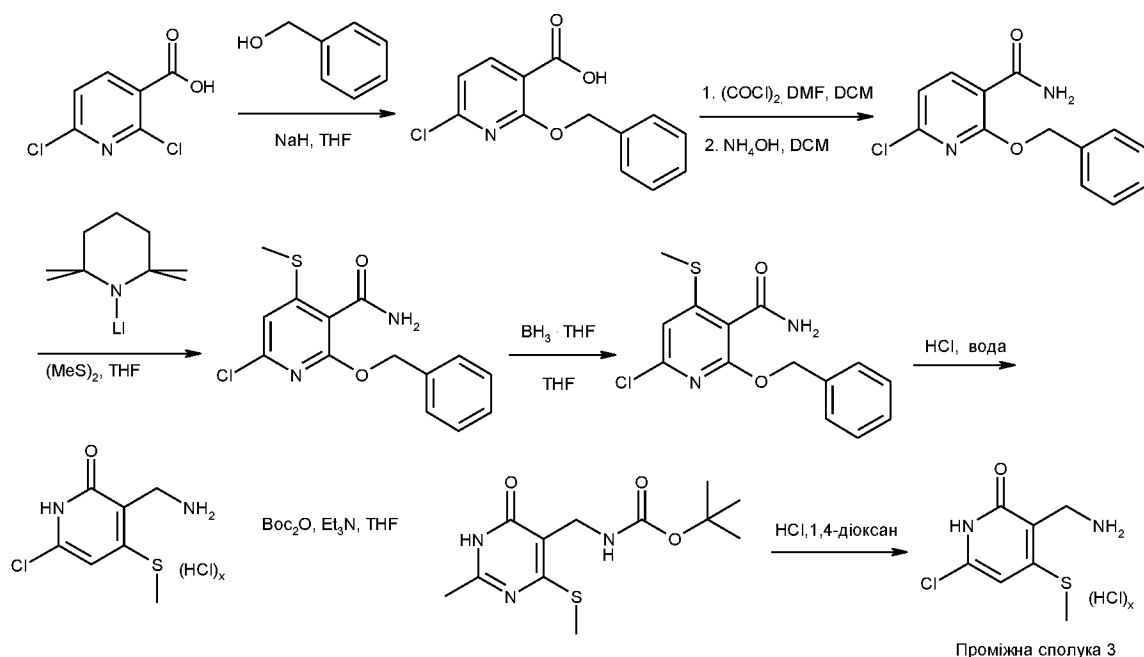
Стадія 3: Синтез трет-бутил ((2-метил-4-(метилтіо)-6-оксо-1,6-дигідропіримідин-5-іл)метил)карбамату

До суспензії 2-метил-4-(метилтіо)-6-оксо-1,6-дигідропіримідин-5-карбонітрилу (1,5 г, 8,27 ммоль) у тетрагідрофурані (50 мл) при 0 °С додавали розчин алюмогідриду літію в тетрагідрофурані (2 М, 6,2 мл, 12,4 ммоль). Реакцію повільно нагрівали до кімнатної температури і після завершення гасили водним розчином гідроксиду натрію (1 М, 33 мл, 33,1 ммоль). До цієї суміші послідовно додавали 1,4-діоксан (50 мл) та ди-трет-бутилдикарбонат (3,61 г, 16,6 ммоль). Двофазну суміш інтенсивно перемішували до повного захисту аміну. Двофазну суміш підкислювали до нейтрального рН оцтовою кислотою, розділяли і водний шар екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом магнію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок розтирали з дихлорметаном і фільтрат (що містить бажаний продукт) концентрували досуха при зниженому тиску. Отриману тверду речовину очищали флеш-хроматографією із зворотною фазою (колонка C18, градієнт від 5 % до 95 % ацетонітрилу у воді, забуферений 0,1 % трифлуороцтовою кислотою), потім за допомогою флеш-хроматографії з нормальною фазою (сілікагель, градієнт від 30 % до 90 % етилацетату в дихлорметані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (2,57 г, вихід 26 %, чистота >99 %) у вигляді білої твердої речовини. РХМС [M-(C₄H₈)+H]⁺ m/z: розраховано 230,1; знайдено 230,0. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ d) δ 13,20 (с, 1H), 5,37 (т, J=5,5 Гц, 1H), 4,26 (д, J=5,6 Гц, 2H), 2,51 (с, 3H), 2,44 (с, 3H), 1,44 (с, 9H).

Стадія 4. Синтез 5-(амінометил)-2-метил-6-(метилтіо)піримідин-4(3H)-ону (гідрохлоридна сіль)

До суспензії трет-бутил ((2-метил-4-(метилтіо)-6-оксо-1,6-дигідропіримідин-5-іл)метил)карбамату (300 мг, 1,05 ммоль) у 1,4-діоксані (7,2 мл) при 23 °С додавали розчин хлориду водню в 1,4-діоксані (4 М, 2,10 мл, 8,40 ммоль). Реакцію перемішували при 23 °С протягом 3 год., потім додавали більше розчину хлориду водню в 1,4-діоксані (4 М, 2,10 мл, 8,40 ммоль). Через 14 год. реакційну суміш концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (254 мг, вихід 94 %) у вигляді білої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+Na]⁺ (вільна основа) m/z: розраховано 208,1; знайдено 208,1.

Проміжна сполука 3: 3-(амінометил)-6-хлор-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-он (гідрохлоридна сіль)



Стадія 1: Синтез 2-(бензилокси)-6-хлоронікотинової кислоти

До суспензії гідриду натрію (60 % дисперсія в мінеральній олії) (11,5 г, 286 ммоль) у тетрагідрофурани (500 мл) додавали бензиловий спирт (14 мл, 143 ммоль) при 0 °С. Реакційну суміш перемішували протягом 20 хв, потім додавали розчин 2,6-дихлорпіридин-3-карбонової кислоти (25 г, 130 ммоль) у тетрагідрофурани (500 мл) і реакційну суміш перемішували протягом 4 годин при 23 °С. Потім реакцію гасили 10 %-ною соляною кислотою (300 мл), обробляли твердим NaHCO₃ до рН ~8, підкисляли оцтовою кислотою (50 % у воді) і, нарешті, екстрагували етилацетатом (200 мл × 3). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (200 мл), сушили над сульфатом магнію, фільтрували і концентрували досуха. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 5 % до 50 % етилацетату в дихлорметані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (33,68 г, вихід 98 %).

Стадія 2: Синтез 2-(бензилокси)-6-хлоронікотинаміду

До розчину 2-(бензилокси)-6-хлоронікотинової кислоти (33,68 г, 128,2 ммоль) у дихлорметані (500 мл) при 0 °С додавали N, N-диметилформамід (1 мл) і потім оксалілхлорид (11,9 мл, 141 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23 °С протягом 2 годин, потім концентрували досуха. Залишок розчиняли в дихлорметані (200 мл) і повільно додавали до концентрованого розчину гідроксиду амонію (50 мл) при 0 °С. Через 1 год. органічний шар збирали і водну фазу екстрагували дихлорметаном (50 мл × 3). Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом магнію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 0 % до 50 % етилацетату в дихлорметані), отримуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини (кількісний вихід).

Стадія 3: Синтез 2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтіо)нікотинаміду

До розчину 2,2,6,6-тетраметилпіперидину (29,45 мл, 175,1 ммоль) в тетрагідрофурани (300 мл) при -78 °С додавали розчин n-бутилтію в гексані (2,5 М, 70 мл, 175,1 ммоль). Реакційну суміш нагрівали до 0 °С протягом 30 хв, потім знову охолоджували до -78 °С. Потім додавали розчин 2-(бензилокси)-6-хлоронікотинаміду (11,5 г, 43,8 ммоль) у тетрагідрофурани (100 мл), підтримуючи внутрішню температуру нижче -60 °С. Реакційну суміш перемішували протягом 1

години при -78°C , потім додавали диметилдисульфід (15,77 мл, 175,1 ммоль). Реакційну суміш перемішували при -78°C протягом додаткових 2 годин, потім гасили при -78°C розчином оцтової кислоти у воді (50 % об/об). Бажаний продукт екстрагували етилацетатом (100 мл \times 3) і об'єднані органічні шари промивали водою (20 мл), насиченим водним розчином бікарбонату натрію (20 мл), розсоллом (20 мл), сушили над сульфатом магнію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 0 % до 20 % етилацетату в дихлорметані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (4,86 г, вихід 36 %).

Стадія 4: Синтез 2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтіо)піридин-3-іл)метанаміну

До розчину 2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтіо)нікотинаміду (4,86 г, 15,7 ммоль) у тетрагідрофурані (100 мл) при 23°C додавали розчин борану в тетрагідрофурані (1 М, 63 мл, 63 ммоль). Реакційну суміш перемішували зі зворотним холодильником протягом 15 год., потім гасили повільним додаванням метанолу при кімнатній температурі. Реакційну суміш концентрували досуха при зниженому тиску і залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 0 % до 30 % метанолу в дихлорметані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (710 мг, вихід 15 %) у вигляді білої твердої речовини.

Стадія 5: Синтез 3-(амінометил)-6-хлор-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-ону (гідрохлоридна сіль)

До колби, що містить 2-(бензилокси)-6-хлор-4-(метилтіо)піридин-3-іл)метанамін (710 мг, 2,41 ммоль), додавали концентровану хлорводневу кислоту (12 М, 5,0 мл, 60 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 23°C протягом 2 год., потім концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок перекристалізували із суміші метанолу та діетилового ефіру, одержуючи вказану в заголовку сполуку (400 мг, вихід 69 %) у вигляді білої твердої речовини.

Стадія 6: Синтез трет-бутил ((6-хлор-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамату

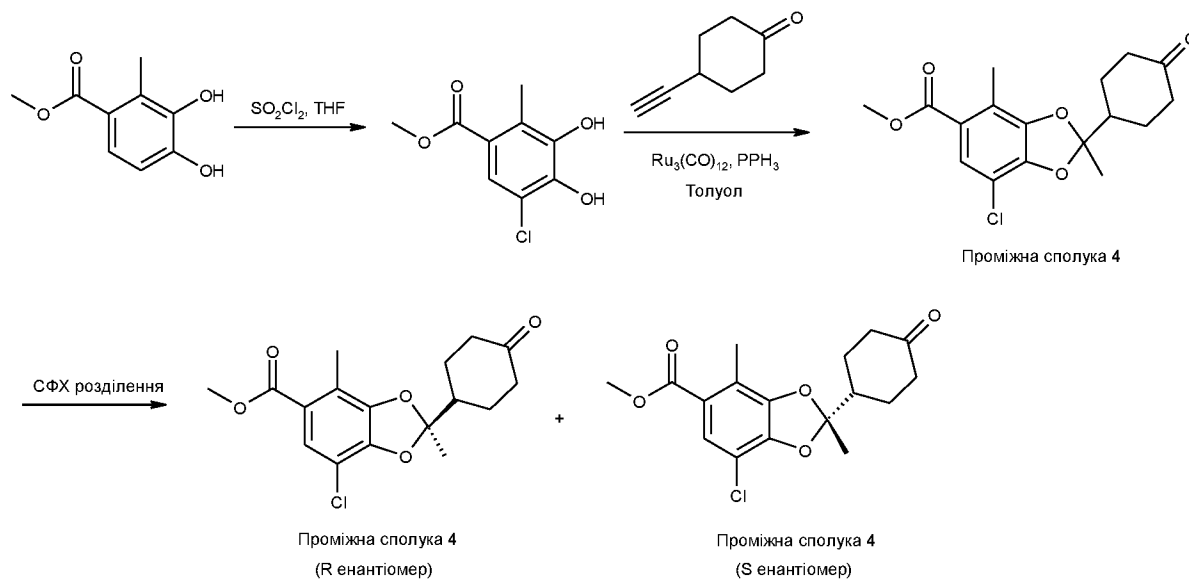
До суспензії гідрохлоридної солі 3-(амінометил)-6-хлор-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-ону (1,575 г, 6,53 ммоль) у дихлорметані (50 мл) додали ди-трет-бутилдикарбонат (2,85 г, 13,1 ммоль), а потім N, N-діізопропілетиламін (3,4 мл, 19,6 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 год. (поки все не розчинилося), потім гасили водою. Органічний шар відокремлювали, сушили над сульфатом магнію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 0 до 10 % метанолу в дихлорметані), отримуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді білої твердої речовини (1,5 г, вихід 75 %). РХМС $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z: розраховано 305,1; знайдено 305,1.

Стадія 7: Синтез 3-(амінометил)-6-хлор-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-ону (гідрохлоридна сіль)

До суспензії трет-бутил ((6-хлор-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)карбамату (300 мг, 984 мкмоль) в 1,4-діоксані (4,9 мл) додавали розчин хлориду водню в 1,4-діоксані (4 М, 1,96 мл, 7,87 ммоль) при кімнатній температурі. Реакцію перемішували при кімнатній температурі протягом 3 год., потім додавали більше розчину хлориду водню в 1,4-діоксані (4 М, 1,96 мл, 7,87 ммоль). Через 14 год. реакцію концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (253 мг, кількісний вихід) у вигляді білої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (вільна основа) m/z: розраховано 227,0; знайдено 227,0.

Проміжна сполука 4: метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилат

45



Стадія 1: Синтез метил 5-хлор-3,4-дигідрокси-2-метилбензоату

До розчину метил 3,4-дигідрокси-2-метилбензоату (5,11 г, 27,9 ммоль) у тетрагідрофурані (199 мл) при -20°C по краплях додавали сульфурилхлорид (2,45 мл, 30,6 ммоль). Реакційну суміш перемішували при -20°C протягом 3 год., потім гасили насиченим водним розчином хлориду амонію (50 мл). Бажаний продукт екстрагували етилацетатом (25 мл \times 3). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (25 мл), сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (сілікагель, градієнт від 0 % до 60 % етилацетату в гептані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (4,117 г, вихід 68 %) у вигляді твердої речовини бежевого кольору. РХМС $[M+H]^+$ m/z: розраховано 217,0; знайдено 217,1 (картина ізотопу Cl).

Стадія 2: Синтез метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)-2H-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилату

Суміш метил 5-хлор-3,4-дигідрокси-2-метилбензоату (1,2 г, 5,53 ммоль), трирутенію додекакарбонілу (176 мг, 276 мкмоль) та трифенілфосфіну (145 мг, 553 мкмоль) дегазували під вакуумом і продували нітрогеном (3 цикли). Додавали толуол (8,1 мл) і реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Потім по краплях додавали розчин 4-етнілциклогексан-1-ону (1,34 г, 11,0 ммоль) у толуолі (17 мл) і реакційну суміш перемішували протягом 23 год. із зворотним холодильником. Нарешті, реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (сілікагель, градієнт від 0 до 60 % етилацетату в гептані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (1,372 г, вихід 70 %) у вигляді жовтого масла. РХМС $[M+Na]^+$ m/z: розраховано 361,1; знайдено 361,1 (картина ізотопу Cl).

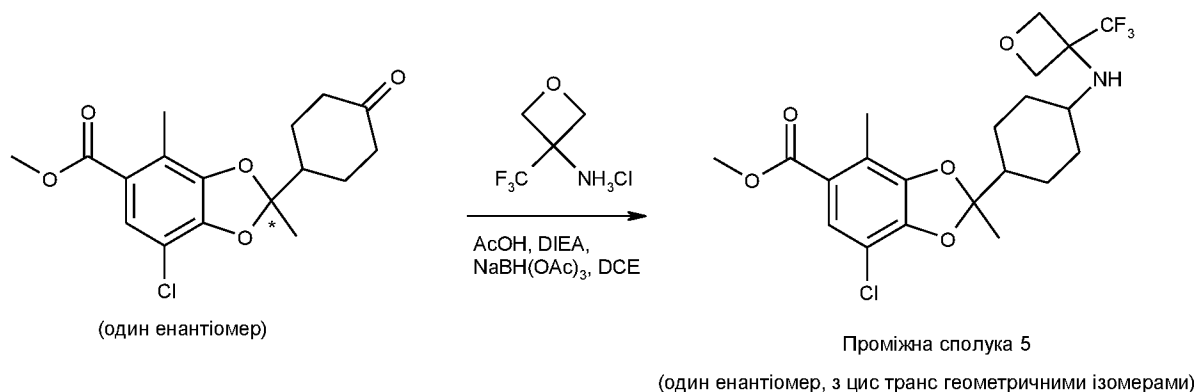
Стадія 3: Розділення метил (R)-7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату та метил (S)-7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

Рацемічну суміш метил-7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (4,4 г, 13 ммоль) розділяли за допомогою препаративної СФХ [Колонка: ChiralPak AY від Daicel chemical industries (250 мм \times 50 мм ВД, 10 мкм). Мобільна фаза А: CO_2 / Мобільна фаза В: 0,1 % NH_4OH у метанолі. Ізократича (85 % мобільна фаза А і 15 % мобільна фаза В). Швидкість потоку: 80 мл/хв. Температура колонки: 40°C]. Проміжна сполука 4 (пік 1) (небажаний енантіомер/дістомер): Час утримання = 6,2 хв. Виділення = 1,4 г, 4,05 ммоль, вихід 31 %, 90 % ee, Чистота 98 % (жовта тверда речовина). ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,48 (с, 1H), 3,78 (с, 3H), 2,44-2,36 (м, 2H), 2,35-2,25 (м, 6H), 2,19 (тдд, $J=2,8, 5,6, 13,1$ Гц, 2H), 1,70-1,57 (м, 5H). Проміжна сполука 4 (пік 2) (бажаний енантіомер/еутомер): Час утримання = 7,0 хв. Виділення = 1,1 г, 3,08 ммоль, Вихід 23,75 %, 99 % ee, Чистота 95 % (жовта тверда речовина). ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,49 (с, 1H), 3,78 (с, 3H), 2,44-2,36 (м, 2H), 2,36-2,25 (м, 6H), 2,20 (тдд, $J=2,8, 5,6, 13,1$ Гц, 2H), 1,72-1,59 (м, 5H). Аналітичний метод СФХ: [колонка: ChiralPak AY-3 (150 \times 4,6 мм ВД, 3 мкм). Мобільна фаза А: CO_2 / Мобільна фаза В: 0,05 % Et_2NH у $i\text{PrOH}$. Градієнт: від 5 до 40 % мобільної фази В (понад 5,5 хв). Швидкість потоку: 2,5 мл/хв. Температура колонки: 40°C]. Проміжна сполука 4 (пік 1 - небажаний енантіомер/дістомер): Час

утримання = 2,853 хв. Проміжна сполука 4 (пік 2 - бажаний енантіомер/еутомер): Час утримання = 2,979 хв.

Проміжна сполука 5: метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(транс-4-((3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл)аміно)циклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилат

5



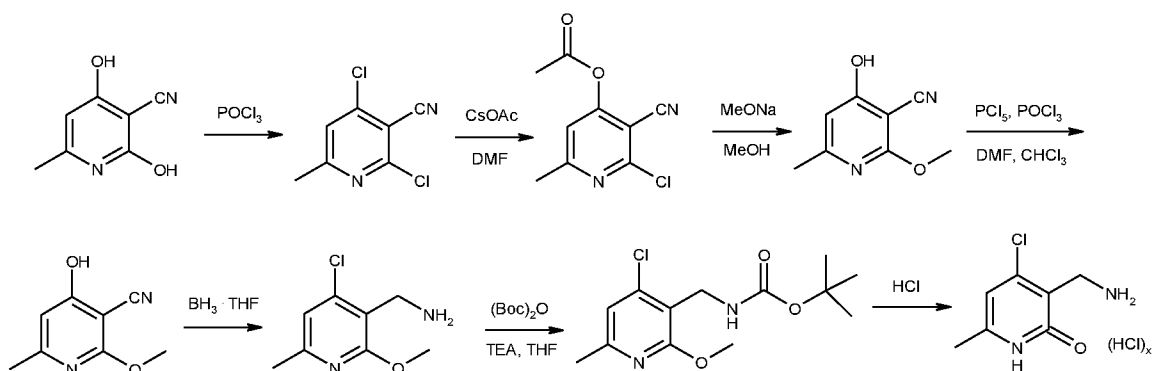
Суміш 1-хлор-N-[3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл]гідрогенаміну (678 мг, 3,82 ммоль) і N, N-діізопропілетиламіну (698 мкл, 4,01 ммоль) у дихлоретані (9,54 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв і потім до цієї реакційної суміші додавали оцтову кислоту (218 мкл, 3,82 ммоль) і метил-7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилат (650 мг, 1,91 ммоль). Через 5 хв при кімнатній температурі суміш ставала прозорою (жовта/коричнева) і додавали триацетоксиборогідрид натрію (404 мг, 1,91 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 3 год. при кімнатній температурі, потім гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію (30 мл). Бажаний продукт екстрагували дихлорметаном (30 мл × 3) і об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією із зворотною фазою (колонка C18, ацетонітрил/вода 1:1 з 0,1% трифлуороцтової кислоти) з отриманням двох геометричних ізомерів (цис та транс). Перший пік елювання відповідає геометричному ізомеру 1.

Аналітичний метод РХМС (для геометричних ізомерів)

[Колонка: Zorbax SB-C8 (75 × 4,6 мм ВД, 3,5 мкм). Мобільна фаза А: 0,1% трифлуороцтова кислота в ацетонітрилі / Мобільна фаза В: трифлуороцтова кислота у воді. Градієнт: від 5 до 100% мобільної фази В (більше 3,0 хв), а потім 100% мобільної фази В (4,5 хв). Швидкість потоку: 1,5 мл/хв. Температура колонки: 20 °С.] Геометричний ізомер 1 (бажаний): Час утримання = 4,073 хв (278 мг, 31%). Геометричний ізомер 2 (небажаний): Час утримання = 4,277 хв (253 мг 29%).

Енантіомери Геометричного ізомеру 1 (бажано на основі методу РХМС) розділяли препаративною СФХ [Колонка: Chiralcel ОХ-Н (250 × 21 мм ВД). Мобільна фаза А: CO₂ / Мобільна фаза В: 0,25% ізопропіламіну в суміші 1:1 ізопропанол/гексан. Ізократична (85% мобільна фаза А і 15% мобільна фаза В). Швидкість потоку: 80 г/хв. Температура колонки: 25 °С]. Проміжна сполука 5 (Пік 1): Час утримання = 1,84 хв. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 464,15; знайдено 464. Проміжна сполука 5 (пік 2): Час утримання = 2,1 хв. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 464,15; знайдено 464,2.

Проміжна сполука 6: 3-(амінометил)-4-хлор-6-метилпіридин-2(1H)-он



Стадія 1: Синтез 2,4-дихлор-6-метилнікотинонітрилу

Розчин 2,4-дигідрокси-6-метилнікотинонітрилу (80 г, 533,3 ммоль) в оксихлориді фосфору (150 мл) перемішували при 120 °С протягом 2 год. і потім гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію (до pH = 8). Його розділяли між водою (2000 мл) та етилацетатом (1000 мл), органічний шар сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (85 г, вихід 86 %) у вигляді твердої речовини коричневого кольору, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 186,98; знайдено 186,6.

Стадія 2: Синтез 2-хлор-4-гідрокси-6-метилнікотинонітрилу

До розчину 2,4-дихлор-6-метилнікотинонітрилу (10 г, 53 ммоль) у N, N-диметилформаміді (50 мл) додавали ацетат цезію (30,8 г, 160 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували при 80 °С протягом ночі, потім гасили водою (800 мл). Бажаний продукт екстрагували етилацетатом (800 мл) і органічний шар сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Вказану в заголовку сполуку (8,8 г, вихід 98 %) отримували у вигляді твердої речовини коричневого кольору та використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 169,01; знайдено 168,8.

Стадія 3: Синтез 4-гідрокси-2-метокси-6-метилнікотинонітрилу

Суміш 2-хлор-4-гідрокси-6-метилнікотинонітрилу (8,8 г, 52,2 ммоль) і метоксиду натрію (14,1 г, 261 ммоль) у метанолі (50 мл) перемішували при 60 °С протягом ночі. Суміш гасили 1 M розчином соляної кислоти до pH = 5. Її розділяли між водою (500 мл) та етилацетатом (500 мл), органічний шар сушили над сульфатом натрію та концентрували, отримуючи вказану в заголовку сполуку (8,0 г, вихід 93 %) у вигляді твердої речовини коричневого кольору, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 165,1; знайдено 164,8.

Стадія 4: 4-хлор-2-метокси-6-метилнікотинонітрил

Суміш 4-гідрокси-2-метокси-6-метилнікотинонітрилу (8,0 г, 48,7 ммоль), пентахлориду фосфору (20,3 г, 97,5 ммоль), оксихлориду фосфору (14,9 г, 9,09 мл, 97,5 ммоль) і N, N-диметилформаміду (5 мл) у хлороформі (100 мл) перемішували при 60 °С протягом 30 хв. Реакцію гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію (до pH = 8). Її розділяли між водою (1000 мл) та етилацетатом (1000 мл), органічний шар сушили над сульфатом натрію і концентрували досуха, отримуючи вказану в заголовку сполуку (8,0 г, вихід 90 %) у вигляді твердої речовини коричневого кольору, яку використовували на наступній стадії безпосередньо без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 183,0; знайдено 182,8.

Стадія 5: Синтез (4-хлор-2-метокси-6-метилпіридин-3-іл)метанаміну

До розчину 4-хлор-2-метокси-6-метилнікотинонітрилу (8,0 г, 43,8 ммоль) у тетрагідрофурані (50 мл) додавали борандиметилсульфідний комплекс (10 M, 5,3 мл, 53 ммоль). Суміш перемішували при 60 °С протягом 2 год. і потім гасили метанолом (10 мл) при 0 °С. Суміш концентрували досуха при зниженому тиску з отриманням вказаної в заголовку сполуки (7,0 г, вихід 93 %) у вигляді твердої речовини коричневого кольору, яку використовували на наступній стадії безпосередньо без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 187,1; знайдено 187,1.

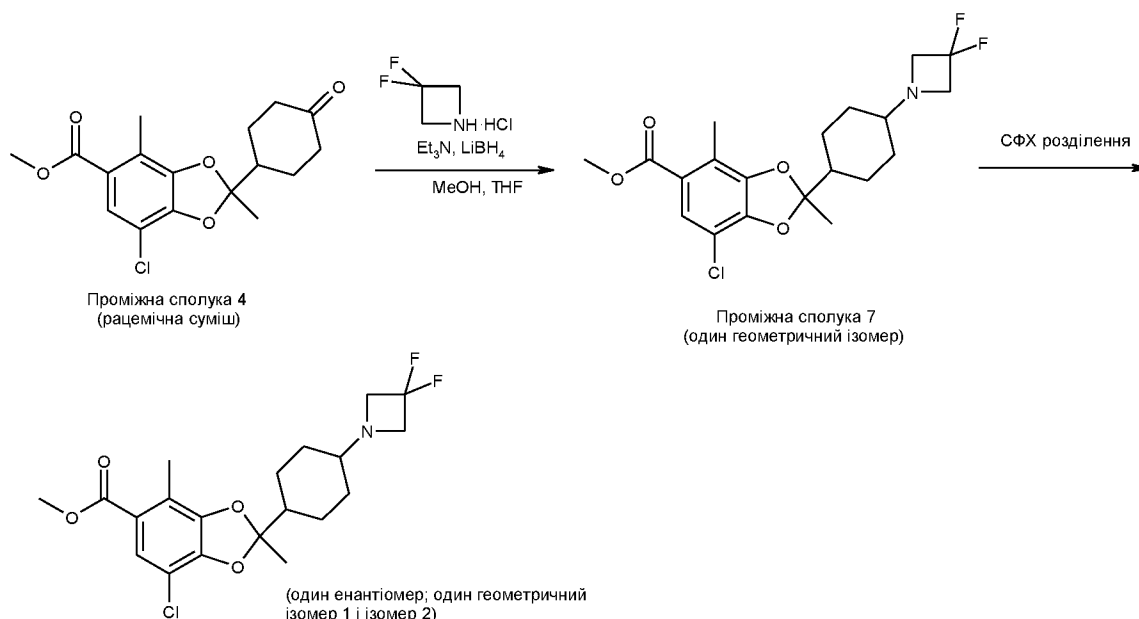
Стадія 6: трет-бутил ((4-хлор-2-метокси-6-метилпіридин-3-іл)метил)карбамат

Суміш (4-хлор-2-метокси-6-метилпіридин-3-іл)метанаміну (7,0 г, 37,5 ммоль), ди-трет-бутилдикарбонату (15,2 г, 75,0 ммоль) і триетиламіну (11,4 г, 15,7 мл, 113 ммоль) у тетрагідрофурані (50 мл) перемішували при 20 °С протягом 16 год., і потім гасили водою (500 мл). Бажаний продукт екстрагували етилацетатом (500 мл) і органічний шар сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали колонковою флеш-хроматографією (колонка з силікагелем, петролейний ефір: етилацетат 40:1), отримуючи вказану в заголовку сполуку (3,0 г, вихід 28 %) у вигляді безбарвної олії. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 287,1; знайдено 286,9.

Стадія 7: 3-(амінометил)-4-хлор-6-метилпіридин-2(1H)-он

До розчину хлориду водню у воді (4 M, 10 мл, 10 ммоль) додавали трет-бутил ((4-хлор-2-метокси-6-метилпіридин-3-іл)метил)карбамат (3,0 г, 10,5 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш нагрівали при 100 °С протягом 2 год., потім концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (1,7 г, вихід 94 %) у вигляді твердої речовини жовтого кольору. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 173,04; знайдено 173,1. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄): δ 6,38 (с, 1H), 4,15 (с, 2H), 2,32 (с, 3H).

Проміжна сполука 7: метил 7-хлор-2-(4-(3,3-дифлуоразетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилат



5

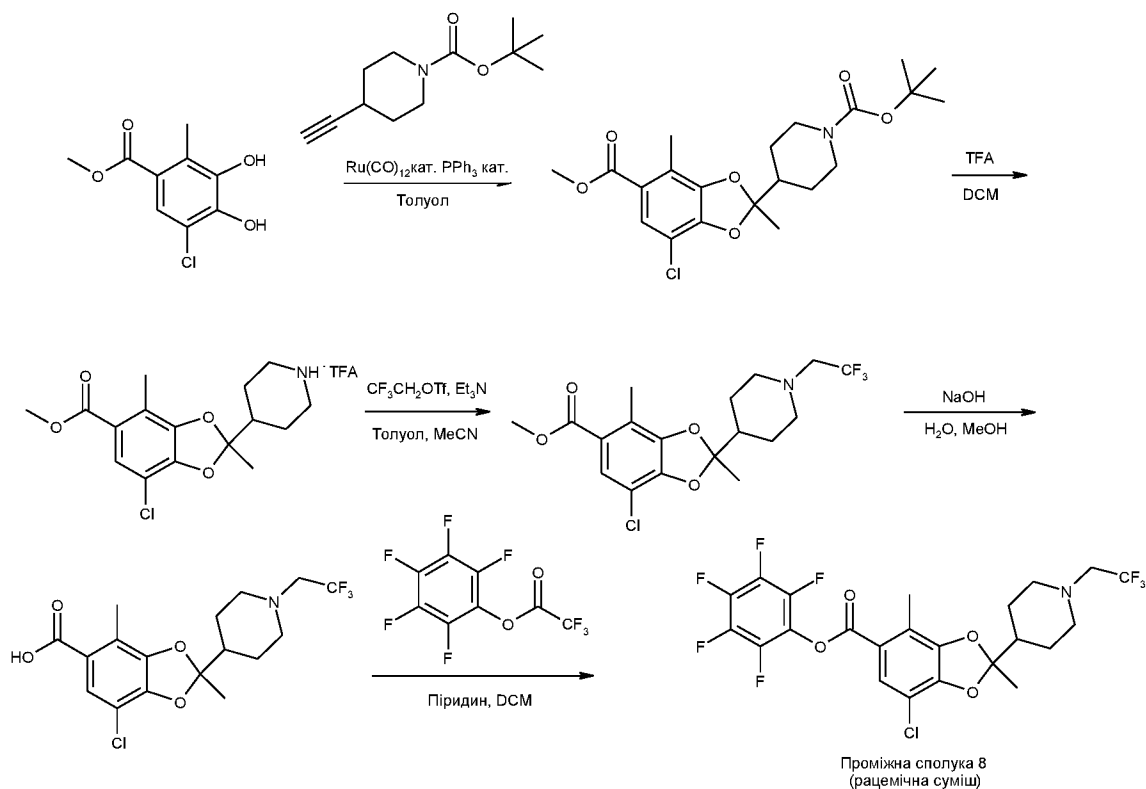
Стадія 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3,3-дифлуоразетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

Розчин метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксочиклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (Проміжна сполука 4 - рацемічна суміш) 550 мг, 1,62 ммоль), 3,3-дифлуоразетидину гідрохлориду (839 мг, 6,48 ммоль) і триетиламіну (895 мкл, 6,64 ммоль) у метанолі (5 мл) і тетрагідрофурані (5 мл) перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Наступного дня реакцію охолоджували до $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ і по краплях додавали розчин боргідриду літію (2 М у тетрагідрофурані, 1,21 мл, 2,43 ммоль). Густу жовту суміш поступово нагрівали до кімнатної температури, потім гасили насиченим водним розчином карбонату натрію при $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Бажаний продукт екстрагували дихлорметаном (тричі) і об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок двічі очищали флеш-хроматографією (колонка з силікагелем KP-NH, градієнт від 0 до 20 % етилацетату в гептані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (354 мг, вихід 53 %) у вигляді рацемічної суміші одного геометричного ізомеру (цис або транс). РХМС $[M+H]^+$ m/z: розраховано 416,9; знайдено 416,2.

Стадія 2: Розділення метил (2R)-7-хлор-2-(4-(3,3-дифлуоразетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату і метил (2S)-7-хлор-2-(4-(3,3-дифлуоразетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

Рацемічну суміш метил 7-хлор-2-(4-(3,3-дифлуоразетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (560 мг) розділяли препаративною СФХ [Колонка: Chiralpak AD-H від Daicel chemical industries. Мобільна фаза А: CO_2 / Мобільна фаза В: 0,25 % ізопропіламіну у суміші гексану та етанолу (1:1). Ізократична (90 % мобільної фази А і 10 % мобільної фази В). Швидкість потоку: 80 г/хв. Температура колонки: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$]. Аналітичний метод СФХ: Колонка: Chiralpak AD-H від Daicel chemical industries (100 мм \times 4,6 мм. Мобільна фаза А: CO_2 / Мобільна фаза В: 0,1 % ізопропіламіну в суміші гексану та етанолу (3:1). Ізократична (85 % мобільної фази А і 15 % мобільної фази В). Швидкість потоку: 4 мл/хв. Температура колонки: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Проміжна сполука 7 (пік 1): Час утримання = 1,02 хв (аналітичний метод СФХ). Виділення = 173 мг, вихід 15 %, 96 % ee. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,48 (с, 1H), 3,78 (с, 3H), 2,44-2,36 (м, 2H), 2,35-2,25 (м, 6H), 2,19 (тдд, J=2,8, 5,6, 13,1 Гц, 2H), 1,70-1,57 (м, 5H). Проміжна сполука 7 (пік 2): Час утримання = 1,16 хв (аналітичний метод СФХ). Виділення = 150 мг, вихід 13 %, 97 % ee. РХМС $[M+H]^+$ m/z: розраховано 416,86; знайдено 416,2.

Проміжна сполука 8: перфлуорфеніл 7-хлор-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуороетил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилат



Стадія 1: Синтез трет-бутил 4-(7-хлор-5-(метоксикарбоніл)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-2-іл)піперидин-1-карбоксилату

5 У 100-мл грушоподібній колбі, обладнаній конденсатором, суміш метил-5-хлор-3,4-дигідрокси-2-метилбензоату (1,219 г, 5,58 ммоль), трифенілфосфіну (146 мг, 0,558 ммоль) та трирутеній додекакарбонілу (178 мг, 0,279 ммоль) продували циклами азот/вакуум (4 цикли), потім додавали толуол (12 мл), продували циклами азот/вакуум, потім перемішували при 120 °С протягом 30 хв. Суміш трет-бутил 4-етинілпіперидин-1-карбоксилату (2,32 г, 11,1 ммоль) у толуолі (10 мл) додавали до темної суміші. Отриманий оранжевий розчин перемішували ще 2 години при 120 °С. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску, потім очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 0 до 100 % етилацетату в гептані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (2,33 г, 98 %) у вигляді жовтого масла. РХМС [M+Na]⁺ m/z: вчислено 448,2; знайдено 448,2.

15 Стадія 2: Синтез метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (сіль трифлуороцтової кислоти)

До жовтого розчину трет-бутил 4-[7-хлор-5-(метоксикарбоніл)-2,4-диметил-2Н-1,3-бензодіоксол-2-іл]піперидин-1-карбоксилату (2,33 г, 5,47 ммоль) у дихлорметані (2 мл) додавали TFA (1 мл). Через 30 хв реакційну суміш концентрували при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (2,40 г, кількісно) у вигляді смоли, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 326,79; знайдено 326,2.

Стадія 3: Синтез метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуороетил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

25 До розчину метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(піперидин-4-іл)-2Н-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилату, сіль трифлуороцтової кислоти (2,40 г, 5,45 ммоль) у толуолі (20 мл) та ацетонітрilі (10 мл) додавали триетиламін (8 мл, 57,6 ммоль) та 2,2,2-трифлуоретилтрифлуорметансульфонат (3,0 г, 12,9 ммоль). Через 3 год. реакційну суміш концентрували при зниженому тиску. Додавали воду (50 мл) і суміш екстрагували EtOAc (30 мл x 3). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (50 мл x 2), сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску, потім очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 0 до 50 % етилацетату в гептані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (2,04 г, 92 %) у вигляді жовтуватого масла. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 408,81; знайдено 408,2.

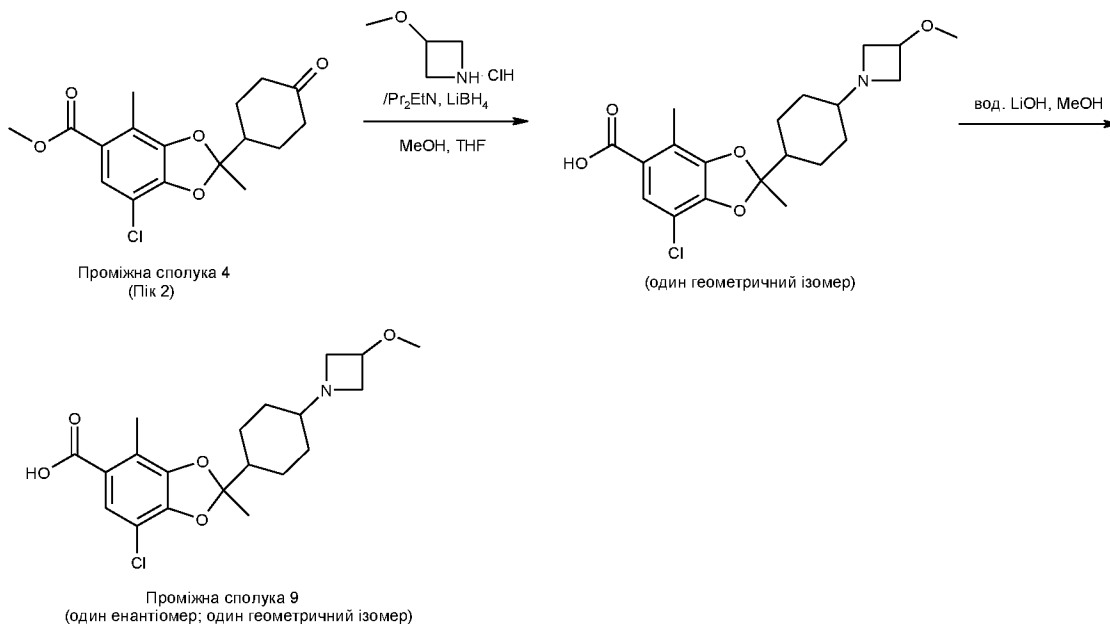
35 Стадія 4: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти

До розчину метил 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифлуороетил)піперидин-4-іл]-2Н-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилату (691 мг, 1,69 ммоль) в метанолі (3 мл) додали 6 М гідроксид натрію у воді (1 мл, 6,00 ммоль) і нагрівали при 60 °С. Через 25 хв реакційну суміш концентрували при зниженому тиску для видалення більшої частини метанолу. Потім суміш розбавляли водою, охолоджували до 0 °С, потім нейтралізували до рН = 7 1 М хлорводневою кислотою. Суміш екстрагували дихлорметаном (3 рази) і об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку у вигляді білої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 394,79; знайдено 394,2.

Стадія 5: Синтез перфлуорфеніл 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл]бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

До перемішаного розчину 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифлуороетил)піперидин-4-іл]-2Н-1,3-бензодіоксол-5-карбонової кислоти (665 мг, 1,68 ммоль) в дихлорметані (5 мл) додали піридин (1 мл, 12,4 ммоль) з подальшим додаванням 2,3,4,5,6-пентафлуорфеніл 2,2,2-трифлуорацетату (500 мкл, 2,90 ммоль). Через 20 хв реакційну суміш концентрували при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 560,84; знайдено 560,2.

Проміжна сполука 9: 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбонова кислота



Стадія 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

Розчин гідрохлоридної солі 3-метоксиазетидину (8 г, 64,75 ммоль) і N, N-діізопропілетиламіну (12 мл, 68,9 ммоль) у метанолі (30 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв і потім додавали розчин іншого розчину метилу 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилату (Проміжна сполука 4- пік 2) (4,1 г, 12,10 ммоль) в тетрагідрофурані (30 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год., потім охолоджували до -70 °С. Додавали боргідрид літію (500 мг, 22,96 ммоль) і реакційну суміш перемішували при -70 °С протягом 30 хв [або до повного використання вихідної речовини, що контролювали за допомогою ТШХ, етилацетат/метанол 5:1]. Далі дві партії реакції поєднували і гасили насиченим водним розчином хлориду амонію (120 мл) при 0 °С і бажаний продукт екстрагували дихлорметаном (200 мл × 3). Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 0 до 14 % метанолу в дихлорметані), отримуючи вказану в заголовку сполуку (8,05 г, вихід 67 %, чистота 83 %) у вигляді світло-жовтої олії. Зразок (50 мг) очищали додатково за допомогою препаративної тонкошарової хроматографії (силікагель, етилацетат:метанол 15:1). РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано. 410,2; знайдено 410,1. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 7,39 (с, 1H),

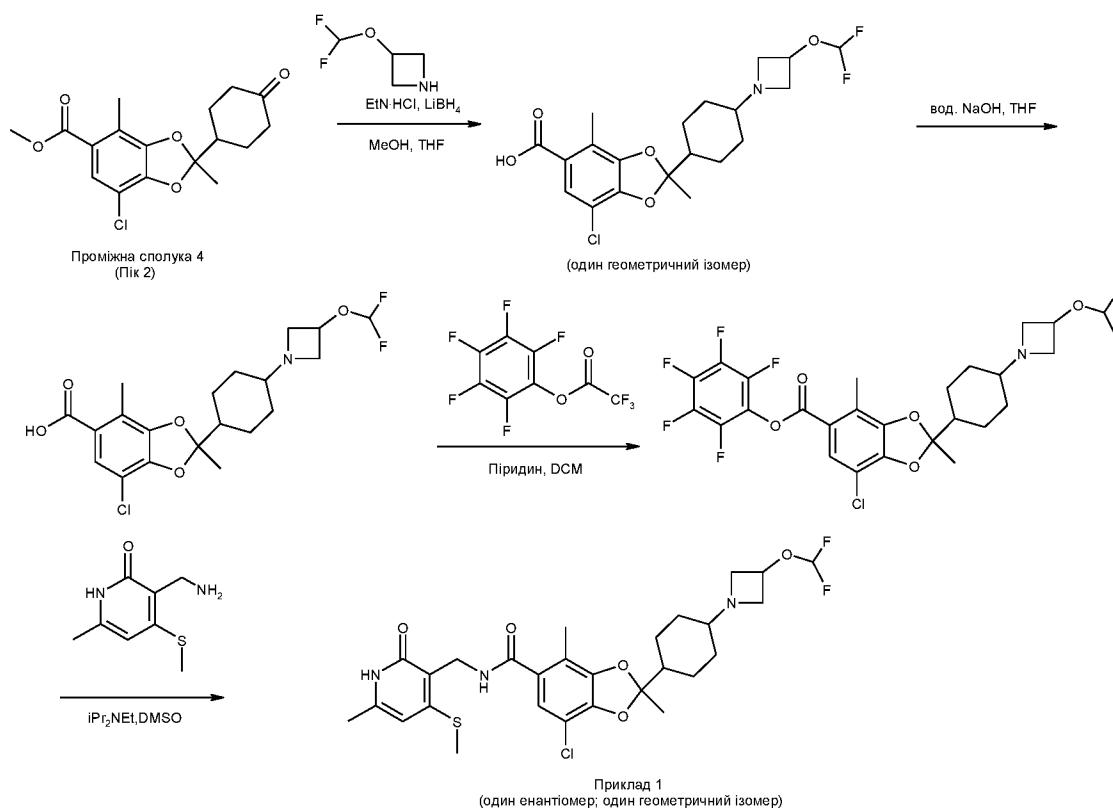
3,95-3,91 (м, 1H), 3,73 (с, 3H), 3,59-3,51 (м, 2H), 3,16 (с, 3H), 2,97 (ш дд, J=6,4, 8,0 Гц, 2H), 2,26 (с, 3H), 2,11-2,02 (м, 1H), 1,91-1,73 (м, 5H), 1,54 (с, 3H), 1,22-1,12 (м, 2H), 0,98-0,86 (м, 2H).

Стадія 2: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти

5 До розчину метил 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (4 г, 9,75 ммоль) у метанолі (48 мл) додавали розчин гідрату гідроксиду літію (4,03 г, 96,06 ммоль) у воді (12 мл). Реакційну суміш перемішували при 70 °С протягом 2 год., потім дві партії об'єднували і концентрували при зниженому тиску. Додавали воду (50 мл) і рН доводили до 6 насиченим водним розчином лимонної кислоти при 0 °С. Бажаний продукт екстрагували 3:1 сумішшю дихлорметану та ізопропанолу (300 мл × 5). Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (6,1 г, неочищена) у вигляді білувато-білої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано. 396,2; знайдено 396,1. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 7,07 (с, 1H), 4,05-4,10 (м, 2H), 3,76-3,88 (м, 1H), 3,67 (ш дд, J=10, 3,6 Гц, 2H), 3,22 (с, 3H), 2,71-2,81 (м, 1H), 2,19 (с, 3H), 1,91-1,99 (м, 4H), 1,75-1,85 (м, 1H), 1,52 (с, 3H), 1,18-1,28 (м, 2H), 1,06-1,14 (м, 2H).

15 Приклад № 1: 7-хлор-2-(4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід

20



Стадія 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

25 Розчин метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (Проміжна сполука 4 - Пік 2) (224 мг, 0,661 ммоль), 3-(дифлуорметокси)азетидину (336 мг, 2,72 ммоль) і гідрохлоридної солі триетиламіну (373 мг, 2,71 ммоль) у суміші метанолу (2 мл) і тетрагідрофурану (2 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 1,5 год., потім охолоджували до -78 °С. Розчин борогідриду літію в тетрагідрофурані (2 М, 500 мкл, 1 ммоль)

30 додавали по краплях при -78 °С і потім реакції давали нагрітися до кімнатної температури протягом 15 хв. Далі суміш охолоджували до 0 °С, потім гасили насиченим водним розчином бікарбонату натрію, розбавляли дихлорметаном і нагрівали до кімнатної температури. Бажаний продукт екстрагували з водного шару дихлорметаном (тричі) і об'єднані органічні шари сушили за допомогою гідрофобного фільтра і концентрували досуха при зниженому тиску. Залишок

35 очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт від 10 до 100 % етилацетату в гептані,

потім від 0 до 100 % етанолу в етилацетаті) з отриманням одного геометричного ізомеру (цис або транс) вказаної в заголовку сполуки (205 мг, вихід 70 %). РХМС $[M+H]^+$ m/z : розраховано 445,9; знайдено 446,2.

5 Стадія 2: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти

До розчину метил 7-хлор-2-(4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (205 мг, 0,460 ммоль) у метанолі (3 мл) додавали розчин гідроксиду натрію у воді (6 М, 1 мл, 6,00 ммоль). Реакційну суміш нагрівали при 60 °С протягом 20 хв, потім розбавляли водою, охолоджували до 0 °С, підкисляли до рН=2 1 М соляною кислотою і потім нейтралізували до рН=7 1 М водним розчином гідроксиду натрію. Бажаний продукт екстрагували дихлорметаном (тричі), сушили за допомогою гідрофобного фільтра і концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (176 мг, вихід 89 %) у вигляді білої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС $[M+H]^+$ m/z : розраховано 431,9; знайдено 432,2.

15 Стадія 3: Синтез перфлуорфеніл 7-хлор-2-((1R, 4R)-4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

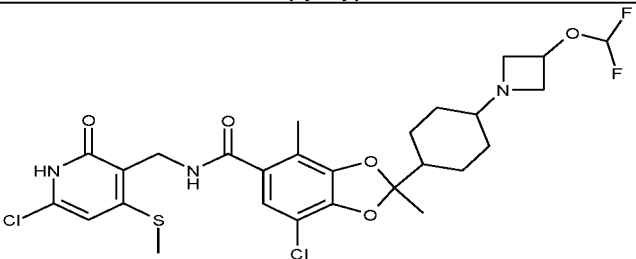
До розчину 7-хлор-2-(4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти (176 мг, 0,408 ммоль) в дихлорметані (0,5 мл) додали піридин (1,0 мл, 12,4 ммоль) з подальшим додаванням 2,3,4,5,6-пентафлуорфеніл 2,2,2-трифлуорацетату (150 мкл, 0,871 ммоль) при кімнатній температурі. Через 20 хв реакційну суміш концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи суміш вказаної в заголовку сполуки (100 % теоретичний вихід = 243 мг) та побічних продуктів. Неочищену суміш використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС $[M+H]^+$ m/z : розраховано 597,91; знайдено 598,2.

25 Стадія 4: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду

До розчину перфлуорфеніл 7-хлор-2-(4-(3-(дифлуорметокси)азетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (≤ 243 мг, $\leq 0,406$ ммоль) в диметилсульфоксиді (1 мл) додавали 3-(амінометил)-6-метил-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-он (гідрохлоридна сіль) (Проміжна сполука 1) (222 мг, 1,20 ммоль) і N, N-діізопропілетиламін (0,30 мл, 1,71 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 60 °С протягом 1 години, потім концентрували досуха під сильним потоком азоту протягом ночі. Залишок очищали двічі за допомогою флеш-хроматографії з зворотною фазою (колонка C18, градієнт від 0 до 100 % ацетонітрилу у воді з 0,1 % трифлуороцтової кислоти). Залишок розбавляли дихлорметаном і насиченим розчином бікарбонату натрію. Водний шар промивали дихлорметаном. Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію та концентрували при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (166 мг, 68 % вихід після двох стадій) у вигляді одного геометричного ізомеру (цис або транс). РХМС $[M+H]^+$ m/z : розраховано 598,1; знайдено 598,3. 1H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 6,88 (с, 1 H), 6,26 (с, 1 H), 6,38 (т, J=74,3 Гц, 2 Г), 4,71 (квін, J=6,0 Гц, 1 H), 4,48 (с, 2 H), 3,69-3,60 (м, 2 H), 3,18-3,11 (м, 2 H), 2,52 (с, 3 H), 2,29 (с, 3 H), 2,18 (с, 3 H), 2,10 (тт, J=3,5, 11,2 Гц, 1 H), 1,98-1,86 (м, 4 H), 1,85-1,78 (м, 1 H), 1,60 (с, 3 H), 1,32-1,21 (м, 2 H), 1,06-0,92 (м, 2 H).

Таблиця 1

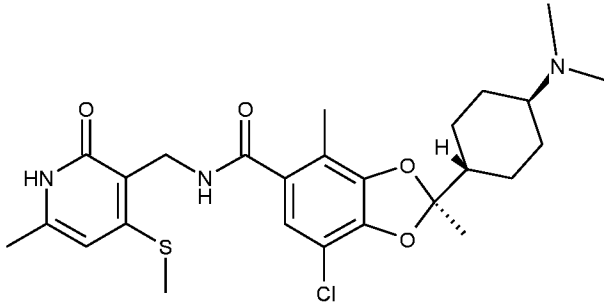
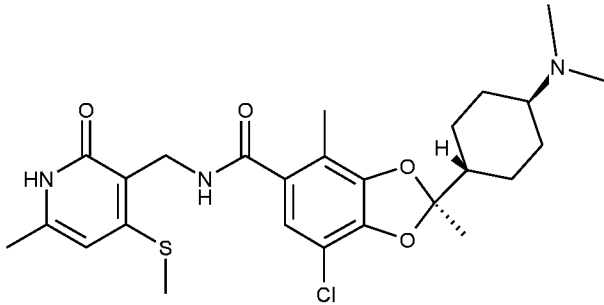
Наступну сполуку одержували аналогічним чином, як у Прикладі 1, використовуючи відповідний вихідний матеріал.

Приклад	Структура	Аналітичні дані
2	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 3 та проміжної сполуки 4 (Пік 2)</p>	<p>РХМС $[M+H]^+$ m/z: вчислено 618,1; знайдено 618,1. 1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 6,91-6,88 (м, 1H), 6,58 (т, J=5,4 Гц, 1H), 6,53 (с, 1H), 6,39-5,97 (м, 2H), 3,80 (д, J=7,3 Гц, 2H), 3,14 (д, J=6,4 Гц, 2H), 2,53-2,49 (м, 3H), 2,26 (с, 3H), 2,13 (ш с, 1H), 1,99-1,78 (м, 5H), 1,60 (с, 3H), 1,45 (д, J=3,4 Гц, 1H), 1,28-1,18 (м, 2H), 1,15-1,01 (м, 2H).</p>

- 986dc7c2a3da/hhttps://mmq.morningtrans.com/memoqwebLegacy/preview/inhpghsfykfwyon040jytun
 q/feedec34-bc96-4604-916a-
 986dc7c2a3da/hhttps://mmq.morningtrans.com/memoqwebLegacy/preview/inhpghsfykfwyon040jytun
 q/feedec34-bc96-4604-916a-
 5 986dc7c2a3da/hhttps://mmq.morningtrans.com/memoqwebLegacy/preview/inhpghsfykfwyon040jytun
 q/feedec34-bc96-4604-916a-
 986dc7c2a3da/hhttps://mmq.morningtrans.com/memoqwebLegacy/preview/inhpghsfykfwyon040jytun
 q/feedec34-bc96-4604-916a-986dc7c2a3da/h

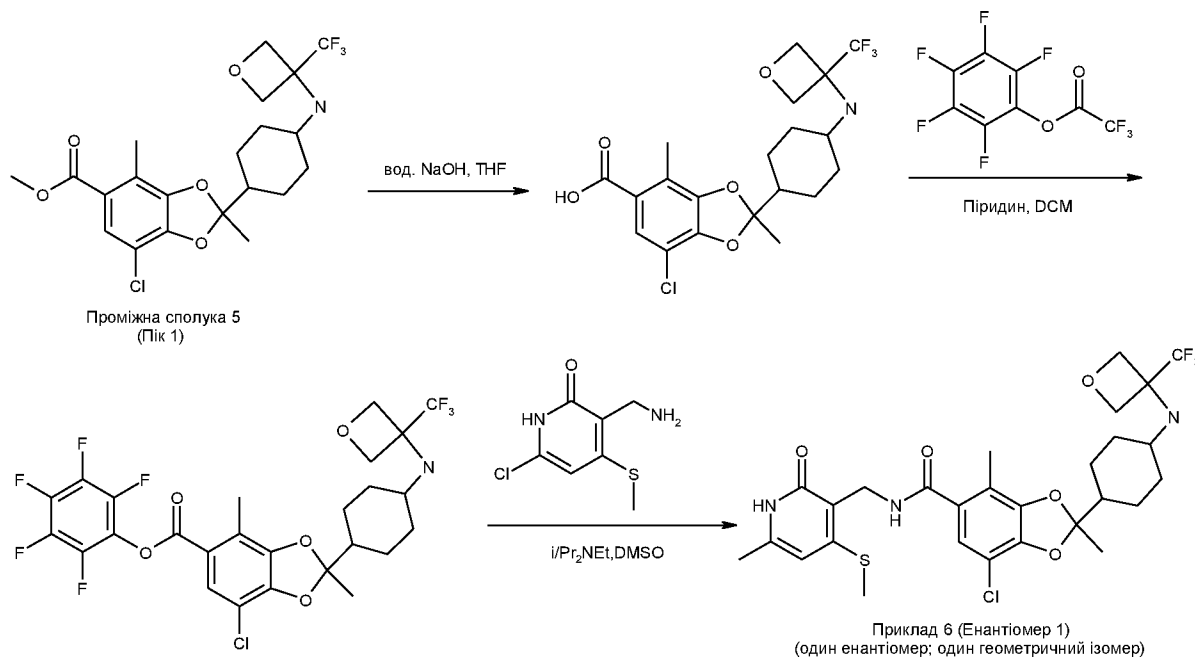
Таблиця 2

Наступну сполуку одержували подібним чином, як у Прикладі 3, використовуючи відповідний вихідний матеріал

Приклад	Структура	Аналітичні дані
4	 <p>(R-енантіомер; транс-геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 1</p>	<p>РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 520,2; знайдено 520,3. ¹H ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d₆) δ 11,52 (ш с, 1H), 8,00 (т, J=4,4 Гц, 1H), 6,85 (с, 1H), 6,08 (с, 1H), 4,27 (д, J=4,4 Гц, 2H), 3,57 (с, 1H), 2,45 (с, 3H), 2,17 (с, 3H), 2,14 (с, 9H), 1,92-1,77 (м, 5H), 1,60 (с, 3H), 1,15 (т, J=9,0 Гц, 4H)</p>
5	 <p>(R-енантіомер; транс-геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 2</p>	<p>РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 521,2; знайдено 521,2. ЯМР (400 МГц, диметилсульфоксид-d₆) δ 12,60-12,19 (м, 2H), 8,05 (т, J=4,4 Гц, 1H), 6,87 (с, 1H), 4,21 (д, J=4,4 Гц, 2H), 2,47 (с, 3H), 2,29 (с, 2H), 2,19-2,12 (м, 9H), 2,09 (ш с, 1H), 1,94-1,76 (м, 5H), 1,60 (с, 3H), 1,15 (т, J=9,5 Гц, 4H)</p>

10

Приклад №6 (Енантіомер 1): 7-хлор-N-((6-хлор-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(4-(диметиламіно)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід



Стадія 1: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-((3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл)аміно)циклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти

До розчину метил 7-хлор-2,4-диметил-2-[4-{{3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл}аміно}циклогексил]-2Н-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилату (Проміжна сполука 5 - Пік 1) (81 мг, 0,174 ммоль) в метанолі (1 мл) додавали гідроксид натрію (72 мг, 1,79 ммоль). Реакційну суміш нагрівали при 60 °С протягом 20 хв, охолоджували до 0 °С, а потім підкисляли до рН = 2 1 М соляною кислотою. Потім бажаний продукт екстрагували дихлорметаном (тричі) і об'єднані органічні шари сушили за допомогою гідрофобного фільтра. Фільтрат концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (70 мг, вихід 89 %) у вигляді білої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 450,1; знайдено 450,2.

Стадія 2: Синтез перфлуорфеніл 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-((3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл)аміно)циклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

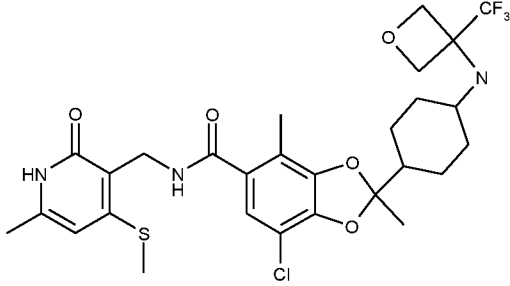
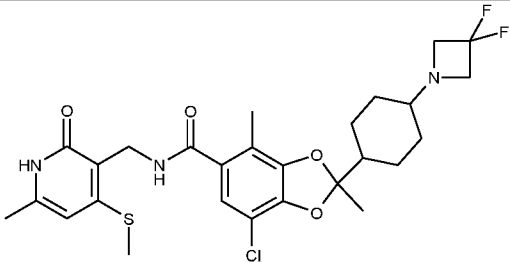
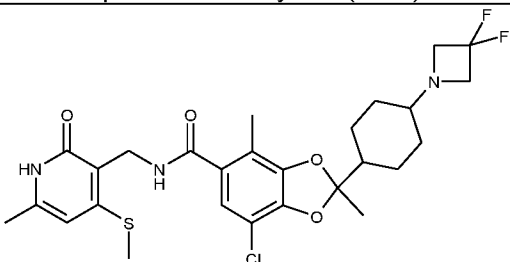
До розчину 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-((3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл)аміно)циклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти (70 мг, 155 мкмоль) в дихлорметані (0,5 мл) додали піридин (24,9 мкл, 310 мкмоль) і 2,3,4,5,6-пентафлуорфенілу 2,2,2-трифлуорацетат (39,8 мкл, 232 мкмоль) при кімнатній температурі. Через 15 хв реакційну суміш концентрували при зниженому тиску, отримуючи суміш вказаної в заголовку сполуки та побічних продуктів (68 мг, неочищена). Неочищену суміш використовували на наступній стадії без подальшого очищення. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 616,1; знайдено 616,2.

Стадія 3: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(4-((3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл)аміно)циклогексил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду

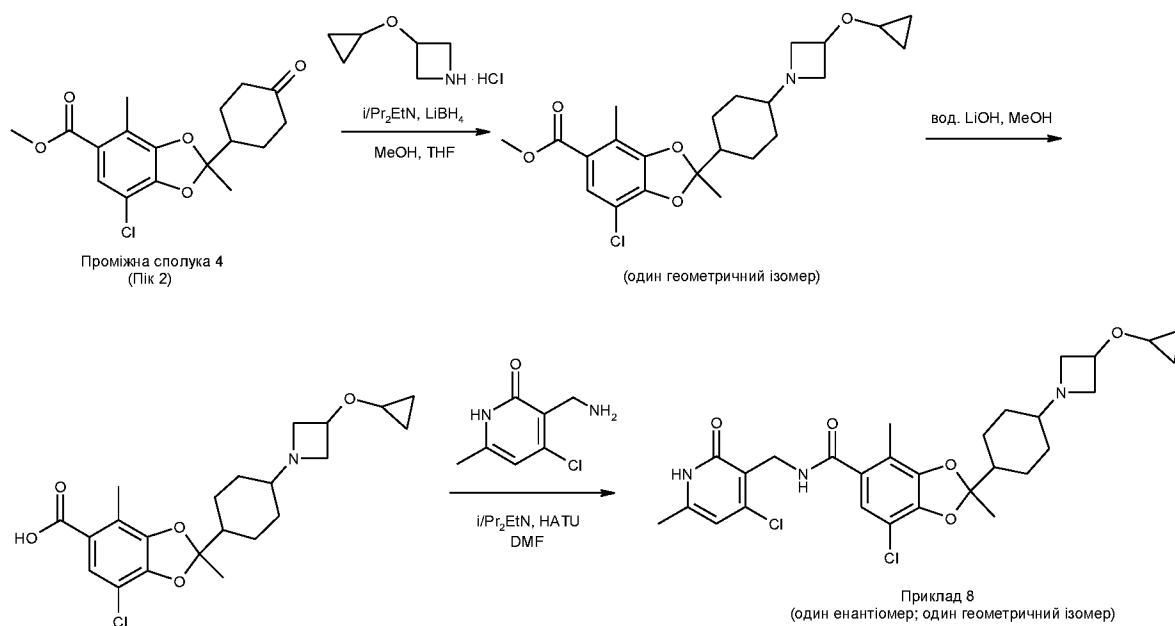
До розчину 2,3,4,5,6-пентафлуорфенілу 7-хлор-2,4-диметил-2-[4-{{3-(трифлуорметил)оксетан-3-іл}аміно}циклогексил]-2Н-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилату (≤68 мг, ≤110 мкмоль) у N, N-диметилформаміді (1 мл) додали 3-(амінометил)-6-метил-4-(метилсульфаніл)-1,2-дигідропіридин-2-он (вільна основа) (30,4 мг, 0,165 ммоль) та N, N-діізопропілетиламін (0,1 мл, 574 мкмоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували при 50 °С протягом 30 хв, потім безпосередньо додавали на колонку С18 для очищення за допомогою флеш-хроматографії з зворотною фазою (колонка С18, градієнт від 5 до 50 % ацетонітрилу у воді з 0,1 % трифлуороцтової кислоти) з отриманням солі трифлуороцтової кислоти вказаної в заголовку заголовки. Сіль розчиняли в дихлорметані і органічний шар промивали насиченим водним розчином бікарбонату натрію. Нарешті, органічний шар концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (вільна основа) (42 мг, вихід 62 %) у вигляді білої твердої речовини. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 616,19; знайдено 616,3. ¹Н ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 12,62-12,44 (м, 1Н), 7,16 (т, J=5,1 Гц, 1Н), 6,91 (с, 1Н), 6,04 (с, 1Н), 4,76 (с, 3Н), 4,62-4,46 (м, 4Н), 2,72-2,63 (м, 1Н), 2,49 (с, 3Н), 2,32 (с, 3Н), 2,27 (с, 3Н), 1,92 (д, J=5,9 Гц, 4Н), 1,80 (ш с, 1Н), 1,60 (с, 3Н), 1,36-1,10 (м, 6Н).

40

Наступні сполуки одержували подібним чином, як у Прикладі 6, використовуючи відповідний вихідний матеріал

Приклад	Структура	Аналітичні дані
6 (Енантіомер 2)	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 1 та проміжної сполуки 5 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 616,19; знайдено 616,3. ¹ H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 12,45-12,30 (м, 1H), 7,14 (т, J=5,4 Гц, 1H), 6,91 (с, 1H), 6,04 (с, 1H), 4,75 (д, J=7,3 Гц, 2H), 4,61 (с, 2H), 4,55-4,51 (м, 2H), 2,68 (т, J=9,5 Гц, 1H), 2,49 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 2,27 (с, 3H), 1,92 (д, J=6,4 Гц, 4H), 1,83 (т, J=11,7 Гц, 1H), 1,61 (с, 3H), 1,35-1,12 (м, 6H).
7 (Енантіомер 1)	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 1 та проміжної сполуки 7 (Пік 1)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 568,2; знайдено 568,3. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,93-6,84 (м, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,67 (ш т, J=12,0 Гц, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 2,26 – 2,19 (м, 1H), 2,18 (с, 3H), 2,02 – 1,81 (м, 5H), 1,61 (с, 3H), 1,34-1,21 (м, 2H), 1,13-1,00 (м, 2H).
7 (Енантіомер 2)	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Примітка: Одержано з проміжної сполуки 1 та проміжної сполуки 7 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 568,2; знайдено 568,3. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,49 (с, 2H), 3,61 (т, J=12,0 Гц, 4H), 2,53 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 2,23-2,08 (м, 4H), 2,03-1,78 (м, 5H), 1,61 (с, 3H), 1,35-1,22 (м, 2H), 1,12-0,99 (м, 2H).

Приклад 8: 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід



Стадія 1: Синтез метил 7-хлор-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату

5 Розчин гідрохлоридної солі 3-(циклопропокси)азетидину (1,9 г, 12,7 ммоль) і N, N-діізопропілетиламіну (2,7 мл, 15,5 ммоль) у метанолі (10 мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год. і потім додавали інший розчин метил 7-хлор-2,4-диметил-2-(4-оксоциклогексил)-1,3-бензодіоксол-5-карбоксилату (Проміжна сполука 4 - Пік 2) (860 мг, 2,54 ммоль) у тетрагідрофурани (30 мл). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі
10 протягом 1,5 год., потім охолоджували до -70°C . Додавали боргідрид літію (120 мг, 5,51 ммоль) і реакційну суміш перемішували при -70°C протягом 30 хв [або до повного використання вихідного матеріалу, що спостерігали за допомогою ТШХ, етилацетат/метанол 5:1]. Далі реакцію гасили насиченим водним розчином хлориду амонію (100 мл) і бажаний продукт екстрагували етилацетатом (50 мл \times 2). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (30 мл), сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при
15 зниженому тиску. Залишок очищали флеш-хроматографією (силікагель, градієнт 50-100 % етилацетату в петролейному ефірі), отримуючи вказану в заголовку сполуку (760 мг, вихід 65 %, чистота 95 %) у вигляді жовтої олії. РХМС $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ m/z: розраховано. 436,1; знайдено 436,0.

20 Стадія 2: Синтез 7-хлор-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти

До розчину метил 7-хлор-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксилату (760 мг, 1,74 ммоль) у метанолі (15 мл) та воді (3 мл) додавали гідрат гідроксиду літію (962 мг, 22,93 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 70°C протягом 15 г і потім концентрували при зниженому тиску. Додавали воду (15 мл) і рН доводили до 6 насиченим водним розчином лимонної кислоти при 0°C . Бажаний продукт екстрагували 10:1 сумішшю дихлорметану та ізопропанолу (30 мл \times 3). Об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (150 мл \times 2), сушили над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували досуха при зниженому тиску, отримуючи вказану в заголовку сполуку (720 мг, неочищена) у вигляді жовтої твердої речовини, яку використовували на наступній стадії без
30 подальшого очищення. РХМС $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ m/z: розраховано. 422,1; знайдено 422,0.

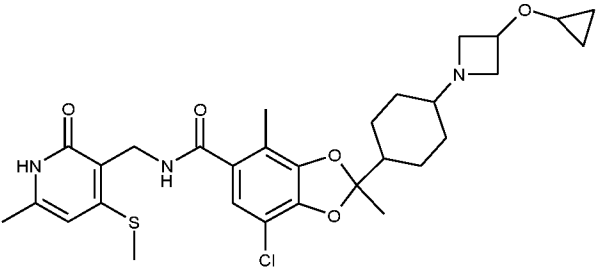
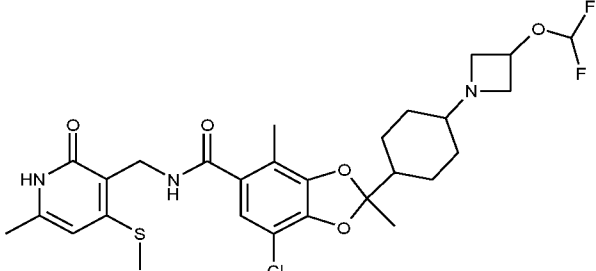
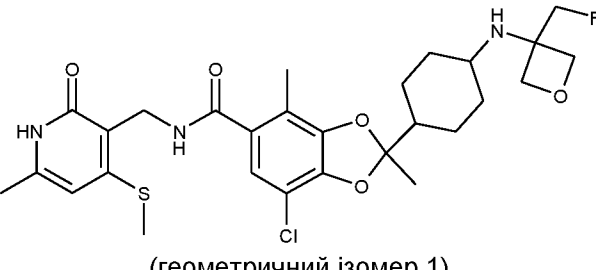
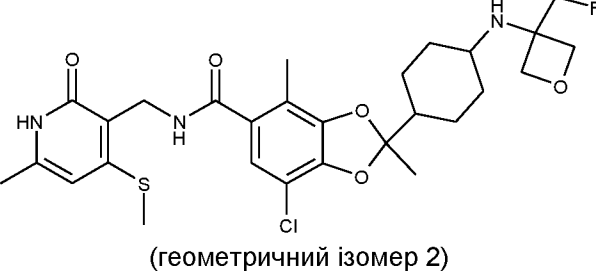
Стадія 3: Синтез 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(4-(3-циклопропоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду

До розчину 7-хлор-2-[4-[3-(циклопропокси)азетидин-1-іл]циклогексил]-2,4-диметил-1,3-бензодіоксол-5-карбонової кислоти (360 мг, 0,853 ммоль) в N, N-диметилформаміді (4 мл) додавали O-(7-азабензотріазол-1-іл)-N, N,N',N'-тетраметилуронію гексафлуорфосфат (500 мг, 1,31 ммоль) і N, N-діізопропілетиламін (1 мл, 5,74 ммоль). Суміш перемішували при 15°C протягом 30 хв і потім додавали гідрохлоридну сіль 3-(амінометил)-4-хлор-6-метил-1H-піридин-2-ону (Проміжна сполука 6) (250 мг, 1,2 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 15°C протягом ще 4 год. і потім фільтрували. Фільтрат очищали препаративною ВЕРХ [Колонка: Waters Xbridge (150 мм \times 25 мм, 5 мкм). Мобільна фаза А: вода (0,05 % гідроксиду аміаку об./об / Мобільна фаза В: ацетонітрил. Градієнт (від 65 до 55 % мобільної фази А / від 35 до 65 %
40

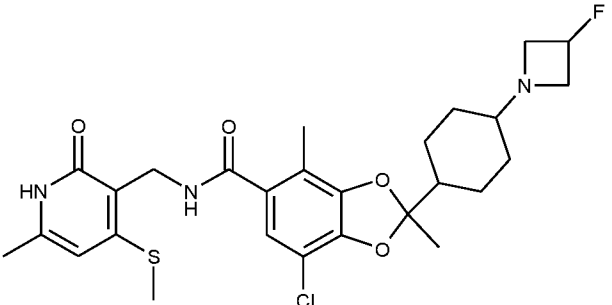
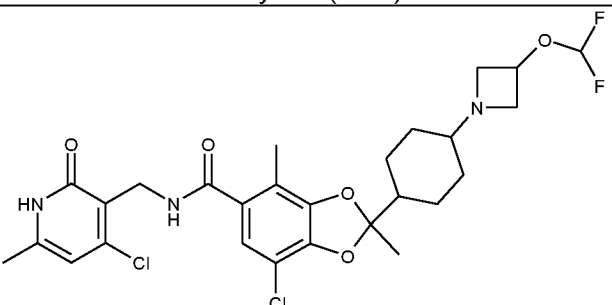
5 мобільної фази В, понад 9,5 хв). Температура колонки: 30 °С] одержуючи вказану в заголовку сполуку (209 мг, вихід 42 %) у вигляді білої твердої речовини. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 576,2; знайдено 576,2. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 6,90 (с, 1H), 6,30 (с, 1H), 4,52 (с, 2H), 4,22 (квін, J=6,0 Гц, 1H), 3,61 (дд, J=6,4, 8,6 Гц, 2H), 3,31-3,25 (м, 1H), 2,99 (дд, J=6,3, 8,4 Гц, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 2,12-2,04 (м, 1H), 1,99-1,85 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,33-1,24 (м, 2H), 1,06-0,95 (м, 2H), 0,56-0,51 (м, 2H), 0,51-0,44 (м, 2H).

Таблиця 4

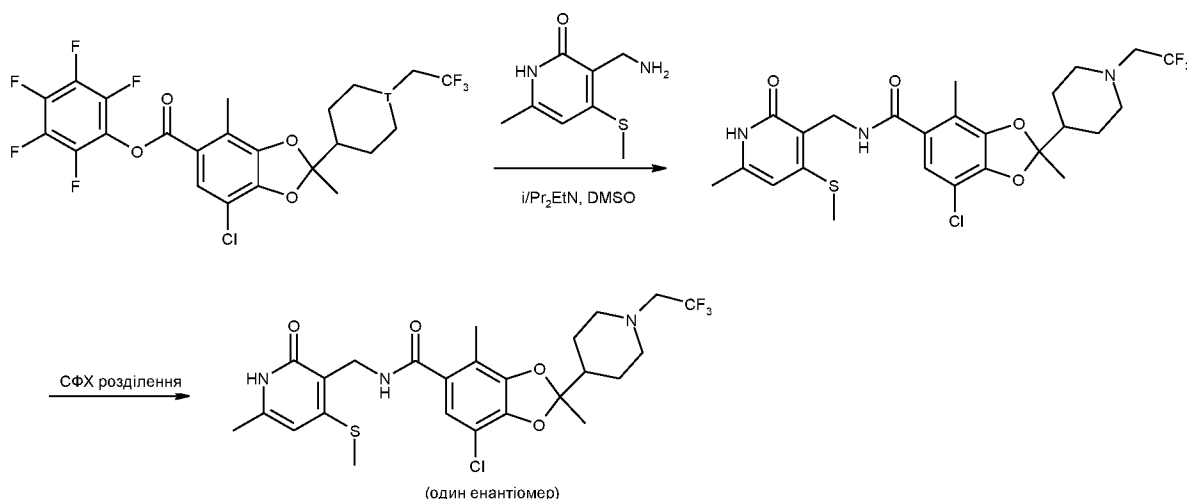
Наступні сполуки одержували подібним чином, як у Прикладі 8, використовуючи відповідний вихідний матеріал

Приклад	Структура	Аналітичні дані
9	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 1 та проміжної сполуки 4 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 588,2; знайдено 588,2. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,91 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 4,53 (с, 2H), 4,26-4,17 (м, 1H), 3,69-3,59 (м, 2H), 3,30-3,24 (м, 1H), 3,06-2,94 (м, 2H), 2,54 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 2,10-2,02 (м, 1H), 1,99-1,80 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,35-1,18 (м, 2H), 1,08-0,93 (м, 2H), 0,58-0,50 (м, 2H), 0,50-0,42 (м, 2H).
10	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 2 та проміжної сполуки 4 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 599,2; знайдено 599,1. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,92 (с, 1H), 6,40 (т, J=76 Гц, 1H), 4,73 (т, J=8 Гц, 1H), 4,43 (с, 2H), 3,68-3,64 (м, 2H), 3,18-3,14 (м, 2H), 2,57 (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 2,14-2,09 (м, 1H), 1,97-1,83 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,32-1,23 (м, 2H), 1,05-0,95 (м, 2H).
11	 <p>(геометричний ізомер 1) Одержано з проміжної сполуки 1 та проміжної сполуки 4 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 580,2; знайдено 580,2. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,91 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 4,82-4,79 (м, 1H), 4,68 (с, 1H), 4,55 (дд, J=4,0, 6,4 Гц, 2H), 4,52-4,46 (м, 4H), 2,63 (ш т, J=10,8 Гц, 1H), 2,55 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 1,94 (ш д, J=13,2 Гц, 2H), 1,89-1,80 (м, 3H), 1,62 (с, 3H), 1,31 (к, J=12,0 Гц, 2H), 1,25-1,15 (м, 2H).
11	 <p>(геометричний ізомер 2) Одержано з проміжної сполуки 1 та проміжної сполуки 4 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 580,2; знайдено 580,1. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,91 (с, 1H), 6,30 (с, 1H), 4,75 (с, 1H), 4,63 (с, 1H), 4,62-4,59 (м, 2H), 4,52-4,57 (м, 4H), 3,06 (ш с, 1H), 2,55 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,22 (с, 3H), 1,91 (ш д, J=10,4 Гц, 1H), 1,68 (ш д, J=8,4 Гц, 4H), 1,65 (с, 5H), 1,61 (ш с, 1H), 1,57 (ш с, 1H).

Таблиця 4 (продовження)

Приклад	Структура	Аналітичні дані
12	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 1 та проміжної сполуки 4 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 572,2; знайдено 571,9. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,96-5,23 (м, 1H), 4,48 (с, 2H), 3,54-3,69 (м, 2H), 3,18-3,30 (м, 2H), 2,52 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,06-2,15 (м, 1H), 1,80-1,98 (м, 5H), 1,61 (с, 3H), 1,19-1,32 (м, 2H), 0,93-1,05 (м, 2H).
13	 <p>(один енантіомер; один геометричний ізомер) Одержано з проміжної сполуки 6 та проміжної сполуки 4 (Пік 2)</p>	РХМС [M+H] ⁺ m/z: розраховано 586,2; знайдено 586,1. ¹ H ЯМР (400 МГц, Метанол-d ₄) δ 6,90 (с, 1H), 6,40 (т, J=76 Гц, 1H), 6,30 (с, 1H), 4,73 (т, J=8 Гц, 1H), 4,53 (с, 2H), 3,68-3,64 (м, 2H), 3,18-3,14 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 2,15-2,08 (м, 1H), 1,97-1,83 (м, 5H), 1,63 (с, 3H), 1,35-1,23 (м, 2H), 1,05-0,90 (м, 2H).

5 Приклад 14: (R)-7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід та (S)-7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід



10 Стадія 1: Синтез 7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду
 До розчину 2,3,4,5,6-пентафлуорфеніл 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл]-2H-1, 3-бензодіоксол-5-карбоксилату (Проміжна сполука 8) (752 мг, 1,34 ммоль) в диметилсульфоксиді (4 мл) додавали 3-(амінометил)-6-метил-4-метилсульфаніл)-1,2-дигідропіридин-2-он (Проміжна сполука 1) (740 мг, 4,02 ммоль) і N, N-діізопропілетиламін (932 мкл, 5,36 ммоль). Реакційну суміш нагрівали при 60 °С і через 1 год.

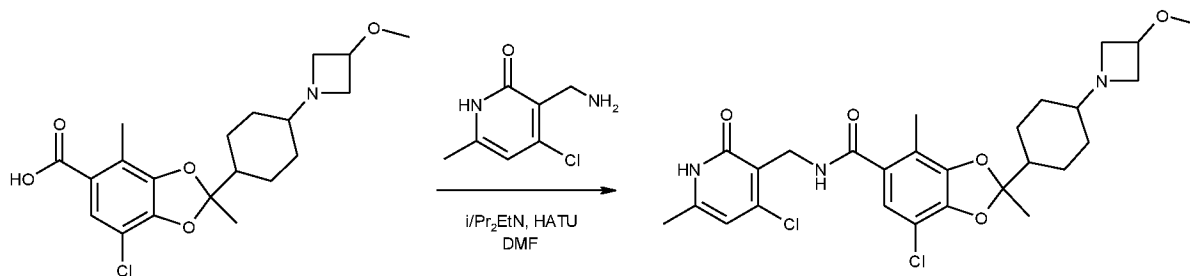
15

додавали на колонку C18 для очищення. Бажаний продукт очищали двічі за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою (колонка C18, градієнт від 0 до 100 % ацетонітрилу у воді з 0,1 % трифлуороцтової кислоти), отримуючи вказану в заголовку сполуку (289 мг, вихід 38 %) у вигляді рацемічної суміші, що має форму смоли.

5 Стадія 2: Розділення (R)-7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду та (S)-7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду

10 Рацемічну суміш 7-хлор-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду (289 мг) розділяли препаративною СФХ [Колонка: ChromegaChiral CC4 від ES Industries (250 мм × 20 мм ВД). Мобільна фаза А: CO₂ / Мобільна фаза В: 0,25 % ізопропіламіну в метанолі. Ізократична (55 % мобільної фази А і 45 % мобільної фази В). Швидкість потоку: 80 г/хв. Температура колонки: 25 °С]. Аналітичний метод СФХ: Колонка: Chiralcel OX-H від Chiral Technologies (100 мм × 4,6 мм ВД). Мобільна фаза А: CO₂ / Мобільна фаза В: 0,1 % ізопропіламіну в метанолі. Ізократична (75 % мобільної фази А і 25 % мобільної фази В). Швидкість потоку: 4 мл/хв. Температура колонки: 40 °С. Приклад 16 (енантіомер 1) (бажаний енантіомер /еутомер): Час утримання = 3,74 хв (аналітичний метод СФХ). Виділення = 90 мг, вихід 12 %, 99 % ee (жовта тверда речовина). РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 560,2; знайдено 560,2. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,49 (с, 2H), 3,08-2,98 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,34 (ш т, J=11,0 Гц, 2H), 2,29 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 1,93-1,84 (м, 1H), 1,83-1,76 (м, 2H), 1,62 (с, 3H), 1,60-1,47 (м, 2H). Приклад 16 (енантіомер 2) (небажаний енантіомер /дистомер): Час утримання = 4,25 хв (аналітичний метод СФХ). Виділення = 101 мг г, вихід 13 %, 98 % ee, (жовта тверда речовина). РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 560,2; знайдено 560,2. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 6,89 (с, 1H), 6,27 (с, 1H), 4,49 (с, 2H), 3,08-2,98 (м, 4H), 2,52 (с, 3H), 2,34 (ш т, J=11,0 Гц, 2H), 2,29 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 1,93-1,84 (м, 1H), 1,83-1,76 (м, 2H), 1,62 (с, 3H), 1,60-1,47 (м, 2H).

25 Приклад 15: 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід



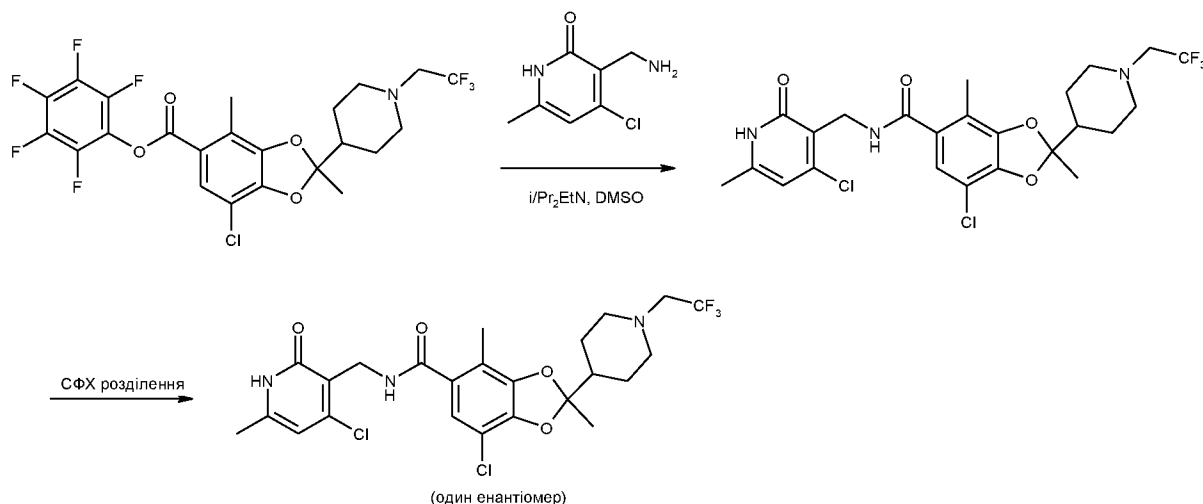
30 Проміжна сполука 9
(один енантіомер; один геометричний ізомер)

Приклад 15
(один енантіомер; один геометричний ізомер)

До розчину 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти (900 мг, 2,27 ммоль) в N, N-диметилформаміді (5 мл) додавали O-(7-азабензотріазол-1-іл)-N, N,N',N'-тетраметилуронію гексафлуорфосфат (1,04 г, 2,73 ммоль) і N, N-діізопропілетиламін (2,38 мл, 13,6 ммоль). Суміш перемішували при 25 °С протягом 30 хв і додавали гідрохлоридну сіль 3-(амінометил)-4-хлор-6-метил-1H-піридин-2-ону (Проміжна сполука 6) (710 мг, 3,4 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом додаткових 1,5 год. і потім фільтрували. Фільтрат двічі очищали препаративною ВЕРХ [Колонка: YMC-Actus Triart C18 (100 мм × 30 мм, 5 мкм). Мобільна фаза А: вода (0,05 % соляної кислоти) / Мобільна фаза В: ацетонітрил. Градієнт (від 85 до 55 % мобільної фази А / від 15 до 45 % мобільної фази В, протягом 10 хв). Температура колонки: 30 °С і колонка: Xtimate C18 (150 мм × 25 мм, 5 мкм). Мобільна фаза А: вода (0,05 % гідроксиду аміаку об./об.) / Мобільна фаза В: ацетонітрил. Градієнт (від 69 до 39 % мобільної фази А / від 31 до 61 % мобільної фази В, протягом 7 хв). Температура колонки: 30 °С] одержуючи вказану в заголовку сполуку (533 мг, вихід 43 %, чистота >99 %) у вигляді твердої речовини білого кольору. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 550,2; знайдено 550,1. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 11,97 (ш, 1H), 7,06-7,03 (м, 1H), 6,88 (с, 1H), 6,19 (с, 1H), 4,65 (д, J=6,0 Гц, 2H), 4,05-4,01 (м, 1H), 3,66-3,62 (м, 2H), 3,25 (с, 3H), 2,93-2,90 (м, 2H), 2,28 (с, 3H), 2,25 (с, 3H), 1,93-1,81 (м, 6H), 1,60 (с, 3H), 1,25-1,02 (м, 4H).

Приклад 16: (R)-7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід та (S)-7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід

5



Стадія 1: Синтез 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду

10 До розчину 2,3,4,5,6-пентафлуорфеніл 7-хлор-2,4-диметил-2-[1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл]-2H-1, 3-бензодіоксол-5-карбоксилату (Проміжна сполука 8) (188 мг, 0,3358 ммоль) в диметилсульфоксиді (1 мл) додавали гідрохлорид 3-(амінометил)-4-хлор-6-метил-1,2-дигідропіридин-2-ону (Проміжна сполука 6) (70,2 мг, 0,336 ммоль) і N, N-діізопропілетиламін (233 мкл, 1,34 ммоль). Реакційну суміш нагрівали при 60 °C і через 1 год.

15 додавали на колонку C18 для очищення. Бажаний продукт очищали двічі за допомогою флеш-хроматографії з оберненою фазою (колонка C18, градієнт від 0 до 100 % ацетонітрилу у воді з 0,1 % трифлуороцтової кислоти), отримуючи вказану в заголовку сполуку (180 мг, вихід 98 %) у вигляді рацемічної суміші як смоли.

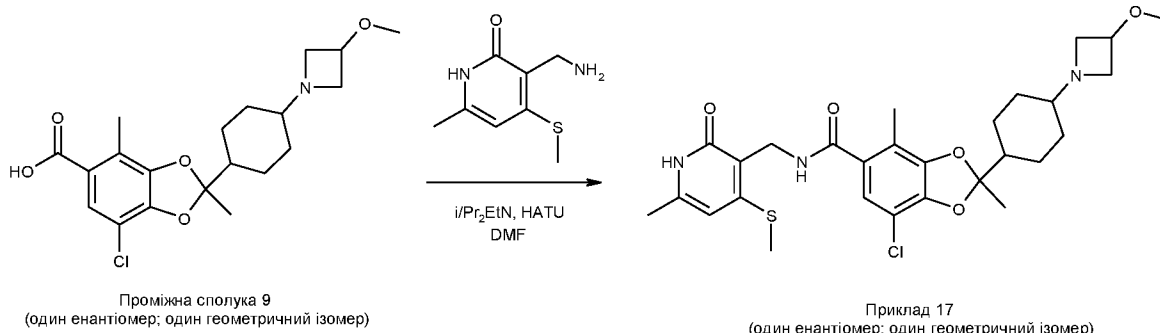
Стадія 2: Розділення (R)-7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду та (S)-7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду

20 Рацемічну суміш 7-хлор-N-((4-хлор-6-метил-2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-іл)метил)-2,4-диметил-2-(1-(2,2,2-трифлуоретил)піперидин-4-іл)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксаміду (180 мг) розділяли препаративною СФХ [Колонка: ChromegaChiral CC4 від ES Industries (250 мм × 20 мм ВД). Мобільна фаза А: CO₂ / Мобільна фаза В: 0,25 % ізопропіламіну в метанолі. Ізократична (65 % мобільної фази А і 35 % мобільної фази В). Швидкість потоку: 80 г/хв. Температура колонки: 25 °C]. Аналітичний метод СФХ: Колонка: Chiralcel OZ-H від Chiral Technologies (100 мм × 4,6 мм ВД, ххпт). Мобільна фаза А: CO₂ / Мобільна фаза В: 0,1 % ізопропіламіну в метанолі. Ізократична (65 % мобільної фази А і 35 % мобільної фази В). Швидкість потоку: 4 мл/хв. Температура колонки: 40 °C. Приклад 17 (енантіомер 1) (бажаний енантіомер/еутомер): Час утримання = 0,73 хв (аналітичний метод СФХ). Виділення = 61 мг, вихід 33 %, 100 % ee (жовта тверда речовина). Приклад 17 (Енантіомер 2) (небажаний енантіомер/дистомер): Час утримання = 0,98 хв (аналітичний метод СФХ). Виділення = 63 мг, вихід 34 %, 97 ee, (жовта

35 тверда речовина). РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 548,1; знайдено 548,2. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 6,89 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 4,52 (с, 2H), 3,04 (к, J=9,8 Гц, 4H), 2,35 (ш т, J=11,0 Гц, H), 2,27 (с, 3H), 2,19 (с, 3H), 1,95-1,85 (м, 1H), 1,85-1,75 (м, 2H), 1,63 (с, 3H), 1,62-1,50 (м, 2H).

Приклад 17: 7-хлор-2-(4-(3-метоксиазетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметил-N-((6-метил-4-(метилтіо)-2-оксо-1, 2-дигідропіридин-3-іл)метил)бензо[d][1,3]діоксол-5-карбоксамід

40



До розчину 7-хлор-2-(4-(3-метоксіязетидин-1-іл)циклогексил)-2,4-диметилбензо[d][1,3]діоксол-5-карбонової кислоти (Проміжна сполука 9 - один енантіомер і геометричний ізомер) (5 г, 12,63 ммоль) в N, N-диметилформаміді (50 мл) додавали O-(7-азабензотріазол-1-іл)-N, N,N',N'-тетраметилуронію гексафлуорфосфат (5,7 г, 14,99 ммоль) і N, N-діізопропілетиламін (11 мл, 63,15 ммоль). Суміш перемішували при 20 °С протягом 30 хв і додавали гідрохлоридну сіль 3-(амінометил)-6-метил-4-(метилтіо)піридин-2(1H)-ону (Проміжна сполука 1) (4,2 г, 19,03 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом додаткових 1,5 год. і потім фільтрували. Фільтрат очищали препаративною ВЕРХ [Колонка: Phenomenex Gemini C18 (250 мм × 50 мм, 10 мкм). Мобільна фаза А: вода (0,04 % гідроксиду амонію об/об і 10 мМ бікарбонату амонію) / Мобільна фаза В: ацетонітрил. Градієнт (від 75 до 44 % мобільної фази А / 25 до 56 % мобільної фази В, протягом 23 хв). Температура колонки: 30 °С] одержуючи вказану в заголовку сполуку (4,4 г, вихід 60 %, чистота 96 % як біла тверда речовина. РХМС [M+H]⁺ m/z: розраховано 562,2; знайдено 562,2. ¹H ЯМР (400 МГц, Метанол-d₄) δ 6,91 (с, 1H), 6,29 (с, 1H), 4,50 (с, 2H), 4,01 (квін, J=6 Гц, 1H), 3,58 (дд, J=8,8, 6,4 Гц, 2H), 3,26 (с, 3H), 2,92-3,02 (м, 2H), 2,54 (с, 3H), 2,31 (с, 3H), 2,21 (с, 3H), 2,01-2,11 (м, 1H), 1,79-2,00 (м, 5H), 1,62 (с, 3H), 1,19-1,34 (м, 2H), 0,91-1,08 (м, 2H).

Дослідження EZH2

Вимірювання IC₅₀ для інгібіторів з використанням EZH2

Біохімічне дослідження EZH2 (IC₅₀): Потенційні сполуки оцінювали шляхом включення ³H-SAM у біотинільований пептид H3. Зокрема, 30 пМ PRC2, що містить wt EZH2 (пентамерний комплекс, одержаний самостійно), попередньо інкубували з 450 нМ SAM, 450 нМ ³H-SAM, 2 мкМ активуючого пептиду H3K27me3 (H₂N-RKQLATKAAR(Kme3)SAPATGGVKKP-амід) та сполуки (у вигляді 10-ти точкового дубльованого титрування відповіді від дози в ДМСО, кінцеве дослідження 0,8 % ДМСО (об/об)) протягом 3-5 год. у 50 мМ Тріс (рН 8,5), 1 мМ DTT, 0,07 мМ Brij-35, 0,1 % BSA та 0,8 % DMSO у загальному об'ємі 12,5 мкл. Реакцію ініціювали біотинільованим пептидом субстрату H3 (H₂N-RKQLATKAAR(Kme1)SAPATGGVKKP-NTPEGBiot) у вигляді 2 мкМ готового розчину в 12,5 мкл буфера і дозволяли реагувати при кімнатній температурі протягом 18-22 год. Гасіння здійснювали додаванням 20 мкл розчину STOP (50 мМ Тріс (рН 8,5), 200 мМ EDTA, 2 мМ SAH). 35 мкл гашеного розчину переносили у покриті стрептавідином планшети FlashPlates (PerkinElmer), інкубували 1-2 години, промивали та зчитували у зчитувачі TopCount (PerkinElmer). Розраховували IC₅₀ в Genedata Screener, використовуючи нелінійний спосіб найменших квадратів з чотирма параметрами, де чотирма параметрами були IC₅₀, нахил Хілла, предперехідний базовий рівень (0 % INH) та постперехідний базовий рівень (100 % INH).

Вимірювання EC₅₀ для інгібіторів в дослідженнях клітин HeLa

Дослідження H3K27me3 Альфа HeLa (AlphaLISA). Десять різних доз кожної досліджуваної сполуки (у серії 3-кратних розведень) висівали в подвійні планшети, оброблені культурою тканин із 384 лунками (Каталожний номер № 6007680; Perkin Elmer, Waltham, MA). Клітини HeLa, вирощені в культурі, трипсинізували і підраховували використовуючи лічильник клітин Countess® (Каталожний номер № C10281; Life Technologies, Grand Island, NY). Клітини розбавляли до 67000 клітин на мл в 10 % DMEM (Каталожний номер № 10569-010 Life Technologies, Grand Island, NY) і 15 мкл (1000 клітин) поміщали в кожну лунку за допомогою дозатора Biotek MicroFlo™ Select (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA), 384-лункового планшета. Планшети інкубували при 37 °С/5 % CO₂ протягом 72 годин. Одну з копій планшетів обробляли для дослідження HeLa а інші для визначення життєздатності. 5 мкл буфера лізису клітин-гістонів (1X) (Каталожний номер № AL009F1 Perkin Elmer; Waltham, MA) додавали в кожну лунку планшета, обробленого для AlphaLISA, і планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин на шейкері з низькою швидкістю (Модель № 4625-Q Thermo

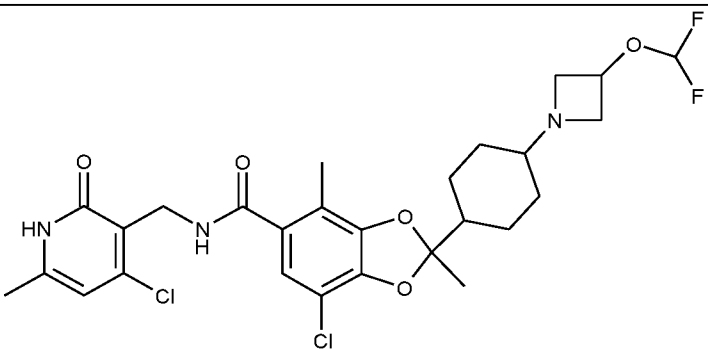
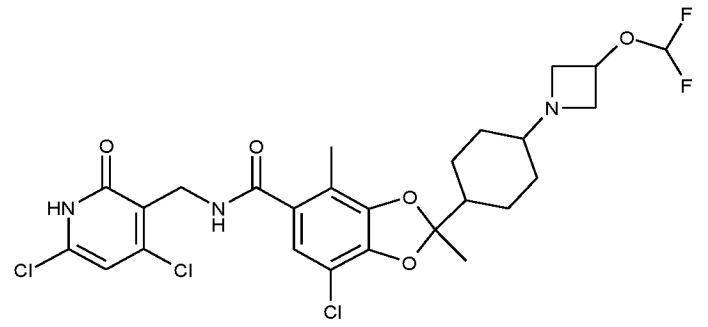
Scientific; Waltham, MA). Потім додавали 10 мкл на лунку буфера для екстракції гістону (Каталожний номер № AL009F2; Perkin Elmer; Waltham, MA) і планшет додатково інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хв на шейкері з низькою швидкістю. Далі в кожну лунку додавали 10 мкл 5-кратної суміші гранул акцепторів анти-K27me3 плюс біотинільоване антитіло до гістону H3 (C-ter) (розведене до кінцевої концентрації 3 нМ) (Каталожний номер № AL118 Perkin Elmer; Waltham, MA). Розведення акцепторних гранул та антигістону H3 проводили в 1X буфері детектування гістону (Каталожний номер № AL009F3 Perkin Elmer; Waltham, MA), який отримували шляхом розведення 10X одержаного готового розчину. Планшет закривали алюмінієвим герметизуючою пластиною і інкубували при 23 °C протягом 60 хв. Далі додавали 10 мкл 5X розчину кульок донора стрептавідину (Каталожний номер № 6760002 Perkin Elmer; Waltham, MA) (кінцева концентрація 20 мкг/мл в 1X буфері для детектування гістону), = планшет герметизували алюмінієвим герметизуючою пластиною і інкубували при 23 °C протягом 30 хв. Потім планшети зчитували за допомогою зчитувача EnVision-Alpha (Модель № 2104 Perkin Elmer; Waltham, MA).

Життєздатність клітин аналізували шляхом додавання 15 мкл клітинного титру Glo ((Каталожний номер № G9241 Promega Madison, WI) до кожної лунки з клітинами з середовищем. Планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 15-20 хвилин на шейкері для планшетів з низькою швидкістю. Потім планшети зчитували за допомогою зчитувача EnVision-Alpha (Модель № 2104 Perkin Elmer; Waltham, MA).

Вимірювання GI_{50} для інгібіторів у тестах життєздатності Karpas-422

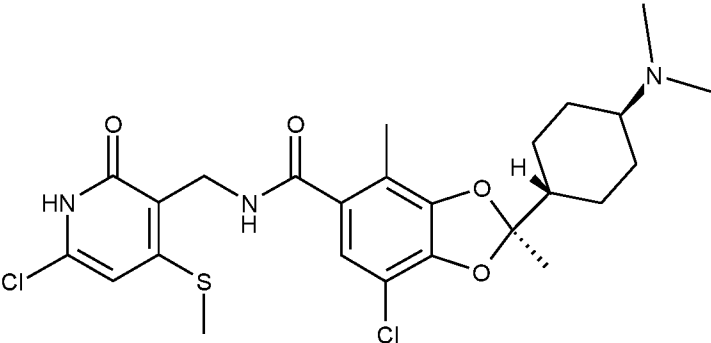
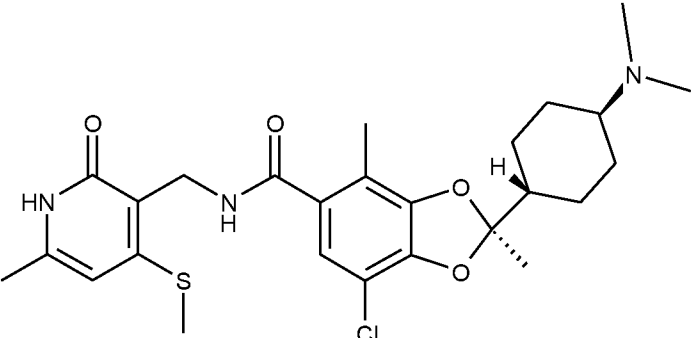
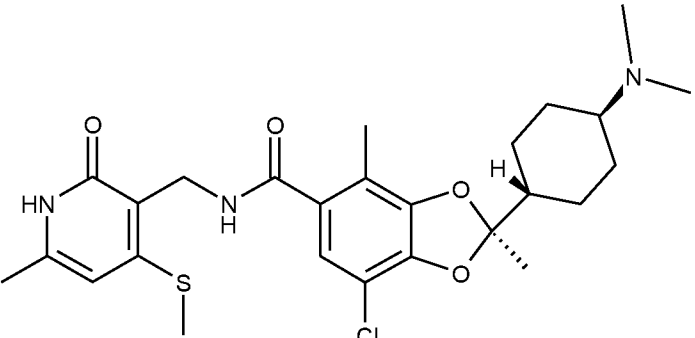
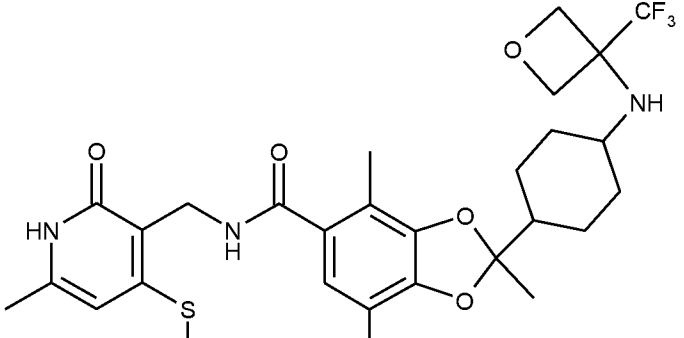
Клітинні лінії Karpas-422 отримували від DSMZ (Braunschweig, Germany) та вирощували в середовищі RPMI-1640. Всі середовища містили 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS) та 1 % пеніцилін/стрептоміцин (Invitrogen). 20К Клітин на лунку висівали на 96-лункові планшети з покриттям. Клітини розщеплювали і висівали при вихідній густині посіву (на основі кількості DMSO на лунку) кожні 4 дні на планшети, що містять свіжі інгібітори EZH2. Відносну кількість клітин оцінювали за допомогою аналізу життєздатності люмінесцентних клітин Cell Titer-Glo (Promega) на 8 день. GraphPad Prism 5 використовували для підгонки кривих і вказували значення GI_{50} . Дані наведені в Таблиці 5.

Таблица 5

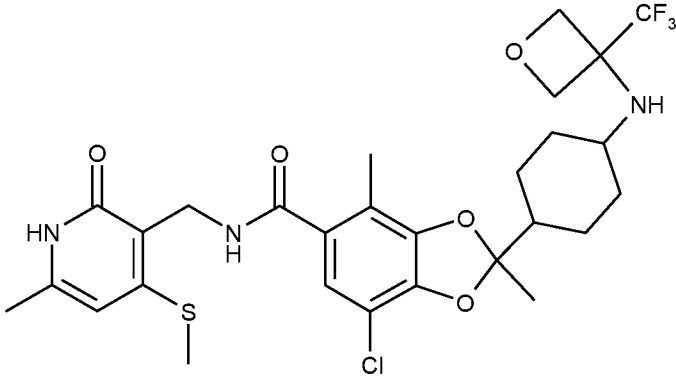
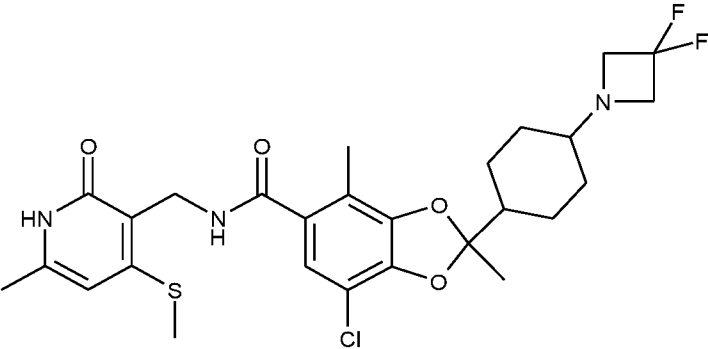
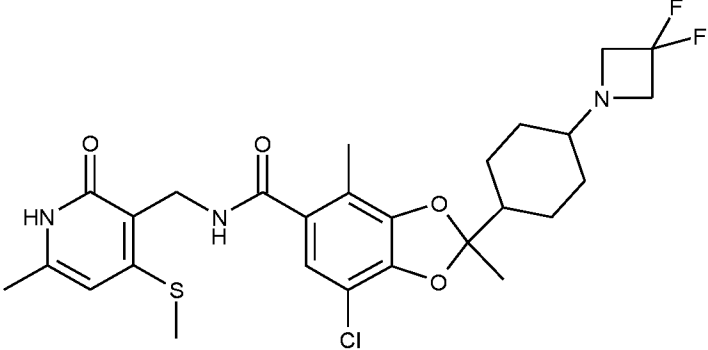
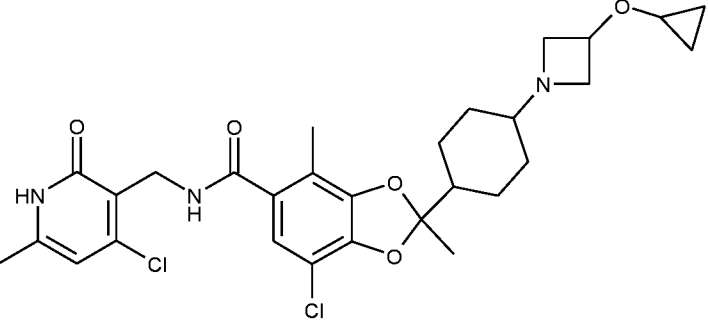
Приклад	EZH2 IC ₅₀ (нМ)	HeLa EC ₅₀ (нМ)	Karpas-422 GI ₅₀ (нМ)
 <p>Приклад 1 (один енантіомер, один геометричний ізомер)</p>	91	0,52	3,9
 <p>Приклад 2 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	1500	15	250

30

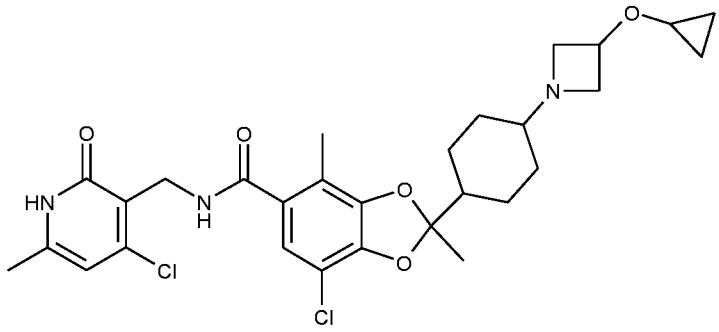
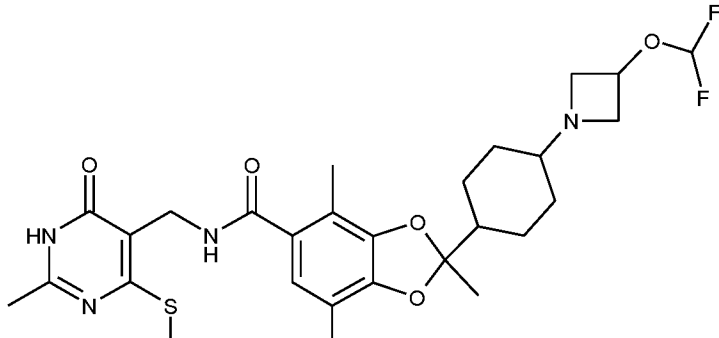
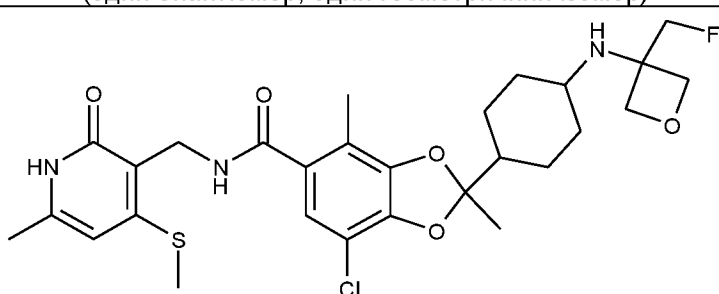
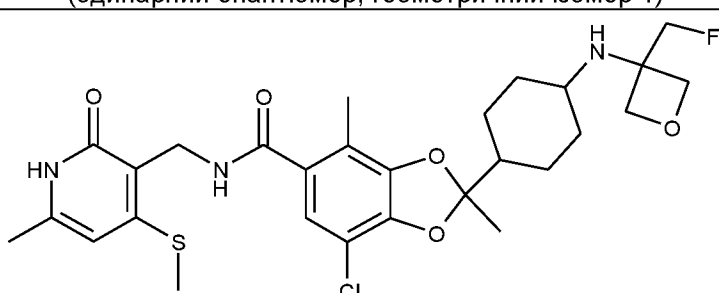
Таблиця 5 (продовження)

Приклад	EZH2 IC ₅₀ (нМ)	HeLa EC ₅₀ (нМ)	Karpas-422 GI ₅₀ (нМ)
 <p>Приклад 3</p>	370	2,4	29
 <p>Приклад 4 (R-енантиомер; транс-геометричний ізомер)</p>	38	0,51	4,0
 <p>Приклад 5 (R-енантиомер; транс-геометричний ізомер)</p>	54	3,6	22
 <p>Приклад 6 - Енантиомер 1 (один енантиомер; один геометричний ізомер)</p>	1800	39	720

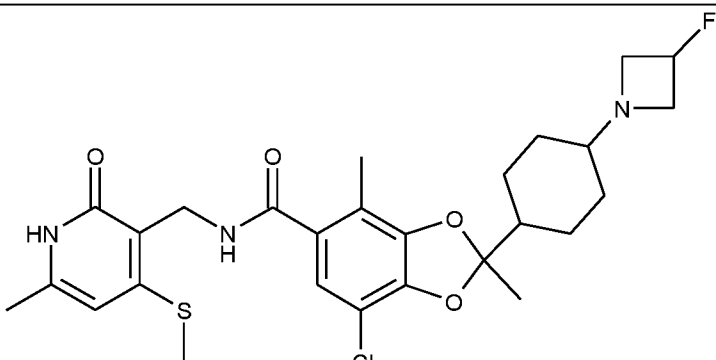
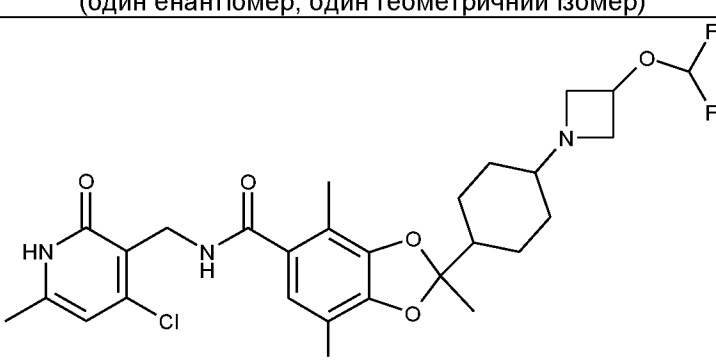
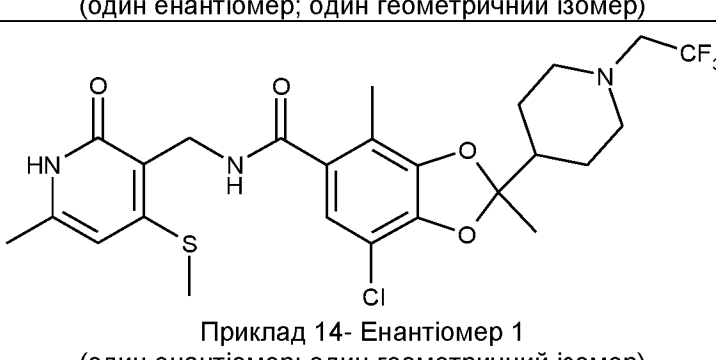
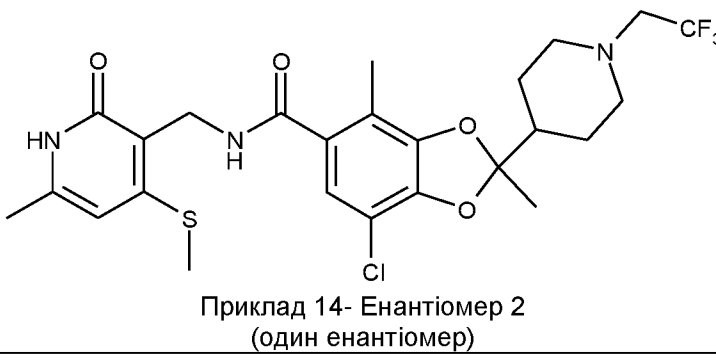
Таблиця 5 (продовження)

Приклад	EZH2 IC ₅₀ (нМ)	HeLa EC ₅₀ (нМ)	Karpas-422 GI ₅₀ (нМ)
 <p>Приклад 6 - Енантіомер 2 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	140	4,2	53
 <p>Приклад 7 - Енантіомер 1 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	8600		
 <p>Приклад 7 - енантіомер 2 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	120		12
 <p>Приклад 8 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	39	0,52	5,0

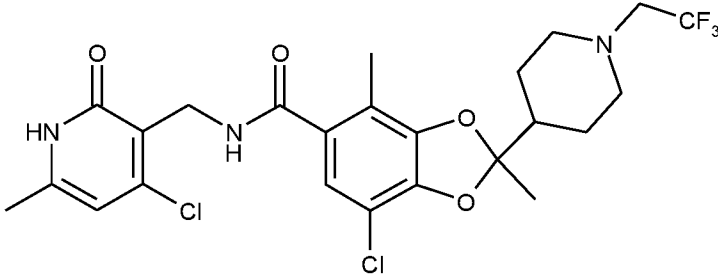
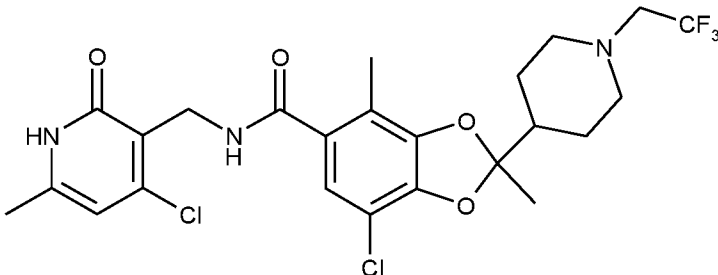
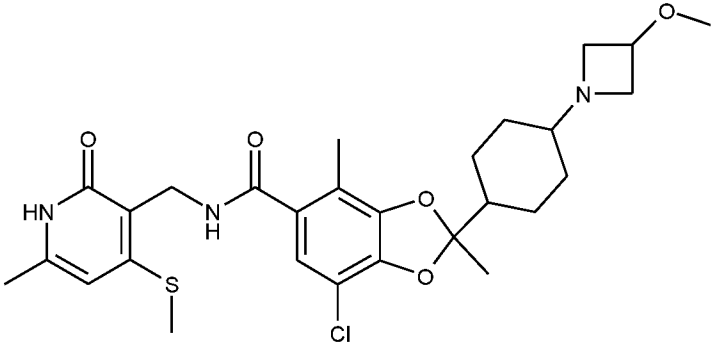
Таблиця 5 (продовження)

Приклад	EZH2 IC ₅₀ (нМ)	HeLa EC ₅₀ (нМ)	Karpas-422 GI ₅₀ (нМ)
 <p>Приклад 9 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	54	0,61	3,7
 <p>Приклад 10 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	202	1,9	20
 <p>Приклад 11 (одинарний енантіомер; геометричний ізомер 1)</p>	140	1,3	8,6
 <p>Приклад 11 (одинарний енантіомер; геометричний ізомер 2)</p>	180	1,7	

Таблиця 5 (продовження)

Приклад	EZH2 IC ₅₀ (нМ)	HeLa EC ₅₀ (нМ)	Karpas-422 GI ₅₀ (нМ)
 <p>Приклад 12 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	92	0,59	4,4
 <p>Приклад 13 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	84	0,81	9,7
 <p>Приклад 14- Енантіомер 1 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	37	1,4	
 <p>Приклад 14- Енантіомер 2 (один енантіомер)</p>	7000	210	

Таблиця 5 (продовження)

Приклад	EZH2 IC ₅₀ (нМ)	HeLa EC ₅₀ (нМ)	Karpas-422 GI ₅₀ (нМ)
 <p>Приклад 16 - Енантіомер 1 (один енантіомер)</p>	310	22	
 <p>Приклад 16 - Енантіомер 2 (один енантіомер)</p>	>10000	>300	
 <p>Приклад 17 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	43	0,33	3,5

Вимірювання часу перебування

- Дослідження часу перебування EZH2: Час перебування сполуки оцінювали, відстежуючи відновлення активності ферменту після 100-кратного розведення попередньо сформованого комплексу інгібітора ферменту (реакція розведення), і порівнюючи його з активністю нерозведеного контролю з тими самими кінцевими концентраціями всіх реагентів (контрольна реакція). Активність ферменту вимірювали шляхом включення ³H-SAM у біотинільований пептид H3. Для реакції розбавлення 20 нМ PRC2, що містить wt EZH2 (пентамерний комплекс, одержаний власноруч), попередньо інкубували з 1 мкМ активуючого пептиду (H₂N-RKQLATKAAR(Kme3)SAPATGGVKKP-амід) та сполукою в 600 разів більше ніж K_i протягом 2 год. в 40 мкл буфера (50 мМ Tris pH 8,5, 4 мМ DTT, 1 мМ MgCl₂, 0,07 мМ Brij-35 і 0,1 мг/мл BSA), потім розбавляли у 100 разів і реакцію ініціювали перенесенням 1,4 мкл до 138,6 мкл об'єму буфера, що містить 1 мкМ активуючого пептиду, 5,05 мкМ субстратного пептиду (H₂N-RKQLATKAARKSAPATGGVKKP-NTPEGbiot), 1,01 мкМ SAM і 1,01 мкМ ³H-SAM. Для контрольної реакції 0,202 нМ PRC2 попередньо інкубували з 1 мкМ активуючого пептиду, 1,01 мкМ SAM, 1,01 мкМ ³H-SAM і сполукою при 6,06 кратному K_i протягом 2 год. у 138,6 мкл буфера, потім реакцію ініціювали додаванням у воду 1,4 мкл 500 мкМ пептиду субстрату. Реакції гасили в різні моменти часу, що охоплювали до 10 годин, шляхом перенесення 8 мкл аліквоти з реакційного посудини на планшет, що містив 8 мкл на лунку розчину STOP (50 мМ Tris pH 8,5, 200 мМ

ЕДТА, 2 мМ SAH). Після останньої точки часу 12 мкл гашених розчинів переносили у покритий стрептавідином планшет FlashPlate (PerkinElmer), що містить 40 мкл на лунку розчину STOP, інкубували 1-8 год., промивали та зчитували у зчитувачі планшетів TopCount (PerkinElmer).

5 Спеціальний сценарій використовували для підбору даних для побудови прямої лінії про хід реакції та даних про хід реакції розбавлення:

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

10 Де y - продукт, що утворюється, t - час реакції, v_i - початкова швидкість, v_s - швидкість стаціонарного стану, k_{obs} - константа швидкості для переходу від початкової фази швидкості кривої до стаціонарної фази швидкості кривої. При побудові даних про хід реакції розведення, v_s був обмежений нахилом лінії, пристосованою до даних про хід реакції контролю.

Встановлене значення k_{obs} потім було перетворено на час перебування:

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

15

Де τ - час перебування, K_i - константа інгібування, $[E]$ - розрахована рівноважна концентрація фермент-інгібіторного комплексу, $[E]$ - розрахована рівноважна концентрація вільного ферменту, $[I]$ - розрахована рівноважна концентрація вільного інгібітору.

Клітинна проникність Вимірювання для інгібіторів в дослідженні MDCK

20 Культура клітин: Клітини MDCK II (отримані від Піта Борста в Нідерландському інституті раку) висівали на поліетиленові мембрани (ПЕТ) у 96-лункових системах з вставками BD при $2,5 \times 10^5$ клітин/мл до 4-7 днів для формування злитого клітинного моношару.

Експериментальна методика: Тестові та еталонні сполуки (надолол, метопролол та дигоксин) розбавляли транспортним буфером (HBSS з 10 мМ Hepes, pH 7,4) із готового розчину до концентрації 2 мкМ (<1 % ДМСО) і наносили на апікальну (A) або базолатеральну (B) сторону моношару клітин. Проникнення досліджуваних сполук від напрямку A до B або напрямку B до A визначали в двох примірниках з інгібітором P-гр (GF120918, 10 мкМ). Дигоксин досліджували при 10 мкМ від напрямку A до B або напрямку від B до A з/без інгібітору P-гр (GF120918, 10 мкМ), тоді як надолол і метопролол досліджували при 2 мкМ у напрямку від A до B без P-гр інгібітору (GF120918, 10 мкМ) у двох примірниках. Платівку інкубували протягом 2,5 годин у інкубаторі CO₂ при 37±1 °C, з 5 % CO₂ при насиченій вологості без струшування. Крім того, також визначали коефіцієнт потоку кожної сполуки. Досліджувані та еталонні сполуки кількісно визначали за допомогою РХ/МС/МС аналізу на основі співвідношення площі піку аналіту/IS. Після транспортного дослідження для визначення цілісності моношару клітин застосовують аналіз відторгнення жовтого Люцифера. Буфери видаляють як з апікальної, так і з базолатеральної камер, з подальшим додаванням 75 мкл 100 мкМ жовтого люцифера в транспортний буфер і 250 мкл транспортного буфера в апікальній і базолатеральній камерах, відповідно. Планшети інкубували протягом 30 хвилин при температурі 37 °C з 5 % CO₂ та 95 % відносній вологості без струшування. Після 30-хвилинної інкубації з апікальних боків відбирають 20 мкл зразків жовтого люцифера з подальшим додаванням 60 мкл транспортного буфера. А потім 80 мкл зразків жовтого люцифера відбирають з базолатеральних сторін. Вимірюють одиниці відносної флуоресценції (RFU) жовтого люцифера при 425/528 нм (збудження/випромінювання) за допомогою зчитувача планшетів Molecular Device M2e.

45 Аналіз даних: Явний коефіцієнт проникності Паппа (см/с) розраховували за допомогою рівняння:

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

50 Де dC_r/dt - сукупна концентрація сполуки в камері приймача в залежності від часу (мкМ/с); V_r - об'єм розчину в приймальній камері (0,075 мл на апікальній стороні, 0,25 мл на базолатеральній стороні); A - площа поверхні для транспортування, тобто 0,0804 см² для площі моношару; C_0 - початкова концентрація в донорній камері (мкМ).

Коефіцієнт потоку розраховували за рівнянням:

$$\text{Відношення потоку} = P_{app} (BA) / P_{app} (AB)$$

Відсоток відновлення розраховували за рівнянням:

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

Де V_d - об'єм у донорських камерах (0,075 мл на апікальній стороні, 0,25 мл на базолатеральній стороні); C_d та C_r - кінцеві концентрації транспортної сполуки в донорній та приймальній камерах, відповідно.

Відсоток жовтого люцифера в базолатеральній лунці обчислюється за допомогою рівняння:

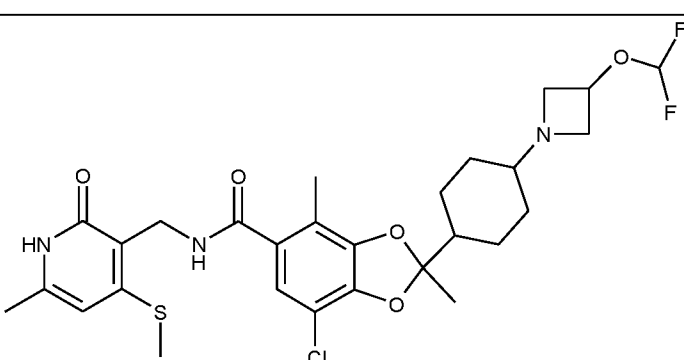
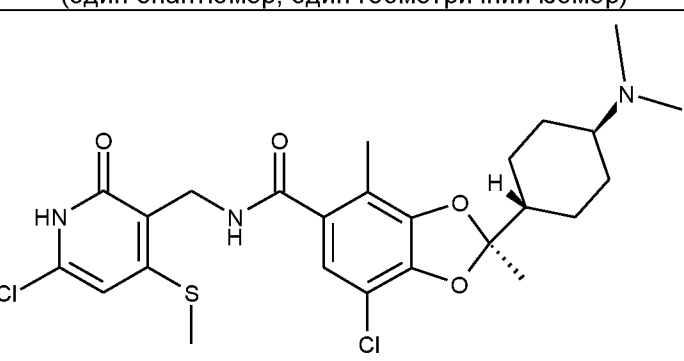
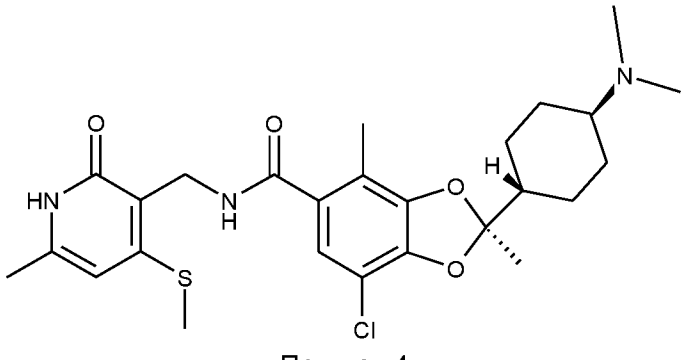
5

$$\% \text{LuciferYellow} = \frac{V_{\text{Basolateral}} \times \text{RFU}_{\text{Basolateral}}}{V_{\text{Apical}} \times \text{RFU}_{\text{Apical}} + V_{\text{Basolateral}} \times \text{RFU}_{\text{Basolateral}}} \times 100$$

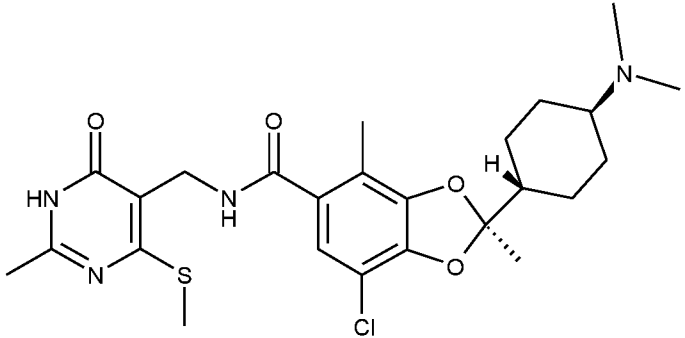
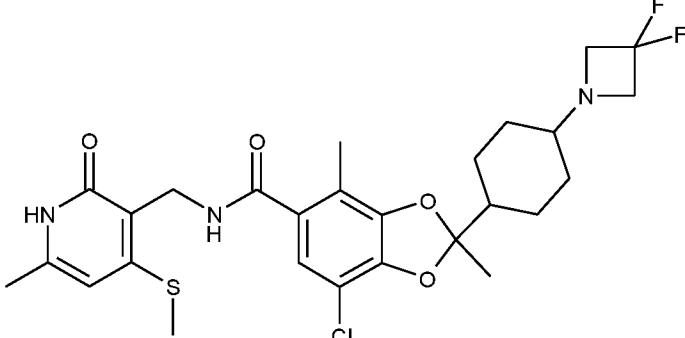
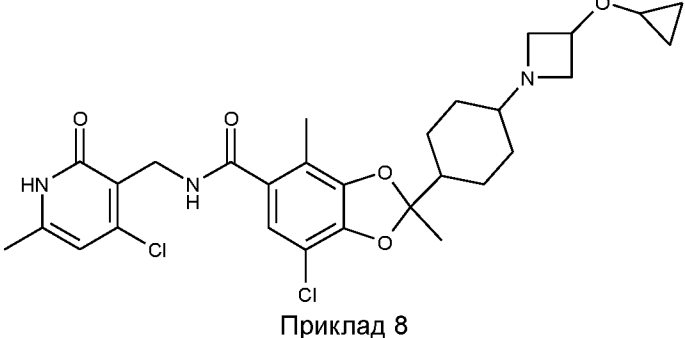
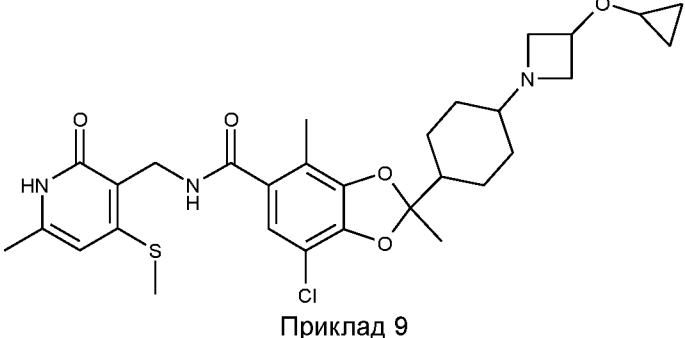
10

де $\text{RFU}_{\text{Апікальні}}$ і $\text{RFU}_{\text{Базолатеральні}}$ відносні значення одиниць флуоресценції люцифера жовтого в апікальних і базолатеральних лунках, відповідно; $V_{\text{апикальна}}$ та $V_{\text{базолатеральна}}$ - це об'єм апікальної та базолатеральної лунки (0,075 мл та 0,25 мл), відповідно. Відсоток люцифера жовтого повинен бути менше 2. Дані наведені в Таблиці 6.

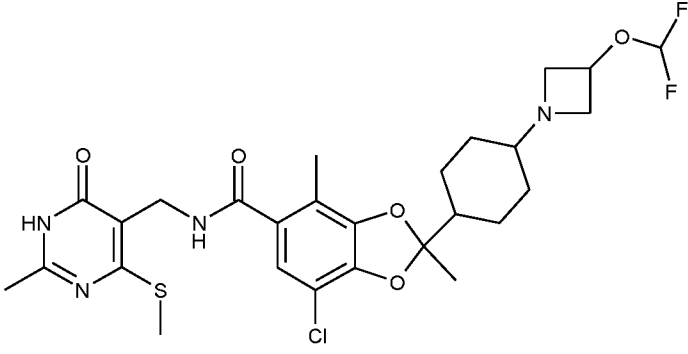
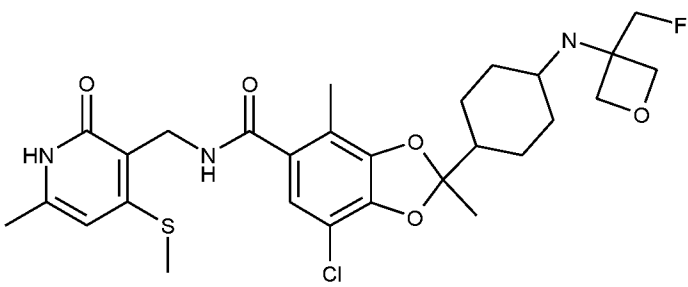
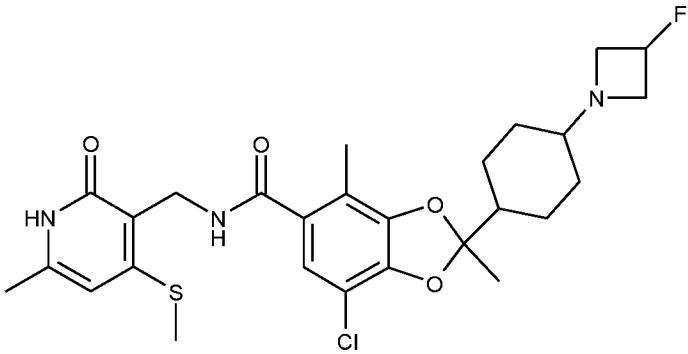
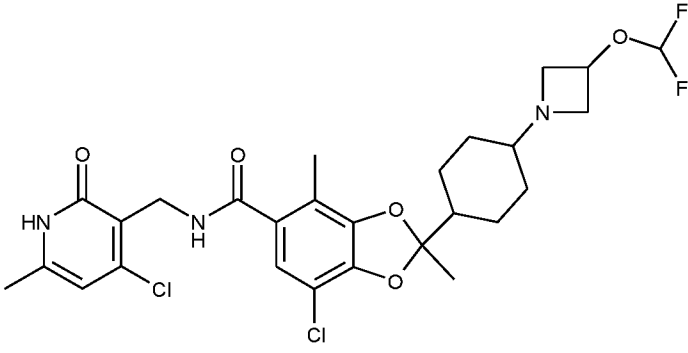
Таблиця 6

Приклад	Час перебування EZH2 (години)	Клітинна проникність (10^{-6} см/с)/ Відношення потоку
 <p>Приклад 1 (один енантіомер, один геометричний ізомер)</p>	>100	5,6/0,79
 <p>Приклад 3</p>		3,7/1,2
 <p>Приклад 4 (R-енантіомер; транс-геометричний ізомер)</p>		0,62/2,3

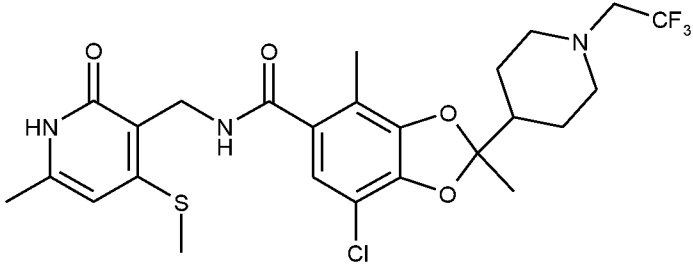
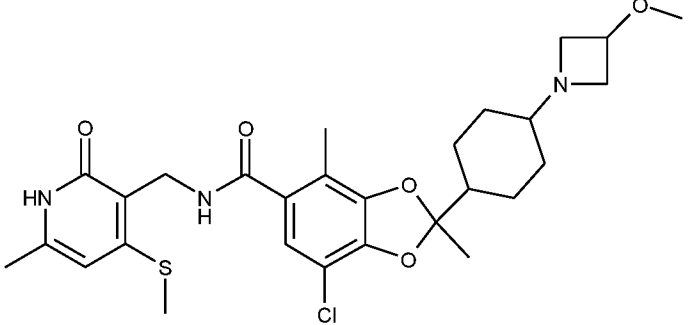
Таблиця 6 (продовження)

Приклад	Час перебування EZH2 (години)	Клітинна проникність (10^{-6} см/с)/ Відношення потоку
 <p>Приклад 5 (R-енантіомер; транс-геометричний ізомер)</p>		1,1/3,6
 <p>Приклад 7 - Енантіомер 2 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	33	12/0,71
 <p>Приклад 8 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	>100	6,1/0,9
 <p>Приклад 9 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	>100	3,8/1,4

Таблиця 6 (продовження)

Приклад	Час перебування EZH2 (години)	Клітинна проникність (10^{-6} см/с)/ Відношення потоку
 <p>Приклад 10 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	37	6,5/0,69
 <p>Приклад 11 (один енантіомер; геометричний ізомер 1)</p>		5,3/1,3
 <p>Приклад 12 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	>100	6,3/1,2
 <p>Приклад 13 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	48	8,9/0,64

Таблиця 6 (продовження)

Приклад	Час перебування EZH2 (години)	Клітинна проникність (10^{-6} см/с)/ Відношення потоку
 <p data-bbox="435 651 767 714">Приклад 14- Енантіомер 2 (один енантіомер)</p>		13/0,56
 <p data-bbox="312 1055 887 1113">Приклад 17 (один енантіомер; один геометричний ізомер)</p>	>100	2,5/1,8

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> CONSTELLATION PHARMACEUTICALS, INC.

<120> МОДУЛЯТОРИ МЕТИЛМОДИФІКУЮЧИХ ФЕРМЕНТІВ, КОМПОЗИЦІЇ ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

<130> 124033-02020

<140> PCT/US2019/027932

<141> 2019-04-17

<150> 62/659,408

<151> 2018-04-18

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> LysMe3

<400> 1

Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Xaa Ser Ala Pro Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Val Lys Lys Pro
 20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> LysMe1

<400> 2
 Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Xaa Ser Ala Pro Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Val Lys Lys Pro
 20

<210> 3
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний пептид"

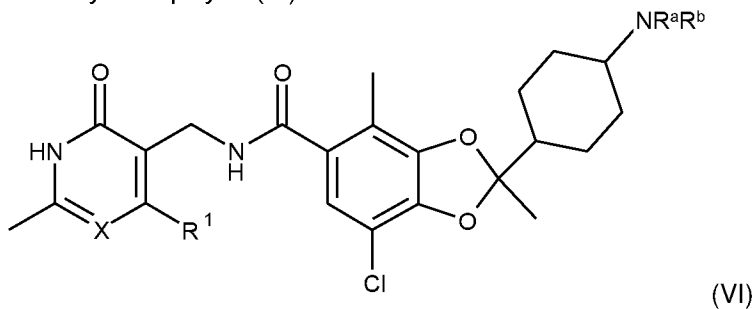
<400> 3
 Arg Lys Gln Leu Ala Thr Lys Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Ala Thr
 1 5 10 15

Gly Gly Val Lys Lys Pro
 20

3

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5 1. Сполука Формули (VI):



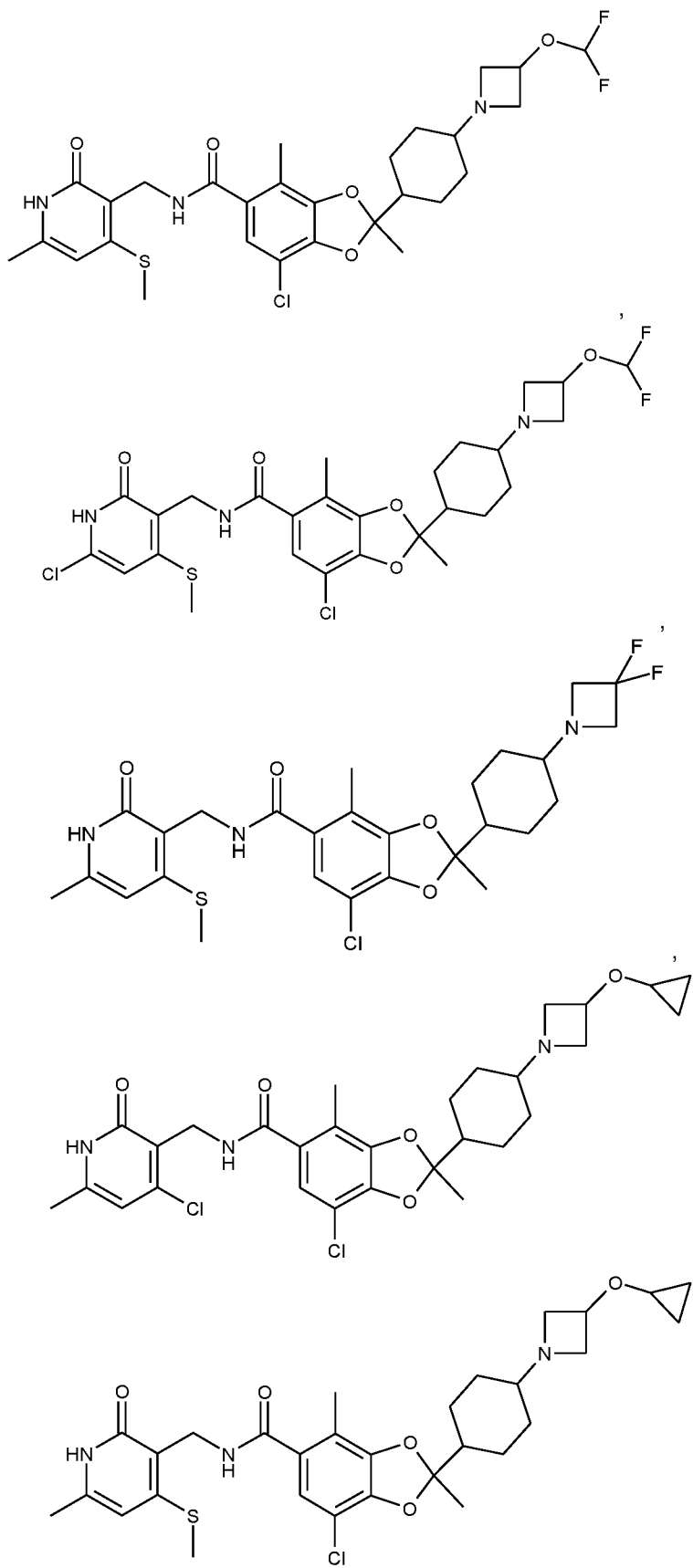
або її фармацевтично прийнятна сіль, де:

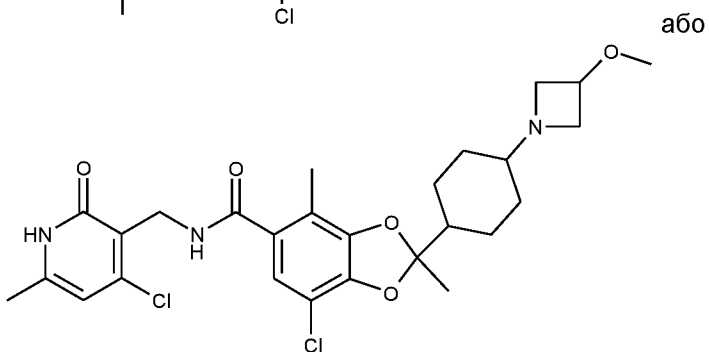
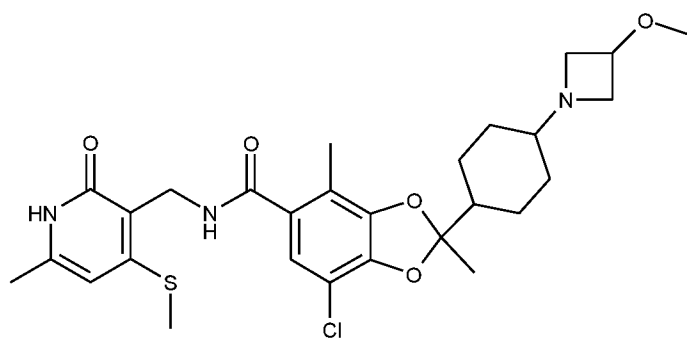
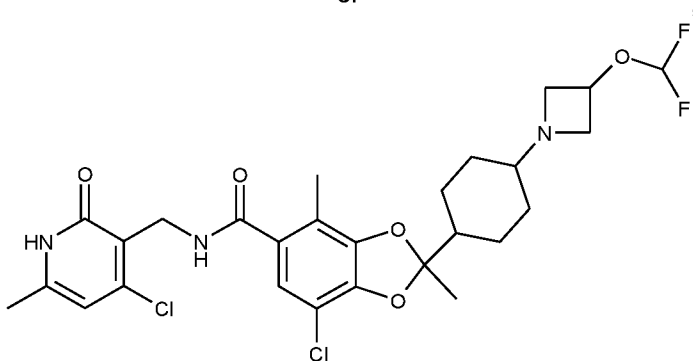
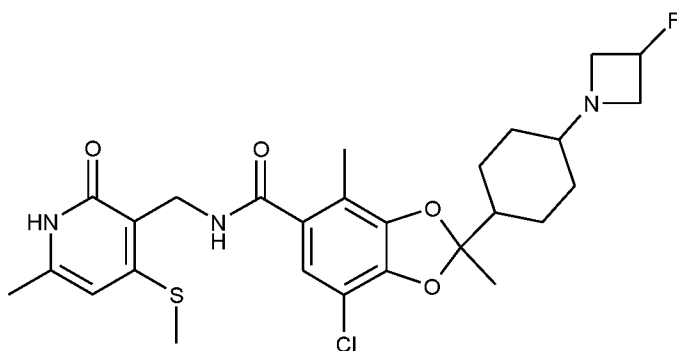
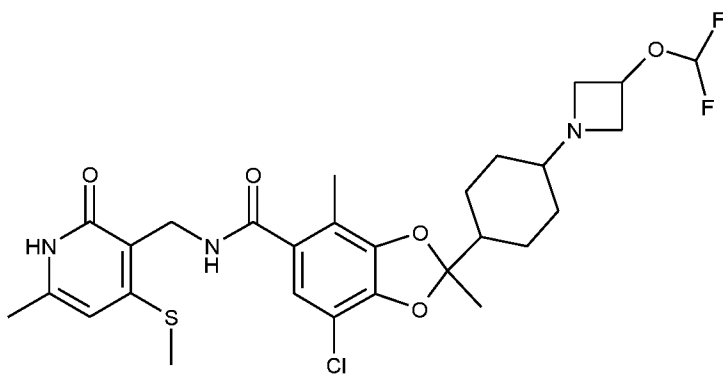
R¹ являє собою хлор або -SCH₃;

X являє собою CH;

10 R^a і R^b разом з атомом нітрогену, до якого вони приєднані, утворюють азетидиніл, заміщений 1 або 2 галогенами або -OR^c, де R^c являє собою -CH₃, -CHF₂ або циклопропіл.

2. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що сполука має Формулу:

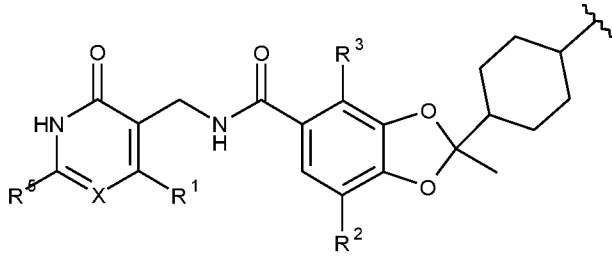




5

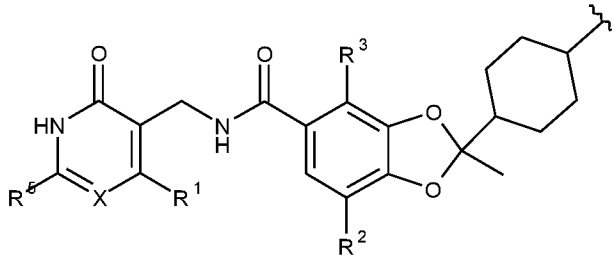
або її фармацевтично прийнятна сіль.

3. Сполука за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що група



і NR^aR^b мають транс-орієнтацію щодо циклогексилу.

4. Сполука за п. 1 або 2, яка **відрізняється** тим, що група

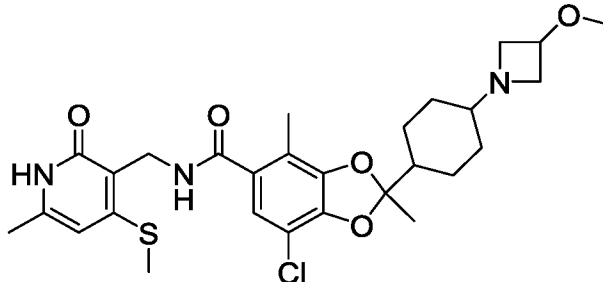


5 і NR^aR^b мають цис-орієнтацію щодо циклогексилу.

5. Сполука за будь-яким з пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що стереохімічна конфігурація хірального центра 1,3-діоксоланілу є R.

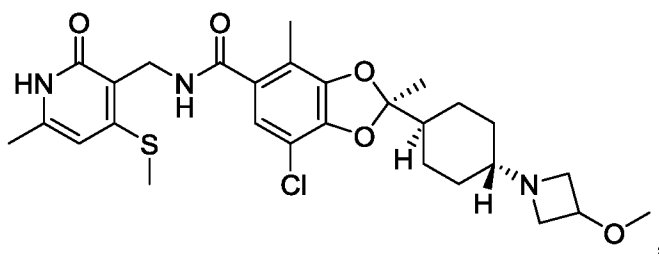
6. Сполука за будь-яким з пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що стереохімічна конфігурація хірального центра 1,3-діоксоланілу є S.

10 7. Сполука за п. 1, яка **відрізняється** тим, що сполука має Формулу:



або її фармацевтично прийнятна сіль.

8. Сполука за п. 7, яка **відрізняється** тим, що сполука має Формулу:



15

або її фармацевтично прийнятна сіль.

9. Фармацевтична композиція, що містить сполуку за будь-яким з пп. 1-8 або її фармацевтично прийнятну сіль і фармацевтично прийнятний носій.

20 10. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-8 або її фармацевтично прийнятної солі або композиції за п. 9 для лікування раку.

11. Застосування сполуки за п. 10, яке **відрізняється** тим, що рак вибирають з раку молочної залози, раку передміхурової залози, раку товстої кишки, нирковоклітинної карциноми, мультиформної гліобластоми, раку сечового міхура, меланоми, раку бронхів, лімфоми, холангіосаркоми, множинної мієломи, раку легень, раку яєчників і раку печінки.

25