

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490643 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.04.19

(22) Дата подачи заявки  
2022.08.29

(51) Int. Cl. C07D 409/14 (2006.01)  
C07C 309/04 (2006.01)  
A61P 7/02 (2006.01)  
A61K 31/4178 (2006.01)

---

(54) ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ S-АЛАНИНАТА

---

(31) 21194781.7

(32) 2021.09.03

(33) EP

(86) PCT/EP2022/073889

(87) WO 2023/031083 2023.03.09

(71) Заявитель:  
БАЙЕР АКЦИЕНГЕЗЕЛЬШАФТ  
(DE)

(72) Изобретатель:

Бек Хартмут (DE), Меш Штефани  
(CH), Вакалопулос Александрос,  
Пфафф Нильс, Циммерманн  
Штефани, Фольманн Маркус (DE),  
Керстен Элизабет (US), Левилейн  
Гийом, Партикель Катрин, Брель  
Андреас Петер, Хайтмейер Штефан,  
Дитце-Торрес Юлия, Леманн Лутц,  
Герике Керстен Маттиас, Зюссмейер  
Франк, Бэрфакер Ларс, Хиллиш  
Александр, Терстееген Адриан,  
Бухмюллер Аня, Гердес Кристоф  
(DE)

(74) Представитель:  
Квашнин В.П. (RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к замещенным производным S-аланината и способам их получения, а также к их применению для получения лекарственных средств для лечения и/или профилактики заболеваний, в частности сосудистых нарушений, предпочтительно тромботических или тромбоэмболических нарушений, и/или тромботических или тромбоэмболических осложнений.

---

A1

202490643

202490643

A1

## ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ S-АЛАНИНАТА

### Описание

Настоящее изобретение относится к замещенным производным S-аланината и способам их получения, а также к их применению для получения лекарственных средств для лечения и/или профилактики заболеваний, в частности сосудистых нарушений, предпочтительно тромботических или тромбозмболических нарушений, и/или тромботических или тромбозмболических осложнений.

Гемостаз является важнейшим механизмом защиты организмов от чрезмерных и потенциально опасных для жизни кровопотерь после травмы, который быстро и надежно закрывает утечки в стенке артериального или венозного сосуда сгустком, состоящим в основном из фибриновой сетки и тромбоцитов. Образование фибрина инициируется в месте повреждения, когда субэндотелиальный тканевый фактор подвергается воздействию крови после повреждения эндотелиальных клеток и запускает водопадный каскад сложных ферментативных реакций, в которых активированный фактор свертывания крови преобразует следующий зимоген в его активную форму протеазы. Традиционно ранние стадии каскада делятся на внешний путь (или тканевой фактор) и внутренний путь (или контактную активацию), в зависимости от того, может ли триггером быть тканевой фактор, связанный с различными типами

клеток, или фактор XII, активируемый отрицательно заряженными поверхностями. Оба пути сходятся на уровне активации фактора X, который является ключевым ферментом генерации тромбина. Наконец, посредством трансформации нескольких субстратов тромбин переводит генерируемые в каскаде сигналы в состояние свертывания крови: Тромбин расщепляет фибриноген, что приводит к образованию фибриновой сетки и активирует факторы от XIII до XIIIa, необходимые для стабилизации сгустка. Кроме того, тромбин является мощным триггером агрегации тромбоцитов (посредством активации PAR-1), что также вносит значительный вклад в образование сгустка. Посредством активации TAFI (тромбин-активируемый ингибитор фибринолиза) в TAFIa в комплексе с тромбомодулином, тромбин ингибирует растворение сгустка. В циклах положительной обратной связи активация факторов V, VIII и XI усиливает продуцирование тромбина и, таким образом, усиливает реакцию коагуляции. Напротив, активация протеина С комплексом тромбин/тромбомодулин приводит к деградации фактора VIIIa в комплексах теназы и фактора Va в комплексах протромбиназы - и тем самым снижает дальнейшее образование тромбина.

Факторы свертывания крови часто существуют в комплексах на поверхностях, например, фактор Xa связан в комплексе протромбиназы с фактором Va. Во время образования фибринового сгустка тромбин и протромбиназа интегрируются и связываются в фибриновую сетку. Данные молекулы ферментов остаются активными и труднодоступными для эндогенных антикоагулянтов, например антитромбина III.

Гемостаз зависит от сложного регуляторного механизма между образованием и растворением сгустка. Хотя перекрытие протекания сосудистой стенки является важной процедурой для предотвращения кровотечений, избыточное образование сгустков, вызванное нарушениями сосудистой стенки, например, атеросклеротическим поражением, продолжающимися воспалительными процессами в крови, например, при инфекциях, или снижением кровотока, может привести к непроходимости сосудов, что приводит к событиям, представляющим большую опасность для окружающих тканей, поскольку затрудняется снабжение питательными веществами и выведение потенциально вредных продуктов распада. Данные сгустки могут блокировать вены, артерии или лимфатические сосуды в месте образования или могут перемещаться по сосудам в виде эмболов, пока не застрянут. Многие из данных тромбов образуются в результате местных заболеваний сосудов, например: обрыв атеросклеротических бляшек или нарушение кровотока в глубоких венах. Это может привести к тяжелым последствиям, которые могут возникнуть в любом сосуде, включая инсульт, инфаркт миокарда или тромбоэмболию легочной артерии, которые являются одними из основных причин смерти. В других случаях воздействие тканевого фактора на клетки крови, например на моноциты в ходе инфекций, или воздействие отрицательно заряженных поверхностей или макромолекул на фактор XII, например после гибели клеток, может привести к общесистемному состоянию гиперкоагуляции, приводящему к микротромботическим расстройствам с возможным последующим повреждением органов. Данные состояния гиперкоагуляции могут быть вызваны, например, бактериальными,

вирусными или грибковыми инфекциями или травмой.

Кроме того, системная гиперкоагуляция может привести к истощающей коагулопатии на фоне диссеминированной внутрисосудистой коагулопатии (DIC). Кроме того, тромбозэмболические осложнения встречаются при микроангиопатических гемолитических анемиях, процедурах экстракорпорального кровообращения, таких как гемодиализ, в полостях сердца, при протезах сердечных клапанов и стентах, а также во время трансплантаций.

Антикоагулянты используются в профилактических целях для предотвращения образования тромбов и во время острых тромботических/эмболических событий для поддержки лизиса уже существующего фибрина плазмином. Поскольку данные соединения могут не только ингибировать образование тромбов, но и влиять на процессы гемостаза, может возникнуть удлинение времени кровотечения, что потенциально может ограничить возможности сильного антикоагулянтного действия. Поэтому предпочтительными являются соединения с широким терапевтическим окном.

В экстренных профилактических или интервенционных условиях желательно быстрое начало и достаточная контролируемость эффективности антикоагулянтов, чего можно достичь парентеральным введением соединений с короткой продолжительностью фармакологического действия. Поэтому антикоагулянтные соединения для перорального введения, к которым относятся главным образом

антагонисты витамина К и прямые пероральные антикоагулянты (DOAC), не являются предпочтительными в данном случае из-за их отсроченного фармакологического начала и длительного фармакологического действия, что ограничивает контролируемость лечения. Кроме того, для многих пациентов прием пероральных препаратов может оказаться затруднительным. Для того чтобы можно было применять такое антикоагулянтное соединение внутривенно, необходима достаточная растворимость. Поскольку пациентов неотложной помощи часто лечат более чем одним препаратом, предпочтительным является низкий потенциал экстренного межлекарственного взаимодействия.

Известные из уровня техники антикоагулянты, например, вещества для ингибирования или предотвращения свертывания крови, имеют различные недостатки. Соответственно, на практике эффективные способы лечения или профилактики тромботических/тромбоэмболических нарушений оказываются очень трудными и неудовлетворительными.

В экстренных ситуациях состояния гиперкоагуляции могут инициироваться внутренним или внешним путем. Следовательно, при таких показаниях полезно воздействовать на общий путь с помощью фактора Ха и тромбина. Хотя ингибирование фактора Ха само по себе не ингибирует ранее существовавший тромбин в уже сформированных сгустках, само по себе ингибирование тромбина, например, с гирудином, бивалирудином или аргатробаном может быть невыгодно с точки зрения терапевтического окна, потенциально, потому, что необходимы большие количества соединений, чтобы остановить водопадный каскад системы свертывания

крови только на последнем этапе. Следовательно, соединения, которые могут регулировать выработку тромбина посредством ингибирования фактора Ха, а также ингибировать уже существующий тромбин, могут представлять интерес для лечения состояний гиперкоагуляции, поскольку они возникают, например, при инфекционных заболеваниях, обусловленных, например, бактериями, вирусами и грибами. Кроме того, таких пациентов часто подключают к экстракорпоральным системам, при которых кровь подвергается воздействию прокоагулянтных поверхностей, и им может помочь антикоагулянтная терапия.

В терапии и профилактике острых тромбозмболических нарушений в первую очередь используют гепарин, который вводят внутривенно или подкожно. Из-за более благоприятных фармакокинетических и фармакодинамических свойств в настоящее время предпочтение все чаще отдается низкомолекулярному гепарину. Однако описанные ниже известные недостатки, встречающиеся при терапии гепарином, избежать таким образом невозможно. Существует высокий риск кровотечений, в частности кровоизлияний в мозг и желудочно-кишечных кровотечений, а лечение в течение нескольких дней повышает риск развития гепарин-индуцированной тромбоцитопении (НИТ). Гепарины ингибируют фактор Ха и тромбин косвенно, ускоряя связывание антитромбина-III (АТIII) с фактором Ха и тромбином, что приводит к дополнительному потреблению АТIII. Учитывая его защитную роль в отношении эндотелия, повышенное сокращение АТIII, вызванное гепарином, также является критическим во время истощающей коагулопатии. Кроме того, гепарины лишь незначительно способствуют ингибированию присутствующего в сгустке

тромбина и фактора Ха.

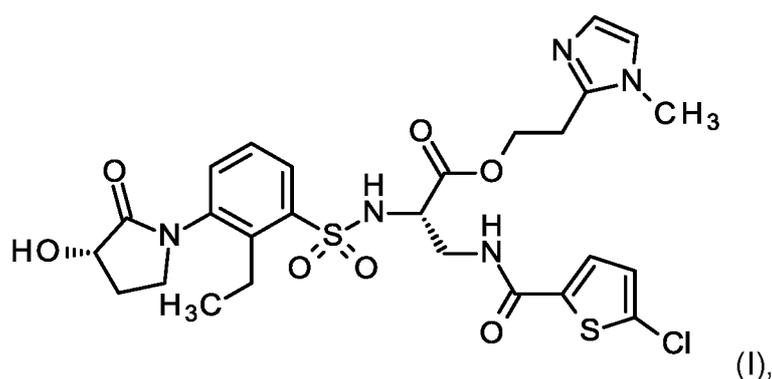
Недавно были описаны небольшие молекулы, которые сочетают ингибирование тромбина и фактора Ха в различных соотношениях в пределах одной молекулы. Данные подходы были протестированы *in vitro* и *in vivo* и продемонстрировали замечательный синергетический потенциал.

EP42675 сочетает в себе пептидомиметическую часть для прямого ингибирования тромбина и фондапаринукс-подобную часть, которая косвенно ингибирует фактор Ха. Однако данная молекула зависит от присутствия АТIII. Таногитран представляет собой еще одно низкомолекулярное соединение, которое ингибирует как тромбин, так и фактор Ха *in vitro*, но с более высокой эффективностью в отношении тромбина. В значительной степени таногитран выводится через почки в неметаболизированном виде, поэтому у пациентов с почечной недостаточностью потребуется коррекция дозы и тщательный мониторинг.

Поэтому задача настоящего изобретения состоит в получении новых соединений для лечения сердечнососудистых нарушений, в частности тромботических или тромбозмболических нарушений и/или тромботических или тромбозмболических осложнений у людей и животных, причем соединения имеют широкое терапевтическое окно, хорошую растворимость и короткую продолжительность фармакологического действия для достижения приемлемой контролируемости.

Международные заявки WO2009/103440, WO2014/174102 и J. Meneurol и др., J. Med.Chem. Chem. 2013, 56, 9441-945 описывают, среди прочего, замещенные хлортиофенамиды в качестве ингибиторов фактора Ха и тромбина. J.-M. Altenburger, и др., Bioorg. Med. Chem. 2004, 12, 1713-1730 описывает, среди прочего, замещенные сульфонамиды в качестве ингибиторов тромбина.

Настоящее изобретение предоставляет 2-(1-метил-1*H*-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-*N*-{2-этил-3-[(3*S*)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-*S*-аланинат формулы (I)



и его соли, его сольваты и сольваты его солей.

Соединения согласно настоящему изобретению могут, в зависимости от их структуры, существовать в различных стереоизомерных формах, т.е. в форме конфигурационных изомеров или же, при необходимости, конформационных изомеров (энантимеров и/или диастереомеров, в том числе в случае ротамеров и атропоизомеров). Таким образом, настоящее изобретение охватывает энантимеры и диастереомеры и их

соответствующие смеси. Стереизомерно однородные компоненты могут быть выделены из таких смесей энантиомеров и/или диастереомеров известным способом; для этого предпочтительно используют процессы хроматографии, особенно ВЭЖХ хроматографию на ахиральной или хиральной фазе.

Если соединения согласно изобретению могут существовать в таутомерных формах, настоящее изобретение охватывает все таутомерные формы.

Настоящее изобретение также охватывает все подходящие изотопные варианты соединений согласно настоящему изобретению. Под изотопным вариантом соединения согласно настоящему изобретению в контексте настоящего изобретения понимается соединение, в котором по меньшей мере один атом в составе соединения согласно настоящему изобретению заменен на другой атом с тем же атомным номером, но с атомной массой, отличной от атомной массы, которая обычно или преимущественно встречается в природе. Примерами изотопов, которые могут быть введены в соединение согласно настоящему изобретению, являются изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, хлора, брома и йода, такие как  $^2\text{H}$  (дейтерий),  $^3\text{H}$  (тритий),  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{129}\text{I}$  и  $^{131}\text{I}$ . Конкретные изотопные варианты соединения согласно настоящему изобретению, особенно те, в которые включены один или несколько радиоактивных изотопов, могут быть полезны, например, для изучения механизма действия или распределения активного ингредиента в организме; из-за

сравнительно легкой подготовки и обнаруживаемости для этой цели особенно подходят соединения, меченные изотопами  $^3\text{H}$  или  $^{14}\text{C}$ . Кроме того, включение изотопов, например дейтерия, может привести к особым терапевтическим преимуществам вследствие большей метаболической стабильности соединения, например, к увеличению периода полувыведения в организме или снижению необходимой активной дозы; такие модификации соединений согласно настоящему изобретению могут поэтому в некоторых случаях также представлять собой предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. Изотопные варианты соединений согласно настоящему изобретению могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники, например, способами, описанными далее, и способами, описанными в рабочих примерах, с использованием соответствующих изотопных модификаций соответствующих реагентов и/или исходных соединений.

Предпочтительными солями в контексте настоящего изобретения являются физиологически приемлемые соли соединений согласно настоящему изобретению. Однако настоящее изобретение охватывает также соли, которые сами по себе непригодны для фармацевтического применения, но которые можно использовать, например, для выделения или очистки соединений согласно настоящему изобретению.

Физиологически приемлемые соли соединений согласно настоящему изобретению включают кислотнo-аддитивные соли минеральных кислот, карбоновых кислот и сульфокислот, например, соли соляной кислоты,

бромистоводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, метансульфокислоты, этансульфокислоты, толуолсульфокислоты, бензолсульфокислоты, нафталиндисульфокислоты, уксусной кислоты, трифторуксусной кислоты, пропионовой кислоты, молочной кислоты, винной кислоты, яблочной кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, малеиновой кислоты и бензойной кислоты. Предпочтительные физиологически приемлемые соли соединений согласно изобретению включают кислотно-аддитивные соли соляной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, метансульфоновой кислоты, толуолсульфоновой кислоты, винной кислоты, яблочной кислоты и лимонной кислоты.

Физиологически приемлемые соли соединений согласно настоящему изобретению также включают соли обычных оснований, в качестве примера и предпочтительно соли щелочных металлов (например, соли натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, соли кальция и магния) и соли аммония, производных аммиака или органических аминов, содержащих от 1 до 16 атомов углерода, например и предпочтительно, этиламин, диэтиламин, триэтиламин, этилдиизопропиламин, моноэтаноламин, диэтаноламин, триэтаноламин, дициклогексиламин, диметиламиноэтанол, прокаин, дибензиламин, *N*-метилморфолин, аргинин, лизин, этилендиамин, *N*-метилпиперидин и холин.

Сольваты в контексте настоящего изобретения описываются как такие формы соединений согласно настоящему изобретению, которые образуют комплекс в твердом или жидком состоянии посредством координации с

молекулами растворителя. Гидраты представляют собой специфическую форму сольватов, в которых координация происходит с водой.

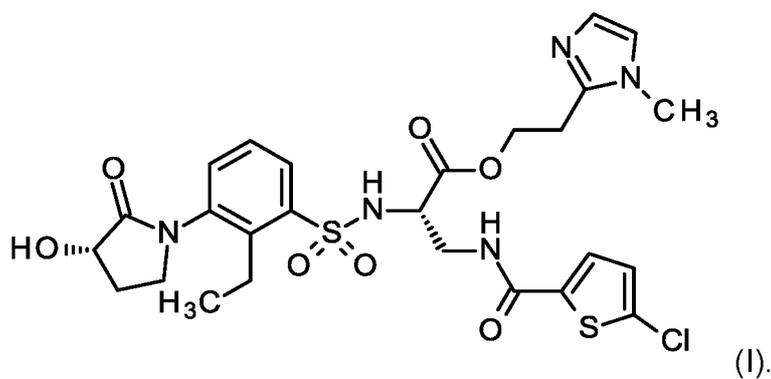
Настоящее изобретение дополнительно также охватывает пролекарства соединений согласно настоящему изобретению. Термин «пролекарства» охватывает соединения, которые со своей стороны могут быть биологически активными или неактивными, но превращаются во время своего пребывания в организме в соединения согласно настоящему изобретению (например, посредством метаболизма или гидролиза).

В контексте настоящего изобретения термин «лечение» или «лечить» включает ингибирование, замедление, сдерживание, облегчение, ослабление, ограничение, уменьшение, подавление, отсрочивание или излечение заболевания, состояния, нарушения, травмы или проблем со здоровьем или развитием, течение или прогрессирование таких состояний и/или симптомы таких состояний. Термин «терапия» понимается в настоящем документе как синоним термина «лечение».

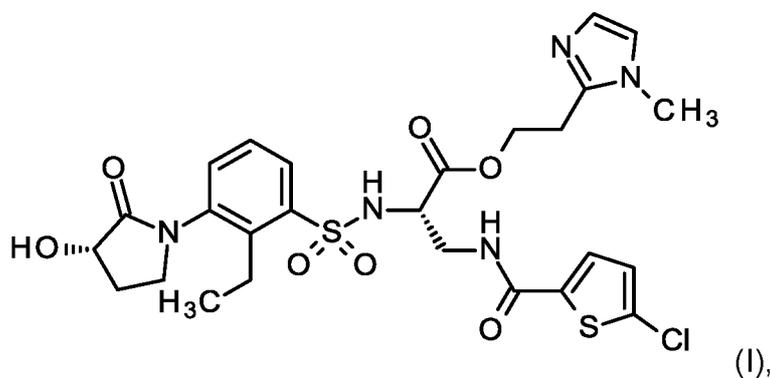
Термины «предупреждение», «профилактика» и «предотвращение» используются как синонимы в контексте настоящего изобретения и относятся к предотвращению или снижению риска заражения, возникновения, поражения или приобретения заболевания, состояния, нарушения, травмы или проблемы со здоровьем, или развитие или прогрессирование таких состояний и/или симптомов таких состояний.

Лечение или профилактика заболевания, состояния, нарушения, травмы или проблемы со здоровьем могут быть частичными или полными.

Предпочтение отдается соединению 2-(1-метил-1*H*-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-*N*-{2-этил-3-[(3*S*)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-*S*-аланинат формулы (I)



Предпочтение также отдается соединению 2-(1-метил-1*H*-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-*N*-{2-этил-3-[(3*S*)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-*S*-аланинат формулы (I)



и его физиологически приемлемым солям.

Предпочтение также отдается физиологически приемлемой соли соединения формулы (I), выбранное из группы состоящей из

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат гидрохлорида

и

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино}-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат сульфата

и

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино}-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат метансульфоната

и

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино}-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат 4-метилбензол-сульфоната

и

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино}-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат малеата

и

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино}-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат фосфата

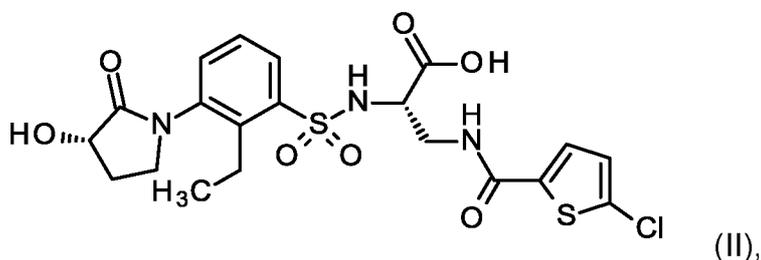
и

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[[(5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил)сульфонил)-S-аланинат (2R,3R)-тартрата

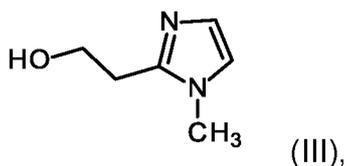
и

2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[[(5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил)сульфонил)-S-аланинат цитрата.

Настоящее изобретение также относится к способу получения соединения формулы (I), или его солей, его сольватов или сольватов его солей, причем соединение формулы



подвергают взаимодействию с соединением формулы



в присутствии дегидратирующего средства с получением соединения формулы (I),

и соединение формулы (I) при необходимости превращают с помощью соответствующих (i) растворителей и/или (ii) оснований или кислот в его сольваты, соли и/или сольваты солей.

Реакцию в основном проводят в инертных растворителях, при необходимости в присутствии основания, предпочтительно в диапазоне температур от -20°C до 80°C при атмосферном давлении.

Подходящими дегидратирующими реагентами согласно настоящему изобретению являются, например, карбодиимиды, например, N,N'-диэтил-, N,N'-дипропил-, N,N'-диизопропил- и N,N'-дициклогексилкарбодиимид, N-N'-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорид (EDCI), N-циклогексилкарбодиимид-N'-пропилоксиметил-полистирол (PS-карбодиимид) или карбонильные соединения, такие как карбонилдиимидазол, или 1,2-оксазолиновые соединения, такие как 2-этил-5-фенил-1,2-оксазолиния 3-сульфат или 2-трет-бутил-5-метил-изоксазолиния перхлорат, или ациламиносоединения, такие как 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин, или изобутил хлорформиат, или бис-(2-оксо-3-оксазолидинил)фосфорилхлорид или бензотриазолилокситри(диметиламино)фосфония гексафторфосфат, или O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU), 2-(2-оксо-1-(2H)-пиридинил)-1,1,3,3-тетраметилурония тетрафторборат (TPTU), (бензотриазол-1-илокси)бисдиметиламинометилия фторборат (TBTU) или O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (HATU), или 1-гидроксибензотриазол (HOBT), или бензотриазол-1-илокситрис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), или этил

циано(гидроксиимино)ацетат (Охута), или (1-циано-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси)диметиламино-морфолино-карбения гексафторфосфат (COMU), или N-[(диметиламино)(3H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)метилен]-N-метил-метан-аминия гексафторфосфат, или 2,4,6-трипропил-1,3,5,2,4,6-триоксатрифосфинан 2,4,6-триоксид (ТЗР), или их смеси с основаниями. Предпочтительной является конденсация с этил циано(гидроксиимино)ацетатом (Охута) и гидрохлоридом 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI).

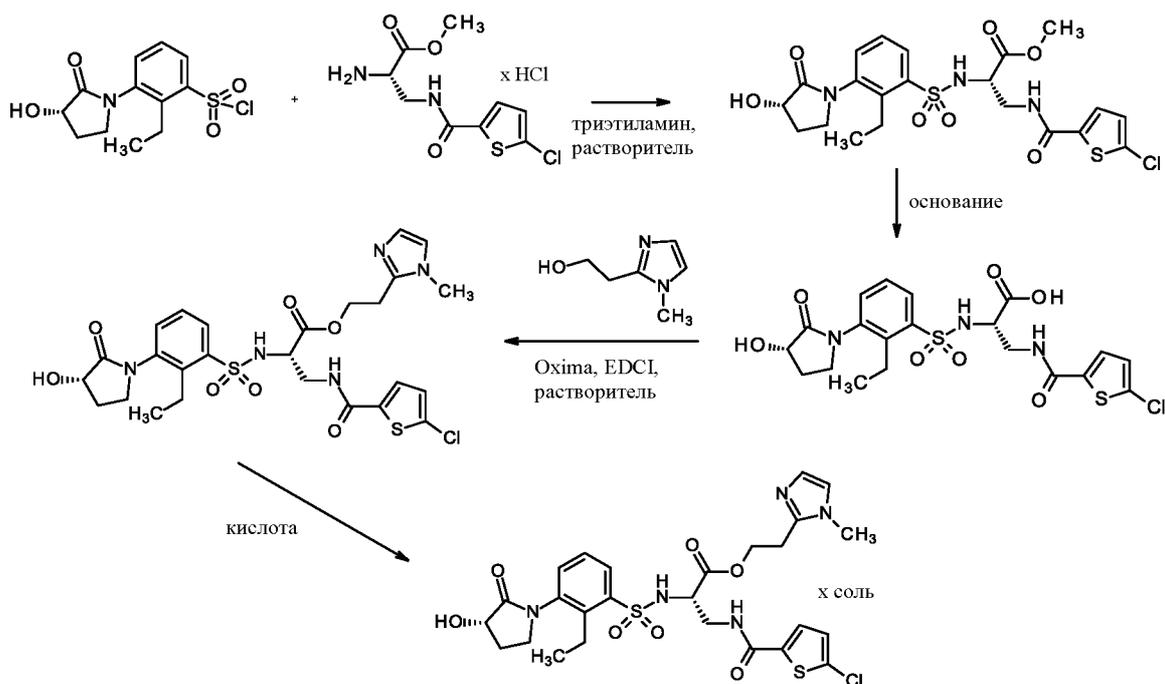
Основаниями являются, например, органические основания, такие как триалкиламины, например, триэтиламин, N-метилморфолин, N-метилпиперидин, 4-диметиламинопиридин, или диизопропилэтиламин, или пиридин. Предпочтение отдается конденсации без основания.

Инертными растворителями являются, например, галогенированные углеводороды, такие как дихлорметан или трихлорметан, углеводороды, такие как бензол или толуол, или другие растворители, такие как 1,4-диоксан, диэтиловый простой эфир, тетрагидрофуран, этилацетат, N,N-диметилформамид, диметилсульфоксид или ацетонитрил, или смеси растворителей. Предпочтение отдается смеси дихлорметана и N,N-диметилформамида.

Соединения формулы (II) и (III) известны или могут быть синтезированы из соответствующих исходных соединений известными способами или могут быть получены аналогично процессам, описанным в разделе А) Примеров.

Получение исходных соединений и соединений формулы (I) может быть проиллюстрировано посредством следующей схемы синтеза.

**Схема:**



Соединения согласно изобретению обладают непредвиденным спектром полезной фармакологической активности и хорошими фармакокинетическими свойствами. Они представляют собой соединения, которые ингибируют фактор Ха и тромбин. Поэтому они подходят для использования в качестве лекарственных средств для лечения и/или профилактики заболеваний людей и животных.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению соединений согласно настоящему изобретению для лечения и/или профилактики

заболеваний, в частности сосудистых заболеваний, предпочтительно тромботических или тромбоэмболических нарушений и/или тромботических или тромбоэмболических осложнений, таких как диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и/или воспалительные нарушения.

Фактор Ха (FХа) и фактор IIa (FIIa, т.е. тромбин) являются важнейшими ферментами, участвующими в свертывании крови. Тромбин напрямую активируется FХа в протромбиназном комплексе и, в свою очередь, превращает фибриноген в фибрин, один из основных компонентов сгустков крови.

В качестве части «общего» пути свертывания крови FХа и тромбин являются важными компонентами как внутренней, так и внешней инициации свертывания крови. При внешнем пути свертывание крови запускается с помощью тканевого фактора (TF), который экспрессируется в сосудистой адвентициальной оболочке и подвергается воздействию крови в результате повреждения сосудов. Тканевой фактор также может секретироваться моноцитами или активированными эндотелиальными клетками под воздействием определенных триггеров (например, бактериальных эндотоксинов). Во внутреннем пути система свертывания крови может быть активирована, в частности, на отрицательно заряженных поверхностях, которые включают не только поверхностные структуры чужеродных клеток (например, бактерии), но также искусственные поверхности, такие как сосудистые протезы, стенты и экстракорпоральное кровообращение. На поверхности изначально фактор

XII (FXII) активируется в фактор XIIa (FXIIa), который впоследствии активирует фактор XI (FXI), прикрепленный к поверхностям клеток, в фактор XIa (FXIa). И внешний, и внутренний пути сходятся в общем пути, в котором FXa активирует протромбин в тромбин, что, в свою очередь, будет 1) способствовать дальнейшему распространению нижестоящего каскада свертывания крови, приводя к образованию фибрина и образованию сгустков, как описано выше, и 2) повторно инициировать каскад свертывания крови в цикле обратной связи посредством активации FXI в FXIa.

Соответственно, соединения согласно настоящему изобретению предназначены для использования при лечении и/или профилактике нарушений или осложнений, которые могут возникнуть в результате образования сгустков.

Для целей настоящего изобретения «тромботические или тромбоземболические нарушения» включают нарушения, которые возникают как в артериальной, так и в венозной сосудистой сети и которые можно лечить соединениями согласно изобретению, в частности, для лечения и профилактики диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (DIC), которое может возникнуть, в частности, в связи с сепсисом, а также вследствие хирургических вмешательств, опухолевых расстройств, ожогов или других травм, которые могут привести к тяжелому повреждению органов в результате микротромбозов. В ходе инфекции может происходить общая активация системы коагуляции (диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови или

коагулопатия потребления, в дальнейшем называемая «DIC») с микротромбозом в различных органах и вторичными геморрагическими осложнениями. Во время DIC происходит массивная активация системы коагуляции на поверхности поврежденных эндотелиальных клеток, на поверхностях инородных тел или сшитых внесосудистых тканей. Как следствие происходит коагуляция в мелких сосудах различных органов с гипоксией и последующей дисфункцией органов. Вторичным эффектом является расход факторов свертывания крови (например, фактор X, протромбин и фибриноген) и тромбоцитов, что снижает свертываемость крови и может привести к сильному кровотечению. Кроме того, может иметь место повреждение эндотелия с повышенной проницаемостью сосудов и диффузией жидкости и белков в экстравазальное пространство.

Соединения согласно изобретению также подходят для профилактики или лечения осложнений, которые могут возникнуть в контексте инфекционного заболевания и/или системного воспалительного синдрома (SIRS), таких как септическая органная дисфункция, септическая органная недостаточность и полиорганная недостаточность, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), острое повреждение легких (ALI), септический шок и/или септическая органная недостаточность.

Кроме того, тромбозмболические осложнения возникают при микроангиопатических гемолитических анемиях и при контакте крови с инородными поверхностями в контексте экстракорпорального кровообращения, такого как, например, гемодиализ, ECMO («экстракорпоральная мембранная оксигенация»), LVAD

(«вспомогательное устройство левого желудочка») и аналогичные методы, AV фистулами, протезами сосудов и клапанов сердца.

Кроме того, соединения согласно изобретению пригодны для лечения и профилактики нарушений в коронарных артериях сердца, таких как острый коронарный синдром (ACS), инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST (STEMI) и без подъема сегмента ST (не STEMI), стабильная стенокардия, нестабильная стенокардия, реокклюзия и рестеноз после коронарных вмешательств, такого как ангиопластика, имплантация стента или аортокоронарное шунтирование.

Соединения согласно изобретению также пригодны для предотвращения и лечения кардиогенных тромбоэмболий, например ишемии головного мозга, инсульта и системных тромбоэмболий и ишемий, у пациентов с острыми, прерывистыми или постоянными нарушениями сердечного ритма, например, мерцательной аритмии, и у пациентов, перенесших кардиостимуляцию электрошоком, а также у пациентов с нарушениями клапанов сердца или с искусственными клапанами сердца.

Соединения согласно изобретению также могут быть использованы для лечения и/или профилактики заболеваний цереброваскулярных артерий, таких как транзиторные ишемические атаки (TIA), ишемические инсульты, включая кардиоэмболические инсульты, такие как инсульты, вызванные фибрилляцией предсердий, не-кардиоэмболические инсульты, такие как лакунарный инсульт, инсульты вследствие заболеваний крупных или мелких артерий или инсульты неустановленной причины, криптогенные

инсульты, эмболические инсульты, эмболические инсульты неустановленного происхождения или события тромботического и/или тромбоемболического происхождения, приводящие к инсульту или ТИА.

Соединения согласно изобретению также могут быть использованы для лечения и/или профилактики нарушений периферических артерий, приводящих к заболеваниям периферических артерий, включая окклюзию периферических артерий, острую ишемию конечностей, ампутации, повторные окклюзии и рестенозы после таких вмешательств, как ангиопластика, стентирование, имплантация или хирургическое вмешательство и шунтирование и/или тромбоз стента.

Кроме того, соединения согласно изобретению также могут быть использованы для лечения и/или профилактики нарушений венозных сосудов, приводящих к венозным тромбозам, в частности, среди прочего, в глубоких венах ног, почечных венах, венах сетчатки и/или цереброваскулярном венозном синусе, и/или венозной тромбоемболии, потенциально приводящей к эмболии легочной артерии.

Стимуляция системы свертывания крови может происходить в результате разных причин или связанных нарушений. В контексте хирургических вмешательств, неподвижности, прикованности к постели, инфекций, воспаления или рака или терапии рака, среди прочего, система свертывания крови может быть сильно активирована, и могут быть тромботические осложнения, в частности венозные тромбозы. Таким образом, соединения согласно изобретению пригодны для профилактики

тромбозов при хирургических вмешательствах у пациентов, страдающих раком.

Соединения согласно настоящему изобретению также предназначены для первичной профилактики тромботических или тромбоэмболических нарушений и/или воспалительных нарушений и/или нарушений с повышенной проницаемостью сосудов у пациентов, у которых генные мутации приводят к повышенной активности ферментов или повышенным уровням зимогенов, и они установлены соответствующими тестами/измерениями активности фермента или концентраций зимогена.

Настоящее изобретение также предоставляет применение соединений согласно настоящему изобретению для лечения и/или профилактики заболеваний, в частности указанных выше заболеваний.

Настоящее изобретение также предоставляет применение соединений согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболеваний, в частности указанных выше заболеваний.

Настоящее изобретение также предоставляет способ лечения и/или профилактики заболеваний, особенно указанных выше заболеваний, с применением терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предоставляет соединения согласно

настоящему изобретению для применения в способе лечения и/или профилактики заболеваний, особенно указанных выше нарушений, с применением терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению.

В частности, настоящее изобретение предоставляет соединения согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения и/или профилактики тромботических или тромбоземболических нарушений, с применением терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет лекарственные средства, содержащие соединение согласно настоящему изобретению и одно или более дополнительных активных соединений.

Кроме того, соединения согласно настоящему изобретению, также могут применяться для предотвращения коагуляции *ex vivo*, например, для защиты трансплантатов органов от повреждений, вызванных образованием тромбов, и для защиты органа-реципиента от тромбоземболии из трансплантированного органа, для сохранения продуктов крови и плазмы, для очистки/предварительной обработки катетеров и других медицинских вспомогательных средств и инструментов, для покрытия синтетических поверхностей медицинских вспомогательных средств и инструментов, используемых *in vivo* или *ex vivo*, или для биологических образцов, которые могут содержать фактор Ха или тромбин.

Другим объектом настоящего изобретения являются лекарственные средства, содержащие соединение согласно изобретению и один или более других активных ингредиентов, особенно для лечения и/или профилактики ранее названных заболеваний. Предпочтительные примеры активных ингредиентов, подходящих для комбинаций, включают:

- гипополипдемические препараты, в особенности НМО-СоА-(3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А)-редуктаза-ингибиторы, как, например, ловастатин (мевакор), симвастатин (Зокор), правастатин (правахол), флювастатин (лескол) и атровастатин (липитор);
- коронарные терапевтические средства/вазодилататоры, в особенности ACE-(ангиотензин-конвертинг-энзимы)-ингибиторы, как, например, каптоприл, лизиноприл, эналаприл, рамиприл, килазаприл, беназеприл, фозиноприл, квинаприл и периндоприл, или АII-(ангиотензин II)-рецептор-антагонисты, как, например, эмбузартан, лозартан, валзартан, ирбезартан, кандезартан, эпрозартан и темизартан, или  $\beta$ -адреноцептор-антагонисты, как, например, карведилол, алпенолол, бисопролол, ацебутолол, атенолол, бетаксоллол, картеолол, метопролол, надолол, пенбутолол, пиндоллол, пропанолол и тимолол, или альфа-1-адренорецептор-антагонисты, как, например, працозин, бунацозин, доксацозин и терацозин, или диуретики, как, например, гидрохлортиазид, фуросемид, буметанид, пиретанид, торасемид, амилорид и дигидралацин, или блокатор кальциевого канала, как, например, верапамил и дилтиазем, или производные дигидропиридина, как, например, нифедипин (адалат) и

нитрендипин (байотензин), или нитропрепараты, как, например, изосорбид-5-мононитрат, изосорбид-динитрат и глицеринтринитрат, или вещества, которые воздействуют на повышение циклического гуанозинмонофосфата (сGMP), как, например, стимуляторы растворимой гуанилатциклазы, как, например, риоцигуат;

- плазминогенные активаторы (тромболитики/фибринолитики) и соединения, повышающие тромболиз/фибринолиз, такие как ингибиторы плазминогенных активаторов (PAI-ингибиторы) или ингибиторы тромбин-активирующих фибринолиз-ингибиторов (TAFI-ингибиторы), такие как, например, тканевый плазминоген-активатор (t-PA, например, Actilyse®), стрептокиназа, ретеплаза и урокиназа или плазминогенмодулирующие вещества, вызывающие повышенное образование плазмينا;
- антикоагуляционно действующие вещества (антикоагулянты), такие как, например, гепарин (UFH), низкомолекулярный гепарин (NMF), например, тинцапарин, цертопарин, парнапарин, надропарин, ардепарин, эноксапарин, ревипарин, далтепарин, данапароид, семулопарин (AVE 5026), адомипарин (M118) и EP-42675/ORG42675;
- прямые тромбин-ингибиторы (DTI), такие как, например, прадакса (дабигатран), атецегатран (AZD-0837), DP-4088, SSR-182289A, аргатробан, бивалирудин и таногитран (BIBT-986 и пролекарство BIBT-1011), гирудин;

- прямые ингибиторы фактора Ха, такие как, например, ривароксабан, апиксабан, эдоксабан (DU-176b), бетриксабан (PRT-54021), R-1663, дарексабан (YM-150), отамиксабан (FXV-673/RPR-130673), летаксабан (ТАК-442), разаксабан (DPC-906), DX-9065a, LY-517717, таногитран (BIBT-986, пролекарство: BIBT-1011), идрапаринукс и фондапаринукс,
- вещества, которые ингибируют агрегацию тромбоцитов (ингибиторы агрегации тромбоцитов, ингибиторы агрегации бляшек), такие как, например, ацетилсалициловая кислота (например, аспирин), антагонисты P2Y<sub>12</sub>, такие как, например, тиклопидин (Ticlid), клопидогрел (Плавикс), прасугрел, тикагрелор, кангрелор, элиногрель, антагонисты PAR-1, такие как, например, ворапаксар, антагонисты PAR-4, антагонисты EP<sub>3</sub>, такие как, например, DG041;
- вещества, подавляющие адгезию тромбоцитов, как GPVI- и/или GPIIb-антагонисты, такие как, например, ревацепт или каплацизумаб;
- антагонисты фибриногенных рецепторов (гликопротеин-IIb/IIIa-антагонисты), такие как, например, абциксимаб, эптифибатид, тирофибан, ламифибан, лефрадафибан и фрадафибан;
- рекомбинантный человеческий активированный белок C, например, Xigris или рекомбинантный тромбомодулин;
- а также антиаритмические препараты;

- кортикостероиды, такие как, например, гидрокортизон, флудрокортизон, анокортан, бетаметазон, дексаметазон, триамцинолон, флуоцинолон или флуоцинолонацетонид;
- ингибиторы циклооксигеназы, такие как, например, бромфенак и непафенак;
- ингибиторы системы каликреин-кинин, включая, без ограничения к этому сафотибант и экаллантид;
- ингибиторы сфингозин-1-фосфат-зависимых путей сигнальной трансдукции, такие как, например, сонепцизумаб;
- ингибиторы комплемента рецептора C5a, такие как, например, экулизумаб;
- ингибиторы 5HT<sub>1a</sub> рецептора, такие как, например, тандоспирон;
- ингибиторы фактора коагуляции XI и XIa, такие как, например, осоцимаб, абелацимаб, асундексан и милвексиан;
- сосудосуживающие агенты, такие как, например, адреналин, норадреналин и дофамин;
- антибиотики, такие как, например, пиперациллин, комбактам, эритромицин, метронидазол, ципрофлоксацин и ванкомицин;

- соединения для поддержания функции органов-мишеней во время лечения острого респираторного дистресс-синдрома или острого повреждения почек.

“Комбинации” в целях настоящего изобретения означают не только лекарственные формы, которые содержат все компоненты (так называемые фиксированные комбинации), и комбинированные упаковки, которые содержат компоненты, отделенные друг от друга, но также компоненты, которые вводят одновременно или последовательно, при условии, что они используются для профилактики и/или лечения одного и того же заболевания. Также возможно комбинировать два или более активных ингредиента друг с другом, что означает, что они, таким образом, находятся в двухкомпонентных или многокомпонентных комбинациях.

Соединения согласно настоящему изобретению могут иметь системную и/или местную активность. С этой целью их можно вводить подходящим образом, например, через пероральный, парентеральный, легочный, назальный, подъязычный, лингвальный, буккальный, ректальный, вагинальный, дермальный, трансдермальный, конъюнктивальный, ушной путь или в виде имплантата или стента.

Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить в формах введения, подходящих для данных путей введения.

Подходящими формами для перорального введения являются те, которые функционируют в соответствии с предшествующим уровнем техники, и

доставляют соединения согласно настоящему изобретению быстро и/или модифицированным образом и которые содержат соединения согласно настоящему изобретению в кристаллической, и/или аморфной, и/или в растворенной форме, например, таблетки (таблетки без покрытия или с покрытием, например, имеющие энтеросолюбильное покрытие или покрытия, которые нерастворимы или растворяются с задержкой, которые контролируют высвобождение соединения согласно изобретению), таблетки, которые быстро распадаются во рту, или пленки/вафли, пленки/лиофилизаты, капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы), таблетки, покрытые сахарной оболочкой, гранулы, пеллеты, порошки, эмульсии, суспензии, аэрозоли или растворы.

Парентеральное введение может быть осуществлено, с предотвращением стадии резорбции (например, внутривенным, внутриартериальным, внутрисердечным, интраспинальным или внутрипоясничным путем) или с включением резорбции (например, внутримышечным, подкожным, внутрикожным, чрескожным или внутрибрюшинным путем). Формы введения, подходящие для парентерального введения, включают препараты для инъекций и инфузий в виде растворов, суспензий, эмульсий, лиофилизатов или стерильных порошков.

Предпочтительным является парентеральное введение.

Подходящими формами введения для других путей введения являются, например, фармацевтические формы для ингаляции (включая порошковые ингаляторы, небулайзеры), назальные капли, растворы или

спреи; таблетки для лингвального, сублингвального или буккального введения, пленки/вафли или капсулы, суппозитории, ушные или глазные препараты, вагинальные капсулы, водные суспензии (лосьоны, смеси для встряхивания), липофильные суспензии, мази, кремы, чрескожные терапевтические системы (например, пластыри), молочко, пасты, пены, присыпки, имплантаты или стенты.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть преобразованы в указанные формы введения. Это может быть выполнено известным способом посредством смешивания с инертными, нетоксичными, фармацевтически подходящими вспомогательными веществами. Эти вспомогательные вещества включают носители (например, микрокристаллическую целлюлозу, лактозу, маннит), растворители (например, жидкие полиэтиленгликоли), эмульгаторы и диспергирующие или смачивающие агенты (например, додецилсульфат натрия, полиоксисорбитанолеат), связующие вещества (например, поливинилпирролидон), синтетические и природные полимеры (например, альбумин), стабилизаторы (например, антиоксиданты, например, аскорбиновая кислота), красители (например, неорганические пигменты, например, оксиды железа) и корректоры вкуса и/или запаха.

Настоящее изобретение дополнительно относится к лекарственным средствам, содержащим по меньшей мере одно соединение согласно настоящему изобретению, предпочтительно вместе с одним или несколькими инертными, нетоксичными, фармацевтически подходящими

вспомогательными веществами, и их применению для вышеупомянутых целей.

В случае парентерального введения обычно оказывается выгодным вводить количества примерно от 100 мг до 15 г каждые 24 часа для достижения эффективных результатов, предпочтительным является вводить количества примерно от 500 мг до 7,5 г каждые 24 часа, и очень предпочтительным является вводить количества примерно от 1 г до 3,5 г каждые 24 часа.

Несмотря на это, при необходимости может возникнуть потребность отклониться от указанных количеств, в частности, в зависимости от массы тела, пути введения, индивидуального поведения по отношению к активному ингредиенту, типа лекарственной формы и времени или интервала введения.

Если не указано иное, проценты в исследованиях и примерах, которые следуют ниже, являются массовыми процентами; части являются массовыми частями. Соотношения растворителей, коэффициенты разбавления и данные о концентрации для жидкостей / жидких растворов основаны в каждом случае на объеме. «Масс./об.» означает «масса/объем». Например, «10 % масс./об.» означает, что 100 мл раствора или суспензии содержит 10 г вещества.

А) Примеры

**Сокращения**

<b>Аббревиатура</b>	<b>Значение</b>
Вос	трет-бутилоксикарбонил
уш.	уширенный (сигнал в ЯМР)
СІ	химическая ионизация
д	дуплет (в ЯМР)
д	день (дни)
DCM	дихлорметан
дд	дуплет дуплетов (в ЯМР)
DIPEA	диизопропилэтиламин
DMAP	4-(диметиламино)пиридин
DMEDA	N,N'-диметилэтан-1,2-диамин
DMF	N,N-диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
EDCI	1-этил-3'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид
ESI	электрораспылительная (ES) ионизация
ч	час (часы)
H	протон
HBTU	(2-(1 <i>H</i> -бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония-гексафторфосфат
HCl	соляная кислота
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ИХ	ионная хроматография
ИК	инфракрасная спектроскопия
ЖХ-МС	жидкостная хроматография масс-спектрометрия
м	мультиплет (в ЯМР)
М	молярный
Мин	минута (минуты)
<b>Аббревиатура</b>	<b>Значение</b>
NCS	N-хлорсукцинимид
МС	масс-спектрометрия
ЯМР	спектрометрия ядерного магнитного резонанса
Охута	этил цианогидроксииминоацетат
RP	обращенная фаза (в ВЭЖХ)

rt	комнатная температура
R <sub>t</sub>	время удерживания (в ВЭЖХ, ЖХ/МС)
c	синглет (в ЯМР)
т	триплет (в ЯМР)
TBTU	(2-(1 <i>H</i> -бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламмония тетрафторборат
трет	четвертичный
TFA	трифтор уксусная кислота
ТГФ	тетрагидрофуран
УФ	Ультрафиолетовая спектроскопия
% масс.	процентное содержание по массе
XRPD	рентгеновская порошковая дифрактометрия

### **Методы ВЭЖХ и ЖХ/МС**

**Метод 1 (препаративная ВЭЖХ):** Колонка: Chromatorex C18, 10 мкм, 205 × 50 мм; элюент А: вода, элюент В: ацетонитрил; впрыск на 3 мин; градиент: 0,0 мин 10% В → 6,0 мин 10% В → 27 мин 95% В → 38 мин 95% В → 39 мин 10% В → 40,2 мин 10% В; скорость потока: 150 мл/мин; УФ обнаружение: 210 нм.

**Метод 2 (препаративная ВЭЖХ):** Колонка: RP18, элюент: градиент ацетонитрил/вода с добавлением 0,1% TFA к водной фазе.

**Метод 3 (препаративная ВЭЖХ):** Колонка: Chromatorex C18, 10 мкм, 205 × 50 мм; элюент А: вода, элюент В: ацетонитрил; впрыск на 3 мин; градиент: 0,0 мин 10% В → 5,5 мин 10% В → 17,65 мин 95% В → 19,48 мин 95% В → 19,66 мин 10% В → 20,51 мин 10% В; скорость потока: 150 мл/мин; УФ обнаружение: 210 нм.

Метод 4 (препаративная ВЭЖХ): Chromatorex C18, 10 мкм, 205 × 50 мм  
30% ацетонитрил / 70% вода (+0,1% TFA) → градиент через 38 мин → 95%  
ацетонитрил / 5% вода (+0,1% TFA).

Метод 5 (препаративная ВЭЖХ): Chromatorex C18, 10 мкм, 125 × 30 мм;  
элюент А: вода +0,1% TFA, элюент В: ацетонитрил; впрыск на 3 мин;  
градиент: 0,0 мин 10% В → 6,0 мин 10% В → 27 мин 95% В → 38 мин 95%  
В → 39 мин 10% В → 40,2 мин 10% В; скорость потока: 75 мл/мин; УФ  
обнаружение: 210 нм.

Метод 6 (препаративная ВЭЖХ): Chromatorex C18, 10 мкм, 125 × 30 мм;  
элюент А: вода + 0,01% HCl, элюент В: ацетонитрил; впрыск на 3 мин;  
градиент: 0,0 мин 10% В → 6,0 мин 10% В → 27 мин 95% В → 38 мин 95%  
В → 39 мин 10% В → 40,2 мин 10% В; скорость потока: 75 мл/мин; УФ  
обнаружение: 210 нм.

Метод 7 (ЖХ-МС): Система МС: Thermo Scientific FT-MS; система УВЭЖХ+:  
Thermo Scientific UltiMate 3000; Колонка: Waters, HSST3, 2.1 x 75 мм, C18  
1,8 мкм; элюент А: 1 л воды + 0.01% муравьиной кислоты; элюент В: 1 л  
ацетонитрила + 0,01% муравьиной кислоты; градиент: 0,0 мин 10% В → 2,5  
мин 95% В → 3,5 мин 95% В; печь: 50°C; скорость потока: 0,90 мл/мин; УФ  
обнаружение: 210 нм/оптимальный путь интегрирования 210-300 нм.

Метод 8 (ЖХ-МС): Устройство: Waters ACQUITY SQD UPLC System;  
Колонка: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 мкм 50 x 1 мм; элюент А: 1 л  
воды + 0,25 мл 99%-ной муравьиной кислоты, элюент В: 1 л ацетонитрила  
+ 0,25 мл 99%-ной муравьиной кислоты; градиент: 0,0 мин 90% А → 1,2  
мин 5% А → 2,0 мин 5% А; печь: 50°C; скорость потока: 0,40 мл/мин; УФ  
обнаружение: 210 нм.

Метод 9 (ЖХ-МС): Устройство: Agilent MS Quad 6150; ВЭЖХ: Agilent 1290; Колонка: Waters Acquity UPLC HSS T3 1,8 мкм 50 x 2,1 мм; элюент А: 1 л воды + 0,25 мл 99%-ной муравьиной кислоты, элюент В: 1 л ацетонитрила + 0,25 мл 99%-ной муравьиной кислоты; градиент: 0,0 мин 90% А → 0,3 мин 90% А → 1,7 мин 5% А → 3,0 мин 5% А; печь: 50°C; скорость потока: 1,20 мл/мин; УФ обнаружение: 205-305 нм.

Метод 10 (хиральная ВЭЖХ): Колонка: Daicel Chiralpak IG, 5 мкм, 250 x 4,6 мм; элюент А: 50% изогексан, 50% этанол + 1% вода + 0,2% TFA; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 40°C:

Метод 11 (хиральная ВЭЖХ): Колонка: Daicel Chiralcel IG, 5 мкм, 250 x 4,6 мм; элюент А: 50% н-гептан, 50% этанол + 0,2% диэтиламин; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура: 60°C:

Когда соединения согласно настоящему изобретению очищают препаративной ВЭЖХ описанными выше методами, в которых элюенты содержат добавки, например, трифторуксусную кислоту, муравьиную кислоту или аммиак, соединения согласно настоящему изобретению могут быть получены в форме соли, например, в виде трифторацетатной, формиатной соли или соли аммония, если соединения согласно настоящему изобретению содержат достаточно основную или кислотную функциональность. Такую соль можно превратить в соответствующее свободное основание или кислоту различными способами, известными специалисту в данной области техники.

В случае промежуточных продуктов синтеза и рабочих примеров настоящего изобретения, описанных ниже, любое соединение, указанное в

форме соли соответствующего основания или кислоты, обычно представляет собой соль неизвестного точного стехиометрического состава, полученную посредством соответствующего получения и/или процесса очистки. Если не указано более подробно, дополнения к названиям и структурным формулам, такие как «гидрохлорид», «трифторацетат», «натриевая соль» или “x HCl”, “x CF<sub>3</sub>COOH”, “x Na<sup>+</sup>” поэтому не следует понимать в стехиометрическом смысле в случае таких солей, а имеется лишь описательный характер в отношении присутствующих в них солеобразующих компонентов.

Это применимо соответственно, если промежуточные продукты синтеза или демонстрационные примеры или их соли были получены в форме сольватов, например, гидратов, неизвестного стехиометрического состава (если они относятся к определенному типу) с помощью описанных процессов получения и/или очистки.

Микроволновая печь: Используемый микроволновый реактор представлял собой «однорежимный» прибор типа Biotage Initiator<sup>TM</sup> или Initiator Plus<sup>TM</sup>.

Количественная ионная хроматография (ИХ) Определение ионов с внешними стандартами; устройство: Thermo Scientific ICS 5000+; капиллярные ИХ колонки: IonPac AS11-HC и IonPac CS16; элюент: градиент элюента [H]<sup>+</sup> [OH]<sup>-</sup>; детектор: обнаружение проводимости.

Спектроскопия протонным ядерным магнитным резонансом (<sup>1</sup>H-ЯМР)

Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР записывали в дейтерированном растворителе (DMSO-

d6) на спектрометрах Bruker Avance, работающих при 400, 500 или 600 МГц, как указано. Химические сдвиги указаны в м.д. относительно тетраметилсилана (TMS) в качестве внутреннего стандарта. Описания закономерностей взаимодействия сигналов  $^1\text{H}$  ЯМР основаны на оптическом внешнем виде сигналов и не обязательно отражают физически правильную интерпретацию. В основном, информация о химическом сдвиге относится к центру сигнала. В случае мультиплетов приводятся интервалы. Сигналы, затененные или частично затененные растворителем или водой, были либо отнесены приблизительно, либо не указаны. Значительно уширенные сигналы, вызванные, например, быстрым вращением молекулярных фрагментов или обменом протонами, также были отнесены приблизительно (часто называемые уширенным мультиплетом или уширенным синглетом) или не указаны.

Рентгеновская порошковая дифрактометрия (XRPD): Рентгенограммы записывали при комнатной температуре с использованием дифрактометров X`Pert PRO (PANalytical) (излучение Cu K альфа 1, длина волны 1,5406 Å). Никакой подготовки проб не проводилось. Все отражения рентгеновских лучей указаны как значения  $^{\circ}2\Theta$  (тета) (максимумы пиков) с разрешением  $\pm 0,2^{\circ}$ .

Инфракрасная спектроскопия (ИК) ИК-спектры записывали при комнатной температуре с использованием ИК-Фурье-спектрофотометра с использованием устройства Tensor 37 от Bruker. Разрешение составляло 2  $\text{cm}^{-1}$ .

В спектрах ЯМР смесей стереоизомеров числа, отмеченные знаком «и», указывают на то, что стереоизомеры показывают отдельные сигналы для соответствующего атома водорода, т.е. «.... и ..... (2 x c, 1H)» означает, что один атом водорода представлен двумя синглетами, каждый синглет из одного или нескольких различных стереоизомеров.

**Пояснение к фигурам:**

Фигура 1: Инфракрасный спектр примера 1

Фигура 2: Инфракрасный спектр примера 2

Фигура 3: Инфракрасный спектр примера 3

Фигура 4: Инфракрасный спектр примера 4

Фигура 5: Инфракрасный спектр примера 5

Фигура 6: Инфракрасный спектр примера 6

Фигура 7: Инфракрасный спектр примера 7

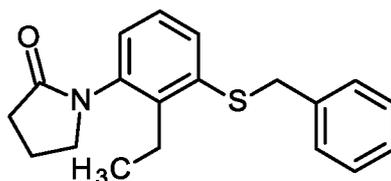
Фигура 8: Инфракрасный спектр примера 8

Фигура 9: Инфракрасный спектр примера 9

## Исходные соединения

### Промежуточное соединение 1

1-[3-(Бензилсульфанил)-2-этилфенил]пирролидин-2-он



К раствору 1-(бензилсульфанил)-3-бром-2-этилбензола (13,0 г, 42,3 ммоль; для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 9441-9456, соединение 40b) и пирролидин-2-она (14,5 мл, 190 ммоль) в диоксане (345 мл) и DMF (87 мл) в атмосфере аргона, добавили DMEDA (5,5 мл, 50,8 ммоль), йодид меди(I) (9,67 г, 50,8 ммоль) и карбонат калия (35,1 г, 254 ммоль) и через смесь барботировали аргон в течение еще 5 минут. Затем смесь перемешивали при 110°C в течение 16 ч в закрытом автоклаве без дополнительной регулировки давления. После охлаждения до комнатной температуры смесь фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в воде и этилацетате и фазы разделяли. Водную фазу трижды экстрагировали этилацетатом, после чего объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, циклогексан/этилацетат 1:1) с получением первой партии указанного в заголовке соединения (9,30 г, 65% от теории, чистота 92%). Вторую

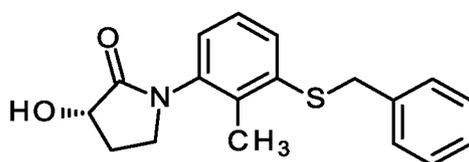
партию (280 мг, 2% от теории, чистота 99%) получали после дополнительной флэш-хроматографии (Biotage Isolera, 50 г силикагельный картридж SNAP Ultra, градиент циклогексан/этилацетат).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 2,03$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 312 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 7.41-7.36 (м, 3H), 7.34-7.29 (м, 2H), 7.28-7.19 (м, 2H), 7.02 (дд, 1H), 4.25 (с, 2H), 3.61 (т, 2H), 2.59-2.50 (м, 2H, частично затенен), 2.40 (т, 2H), 2.16-2.05 (м, 2H), 1.01 (т, 3H)

### Промежуточное соединение 2

(3S)-1-[3-(Бензилсульфанил)-2-метилфенил]-3-гидроксипирролидин-2-он



В атмосфере аргона 1-(бензилсульфанил)-3-бром-2-метилбензол (4,50 г, 15,3 ммоль; получение см. в WO 2009/103440, стр. 81, промежуточное соединение 83) смешивали с (3S)-3-гидроксипирролидин-2-оном (3,10 г, 30,7 ммоль), йодидом меди(I) (4,09 г, 21,5 ммоль) и карбонатом калия (8,48 г, 61,4 ммоль), с последующим добавлением диоксана (120 мл) и DMF (31 мл). Затем добавляли DMEDA (2,3 мл, 21,5 ммоль) и смесь перемешивали в течение ночи при 110°C. После охлаждения до комнатной температуры смесь объединяли со смесями из двух тестовых реакций, которые были

получены в аналогичных условиях, исходя из 100 мг и 1,0 г 1-(бензилсульфанил)-3-бром-2-метилбензола соответственно.

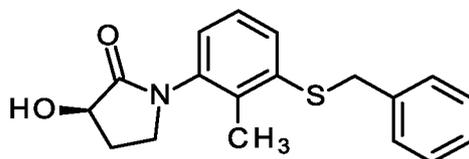
Объединенные смеси фильтровали через целит, промывали этилацетатом и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате и воде и снова фильтровали через целит. Фазы разделяли и водную фазу три раза экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией (Biotage Isolera, силикагельный картридж, градиент циклогексан/этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения (4,24 г, 65% от теории, чистота 92%). Выход основан на объединенных экспериментах.

ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 1,18$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 314 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 7.38 (д, 2H), 7.34-7.29 (м, 3H), 7.27-7.23 (м, 1H), 7.21 (т, 1H), 7.05 (д, 1H), 5.65 (д, 1H), 4.33-4.25 (м, 1H), 4.23 (с, 2H), 3.59-3.54 (м, 1H), 3.54-3.48 (м, 1H), 2.45-2.38 (м, 1H), 2.05 (с, 3H), 1.98-1.89 (м, 1H).

**Промежуточное соединение 3**

(3R)-1-[3-(Бензилсульфанил)-2-метилфенил]-3-гидроксипирролидин-2-он



В атмосфере аргона 1-(бензилсульфанил)-3-бром-2-метилбензол (3,00 г, 10,2 ммоль; получение см. в WO 2009/103440, стр. 81, промежуточное соединение 83) смешивали с (3R)-3-гидроксипирролидин-2-оном (1,86 г, 18,4 ммоль), йодидом меди(I) (2,73 г, 14,3 ммоль) и карбонатом калия (5,66 г, 40,9 ммоль), с последующим добавлением диоксана (82 мл) и DMF (21 мл). Затем добавляли DMEDA (1,5 мл, 14 ммоль) и смесь перемешивали в течение ночи при 110°C. После охлаждения до комнатной температуры смесь объединяли со смесью из тестовой реакции, которая была получена в аналогичных условиях, исходя из 42 мг 1-(бензилсульфанил)-3-бром-2-метилбензола. Объединенные смеси фильтровали через целит, промывали этилацетатом и растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате и воде и снова фильтровали через целит. Фазы разделяли и водную фазу три раза экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией (Biotage Isolera, силикагельный картридж, градиент циклогексан/этилацетат) с

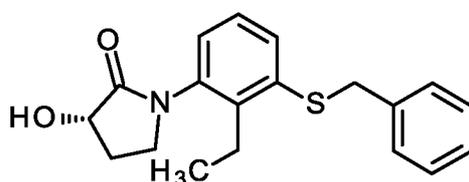
получением указанного в заголовке соединения (2,27 г, 54% от теории, чистота 79%). Выход основан на объединенных экспериментах.

ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 1,18$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 314 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 7.42 (д, 2H), 7.38-7.33 (м, 3H), 7.31-7.27 (м, 1H), 7.25 (т, 1H), 7.08 (д, 1H), 5.69 (д, 1H), 4.34-4.30 (м, 1H), 4.27 (с, 2H), 3.63-3.57 (м, 1H), 3.57-3.57 (м, 1H), 2.49-2.42 (м, 1H), 2.09 (с, 3H), 2.02-1.94 (м, 1H).

#### Промежуточное соединение 4

(3S)-1-[3-(Бензилсульфанил)-2-этилфенил]-3-гидрокси-2-пирролидин-2-он



К смеси 1-(бензилсульфанил)-3-бром-2-этилбензола (4,05 г, 13,19 ммоль; для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 9441-9456, соединение 40b) и 3S-3-гидрокси-2-пирролидинона (4,0 г, 39,56 ммоль) в диоксане (105 мл) и DMF (27 мл) в атмосфере аргона, добавили DMEDA (1,14 мл, 10,55 ммоль), йодид меди(I) (2,01 г, 10,55 ммоль) и карбонат калия (7,29 г, 52,75 ммоль). Смесь поровну распределили по 8 микроволновым сосудам и закрыли крышками. 2 из данных сосудов нагревали в микроволновой печи в течение 16 часов при 110°C, а

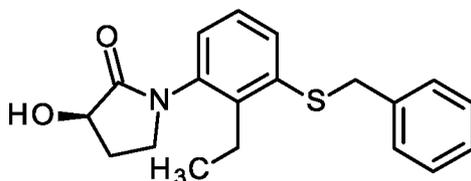
остальные 6 сосудов перемешивали в течение 16 часов при 110°C в нагревательном блоке. После охлаждения до комнатной температуры объединенные смеси фильтровали и удаляли растворитель. Остаток обрабатывали этилацетатом и водой и после разделения фаз водную фазу трижды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы один раз промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток адсорбировали на Isolute и очищали флэш-хроматографией (Biotage Isolera, 100 г силикагеля SNAP-Ultra, градиент циклогексан-этилацетат). Объединенные фракции продукта концентрировали и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (2,17 г, 49% теории, чистота 98%).

ЖХ-МС (Метод 8):  $R_t = 0,92$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 328 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 7.41-7.36 (м, 3H), 7.34-7.29 (м, 2H), 7.28-7.20 (м, 2H), 7.01 (дд, 1H), 5.69 (д, 1H), 4.30-4.24 (м, 3H), 3.58-3.52 (м, 1H), 3.50-3.42 (м, 1H), 2.60-2.47 (м, 2H, частично затенен), 2.45-2.36 (м, 1H), 1.98-1.87 (м, 1H), 1.01 (т, 3H).

**Промежуточное соединение 5**

(3R)-1-[3-(Бензилсульфанил)-2-этилфенил]-3-гидроксипирролидин-2-он



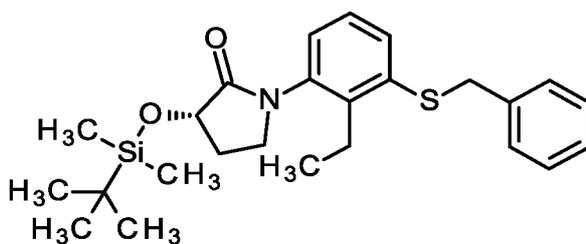
К 1-(бензилсульфанил)-3-бром-2-этилбензолу (844 мг, 2,75 ммоль; для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 9441-9456, соединение 40b) в атмосфере аргона добавили 3R-3-гидрокси-2-пирролидинон (500 мг, 4,95 ммоль), йодид меди(I) (733 мг, 3,85 ммоль), карбонат калия (1,52 г, 11,0 ммоль), диоксан (22 мл), DMF (5,6 мл) и DMEDA (0,41 мл, 3,85 ммоль). Смесь перемешивали в течение ночи при 110°C. После охлаждения до комнатной температуры смеси фильтровали через целит и удаляли растворитель. Остаток обрабатывали этилацетатом и водой, снова фильтровали через целит и после разделения фаз водную фазу трижды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы один раз промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент циклогексан-этилацетат). Объединенные фракции продукта концентрировали и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (548 мг, 60% теории, чистота 99%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,78$  мин; MS (ESIpos):  $m/z = 328 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 7.41-7.36 (м, 3H), 7.34-7.29 (м, 2H), 7.28-7.20 (м, 2H), 7.01 (д, 1H), 5.66 (д, 1H), 4.30-4.24 (м, 3H), 3.58-3.52 (м, 1H), 3.50-3.42 (м, 1H), 2.60-2.47 (м, 2H, частично затенен), 2.45-2.36 (м, 1H), 1.98-1.87 (м, 1H), 1.01 (т, 3H).

### Промежуточное соединение 6

(3S)-1-[3-(Бензилсульфанил)-2-этилфенил]-3-[[трет-бутил(диметил)силил]окси]пирролидин-2-он



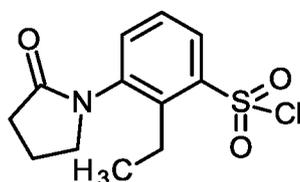
К раствору (3S)-1-[3-(бензилсульфанил)-2-этилфенил]-3-гидрокси-пирролидин-2-она (2,17 г, 6,64 ммоль, промежуточное соединение 4) в дихлорметане (19 мл) и DMF(4,8 мл) добавляли трет-бутилдиметилсилилхлорид (3,0 г, 19,93 ммоль), DIPEA (2,9 мл, 16,61 ммоль) и DMAP (16 мг, 0,13 ммоль) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Смесь концентрировали, остаток растворяли в ацетонитриле и воде и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 1). Объединенные фракции продукта высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (2,0 г, 68% от теории, 100% чистота).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 2,84$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 442$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 7.41-7.36 (м, 3H), 7.34-7.29 (м, 2H), 7.28-7.20 (м, 2H), 7.02 (д, 1H), 4.48 (т, 1H), 4.26 (с, 2H), 3.62-3.53 (м, 1H), 3.53-3.45 (м, 1H), 2.59-2.40 (м, 3H, частично затенен), 2.03-1.90 (м, 1H), 1.01 (т, 3H), 0.9 (с, 9H), 0.13 (с, 3H), 0.12 (с, 3H).

### **Промежуточное соединение 7**

2-Этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил хлорид

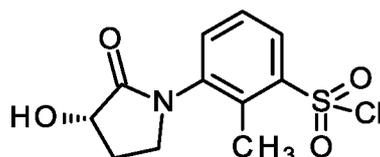


К раствору 1-[3-(бензилсульфанил)-2-этилфенил]пирролидин-2-она (9,30 г, 29,86 ммоль, без поправок на чистоту, Промежуточное соединение 1) в уксусной кислоте (550 мл) добавляли сульфурилхлорид (9,60 мл, 119,4 ммоль) и смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Добавляли воду и смесь трижды экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические фазы три раза промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток растворяли в циклогексане и очищали флэш-хроматографией (Biotage Isolera One, 100 г силикагелевый картридж SNAP Ultra, градиент циклогексан/этилацетат) с получением указанного в заголовке соединения (5,15 г, 55% от теоретического, чистота 91%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,66$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 288$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

**Промежуточное соединение 8**

3-[(3S)-3-Гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил  
хлорид

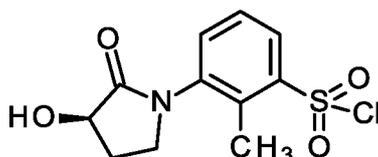


К раствору (3S)-1-[3-(бензилсульфанил)-2-метилфенил]-3-гидроксипирролидин-2-она (4,24 г, чистота 92%, 12,45 ммоль, промежуточное соединение 2) в дихлорметане (73 мл) и уксусной кислоте (290 мл) добавляли NCS (6,65 г, 49,8 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли воду и смесь трижды экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические фазы три раза промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток растворяли в дихлорметане и трижды промывали насыщенным раствором хлорида натрия. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и концентрировали, а остаток сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (3,94 г, 80% от теории, чистота 73%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,26$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 290$  [M+H]<sup>+</sup>

**Промежуточное соединение 9**

3-[(3R)-3-Гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил  
хлорид



К раствору (3R)-1-[3-(бензилсульфанил)-2-метилфенил]-3-гидроксипирролидин-2-она (2,27 г, чистота 79%, 5,72 ммоль, промежуточное соединение 3) в дихлорметане (34 мл) и уксусной кислоте (135 мл) добавляли NCS (3,06 г, 22,9 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Добавляли воду и смесь трижды экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток растворяли дихлорметаном и трижды промывали насыщенным раствором хлорида натрия с последующей повторной экстракцией объединенных водных фаз дихлорметаном. Объединенные органические фазы сушили над сульфатом натрия и концентрировали, а остаток сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (1,90 г, 62% от теории, чистота 54%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,26$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 290 [M+H]^+$

**Промежуточное соединение 10**

2-Этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил  
хлорид

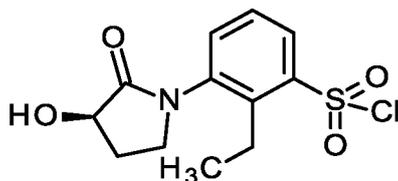


К раствору (3S)-1-[3-(бензилсульфанил)-2-этилфенил]-3-[[трет-бутил(диметил)силил]окси]пирролидин-2-она (2,0 г, 4,53 ммоль, промежуточное соединение 6) в уксусной кислоте (120 мл) добавляли сульфурилхлорид (1,50 мл, 18,1 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь разбавляли водой и пять раз экстрагировали дихлорметаном, после чего водную фазу насыщали хлоридом натрия и снова экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические фазы сушили над сульфатом натрия и концентрировали в роторном испарителе при температуре бани 25°C. Остаток очищали двумя порциями посредством флэш-хроматографии (Biotage Isolera, 100 г силикагеля SNAP-Ultra, градиент циклогексан-этилацетат). Объединенные фракции продукта концентрировали в роторном испарителе при температуре бани 25°C с получением указанного в заголовке соединения (1,11 г, 72% от теории, чистота 90% согласно ЖХ-МС).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,39$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 304 [M+H]^+$

**Промежуточное соединение 11**

2-Этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил  
хлорид



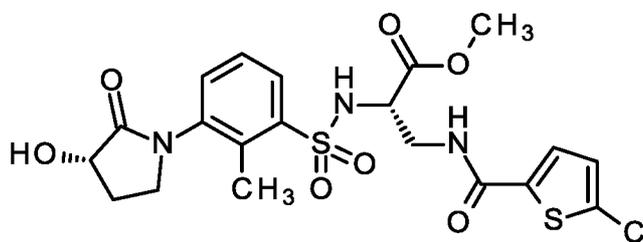
К раствору (3R)-1-[3-(бензилсульфанил)-2-этилфенил]-3-гидрокси-2-оксопирролидин-2-она (545 мг, 1,65 ммоль, промежуточное соединение 5) в дихлорметане (10 мл) и уксусной кислоте (39 мл) добавляли NCS (880 мг, 6,59 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем смесь разбавляли водой и трижды экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические фазы три раза промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в роторном испарителе при температуре бани 25°C. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии (Biotage Isolera, силикагель SNAP-Ultra, градиент циклогексан-этилацетат). Объединенные фракции продукта концентрировали в роторном испарителе при температуре бани 25°C с получением указанного в заголовке соединения (450 мг, 84% от теории, чистота 93%, согласно ЯМР, содержит некоторое количество растворителя).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,39$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 304 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 7.80 (дд, 1H), 7.21-7.16 (м, 1H), 7.13 (дд, 1H), 4.27 (т, 1H), 3.63-3.57 (м, 1H), 3.55-3.46 (м, 1H), 3.02-2.87 (м, 2H), 2.46-2.38 (м, 1H), 1.97-1.89 (м, 1H), 1.05 (т, 3H).

### Промежуточное соединение 12

Метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланинат



К раствору 3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил хлорида (3,69 г, 7,39 ммоль, чистота 58%, промежуточное соединение 8) в дихлорметане (91 мл) добавляли триэтиламин (4,1 мл, 29,55 ммоль) и метил-3-[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино}-S-аланинат (2,04 г, 7,76 ммоль; для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441-9456, соединение 49), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 часов. Смесь объединяли со смесью реакции меньшего количества, полученной в аналогичных условиях, исходя из 250 мг (чистота 94%) 3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонилхлорида.

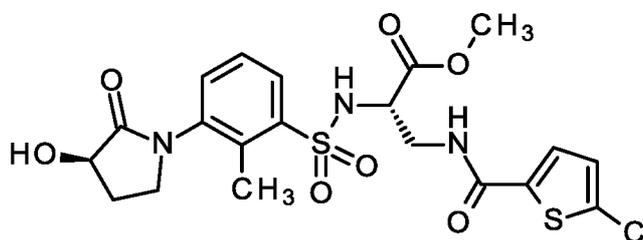
Объединенные смеси разбавляли дихлорметаном и дважды промывали водой с последующей повторной экстракцией объединенных водных фаз

дихлорметаном. Затем органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, DCM/метанол 20:1) с получением указанного в заголовке соединения (2,25 г, 46% от теории, чистота 87%). Выход основан на объединенных экспериментах.

ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 0,99$  мин; МС (ESI<sup>neg</sup>):  $m/z = 514$  [M-H]<sup>-</sup>

### Промежуточное соединение 13

Метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланинат



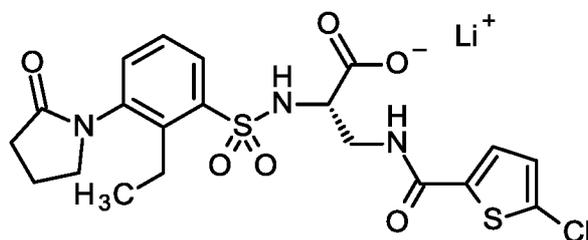
К раствору 3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил хлорида (1,90 г, 3,54 ммоль, чистота 54%, промежуточное соединение 9) в дихлорметане (44 мл) добавляли триэтиламин (2,0 мл, 14,2 ммоль) и метил-3-[[5-хлор-2-тиенил]карбонил]амино}-S-аланинат (0,98 г, 3,72 ммоль; для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441-9456, соединение 49), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 часов. Смесь разбавляли дихлорметаном и дважды промывали водой с последующей повторной

экстракцией объединенных водных фаз дихлорметаном. Затем органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент DCM/метанол) с получением указанного в заголовке соединения (882 мг, 46% от теории, чистота 96%).

ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 0,99$  мин; МС (ESI<sub>neg</sub>):  $m/z = 514$  [M-H]<sup>-</sup>

### Промежуточное соединение 14

(2S)-3-[[[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино]-2-({[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил}амино)пропаноат лития



К раствору метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланината (2,0 г, 3,89 ммоль, сравнительное соединение 5) в ТГФ (30 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (816 мг, 19,45 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Затем смесь концентрировали, остаток растворяли в смеси вода/метанол/ацетонитрил и очищали посредством препаративной ВЭЖХ (метод 3). Объединенные фракции

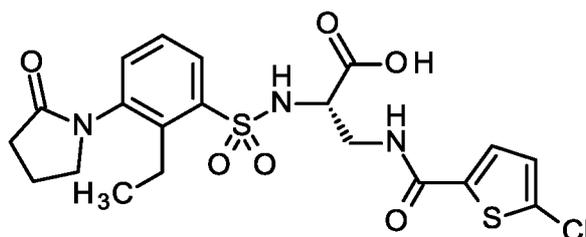
продукта концентрировали и остаток сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (1,56 г, 80% от теории, чистота 100%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,38$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 500$   $[M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 8.65 (уш. с, 1H), 7.91 (д, 1H), 7.47 (д, 1H), 7.43 (д, 1H), 7.36 (т, 1H), 7.15 (д, 1H), 3.65 (уш. с, 2H), 3.57-3.48 (м, 1H), 3.38-3.27 (затенен, 2H), 2.98-2.88 (м, 1H), 2.88-2.80 (м, 1H), 2.42 (т, 2H), 2.17-2.08 (м, 2H), 1.08 (т, 3H).

### Промежуточное соединение 15

3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланин



К раствору метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланината (515 мг, 1,00 ммоль, сравнительное соединение 5) в ТГФ (5 мл) добавляли 1М раствор гидроксида лития (5,0 мл, 5,0 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем смесь разбавляли водой и промывали диэтиловым эфиром. Затем водную фазу обрабатывали 1 М

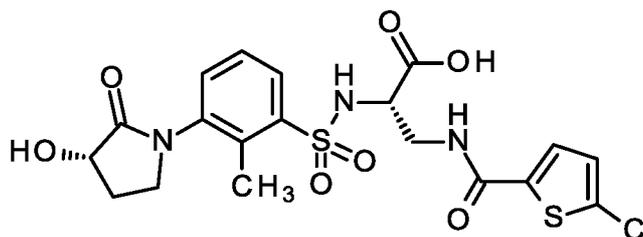
соляной кислотой (6 мл) и трижды экстрагировали бутанолом. Объединенные бутанольные фазы концентрировали, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/вода и высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (482 мг, 90% от теории, чистота 94%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,38$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 500 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 12.84 (с, 1H), 8.68 (т, 1H), 8.44 (д, 1H), 7.85 (д, 1H), 7.55 (д, 1H), 7.41 (д, 1H), 7.32 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 4.00 (дд, 1H), 3.66-3.57 (уш. м, 2H), 3.57-3.50 (м, 1H), 3.43-3.36 (м, 1H), 2.93-2.80 (м, 2H), 2.42 (т, 2H), 2.16-2.09 (м, 2H), 1.08 (т, 3H).

### Промежуточное соединение 16

3-[(5-Хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланин



К раствору метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланината (2,25 г, чистота 87%, 3,79 ммоль, промежуточное соединение 12) в ТГФ (8,1 мл) добавляли водный раствор гидроксида лития (38 мл, 1,0

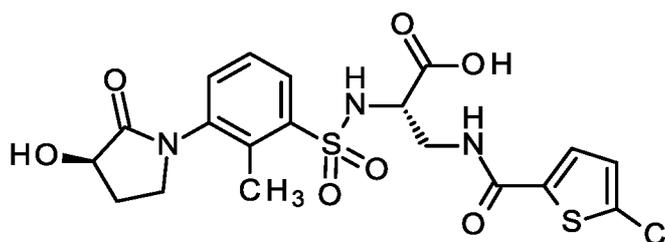
M, 38 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После выпаривания ТГФ водную смесь медленно подкисляли 2 М соляной кислотой до достижения значения pH 1. Полученную смесь дважды экстрагировали этилацетатом и объединенные органические фазы сушили над сульфатом натрия, концентрировали и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (1,96 г, 97% от теории, чистота 94%, содержащее некоторое количество растворителя по данным ЯМР).

ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 0,89$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 502 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 12.84 (уш. с, 1H), 8.55 (т, 1H), 8.35 (д, 1H), 7.81 (д, 1H), 7.48 (д, 1H), 7.40 (д, 1H), 7.31 (т, 1H), 7.15 (д, 1H), 5.70 (д, 1H), 4.33-4.28 (м, 1H), 4.02-3.97 (м, 1H), 3.58-3.49 (м, 2H), 3.49-3.41 (м, 1H), 3.38-3.30 (м, 1H, частично затенен), 2.47-2.39 (м, 1H), 2.35 (с, 3H), 1.97-1.89 (м, 1H).

**Промежуточное соединение 17**

3-[(5-Хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланин



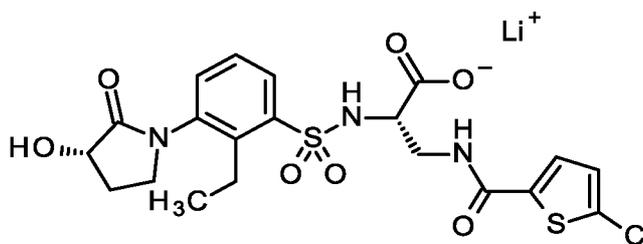
К раствору метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланината (882 мг, 1,71 ммоль, промежуточное соединение 13) в ТГФ (3,6 мл) добавляли водный раствор гидроксида лития (17 мл, 1,0 М, 17 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После выпаривания ТГФ водную смесь медленно подкисляли 2 М соляной кислотой до достижения значения рН 1. Полученную смесь дважды экстрагировали этилацетатом и объединенные органические фазы сушили над сульфатом натрия, концентрировали и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (784 мг, 81% от теории, чистота 89%, содержащее некоторое количество растворителя по данным ЯМР).

ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 0,89$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 502$  [M+H]<sup>+</sup>

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 12.76 (уш. с, 1H), 8.57 (т, 1H), 8.36 (д, 1H), 7.82 (д, 1H), 7.50 (д, 1H), 7.42 (д, 1H), 7.32 (т, 1H), 7.16 (д, 1H), 5.70 (д, 1H), 4.31 (уш. т, 1H), 4.02-3.97 (м, 1H), 3.58-3.50 (м, 2H), 3.50-3.44 (м, 1H), 3.39-3.33 (м, 1H), 2.47-2.39 (м, 1H), 2.36 (с, 3H), 1.98-1.92 (м, 1H).

### **Промежуточное соединение 18**

(2S)-3-[[[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино]-2-[(2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил)сульфонил)амино]пропаноат лития



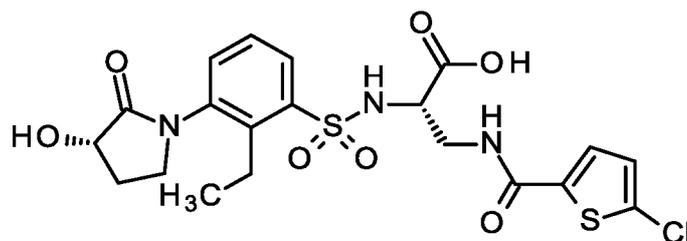
К раствору метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил]-S-аланината (200 мг, 0,38 ммоль, сравнительное соединение 6) в ТГФ (2,1 мл) добавляли моногидрат гидроксида лития (48 мг, 1,13 ммоль) и две капли воды, и смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод 1). Объединенные фракции продукта высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (140 мг, 71% от теории, 100% чистота).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,23$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 516$   $[M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 8.70-8.64 (м, 1H), 7.93 (д, 1H), 7.47-7.40 (м, 2H), 7.40-7.34 (м, 1H), 7.16 (д, 1H), 5.75 (уш. с, 1H), 4.28 (т, 1H), 3.65-3.57 (м, 1H), 3.56-3.47 (м, 2H), 3.38-3.20 (м, 4H, частично затенен), 2.98-2.76 (м, 2H), 2.47-2.38 (м, 1H), 2.00-1.87 (м, 1H), 1.07 (т, 1H).

### **Промежуточное соединение 19**

3-[(5-Хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланин



К раствору метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланината (508 мг, 0,96 ммоль, сравнительное соединение 6) в ТГФ (2,0 мл) добавляли водный раствор гидроксида лития (1 М, 9,6 мл, 9,6 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. После выпаривания ТГФ водную смесь медленно подкисляли 1 М соляной кислотой до достижения значения рН 1. Полученную смесь дважды экстрагировали этилацетатом и объединенные органические фазы сушили над сульфатом натрия, концентрировали и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (391 мг, 75% от теории,

чистота 95%, содержащее некоторое количество растворителя по данным Н-ЯМР).

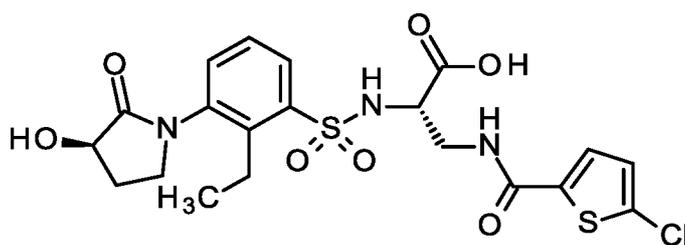
ЖХ-МС (Метод 8):  $R_t = 0,65$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 516 [M+H]^+$

Хиральная ВЭЖХ (Метод 10):  $R_t = 7,76$  мин

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 12.83 (уш. с, 1H), 8.60 (т, 1H), 8.40 (д, 1H), 7.86 (дд, 1H), 7.52 (д, 1H), 7.39 (дд, 1H), 7.33 (т, 1H), 7.16 (д, 1H), 5.70 (д, 1H), 4.32-4.26 (м, 1H), 4.05-4.00 (м, 1H), 3.59-3.51 (м, 2H), 3.49-3.36 (м, 2H), 2.91-2.81 (м, 2H), 2.47-2.37 (м, 1H), 1.97-1.87 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

### Промежуточное соединение 20

3-[(5-Хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланин



К раствору метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланината (620 мг, чистота 95%, 1,11 ммоль, сравнительное соединение 7) в ТГФ (2,4 мл) добавляли водный раствор гидроксида лития (11 мл, 1М, 11 ммоль) и

смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. После выпаривания ТГФ водную смесь медленно подкисляли 1 М соляной кислотой до достижения значения pH 1. Полученную смесь дважды экстрагировали этилацетатом и объединенные органические фазы сушили над сульфатом натрия, концентрировали и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (570 мг, 99% от теории, чистота 100%, содержащее некоторое количество растворителя по данным ЯМР).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,21$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 516 [M+H]^+$

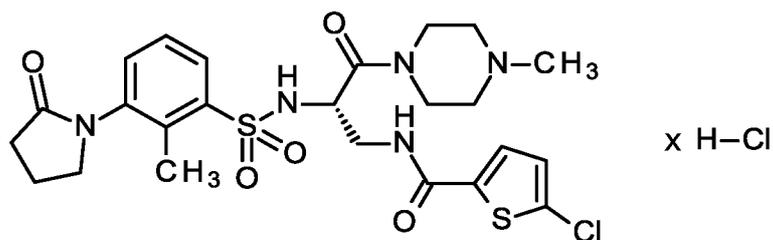
Хиральная ВЭЖХ (Метод 10):  $R_t = 6,31$  мин

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 12.90 (уш. с, 1H), 8.61 (т, 1H), 8.40 (д, 1H), 7.87 (дд, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.40 (д, 1H), 7.33 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 5.71 (уш. с, 1H), 4.29 (уш. т, 1H), 4.06-3.99 (м, 1H), 3.61-3.50 (м, 2H), 3.49-3.44 (м, 1H), 3.44-3.37 (м, 1H), 2.94-2.80 (м, 2H), 2.48-2.40 (м, 1H), 1.97-1.91 (м, 1H), 1.07 (т, 3H).

## **Сравнительные соединения**

### **Сравнительное соединение 1**

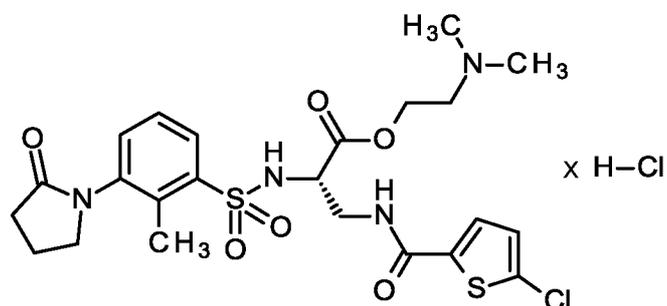
5-Хлор-N-[(2S)-2-({[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил}амино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)-3-оксопропил]тиофен-2-карбоксамид гидрохлорид



Информацию о приготовлении см. в *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 9441-9456, соединение 15.

### Сравнительное соединение 2

2-(Диметиламино)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил]карбонил]амино-N-[[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил]-S-аланинат гидрохлорид



К раствору 3-[[5-хлор-2-тиенил]карбонил]амино-N-[[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил]-S-аланина (150 мг, 0,31 ммоль, для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 9441-9456, соединение 51) в ТГФ (1,5 мл) добавляли НВТУ (140 мг, 0,37 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,16 мл, 0,93 ммоль) и 2-(диметиламино)этанол (37 мкл, 370 мкмоль) и смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали

в роторном испарителе, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/вода и очищали препаративной ВЭЖХ с добавлением TFA к подвижной фазе (метод 5). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор перемешивали в течение 1 часа с хлорид-ионообменной смолой (2,0 г амберлита IRA405 Cl). После этого раствор очищали препаративной ВЭЖХ с добавлением хлористого водорода к подвижной фазе (метод 6) с получением первой партии указанного в заголовке соединения (96 мг, 52% от теории, 100% чистота) и второй партии указанного в заголовке соединения (6 мг, 3% от теории, чистота 94%).

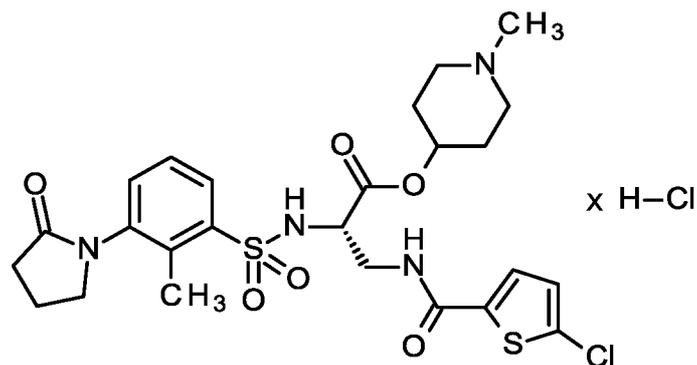
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 0,99$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 557 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 10.28 (уш. с, 1H), 8.92 (т, 1H), 8.74 (д, 1H), 7.81 (д, 1H), 7.66 (д, 1H), 7.48 (д, 1H), 7.37 (т, 1H), 7.19 (д, 1H), 4.24-4.18 (м, 1H), 4.16-4.08 (м, 2H), 3.68-5.57 (м, 3H), 3.52-3.45 (м, 1H), 3.23 (м, 2H), 2.75 (д, 3H), 2.73 (д, 3H), 2.45 (т, 2H), 2.39 (с, 3H), 2.18-2.11 (м, 2H).

ИХ: 6,0 % масс. хлорида, < 1 % масс. TFA

### **Сравнительное соединение 3**

1-Метилпиперидин-4-ил 3-[[{(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино}-N-[[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил]-S-аланинат гидрохлорид



К раствору 3-[[[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино]-N-{[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил}-S-аланина (150 мг, 0,31 ммоль, для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 9441-9456, соединение 51) в ТГФ (1,5 мл) добавляли TBTU (119 мг, 0,37 ммоль, регистрационный номер CAS 125700-67-6), DIPEA (0,16 мл, 0,93 ммоль) и N-метил-4-пиперидиол (44 мкл, 370 мкмоль) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем смесь очищали препаративной ВЭЖХ с добавлением хлористого водорода к подвижной фазе (метод 6) с получением указанного в заголовке соединения (28 мг, 14% от теории, 100% чистота).

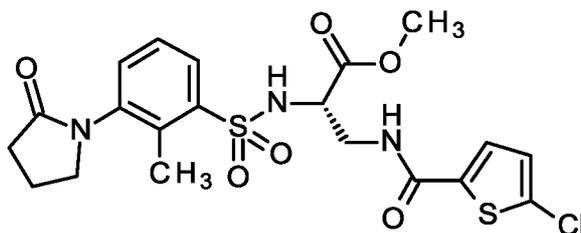
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,00$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 583 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 10.28 (уш. с, 1H), 8.86 и 8.81 (2 x т, 1H), 8.75 и 8.74 (2 x д, 1H), 7.83 и 7.81 (2 x д, 1H), 7.62 и 7.58 (2 x д, 1H), 7.49-7.45 (м, 1H), 7.39-7.34 (м, 1H), 7.19-7.17 (м, 1H), 4.83-4.78 и 4.65-4.59 (2 x м, 1H), 4.14-4.08 и 4.04-3.98 (2 x м, 1H), 3.66-3.13 (3 x м, 6H, частично затенен), 3.03-2.89 (м, 2H), 2.69-2.65 (м, 3H), 2.47-2.41 (м, 2H), 2.37 (с, 3H), 2.18-2.11 (м, 2H), 1.97-1.73 (2 x м, 2H), 1.67-1.50 (м, 2H).

ИХ: 5,6 % масс. хлорида

#### Сравнительное соединение 4

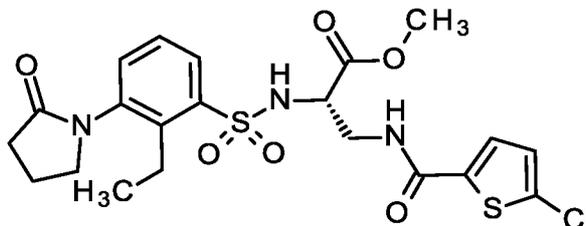
Метил 3-[[[5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино]-N-[[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил]-S-аланинат



Информацию о приготовлении см. в *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441-9456, соединение 50.

#### Сравнительное соединение 5

Метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланинат



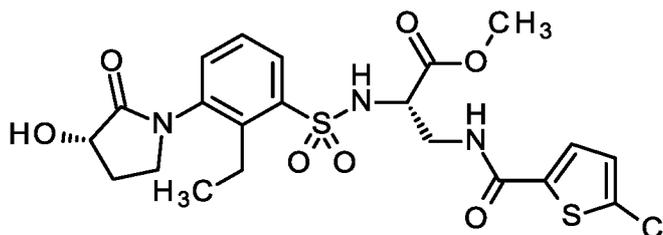
К смеси 2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонилхлорида (5,15 г, 17,90 ммоль, промежуточное соединение 7) в дихлорметане (215 мл) добавляли метил-3-[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино}-S-аланинат гидрохлорид (5,89 г, 19,7 ммоль, для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441-9456, соединение 49) и триэтиламин (5,0 мл, 35,8 ммоль) и смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали и остаток очищали флэш-хроматографией (Biotage Isolera, 100 г силикагеля SNAP-Ultra, градиент DCM/метанол). Объединенные фракции продукта концентрировали и сушили в вакууме с получением первой партии указанного в заголовке соединения (8,35 г, 86 % от теории, чистота 95%) и вторую порцию указанного в заголовке соединения (830 мг, 9% от теории, чистота 100%).

ЖХ-МС (Метод 8):  $R_t = 0,85$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 514 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (400,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 8.68 (т, 1H), 8.63 (д, 1H), 7.81 (дд, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.45 (дд, 1H), 7.37 (т, 1H), 7.18 (д, 1H), 4.12-4.00 (м, 1H), 3.73-3.49 (м, 3H), 3.46-3.35 (м, 4H), 2.98-2.74 (м, 2H), 2.43 (т, 2H), 2.19-2.08 (м, 2H), 1.08 (т, 3H).

### **Сравнительное соединение 6**

Метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат



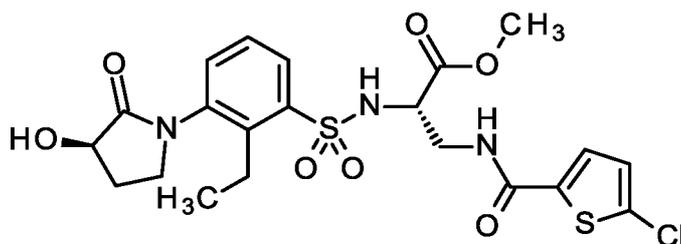
К смеси 2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонилхлорида (1,11 г, 3,66 ммоль, промежуточное соединение 10) в дихлорметане (45 мл) добавляли гидрохлорид метил-3-[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино}-S-аланината (1,64 г, 5,50 ммоль, для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441-9456, соединение 49) и триэтиламин (1,0 мл, 7,32 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали и статок адсорбировали на Isolute и очищали флэш-хроматографией (Biotage Isolera, 50 г силикагеля SNAP-Ultra, градиент циклогексан/этилацетата/метанол). Объединенные фракции продукта концентрировали и сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (892 мг, 44% от теории, чистота 96% согласно данным ЖХ-МС).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,42$  мин, МС (ESIpos):  $m/z = 530$  [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-ЯМР (600,0 МГц, ДМСО-*d*6)  $\delta$  [м.д.]: 8.71-8.62 (м, 2H), 7.85-7.80 (м, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.46-7.42 (м, 1H), 7.40-7.34 (м, 1H), 7.17 (д, 1H), 5.76-5.74 (м, 1H), 4.34-4.27 (м, 1H), 4.11-4.00 (м, 1H), 3.68-3.34 (м, 7H), 2.95-2.77 (м, 2H), 2.48-2.39 (м, 1H), 2.00-1.88 (м, 1H), 1.07 (т, 3H).

### Сравнительное соединение 7

Метил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат



К смеси 2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонилхлорида (445 мг, чистота 93%, 1,36 ммоль, промежуточное соединение 11) в дихлорметане (17 мл) добавляли триэтиламин (0,63 мл, 4,5 ммоль) и гидрохлорид метил-3-[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино}-S-аланинат (481 мг, 1,61 ммоль, для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 9441-9456, соединение 49) и смесь перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре. Добавляли еще гидрохлорида метил-3-[(5-хлор-2-тиенил)карбонил]амино}-S-аланината (45 мг, 0,15 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение еще 10 минут. Затем добавляли воду и фазы разделяли. Водную фазу дважды экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические фазы промывали насыщенным раствором хлорида натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали флэш-хроматографией (силикагель, градиент этилацетат/метанол). Объединенные фракции продукта концентрировали и сушили в вакууме с

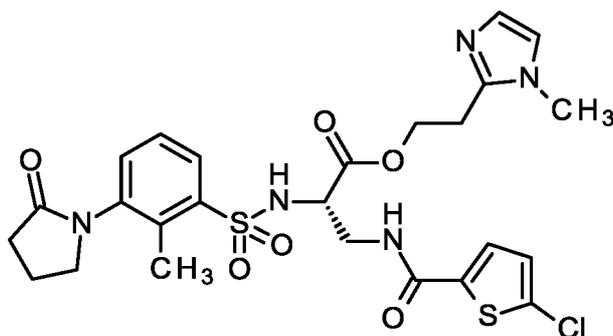
получением указанного в заголовке соединения (620 мг, 82% от теории, чистота 95% согласно данным ЯМР).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,40$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 530 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 8.65 (т, 1H), 8.61 (д, 1H), 7.83 (д, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.44 (д, 1H), 7.38 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 5.71 (д, 1H), 4.33-4.27 (м, 1H), 4.10-4.04 (м, 1H), 3.62-3.48 (м, 3H), 3.45-3.38 (м, 4H), 2.95-2.87 (м, 1H), 2.86-2.77 (м, 1H), 2.47-2.40 (м, 1H), 2.00-1.91 (м, 1H), 1.07 (т, 3H).

### Сравнительное соединение 8

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил]карбонил]амино}-N-[[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил]-S-аланинат



К раствору 3-[[5-хлор-2-тиенил]карбонил]амино}-N-[[2-метил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил]-S-аланина (150 мг, 0,31 ммоль, для приготовления см. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013, 56, 9441-9456, соединение 51) в ТГФ (3,0 мл) добавляли НВТУ (211 мг, 0,56 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (108 мкл, 0,62 ммоль) и 2-

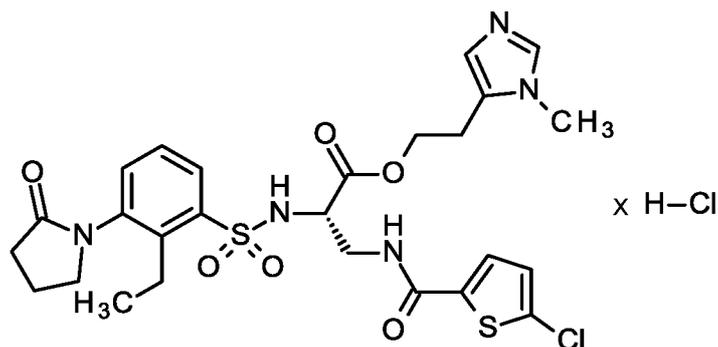
(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этанол (117 мг, 0,93 ммоль, регистрационный номер CAS 18994-70-2) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем смесь растворяли в смеси вода/ацетонитрил и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 4). Объединенные фракции продукта концентрировали и остаток высушивали сублимацией. Остаток после сублимационной сушки растворяли в этилацетате, раствор несколько раз промывали насыщенным раствором гидрокарбоната натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Полученный остаток сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (31 мг, 17% от теории, чистота 100%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,08$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 594 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 13.94 (уш. с, 1H), 8.65 (т, 1H), 8.59 (д, 1H), 7.75 (дд, 1H), 7.58 (д, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.48 (д, 1H), 7.44 (дд, 1H), 7.32 (т, 1H), 7.18 (д, 1H), 4.25-4.15 (м, 2H), 4.06-3.99 (м, 1H), 3.74 (с, 3H), 3.66-3.55 (м, 2H), 3.53-3.44 (м, 1H), 3.40-3.30 (1H, затенен), 3.17 (т, 2H), 2.44 (т, 2H), 2.34 (с, 3H), 2.18-2.10 (м, 2H).

### **Сравнительное соединение 9**

2-(1-Метил-1H-имидазол-5-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланинат  
гидрохлорид



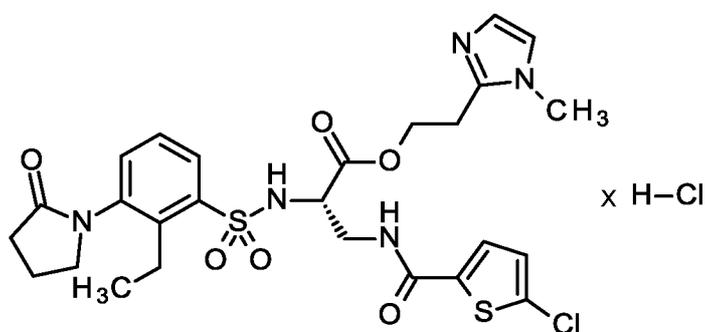
К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланина (60 мг, 120 мкмоль, промежуточное соединение 15) в ТГФ (2,3 мл) добавляли HBTU (82 мг, 216 мкмоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (63 мкл, 360 мкмоль) и 2-(1-метил-1H-имидазол-5-ил)этанол (19 мг, 150 мкмоль, регистрационный номер CAS 802027-25-4) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали в роторном испарителе при температуре водяной бани 30°C, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (1,0 г смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой/ацетоном и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (64 мг, 81% от теории, чистота 98%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,11$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 608 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.26 (уш. с, 1H), 8.99 (с, 1H), 8.84 (т, 1H), 8.70 (д, 1H), 7.81 (дд, 1H), 7.60 (д, 1H), 7.45 (дд, 1H), 7.42 (с, 1H), 7.34 (т, 1H), 7.18 (д, 1H), 4.15 (т, 2H), 4.08-4.03 (м, 1H), 3.74 (с, 3H), 3.69-3.57 (м, 2H), 3.57-3.50 (м, 1H), 3.47-3.40 (м, 1H), 2.93-2.78 (м, 4H), 2.43 (т, 2H), 2.17-2.10 (м, 2H), 1.08 (т, 3H).

### Сравнительное соединение 10

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил]карбонил]амино]-N-[[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)фенил]сульфонил]-S-аланинат гидрохлорид



К раствору 3-[[5-хлортиофен-2-карбонил]амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланина (350 мг, 0,70 ммоль, промежуточное соединение 15) в ТГФ (13,6 мл) добавляли НВТУ (478 мг, 1,26 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,37 мл, 2,10 ммоль) и 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этанол (116 мг, 0,88 ммоль, чистота 95%, регистрационный номер CAS 18994-70-2) и смесь

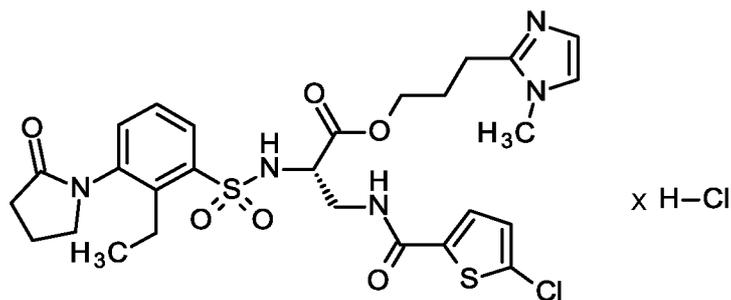
перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали в роторном испарителе при температуре водяной бани 30°C, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (4,67 г смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой/ацетоном и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (321 мг, 90% от теории, чистота 99%).

ЖХ-МС (Метод 8):  $R_t = 0,63$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 608 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (400,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.43 (уш. с, 1H), 9.00-8.93 (м, 1H), 8.70 (д, 1H), 7.80 (дд, 1H), 7.70-7.66 (м, 1H), 7.58 (д, 1H), 7.53 (д, 1H), 7.44 (д, 1H), 7.32 (т, 1H), 7.18 (д, 1H), 4.28-4.20 (м, 2H), 4.08-4.03 (м, 1H), 3.76 (с, 3H), 3.70-3.57 (м, 2H), 3.54-3.47 (м, 1H), 3.46-3.39 (м, 1H), 3.23 (т, 2H), 2.91-2.83 (м, 1H), 2.83-2.74 (м, 1H), 2.42 (т, 2H), 2.17-2.09 (м, 2H), 1.06 (т, 3H).

### **Сравнительное соединение 11**

3-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)пропил  
3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланинат гидрохлорид



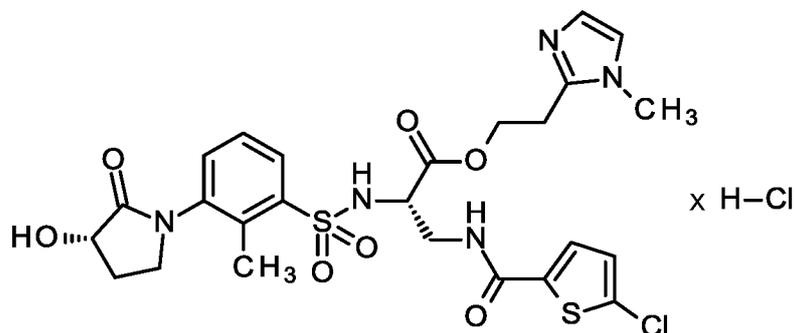
К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-[2-этил-3-(2-оксопирролидин-1-ил)бензол-1-сульфонил]-S-аланина (50,0 мг, 100 мкмоль, промежуточное соединение 15) в ТГФ (1,9 мл) добавляли HBTU (68 мг, 180 мкмоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (52 мкл, 300 мкмоль) и 3-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)пропан-1-ол (18 мг, чистота 95%, 125 мкмоль, регистрационный номер CAS 136609-58-0) и смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали в роторном испарителе при температуре водяной бани 30°C, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (400 мг смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой/ацетоном и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (33 мг, 49% от теории, чистота 97%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,16$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 622$   $[M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (500,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.25 (уш. с, 1H), 8.92 (т, 1H), 8.74 (д, 1H), 7.84 (дд, 1H), 7.65 (д, 1H), 7.58 (д, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.45 (дд, 1H), 7.35 (т, 1H), 7.16 (д, 1H), 4.10-4.02 (м, 1H), 3.98-3.92 (м, 2H), 3.72 (с, 3H), 3.69-3.51 (м, 3H), 3.50-3.40 (м, 1H), 2.95-2.79 (м, 4H), 2.42 (т, 2H), 2.17-2.09 (м, 2H), 1.92-1.83 (м, 2H), 1.08 (т, 3H).

### Сравнительное соединение 12

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланинат гидрохлорид



К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланина (60 мг, чистота 94%, 0,11 ммоль, промежуточное соединение 16) в ТГФ (2,2 мл) добавляли HBTU (77 мг, 0,20 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,10 мл, 0,56 ммоль) и 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этанол (18 мг, 0,14 ммоль, регистрационный номер CAS 18994-70-2) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем

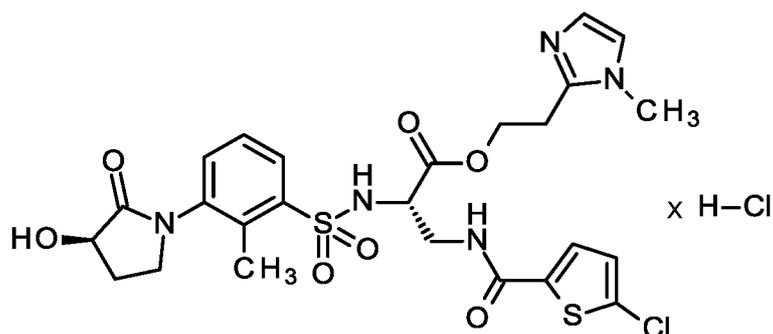
смесь концентрировали в роторном испарителе при температуре водяной бани 30°C, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (400 мг смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (33 мг, 45% от теории, чистота 98%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 0,96$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 610 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.27 (уш. с, 1H), 8.82 (т, 1H), 8.64 (д, 1H), 7.76 (д, 1H), 7.59 (д, 2H), 7.57 (д, 1H), 7.52 (д, 1H), 7.42 (д, 1H), 7.32 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 5.73 (уш. с, 1H), 4.32 (т, 1H), 4.29-4.17 (м, 2H), 4.06-4.01 (м, 1H), 3.76 (с, 3H), 3.57-3.44 (м, 3H), 3.41-3.35 (м, 1H), 3.20 (т, 2H), 2.47-2.38 (м, 1H), 2.34 (с, 3H), 2.02-1.91 (м, 1H).

### **Сравнительное соединение 13**

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланинат гидрохлорид



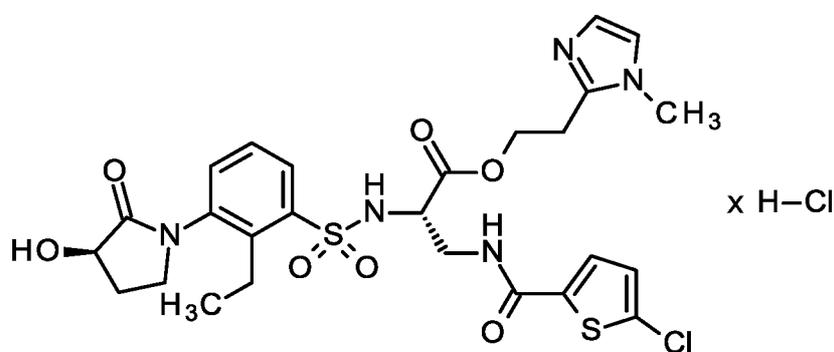
К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]-2-метилбензол-1-сульфонил}-S-аланина (60 мг, чистота 89%, 0,11 ммоль, промежуточное соединение 17) в ТГФ (2,1 мл) добавляли HBTU (73 мг, 0,19 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,09 мл, 0,53 ммоль) и 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этанол (17 мг, 0,13 ммоль, регистрационный номер CAS 18994-70-2) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали в роторном испарителе при температуре водяной бани 30°C, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (600 мг смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (45 мг, 62% от теории, чистота 95%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 0,96$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 610 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.35 (уш. с, 1H), 8.87 (т, 1H), 8.66 (д, 1H), 7.77 (д, 1H), 7.62 (д, 1H), 7.58 (д, 1H), 7.53 (д, 1H), 7.44 (д, 1H), 7.33 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 5.71 (уш. с, 1H), 4.32 (т, 1H), 4.26-4.17 (м, 2H), 4.09-4.03 (м, 1H), 3.76 (с, 3H), 3.58-3.46 (м, 3H), 3.43-3.38 (м, 1H), 3.21 (т, 2H), 2.48-2.40 (м, 1H), 2.33 (с, 3H), 2.02-1.93 (м, 1H).

### Сравнительное соединение 14

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат гидрохлорид



К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланина (120 мг, 0,23 ммоль, промежуточное соединение 20) в ТГФ (4,5 мл) добавляли НВТУ (159 мг, 0,42 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,12 мл, 0,70 ммоль) и 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этанол (37 мг,

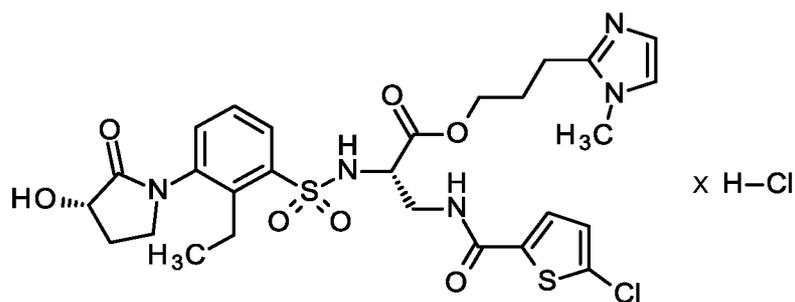
0,29 ммоль, регистрационный номер CAS 18994-70-2) и смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали в роторном испарителе при температуре водяной бани 30°C, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали продукт, содержащий TFA. Для получения гидрохлорида продукт, содержащий TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор элюировали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (1,5 г смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой). Затем смолу промывали деионизированной водой и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (95 мг, 61% от теории, чистота 99%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,02$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.20 (с, 1H), 8.81 (уш. с, 1H), 8.66 (д, 1H), 7.81 (д, 1H), 7.60 (д, 1H), 7.58 (д, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.43 (д, 1H), 7.34 (т, 1H), 7.18 (д, 1H), 4.30 (т, 1H), 4.27-4.21 (м, 2H), 4.06 (дд, 1H), 3.76 (с, 3H), 3.63-3.56 (м, 1H), 3.55-3.47 (м, 2H), 3.46-3.39 (м, 1H), 3.22 (т, 2H), 2.92-2.84 (м, 1H), 2.83-2.75 (м, 1H), 2.48-2.40 (м, 1H), 2.00-1.91 (м, 1H), 1.06 (м, 3H)

### **Сравнительное соединение 15**

3-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)пропил  
3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат гидрохлорид



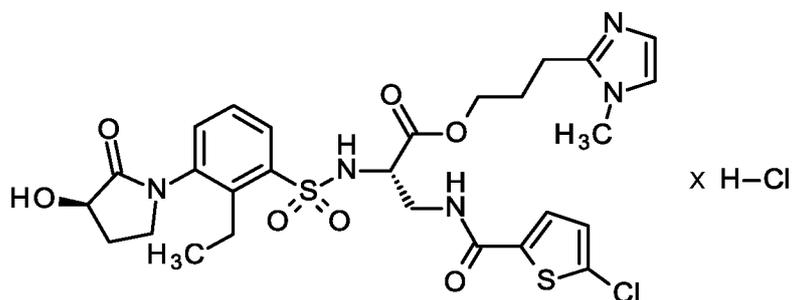
К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланина (60 мг, 0,12 ммоль, промежуточное соединение 19) в ТГФ (2,3 мл) добавляли HBTU (79 мг, 0,21 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,08 мл, 0,47 ммоль) и 3-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)пропан-1-ол (24,5 мг, 0,17 ммоль, регистрационный номер CAS 136609-58-2) и смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем смесь растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (880 мг смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (19 мг, 22% от теории, чистота 90%).

ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 0,83$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 638 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (400,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.06 (уш. с, 1H), 8.80 (т, 1H), 8.72 (д, 1H), 7.85 (дд, 1H), 7.60-7.57 (м, 2H), 7.54 (д, 1H), 7.43 (дд, 1H), 7.37 (т, 1H), 7.16 (д, 1H), 5.75 (уш. с, 1H), 4.31 (т, 1H), 4.12-4.02 (м, 1H), 3.97 (т, 2H), 3.72 (с, 3H), 3.65-3.53 (м, 2H), 3.51-3.42 (м, 2H), 2.96-2.84 (м, 4H), 2.47-2.40 (м, 1H), 1.99-1.80 (м, 3H), 1.07 (т, 3H).

### Сравнительное соединение 16

3-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)пропил  
3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат гидрохлорид



К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3R)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланина (60 мг, 0,12 ммоль, промежуточное соединение 20) в ТГФ (2,3 мл) добавляли HBTU (79 мг, 0,21 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,08 мл, 0,47 ммоль) и 3-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)пропан-1-ол (24,5 мг, 0,17 ммоль, регистрационный номер CAS 136609-58-2) и смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем смесь растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали

препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (500 мг смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (43 мг, 49% от теории, чистота 90%).

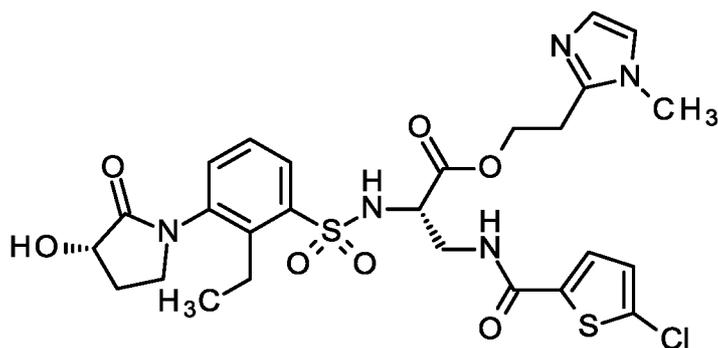
ЖХ-МС (Метод 9):  $R_t = 0,83$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 638 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (400,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.10 (уш. с, 1H), 8.84 (уш. с, 1H), 8.72 (д, 1H), 7.86 (дд, 1H), 7.62-7.57 (м, 2H), 7.55 (д, 1H), 7.44 (д, 1H), 7.37 (т, 1H), 7.16 (д, 1H), 5.75 (уш. с, 1H), 4.31 (т, 1H), 4.11-4.02 (м, 1H), 4.00-3.91 (м, 2H), 3.72 (с, 3H), 3.63-3.40 (м, 4H), 2.96-2.77 (м, 4H), 2.47-2.40 (м, 1H), 1.99-1.82 (м, 3H), 1.07 (т, 3H).

### **Демонстрационные примеры**

#### **Пример 1**

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат



К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланин (2,0 г, 3,88 ммоль, промежуточное соединение 19) в дихлорметане (20 мл) и DMF(4 мл) добавляли 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этанол (978 мг, 7,75 ммоль, регистрационный номер CAS 18994-70-2) и раствор охлаждали до 0°C. Затем порциями добавляли Охута (661 мг, 4,65 ммоль, регистрационный номер CAS 3849-21-6), а затем EDCI (892 мг, 4,65 ммоль, регистрационный номер CAS 25952-53-8) и смесь перемешивали в течение 1,5 часов при 0°C. Смесь промывали ледяной водой (20 мл) и после разделения фаз органическую фазу трижды промывали ледяной водой. При третьем промывании для улучшения разделения фаз добавляли дихлорметан (10 мл) и 10% водный раствор хлорида натрия (10 мл). Затем органическую фазу сушили над сульфатом натрия и концентрировали. После сушки в вакууме остаток очищали флэш-хроматографией с использованием основной силикагелевой фазы (Isolera, KP-NH 28 г, градиент DCM/ацетон 9:1 → 1:9). Объединенные фракции продукта концентрировали и остаток сушили в вакууме с получением указанного в заголовке соединения (1,51 г, 62% от теории, чистота 100%).

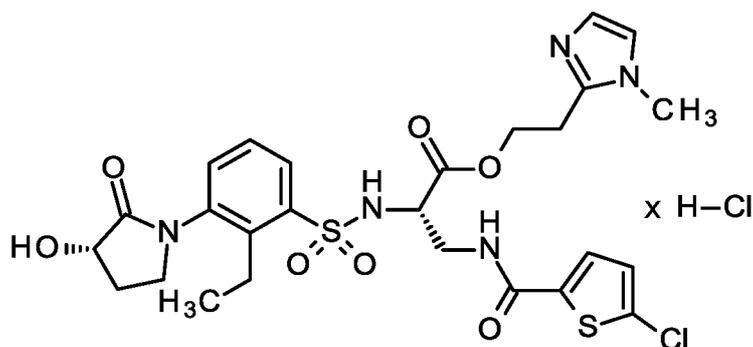
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,02$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (600,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 9.09 (т, 1H), 8.65 (д, 1H), 7.82 (дд, 1H), 7.57 (д, 1H), 7.44 (дд, 1H), 7.38 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 7.03 (д, 1H), 6.74 (д, 1H), 5.75 (д, 1H), 4.34-4.01 (м, 4H), 3.66-3.56 (м, 1H), 3.51 (с, 3H), 3.50-3.39 (м, 3H), 2.94-2.70 (м, 4H), 2.48-2.38 (м, 1H), 2.01-1.87 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

ИК: см. Фигуру 1

### Пример 2

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат гидрохлорид



### Альтернативный синтез А

К раствору 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланина (190 мг, 0,37 ммоль, промежуточное соединение 19) в ТГФ (7,2 мл) добавляли

NBTU (251 мг, 0,66 ммоль, регистрационный номер CAS 94790-37-1), DIPEA (0,19 мл, 1,11 ммоль) и 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этанол (93 мг, 0,74 ммоль, регистрационный номер CAS 18994-70-2) и смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем смесь концентрировали в роторном испарителе при температуре водяной бани 30°C, остаток растворяли в смеси ацетонитрил/TFA/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (метод 2). После высушивания сублимацией получали партию, содержащую TFA. Для получения соответствующего гидрохлорида партию, содержащую TFA, сначала растворяли в смеси ацетонитрил/вода и раствор пропускали десять раз через хлорид-ионообменную смолу (2,66 г смолы амберлита IRA405 Cl, кондиционированной деионизированной водой) под действием силы тяжести. Затем смолу промывали деионизированной водой и раствор высушивали сублимацией с получением указанного в заголовке соединения (122 мг, 49% от теории, чистота 98%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,01$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (600,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.30 (уш. с, 1H), 8.88 (т, 1H), 8.69 (д, 1H), 7.81 (д, 1H), 7.63 (д, 1H), 7.57 (д, 1H), 7.53 (д, 1H), 7.43 (д, 1H), 7.33 (т, 1H), 7.18 (д, 1H), 5.74 (уш. с, 1H), 4.30 (т, 1H), 4.29-4.19 (м, 2H), 4.05 (дд, 1H), 3.77 (с, 3H), 3.63-3.56 (м, 1H), 3.54-3.39 (м, 3H), 3.22 (т, 2H), 2.90-2.76 (м, 2H), 2.48-2.40 (м, 1H), 2.00-1.87 (м, 1H), 1.05 (т, 3H).

ИХ: 4,6 % масс. хлорида, < 1 % масс. TFA

Альтернативный синтез В

К раствору 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат (2,31 г, 3,70 ммоль, пример 1) в дихлорметане (3,5 мл) добавляли по каплям – при интенсивном перемешивании и охлаждении ледяной баней – раствор 1М хлористого водорода в диэтиловом эфире (4,07 мл, 4,07 ммоль), а затем еще диэтилового эфира (70 мл) для улучшения перемешиваемости. После перемешивания в течение 10 мин при охлаждении и 15 мин при комнатной температуре осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром (100 мл). Затем осадок снова растворяли в ледяной воде (20 мл) посредством кратковременной ультразвуковой обработки и раствор высушивали сублимацией. Для удаления следов диэтилового эфира сублимационную сушку повторяли с получением указанного в заголовке соединения (2,06 г, 84% от теории, чистота 99%).

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 0,99$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

Хиральная ВЭЖХ (Метод 11):  $R_t = 9,10$  мин

$^1\text{H-NMR}$  (500,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.42 (уш. с, 1H), 8.98 (т, 1H), 8.75 (д, 1H), 7.80 (дд, 1H), 7.68 (д, 1H), 7.58 (д, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.43 (д, 1H), 7.33 (т, 1H), 7.19 (д, 1H), 5.80 (уш. с, 1H), 4.31 (т, 1H), 4.29-4.19 (м, 2H), 4.08-4.01 (м, 1H), 3.77 (с, 3H), 3.63-3.56 (м, 1H), 3.54-3.39 (м, 3H), 3.23 (т, 2H), 2.90- 2.73 (м, 2H), 2.48-2.40 (м, 1H), 2.00-1.87 (м, 1H), 1.05 (т, 3H).

ИХ: 4,7 % масс. хлорида

### Альтернативный синтез С

К этилацетату (2,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат (30 мг, 48,1 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1 М хлористоводородную кислоту (50,2 мг, 49,22 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре в стеклянном флаконе с крышкой. Затем крышку заменяли лентой из парафильма, в ленте пробивали иглой 2-5 отверстий и смесь осторожно перемешивали еще 10 суток при комнатной температуре, давая растворителю медленно испариться. Указанное в заголовке соединение получали в виде твердого вещества.

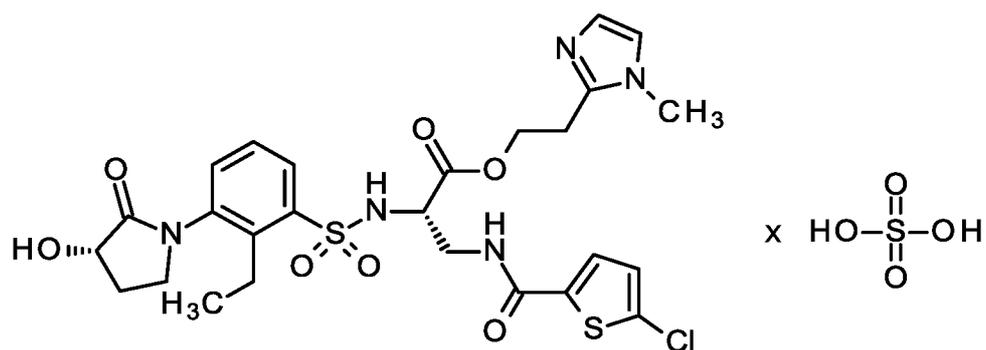
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,03$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (500,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 14.40 (уш. с, 1H), 8.97 (т, 1H), 8.74 (д, 1H), 7.80 (д, 1H), 7.67 (д, 1H), 7.58 (д, 1H), 7.54 (д, 1H), 7.43 (д, 1H), 7.33 (т, 1H), 7.19 (д, 1H), 5.75 (уш. с, 1H), 4.31 (т, 1H), 4.28-4.19 (м, 2H), 4.08-4.00 (м, 1H), 3.77 (с, 3H), 3.63-3.56 (м, 1H), 3.54-3.39 (м, 3H), 3.23 (т, 2H), 2.90-2.74 (м, 2H), 2.48-2.41 (м, 1H), 1.98-1.92 (м, 1H), 1.05 (т, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 2

**Пример 3**

2-(1-Метил-1Н-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино}-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил)сульфонил)-S-аланинат сульфат



К этилацетату (2,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1Н-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат (30 мг, 48,1 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0,5 М серную кислоту (100,6 мг, 47,90 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре в стеклянном флаконе с крышкой. Затем крышку заменяли лентой из парафильма, в ленте пробивали иглой 2-5 отверстий и смесь осторожно перемешивали еще 10 суток при комнатной температуре, давая растворителю медленно испариться. Указанное в заголовке соединение получали в виде твердого вещества.

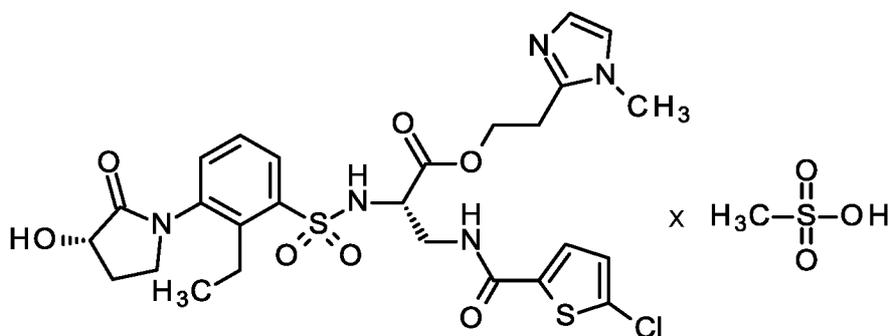
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,03$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (500,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 13.94 (уш. с, 1H), 8.70 (т, 1H), 8.64 (д, 1H), 7.80 (д, 1H), 7.62-7.56 (м, 1H), 7.55 (д, 1H), 7.52 (д, 1H), 7.43 (д, 1H), 7.34 (т, 1H), 7.21-7.17 (м, 1H), 4.36-4.27 (м, 1H), 4.27-4.17 (м, 2H), 4.11-3.97 (м, 1H), 3.76 (с, 3H), 3.64-3.55 (м, 1H), 3.55-3.34 (м, 3H), 3.21 (т, 2H), 2.91-2.75 (м, 2H), 2.49-2.41 (м, 1H), 2.01-1.92 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 3

#### Пример 4

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил]-карбонил]амино-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат метансульфонат



К этилацетату (2,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлортиофен-2-карбонил]амино]-N-[2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил]-S-аланинат (30 мг, 48,1 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли метансульфоновою кислоту (4,9 мг, 51,0 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре в

стеклянном флаконе с крышкой. Затем крышку заменяли лентой из парафильма, в ленте пробивали иглой 2-5 отверстий и смесь осторожно перемешивали еще 10 суток при комнатной температуре, давая растворителю медленно испариться. Указанное в заголовке соединение получали в виде твердого вещества.

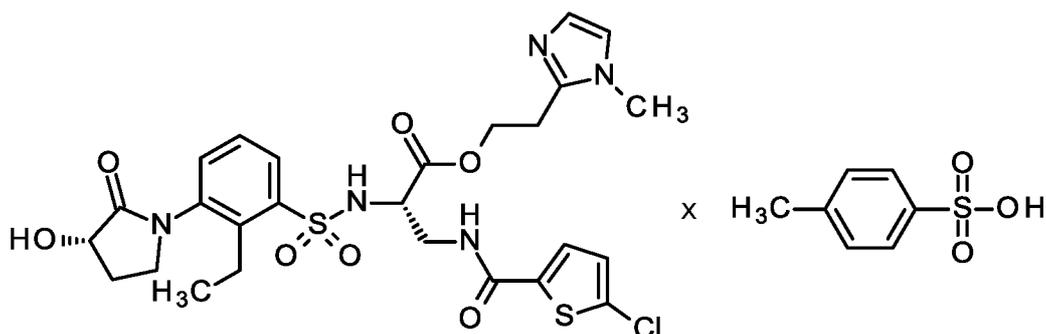
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,02$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (500,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 13.97 (уш. с, 1H), 8.72 (т, 1H), 8.65 (д, 1H), 7.80 (д, 1H), 7.59 (с, 1H), 7.55 (д, 1H), 7.53 (д, 1H), 7.43 (д, 1H), 7.34 (т, 1H), 7.19 (д, 1H), 5.75 (уш. с, 1H), 4.31 (т, 1H), 4.27-4.18 (м, 2H), 4.09-3.98 (м, 1H), 3.76 (с, 3H), 3.63-3.57 (м, 1H), 3.55-3.36 (м, 3H), 3.21 (уш. т, 2H), 2.91-2.74 (м, 2H), 2.48-2.41 (м, 1H), 2.34 (с, 3H), 1.98-1.88 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 4

### **Пример 5**

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[[(5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат 4-метилбензол-сульфонат



К этилацетату (2,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат (30 мг, 48,1 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли 4-толуолсульфоновую кислоту (9,6 мг, 55,7 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре в стеклянном флаконе с крышкой. Затем крышку заменяли лентой из парафильма, в ленте пробивали иглой 2-5 отверстий и смесь осторожно перемешивали еще 10 суток при комнатной температуре, давая растворителю медленно испариться. Указанное в заголовке соединение получали в виде твердого вещества.

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,02$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624$   $[M+H]^+$  и  $R_t = 0,57$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 171$   $[M-H]^-$

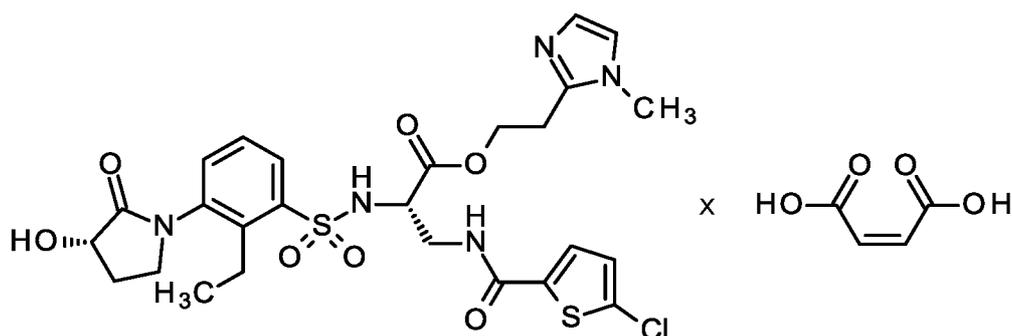
$^1\text{H-NMR}$  (500,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 13.92 (уш. с, 1H), 8.69 (уш. т, 1H), 8.64 (д, 1H), 7.80 (д, 1H), 7.60-7.56 (м, 1H), 7.55 (д, 1H), 7.52 (д, 1H), 7.48 (д, 2H), 7.43 (д, 1H), 7.36-7.31 (м, 1H), 7.21-7.16 (м, 1H), 7.11 (д, 2H), 4.35-4.28 (м, 1H), 4.27-4.17 (м, 2H), 4.07-4.00 (м, 1H), 3.76 (с, 3H), 3.63-3.56 (м, 1H),

3.54-3.36 (м, 3H), 3.20 (уш. т, 2H), 2.91-2.75 (м, 2H), 2.48-2.41 (м, 1H), 2.29 (с, 3H), 2.02-1.92 (м, 1H), 1.09-1.03 (м, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 5

### Пример 6

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[[(5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат малеат



К этилацетату (2,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат (30 мг, 48,1 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли малеиновую кислоту (5,8 мг, 50,0 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре в стеклянном флаконе с крышкой. Затем крышку заменяли лентой из парафильма, в ленте пробивали иглой 2-5 отверстий и смесь осторожно перемешивали еще 10 суток при комнатной температуре, давая растворителю медленно

испариться. Указанное в заголовке соединение получали в виде твердого вещества.

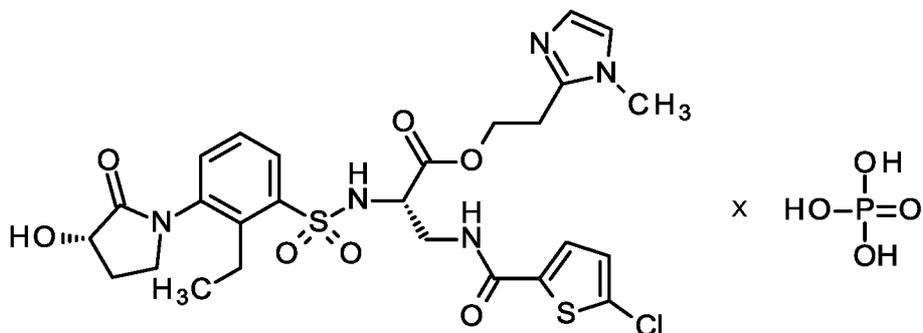
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,03$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (500,0 МГц,  $\text{DMCO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 8.75 (уш. т, 1H), 8.65 (уш. д, 1H), 7.80 (д, 1H), 7.52 (д, 1H), 7.50 (д, 1H), 7.45-7.40 (м, 2H), 7.38-7.32 (м, 1H), 7.19 (д, 1H), 6.07 (с, 2H), 5.76 (уш. с, 1H), 4.31 (т, 1H), 4.23 (уш. т, 2H), 4.09-3.99 (м, 1H), 3.72 (с, 3H), 3.65-3.56 (м, 1H), 3.52-3.37 (м, 3H), 3.13 (уш. т, 2H), 2.91-2.75 (м, 2H), 2.48-2.41 (м, 1H), 1.97-1.90 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 6

### Пример 7

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[[(5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино]-N-(2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил)сульфонил]-S-аланинат фосфат



К этилацетату (2,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-{2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат (30 мг, 48,1 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1 М фосфорную кислоту (48,7 мг, 46,38 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре в стеклянном флаконе с крышкой. Затем крышку заменяли лентой из парафильма, в ленте пробивали иглой 2-5 отверстий и смесь осторожно перемешивали еще 10 суток при комнатной температуре, давая растворителю медленно испариться. Указанное в заголовке соединение получали в виде твердого вещества.

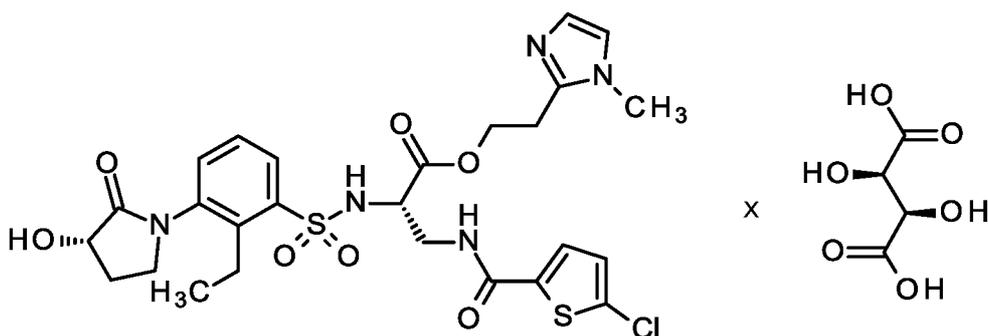
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,03$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (500,0 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 9.10 (т, 1H), 8.79-8.58 (уш. м, 1H), 7.82 (д, 1H), 7.57 (д, 1H), 7.47-7.40 (м, 1H), 7.40-7.35 (м, 1H), 7.17 (д, 1H), 7.08 (с, 1H), 6.82 (с, 1H), 4.30 (т, 1H), 4.25-4.11 (м, 2H), 4.09-4.04 (м, 1H), 3.65-3.57 (м, 1H), 3.54 (с, 3H), 3.51-3.37 (м, 3H), 2.93-2.77 (м, 4H), 2.47-2.39 (м, 1H), 1.97-1.90 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 7

**Пример 8**

2-(1-Метил-1Н-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил)-карбонил]амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил)сульфонил)-S-аланинат (2R, 3R)-тарtrat



К этилацетату (2,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1Н-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-S-аланинат (30 мг, 48,1 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры, добавляли (2R, 3R)-винную кислоту (7,4 мг, 49,3 ммоль) и смесь перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре в стеклянном флаконе с крышкой. Затем крышку заменяли лентой из парафильма, в ленте пробивали иглой 2-5 отверстий и смесь осторожно перемешивали еще 10 суток при комнатной температуре, давая растворителю медленно испариться. Указанное в заголовке соединение получали в виде твердого вещества.

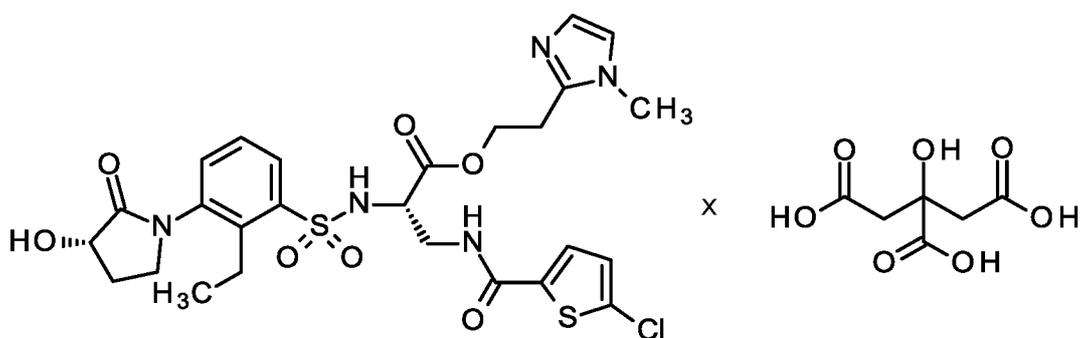
ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,03$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H}$ -ЯМР (500,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 9.09 (уш. т, 1H), 8.67 (уш. с, 1H), 7.82 (д, 1H), 7.57 (д, 1H), 7.44 (д, 1H), 7.38 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 7.06 (с, 1H), 6.78 (с, 1H), 4.30 (т, 1H), 4.25-4.22 (м, 2H), 4.22-4.10 (м, 2H), 4.06-4.00 (м, 1H), 3.53 (с, 3H), 3.50-3.38 (м, 3H), 2.92-2.74 (м, 4H), 2.47-2.40 (м, 1H), 1.98-1.90 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 8

### Пример 9

2-(1-Метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлор-2-тиенил]-карбонил]амино]-N-({2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]фенил}сульфонил)-S-аланинат цитрат



К этилацетату (10,0 мл) при 60°C добавляли 2-(1-метил-1H-имидазол-2-ил)этил 3-[[5-хлортиофен-2-карбонил]амино]-N-[2-этил-3-[(3S)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил]-S-аланинат (100 мг, 160,2 ммоль, пример 1) при перемешивании. Раствор охлаждали до комнатной температуры и при комнатной температуре добавляли раствор лимонной кислоты (31 мг, 161,4 ммоль) в этилацетате (8 мл), что приводило к

осаждению белого твердого вещества. Смесь перемешивали в течение 5 дней при комнатной температуре в стеклянном флаконе с крышкой, после чего осадок отфильтровывали и сушили на воздухе с получением указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества.

ЖХ-МС (Метод 7):  $R_t = 1,02$  мин; МС (ESIpos):  $m/z = 624 [M+H]^+$

$^1\text{H-NMR}$  (500,0 МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  [м.д.]: 9.01 (т, 1H), 8.66 (д, 1H), 7.82 (дд, 1H), 7.56 (д, 1H), 7.44 (дд, 1H), 7.37 (т, 1H), 7.17 (д, 1H), 7.15 (д, 1H), 6.91 (с, 1H), 4.30 (т, 1H), 4.25-4.11 (м, 2H), 4.07-4.01 (м, 1H), 3.65-3.58 (м, 1H), 3.57 (с, 3H), 3.50-3.40 (м, 3H), 2.92-2.79 (м, 4H), 2.70 (д, 2H), 2.61 (д, 2H), 2.48-2.40 (м, 1H), 1.98-1.90 (м, 1H), 1.06 (т, 3H).

XRPD: аморфный; ИК: см. Фигуру 9

Таблица 1: Инфракрасная спектроскопия примера 1 и солевых форм (примеры 2-9)

Максимумы полос (см <sup>-1</sup> )								
Пример 1	Пример 2 Гидрохлоридная соль	Пример 3 Сульфатная соль	Пример 4 Мезилатная соль	Пример 5 Тозилатная соль	Пример 6 Малеатная соль	Пример 7 Фосфатная соль	Пример 8 Тартратная соль	Пример 9 Цитратная соль
552	552	575	552	566	572	575	574	576
577	577	608	576	610	610	609	610	609
609	609	694	609	680	650	671	660	651
618	618	730	694	711	694	695	670	668
655	655	745	728	730	727	730	697	695
668	668	770	746	746	745	745	744	728
694	694	784	772	769	784	769	768	746
728	728	809	809	784	806	784	784	770
745	745	856	879	815	864	807	807	784
770	770	915	915	877	912	874	876	808
784	784	1016	964	919	978	912	914	877
808	808	1042	1016	1009	993	950	926	913
878	878	1125	1039	1032	1012	1013	973	1014
922	922	1148	1124	1120	1043	1044	997	1043
973	973	1163	1163	1163	1106	1058	1013	1110
1013	1013	1190	1190	1190	1123	1080	1045	1124
1043	1043	1224	1306	1224	1147	1107	1056	1147
1122	1122	1281	1328	1282	1164	1123	1125	1164
1146	1146	1305	1373	1306	1194	1163	1164	1193

Максимумы полос (см<sup>-1</sup>)

Пример 1	Пример 2 Гидрохлоридная соль	Пример 3 Сульфатная соль	Пример 4 Мезилатная соль	Пример 5 Тозилатная соль	Пример 6 Малеатная соль	Пример 7 Фосфатная соль	Пример 8 Тартратная соль	Пример 9 Цитратная соль
1164	1164	1328	1427	1328	1242	1198	1193	1243
1194	1194	1373	1463	1374	1280	1243	1241	1279
1242	1242	1426	1489	1426	1306	1279	1284	1306
1280	1280	1463	1524	1463	1328	1306	1304	1328
1304	1304	1489	1553	1494	1352	1327	1328	1373
1327	1327	1520	1609	1521	1373	1373	1373	1426
1373	1373	1553	1644	1552	1426	1426	1426	1463
1426	1426	1609	1695	1608	1461	1463	1461	1489
1462	1462	1635	1742	1645	1520	1489	1495	1520
1488	1488	1683		1699	1549	1520	1520	1552
1520	1520	1743		1745	1580	1549	1549	1587
1549	1549				1615	1635	1635	1611
1605	1605				1694	1683	1688	1637
1641	1641				1742	1738	1699	1699
1652	1652						1738	1730
1695	1695							
1699	1699							
1738	1738							

## **В) Оценка физиологической эффективности**

Пригодность соединений согласно изобретению для лечения тромбоэмболических нарушений может быть продемонстрирована с помощью следующих систем анализа:

### **а) Описания испытаний (*in vitro*)**

#### **а.1) Измерение ингибирования фактора Ха в буфере**

Для определения ингибирования фактора Ха перечисленными выше веществами изготавливают биологическую тест-систему, в которой для определения ферментативной активности человеческого фактора Ха используют конверсию субстрата фактора Ха. В данном случае фактор Ха отщепляет от пептидного субстрата аминотетилкумарин, который измеряется флуоресцентно. Определения осуществляют на микропланшетах.

Исследуемые вещества растворяют в различных концентрациях в диметилсульфоксиде и инкубируют в течение 30 мин с человеческим фактором Ха (1,3 нмоль/л растворенных в 50 ммоль/л Трис-буфера [С,С,С-трис(гидроксиметил)аминометан], 100 ммоль/л хлорида натрия, 5 ммоль/л хлорида кальция, 0,1% BSA [бычий сывороточный альбумин], рН 7,4) при 22°C. Затем добавляют субстрат (5 мкмоль/л Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC от Bachem). После 30 мин инкубации образец возбуждают на длине волны 360 нм и измеряют излучение на 460 нм. Измеренные излучения

исследуемых партий с тестируемым веществом сравниваются с контрольными партиями без тестируемого вещества (только диметилсульфоксид вместо тестируемого вещества в диметилсульфоксиде), а значения  $IC_{50}$  рассчитываются на основе соотношения концентрация/активность. Репрезентативные данные об активности данного испытания приведены в таблицах 2a и 2b ниже.

### **a.2) Измерение ингибирования тромбина в буфере**

Для определения ингибирования тромбина перечисленными выше веществами изготавливают биологическую тест-систему, в которой для определения ферментативной активности человеческого тромбина используют конверсию субстрата тромбина. В данном случае тромбин отщепляет от пептидного субстрата аминотетилкумарин, который измеряется флуоресцентно. Определения осуществляют на микропланшетах.

Исследуемые вещества растворяют в различных концентрациях в диметилсульфоксиде и инкубируют в течение 15 мин с человеческим тромбином (0,06 нмоль/л растворенных в 50 ммоль/л Трис-буфера [С,С,С-трис(гидроксиметил)аминометан], 100 ммоль/л хлорида натрия, 0,1% BSA [бычий сывороточный альбумин], рН 7,4) при 22°C. Затем добавляют субстрат (5 мкмоль/л Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC от Bachem). После 30 мин инкубации образец возбуждают на длине волны 360 нм и измеряют излучение на 460 нм. Измеренные излучения исследуемых партий с тестируемым веществом сравниваются с контрольными партиями без

тестируемого вещества (только диметилсульфоксид вместо тестируемого вещества в диметилсульфоксиде), а значения  $IC_{50}$  рассчитываются на основе соотношения концентрация/активность. Репрезентативные данные об активности данного испытания приведены в таблицах 2a и 2b ниже.

### **a.3) Определение селективности**

Чтобы продемонстрировать селективность веществ в отношении ингибирования тромбина и фактора Ха, тестируемые вещества исследуют на ингибирование других сериновых протеаз человека, таких как фактор XIa, трипсин, плазмин, тканевой активатор плазминогена (ТРА) и калликреин плазмы. Определения осуществляют на микропланшетах. Для определения ферментативной активности фактора XIa (0,15 нмоль/л от Kordia), трипсина (42 мЕд/мл от Sigma), плазмينا (0,1 мкг/мл от Kordia), ТРА (1 нмоль/л от Kordia) и калликреина плазмы (0,2 нмоль/л от Loxo), данные ферменты растворяют (50 ммоль/л Трис-буфера [С,С,С-трис(гидроксиметил)аминометана], 100 ммоль/л хлорида натрия, 0,1% BSA [альбумин бычьей сыворотки], 5 ммоль/л хлорида кальция, pH 7,4) и инкубируют в течение 15 мин с тестируемым веществом в различных концентрациях в диметилсульфоксиде, а также с диметилсульфоксидом без тестируемого вещества. Затем ферментативную реакцию начинают добавлением соответствующих субстратов (5 мкмоль/л Boc-Glu(OBzl)-Ala-Arg-AMC от Bachem для фактора XIa, 5 мкмоль/л Boc-Ile-Glu-Gly-Arg -AMC от Bachem для трипсина, 50 мкмоль/л MeOSuc-Ala-Phe-Lys-AMC от Bachem для плазмина, 5 мкмоль/л CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>-D-Phe-Gly-Arg-AMC от Pentapharm для ТРА и 5 мкмоль/л H-Pro-Phe-Arg-AMC от Bachem для

калликреина плазмы). После 30-минутного инкубирования при 22°C измеряют флуоресценцию (возбуждение: 360 нм, излучение: 460 нм). Измеренные излучения исследуемых партий с тестируемым веществом сравниваются с контрольными партиями без тестируемого вещества (только диметилсульфоксид вместо тестируемого вещества в диметилсульфоксиде), а значения  $IC_{50}$  рассчитываются на основе соотношения концентрация/активность. Репрезентативные данные об активности данного испытания приведены в таблицах 2a и 2b ниже.

Таблица 2a:

Сравнительное соединение №	FXa $IC_{50}$ [нМ]	FIIa $IC_{50}$ [нМ]	FXIa $IC_{50}$ [нМ]	Трипсин $IC_{50}$ [нМ]	Плазмин $IC_{50}$ [нМ]	ТРА $IC_{50}$ [нМ]	Калликреин $IC_{50}$ [нМ]
Сравнительное соединение 1	0,43	0,19	> 49000	2700	22000	2300	2600
Сравнительное соединение 2	1,1	15	> 50000	32000	> 50000	16000	11000
Сравнительное соединение 3	2,3	300	> 50000	14000	> 50000	23000	7600
Сравнительное соединение 4	0,49	26	> 50000	41000	> 50000	1200	5700
Сравнительное соединение 5	0,54	9,7	> 50000	30000	> 50000	960	1200
Сравнительное соединение 6	0,68	70	> 50000	20000	> 50000	3100	2300
Сравни-	0,76	52	47000	15000	> 50000	790	1400

Сравнительное соединение №	FXa IC <sub>50</sub> [нМ]	FIIa IC <sub>50</sub> [нМ]	FXIa IC <sub>50</sub> [нМ]	Трипсин IC <sub>50</sub> [нМ]	Плазмин IC <sub>50</sub> [нМ]	ТРА IC <sub>50</sub> [нМ]	Калликреин IC <sub>50</sub> [нМ]
Сравнительное соединение 7							
Сравнительное соединение 8	0,45	1,7	17000	3200	9100	2300	650
Сравнительное соединение 9	0,89	0,83	7200	1500	15000	7900	260
Сравнительное соединение 10	0,63	0,74	9300	2600	13000	2500	230
Сравнительное соединение 11	0,48	1,8	8300	3000	4900	1300	33
Сравнительное соединение 12	0,61	16	> 50000	2000	19000	1100	1600
Сравнительное соединение 13	1,1	35	33000	3500	21000	4000	2300
Сравнительное соединение 14	0,68	4,9	7500	1400	13000	1800	520
Сравнительное соединение 15	0,93	18	18000	2900	8300	> 4000	99
Сравнительное соединение 16	0,79	10	8100	1300	4200	780	62

Значения округляются до двух значащих цифр.

Таблица 2b

Пример №	FXa IC <sub>50</sub> [нМ]	FIIa IC <sub>50</sub> [нМ]	FXIa IC <sub>50</sub> [нМ]	Трипсин IC <sub>50</sub> [нМ]	Плазмин IC <sub>50</sub> [нМ]	ТРА IC <sub>50</sub> [нМ]	Калли- креин IC <sub>50</sub> [нМ]
Пример 1	0,71	5,3	36000	3200	16000	7400	420
Пример 2	0,66	4,9	31000	2700	15000	6500	380
Пример 3	0,78	5,9	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Пример 4	0,52	4,0	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Пример 5	0,78	5,8	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Пример 6	0,51	4,5	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Пример 7	0,56	5,2	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Пример 8	0,85	6,0	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Пример 9	0,49	4,6	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

н.о.: не определено

Значения округляются до двух значащих цифр.

#### **а.4) Определение ингибирующей фактор Ха активности потенциальных ингибиторов в образцах плазмы**

Чтобы определить ингибирование фактора Ха в образцах плазмы, фактор X, присутствующий в плазме, активируется протеазой токсина гремучей змеи. Затем посредством добавления хромогенного субстрата измеряют активность фактора Ха или его ингибирование потенциальными ингибиторами.

Различные концентрации испытуемых веществ растворяют в диметилсульфоксиде и смешивают с водным раствором рефлудана (10 мкг/мл). В прозрачных 96-луночных планшетах с плоским дном 30 мкл цитратной плазмы (Octapharma) смешивают с 10 мкл разведенного

вещества. Затем добавляют либо 20 мкл раствора токсина гремучей змеи (яд гадюки Рассела (RVV); реагент RVV: Pentapharm 121-06, конечная концентрация 0,6 мЕд) в водном буферном растворе хлорида кальция (конечная концентрация хлорида кальция 0,05 М) или 20 мкл водного раствора хлорида кальция (конечная концентрация хлорида кальция 0,05 М) без реагента RVV (в качестве эталона для нестимулированного образца). После добавления 20 мкл субстрата ChromozymX (конечная концентрация 1,6 ммоль/л, Bachem L-1565, разведенного в воде) образцы измеряют каждую минуту в течение 20 минут в приборе SpectraFluor Reader с использованием измерительного фильтра 405 нм. Значение IC<sub>50</sub> определяют при достижении около 70% максимального сигнала (около 12 мин). Репрезентативные данные об активности данных испытаний приведены в таблицах 3а и 3б ниже.

#### **а.5) Определение ингибирующей тромбин активности потенциальных ингибиторов в образцах плазмы**

Различные концентрации испытуемых веществ растворяют в диметилсульфоксиде и разводят водой. В белых 96-луночных планшетах с плоским дном 20 мкл разведенного вещества смешивают с 20 мкл раствора экарина (реагент экарина, от Sigma E-0504, конечная концентрация 20 мЕд на партию) в Ca-буфере (200 мМ Hepes + 560 мМ хлорида натрия + 10 мМ хлорида кальция + 0,4% PEG) или с 20 мкл Ca-буфера (в качестве нестимулированного контроля). Кроме того, добавляют 20 мкл флюорогенного субстрата тромбина (от Bachem I-1120, конечная концентрация 50 мкмоль/л) и 20 мкл цитратной плазмы (от Octapharma) и

тщательно гомогенизируют. Планшет подвергают измерению каждую минуту в течение 20 минут в приборе SpectraFluorplus Reader с использованием фильтра возбуждения 360 нм и фильтра излучения 465 нм. Значение IC<sub>50</sub> определяют при достижении около 70% максимального сигнала (около 12 мин). Репрезентативные данные об активности данных испытаний приведены в таблицах 3а и 3б ниже.

Таблица 3а:

Сравнительное соединение №	FXa IC <sub>50</sub> [нМ] в плазме	FIIa IC <sub>50</sub> [нМ] в плазме	Соотношение FIIa IC <sub>50</sub> / FXa IC <sub>50</sub>
Сравнительное соединение 1	3,3	16	4,8
Сравнительное соединение 2	6,1	86	14
Сравнительное соединение 3	19	140	7,4
Сравнительное соединение 4	12	430	36
Сравнительное соединение 5	16	190	12
Сравнительное соединение 6	17	610	36
Сравнительное соединение 7	13	510	39
Сравнительное соединение 8	26	16	0,62
Сравнительное соединение 9	3,4	2,9	0,85
Сравнительное соединение 10	4,1	8,5	2,1
Сравнительное соединение 11	10	21	2,1
Сравнительное соединение 12	1,1	79	72
Сравнительное соединение 13	9,0	160	18

Сравнительное соединение №	FXa IC <sub>50</sub> [нМ] в плазме	FIIa IC <sub>50</sub> [нМ] в плазме	Соотношение FIIa IC <sub>50</sub> / FXa IC <sub>50</sub>
Сравнительное соединение 14	6,6	22	3,3
Сравнительное соединение 15	42	63	1,5
Сравнительное соединение 16	7,2	60	8,3

Значения округляются до двух значащих цифр.

Таблица 3b

Пример №	FXa IC <sub>50</sub> [нМ] в плазме	FIIa IC <sub>50</sub> [нМ] в плазме	Соотношение FIIa IC <sub>50</sub> / FXa IC <sub>50</sub>
Пример 1	4,1	26	6,3
Пример 2	9,2	22	2,4
Пример 3	5,8	56	9,7
Пример 4	4,1	27	6,6
Пример 5	6,4	100	16
Пример 6	5,1	22	4,3
Пример 7	0,96	28	29
Пример 8	2,1	31	15
Пример 9	7,1	44	6,2

Значения округляются до двух значащих цифр.

#### **a.6) Анализ образования тромбина (тромбограмма)**

Влияние тестируемых веществ на тромбограмму (анализ образования тромбина по Хемкеру) определяют *in vitro* в плазме человека (Octaplas® от Octapharma). В анализе образования тромбина по Хемкеру активность тромбина в коагулирующей плазме определяют посредством измерения флуоресцентных продуктов расщепления субстрата I-1140 (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem). Реагенты от Thrombinoscope (реагент PPP: 30 нМ

рекомбинантного тканевого фактора, 24 мкМ фосфолипидов в HEPES) используются для запуска реакции коагуляции. Реакцию осуществляют в присутствии различных концентраций тестируемого вещества или соответствующего растворителя. Кроме того, используется калибратор тромбина фирмы Thrombinoscope, амидолитическая активность которого необходима для расчета активности тромбина в образце плазмы.

Испытание осуществляют согласно спецификациям производителя (Thrombinoscope BV): 4 мкл тестируемого вещества или растворителя, 76 мкл плазмы и 20 мкл реагента PPP или калибратора тромбина инкубируют при 37°C в течение 5 мин. После добавления 20 мкл 2,5 мМ субстрата тромбина в 20 мМ HEPES, 60 мг/мл BSA, 102 мМ хлорида кальция генерацию тромбина измеряют каждые 20 с в течение 120 мин. Измерение проводят с помощью флуориметра (Fluoroskan Ascent) от Thermo Electron, оснащенного парой фильтров 390/460 нм и дозатором. С помощью программного обеспечения фирмы Thrombinoscope рассчитывается тромбограмма и представляется графически. Рассчитываются следующие параметры: время задержки, время достижения пика, пик, ETP (эндогенный потенциал тромбина) и начало шлейфа.

#### **a.7) Определение антикоагулянтной активности**

Антикоагулянтную активность исследуемых веществ определяют *in vitro* в плазме человека, плазме кролика и плазме крыс. С этой целью кровь отбирают при соотношении смешивания цитрат натрия/кровь 1/9, используя в качестве ресивера 0,11-молярный раствор цитрата натрия.

Сразу после забора крови ее тщательно перемешивают и центрифугируют при примерно 4000 g в течение 15 минут. Супернатант отбирают пипеткой.

Протромбиновое время (РТ, синонимы: тромбопластиновое время, быстрый тест) определяют в присутствии различных концентраций тестируемого вещества или соответствующего растворителя с использованием коммерческого тест-набора (Neoplastin® от Boehringer Mannheim или Hemoliance® RecombiPlastin от Instrumentation Laboratory). Испытуемые соединения инкубируют с плазмой при 37 °С в течение 3 минут. Затем коагуляцию начинают добавлением тромбопластина, и определяют время, когда происходит коагуляция. Определяют концентрацию тестируемого вещества, вызывающую удвоение протромбинового времени.

Тромбиновое время (ТТ) определяется в присутствии различных концентраций тестируемого вещества или соответствующего растворителя с использованием коммерческого тест-набора (тромбиновый реагент от Roche). Тестируемые соединения инкубируют с плазмой при 37 °С в течение 3 минут. Затем коагуляцию начинают добавлением тромбинового реагента, и определяют время, когда происходит коагуляция. Определяют концентрацию тестируемого вещества, вызывающую удвоение тромбинового времени.

Активированное частичное тромбиновое время (АРТТ) определяется в присутствии различных концентраций тестируемого вещества или соответствующего растворителя с использованием коммерческого тест-

набора (реагента РТТ от Roche). Тестируемые соединения инкубируют с плазмой и реагентом РТТ (цефалин, каолин) при 37 °С в течение 3 минут. Затем коагуляцию начинают добавлением 25 мМ хлорида кальция, и определяют время, когда происходит коагуляция. Определяют концентрацию тестируемого вещества, вызывающую удвоение АРТТ.

#### **а.8) Тромбоэластография (тромбоэластограмма)**

Тромбоэластографию проводят с помощью тромбоэластографа ROTEM фирмы Pentapharm и его аксессуаров — чашечки и штифта. Измерение проводится на цельной крови, предварительно отобранной в моноветт с цитратом натрия от Sarstedt. Кровь в моноветтах перемешивают с помощью шейкера и предварительно инкубируют при 37°С в течение 30 мин. Готовят 2-молярный исходный раствор хлорида кальция в воде. Его разбавляют в соотношении 1:10 водным раствором хлорида натрия концентрацией 0,9%. Для измерения в чашки изначально загружают 20 мкл 200 мМ раствора хлорида кальция (конечная концентрация хлорида кальция 12,5 мМ). Добавляют 3,2 мкл вещества или растворителя. Измерение начинают посредством добавления 300 мкл цельной крови. После добавления кончиком пипетки смесь ненадолго набирают в пипетку и снова выпускают без образования пузырьков воздуха. Измерение проводят в течение 2,5 часов или прекращают, когда начинается фибринолиз. Для оценки определяют следующие параметры: СТ (время свертывания/[сек]), CFT (время образования сгустка/[сек]), MCF (максимальная уплотненность сгустка/[мм]) и угол альфа [°]. Точки измерения определяются каждые 3 секунды и представляются

графически: ось Y соответствует MCF [мм], а ось X — времени [сек].

#### **а.9) Ингибирование происходящей коагуляции**

Тестируемые соединения растворяют в виде 10 мМ исходного раствора в диметилсульфоксиде и готовят серийные разведения от 0,018 до 600 мкМ с помощью диметилсульфоксида.

В белый 384-луночный планшет (Lumitrac 200, Greiner) 20 мкл Octaplas (Octapharm), добавляют 10 мкл дистиллированной воды, 10 мкл Pefabloc FG (DSM, 24 мМ) и 10 мкл флюорогенного тромбинсубстрата (BACHEM, I-1560, 300 мкМ). Для инициации коагуляции добавляют 10 мкл смеси тканевого фактора (Instrumentation Laboratory, Recombiplastin 2G, 0,06%) и  $\text{CaCl}_2$  (40 мМ). Сигнал флуоресценции, генерируемый расщеплением субстрата, измеряют с помощью Tecan Infinite M1000 Pro каждые 30 сек в течение 20 мин при 37°C, длине волны возбуждения 340 нм и длине волны излучения 460 нм. После удвоения сигнала флуоресценции в каждую лунку добавляют по 1 мкл раствора соединения в диметилсульфоксиде и продолжают измерение. Может ли тестируемое соединение ингибировать происходящую коагуляцию, определяется наклоном сигнала флуоресценции после добавления соединения.

**а.10) Ингибирование агрегации тромбоцитов, инициируемой  
тканевым фактором**

Цельную кровь собирают посредством венепункции у здоровых людей мужского и женского пола. Образцы помещают в пробирки-вакуумные контейнеры, содержащие 1/10 объема 3,12% тринатрийцитрата, и получают богатую тромбоцитами плазму (PRP) посредством немедленного центрифугирования крови при 140 g в течение 20 минут при 20°C.

Для корректировки количества тромбоцитов PRP разбавляют бедной тромбоцитами плазмой до 300 000–350 000 тромбоцитов/мкл. Бедную тромбоцитами плазму получают центрифугированием PRP при 1000 g в течение 20 минут при 20°C. Pefabloc FG (Pentapharm, Базель, Швейцария) растворяют в деминерализованной воде (2 мг/мл; конечная концентрация) и добавляют для предотвращения полимеризации фибрина. После добавления CaCl<sub>2</sub> (7 ммоль/л, конечная концентрация) аликвоты (178 мкл) незамедлительно помещают в агрегометр (Apact 4, DiaSys Greiner, Флахт, Германия). В образцы добавляют 2 мкл возрастающих концентраций тестируемого соединения (концентрации в плазме 0,3-10 мкмоль/л) или носителя и инкубируют в течение 3 минут при 37°C. Агрегацию тромбоцитов индуцируют добавлением 20 мл тканевого фактора (RecombiPlasTin 2G; Instrumentation Laboratory), растворенного в водном растворе 10 ммоль/л CaCl<sub>2</sub> (согласно инструкции производителя). Индивидуальные концентрации тканевого фактора (разведение 1:10-1:2500 раствором CaCl<sub>2</sub> 10 ммоль/л) используются для достижения минимальной концентрации тканевого фактора для каждого эксперимента,

приводящей к максимальной агрегации. Агрегацию измеряют турбидиметрическим методом и регистрируют в течение 10 минут, и ответную реакцию агрегации оценивают как площадь под кривой концентрация-время. Значения  $IC_{50}$  рассчитывают с использованием теста Больцмана (GraphPad Prism).

**а.11) Ингибирование коагуляции цельной крови, индуцированной LPS или *Staphylococcus aureus*, инактивированной нагреванием**

$10^{10}$  клеток убитого нагреванием *Staphylococcus aureus* (InvivoGen) растворяют в 1 мл воды и растворы, содержащие от  $10^9$  до  $10^6$  клеток, готовят посредством разведения в водном 0,9% растворе NaCl. Липополисахарид (LPS, Sigma) растворяют в 0,9% водном растворе NaCl с получением раствора с концентрацией 0,005 мг/мл.

Свежую цельную кровь собирают посредством венепункции у здоровых людей мужского и женского пола в пробирки-вакуумные контейнеры, содержащие 1/10 объема 3,12% тринатрийцитрата. 10 мкл раствора испытуемого соединения (0-20 мкМ, конечная концентрация) в диметилсульфоксиде и 10 мкл триггерных растворов, содержащих убитый нагреванием *Staphylococcus aureus* или LPS, добавляют к 980 мкл цитратной цельной крови, осторожно перемешивают и инкубируют в течение 4 ч при 37°C.

В кюветы добавляют 150 мкл смеси и 20 мкл 0,1 М раствора хлорида кальция для начала измерения времени свертывания (Apact 4, DiaSys

Greiner, Флахт, Германия). Время свертывания контрольных образцов и образцов соединений в различных концентрациях сравнивается для расчета концентрации, необходимой для удвоения времени свертывания, с помощью GraphPad Prism.

#### **a.12) Влияние на целостность эндотелиального слоя в присутствии тромбина**

50 мкл базальной среды-2 эндотелиальных клеток (EBM-2), дополненной рекомбинантным эпидермальным фактором роста человека (hEGF), человеческим основным фактором роста фибробластов с гепарином (hFGF-B), фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), аскорбиновой кислотой, гидрокортизоном, человеческим рекомбинантным инсулиноподобным фактором роста (длинный R3-IGF-1), гепарином, GA-1000 и 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS) заполняют в каждую лунку E-Plate 96 (OLS Omni Life, Германия), который затем помещается на прибор ACEA-Xcelligence RTCA (Agilent, США) для измерения фонового импеданса среды.

Криоконсервированные пулы эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC; Lonza, Германия; C2519a) размножают и поддерживают в базальной среде-2 эндотелиальных клеток (EBM-2), дополненной человеческим рекомбинантным эпидермальным фактором роста (hEGF), человеческим основным фактором роста фибробластов с гепарином (hFGF-B), фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), аскорбиновой кислотой, гидрокортизоном, человеческим рекомбинантным

инсулиноподобным фактором роста (длинный R3-IGF-1), гепарином, GA-1000 и 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS) . Клетки культивируют при 37°C во влажном воздухе, содержащем 5% CO<sub>2</sub>.

В каждую лунку добавляют по 50 мкл среды, содержащей 20 000 клеток на пассаже 3. Планшет выдерживают при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов в инкубаторе прибора Xcelligence RTCA. Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл раствора испытуемого соединения в диметилсульфоксиде или только диметилсульфоксид и измеряют импеданс каждые 5 минут в течение 30 минут. Затем добавляют 40 мкл раствора тромбина (конечная концентрация 0,1 Ед/мл) и импеданс снова измеряют каждые 5 мин в течение 190 мин.

Сила клеточной адгезии представляется посредством программного обеспечения RTCA как клеточный индекс и сравнивается между различными концентрациями соединений с пустыми экспериментами с использованием Graphpad Prism.

## **b) Определение антитромботической активности (*in vivo*)**

### **b.1) Модель артериовенозного шунта и кровотечения (комбинированная модель кролика)**

Кроликов-самцов (Новозеландский белый кролик; Crl:KBL(NZW) массой 2700-3500 г анестезируют 2% ксилазином (Rompun, Bayer Vital) и 100 мг/мл кетамином (Ketaset, Zoetis). Образование тромба инициируется в

артериовенозном шунте по методу, описанному Christopher N. Berry и др., *Br. J. Pharmacol.* (1994), 113, 1209-1214. Для этой цели рассекают левую лицевую вену и правую сонную артерию. Для соединения обоих сосудов используется экстракорпоральный шунт из полиэтиленовой трубки длиной 10 см. Данную трубку помещают в другую полиэтиленовую трубку длиной 4 см (PE 240), содержащую нейлоновую нить длиной 6 см (диаметром 0,14 мм), обработанную наждачной бумагой и сложенную в форме петли 3 см. Данная нить обеспечивает тромбогенную поверхность, необходимую для индукции коагуляции. Экстракорпоральное кровообращение поддерживают в течение 15 мин, затем удаляют шунт и взвешивают нейлоновую нить вместе с тромбом. Исходную массу самой нейлоновой нити определяют до начала эксперимента. Для определения времени кровотечения стерильным скальпелем производят разрез на 0,5 см рядом с периферической ушной веной. Каждые 30 с кровь протирают фильтровальной бумагой до прекращения кровотечения. Тестируемые соединения вводят в виде непрерывной внутривенной инфузии за 30 минут до открытия артериовенозного шунта через бедренную вену.

## **b.2) Определение эффективности на эндотоксиновых моделях (*in vivo*)**

### **b.2.1) Индуцированная LPS эндотоксиновая кролик-модель**

Эксперимент проводят на анестезированных кроликах-самцах (Новозеландский белый кролик). Анестезию выполняют внутримышечной инъекцией 5 мг/кг 2% ксилазина (Rompun, Bayer Vital) и 40 мг/кг 100 мг/мл

кетамин (Ketavet, Pfizer) с последующей непрерывной инфузией 2% ксилазина (Rompun, Bayer Vital) и кетамин 100 мг/мл (Ketavet, Pfizer).

Для индукции эндотоксинемии через левую бедренную вену непрерывно вводят 100 мкг/кг/ч липополисахарида из *E. coli* (LPS 055:B5; Sigma-Aldrich; LOT 025M4040V) в течение 8 часов. Испытуемые соединения непрерывно вводят через правую бедренную вену. Для непрерывного измерения параметров гемодинамики, таких как частота сердечных сокращений и артериальное давление, в левую бедренную артерию имплантируют катетер с микронаконечником для отслеживания давления (SPR-595; Millar Instruments). Образцы артериальной крови собирают один раз в час через правую бедренную артерию в течение 8 часов. Параметры считывания, полученные из образцов цельной крови, включают количество клеток крови (тромбоциты, лейкоциты, эритроциты), параметры коагуляции (PT, aPTT) и ротационную тромбоэластографию (ROTEM). Плазму производят из части цельной крови для определения маркеров воспаления (IL-6, TNF-альфа), уровней фибриногена и биомаркеров поражения органов-мишеней, таких как сывороточный креатинин или ферменты печени, такие как ALT и AST.

#### **b.2.2) Бобуин-модель с сепсисом, вызванным инфузией инактивированного нагреванием *Staph. Aureus***

Животных не кормят в течение 12 часов перед процедурой и дают пить воду без ограничения. Каждое животное идентифицируют своим уникальным номером в виде татуировки. Животных взвешивают перед

экспериментом для расчета подходящей дозы анестетика и бактериемического заражения.

Сначала животным вводят седативное средство гидрохлорид кетамина (14-20 мг/кг/внутримышечно), затем анестезируют пентобарбиталом натрия (25 мг/кг/внутривенно), вводя каждые 30 минут или по мере необходимости для поддержания анестезии, контролируя рефлексы век и пальцев ног. За анестезированными животными ведется постоянное наблюдение, и во время процедуры присутствуют в готовности соответствующие уровни анестезии и жизнеобеспечения. Во время анестезии животных переворачивают со стороны на сторону в середине 8-10-часовой анестезии, чтобы предотвратить гипостатический застой в легких. Внутривенный катетер устанавливается для обеспечения доступа жидкостей и лекарств. Для минимизации влияния анестезии на гидратацию и восполнения потери объема крови из-за забора крови во время 8-10 часовой анестезии вводят физиологический раствор со скоростью ~5 мл/кг/час. Если необходимо, для предотвращения аспирационной пневмонии и обеспечения искусственного дыхания проводится пероральная интубация под анестезией с использованием видеоларингоскопа King Vision. Под контролем ультразвука в плечевую вену имплантируют венозный катетер размера 18-20 (короткий катетер) для бактериальной инфузии, а внутренний катетер размера 18-20 (длинный катетер) имплантируют в подкожную вену для инфузии тестируемых соединений.

Чтобы предотвратить переохлаждение, животных помещают на площадку, подогреваемую рециркуляцией воды (37°C), и на все конечности надевают рукава/носки, чтобы поддерживать животное в тепле.

Инактивированный нагреванием *S. aureus* (штамм B17266 Rosenbach; ATCC 49496) вводят в дозе  $3 \times 10^{10}$  бактерий/кг в 1,5 мл/кг стерильного физиологического раствора внутривенно в виде медленной непрерывной инфузии в течение 2 часов. Проводят заборы крови. Под анестезией образцы крови собираются через T0, 2, 4, 6 и 8 часов после бактериального заражения. Для всех экспериментов кровь также берут через 24 и 48 часов перед эвтаназией. Образцы крови объемом 5–10 мл берут из постоянного катетера подкожной вены или путем венепункции. Образцы крови анализируют на наличие маркеров воспаления и свертывания крови.

### **с) Определение фармакокинетических свойств тестируемых соединений**

#### **с.1) Фармакокинетические/фармакодинамические исследования на мини-свиньях**

Самцов или самок мини-свиней Геттингена (Эллегард) анестезируют внутримышечной инъекцией 20 мг/кг кетамина (Ketaset, Zoetis), 8 мг/кг азаперона (Stresnil, Elanco) и 0,03 мг/кг атропинсульфата (Атропин, B. Braun). Анестезию поддерживают болюсной инъекцией кетамина 3 мг/кг и мидазолама 0,5 мг/кг (Дормикум, Chelpharm) в периферическую ушную

вену с последующей непрерывной инфузией 22 мг/кг/ч кетамина и 3,4 мг/кг/ч мидазолама. Трахеальную трубку (Super Safety Clear, внутренний диаметр 4 мм; Rüsch) имплантируют для обеспечения механической вентиляции (Avance CS<sup>2</sup>; GE Healthcare). Перед интубацией в периферическую ушную вену вводят болюсную инъекцию 0,03 мг/кг панкурония (Inresa) для индукции мышечной релаксации. Для поддержания мышечной релаксации проводят постоянную внутривенную инфузию 0,3 мг/кг/ч панкурония. Для поддержания гидратации животных вводят внутривенно раствор Рингера-Лактата.

Тестируемые соединения непрерывно вливают через правую бедренную вену в период до 180 мин. Артериальную кровь собирают для определения коагуляции цельной крови (PT, aPTT) и для фармакокинетического анализа после осаждения 3 частями ацетонитрила. После прекращения инфузии тестируемого соединения проводят дополнительные заборы крови для мониторинга фармакологического и фармакокинетического периода полувыведения испытуемых соединений.

## **с.2) Фармакокинетические/фармакодинамические исследования на кроликах**

Кроликов-самцов (Новозеландский белый) анестезируют внутримышечной инъекцией 5 мг/кг ксилазина (Rompun, Bayer Vital) и 40 мг/кг кетамина (Ketaset, Zoetis). Анестезию поддерживают постоянной внутривенной инфузией ксилазина и кетамина через правую периферическую ушную вену. Испытываемые соединения непрерывно вливают через правую

бедренную вену в период до 120 мин. Артериальную кровь собирают через сонную артерию для определения параметров коагуляции (РТ, аРТТ) и для фармакокинетического анализа после осаждения 3 частями ацетонитрила. После прекращения инфузии тестируемого соединения проводят дополнительные заборы крови для мониторинга фармакологического и фармакокинетического периода полувыведения тестируемых соединений.

#### **d) Стабильность**

##### **d.1) Гидролитическая стабильность**

0,15 мг тестируемого соединения растворяют в 0,1 мл диметилсульфоксида и 0,4 мл ацетонитрила. Для полного растворения флакон для ВЭЖХ с раствором образца встряхивают и обрабатывают ультразвуком. Затем добавляют 1,0 мл соответствующего буферного раствора (например, цитратный буфер рН 4, цитратный буфер рН 5, фосфатно-солевой буфер рН 6,5, фосфатно-солевой буфер 7,4) и образец перемешивают на вортексе. Раствор образца анализируют с помощью ВЭЖХ для определения количества тестируемого соединения и до двух побочных продуктов в определенный момент времени в течение 24 часов при 37°C. Значения  $t(0)$  получены из образца, взятого сразу после перемешивания на вортексе с буфером при комнатной температуре. Площади пиков (в процентах) используются для количественного определения. Анализы ВЭЖХ, ЖХ/МС: Исходный материал анализируют

на чистоту с помощью ВЭЖХ. 24-часовой образец дополнительно анализируют методом ЖХ/МС.

Условия ВЭЖХ: Колонка: Nucleodur 100 C18ec 3 мкм 50 x 2 мм; температура: 37°C; Различные градиентные системы с 1 мл TFA/л воды и 1 мл TFA/л ацетонитрила.

Репрезентативные данные о гидролитической стабильности из данного испытания в цитратном буфере pH 4 приведены в таблицах 4a и 4b ниже:

Таблица 4a:

Сравнительное соединение №	Степень извлечения [%] 1 ч	Степень извлечения [%] 2 ч	Степень извлечения [%] 4 ч	Степень извлечения [%] 24 ч
Сравнительное соединение 1	100	100	100	100
Сравнительное соединение 4	100	100	100	100
Сравнительное соединение 14	100	100	99	97
Сравнительное соединение 15	100	100	100	100

Таблица 4b

Пример №	Степень извлечения [%] 1 ч	Степень извлечения [%] 2 ч	Степень извлечения [%] 4 ч	Степень извлечения [%] 24 ч
Пример 1	101	100	100	98
Пример 2	100	100	99	97

Репрезентативные данные о гидролитической стабильности из данного испытания в PBS буфере pH 7,4 приведены в таблицах 5a и 5b ниже:

Таблица 5a:

Сравнительное соединение №	Степень извлечения [%] 1 ч	Степень извлечения [%] 2 ч	Степень извлечения [%] 4 ч	Степень извлечения [%] 24 ч
Сравнительное соединение 1	97	98	99	99
Сравнительное соединение 4	99	98	96	82

Таблица 5b

Пример №	Степень извлечения [%] 1 ч	Степень извлечения [%] 2 ч	Степень извлечения [%] 4 ч	Степень извлечения [%] 24 ч
Пример 1	93	83	69	9
Пример 2	90	84	69	10

### **d.2) Гидролитическая стабильность**

Различные водные растворы (вода, 0,1 М HCl, буфер pH 10 и буфер pH 7) лекарственного вещества (0,25 мг/мл лекарственного вещества в 50% водном растворе и 50% тетрагидрофурана, ацетонитрила, метанола или цитратного буфера pH 4 для улучшения растворимости) хранят 24 часа при 70°C и одну неделю при комнатной температуре. Кроме того, для каждого стрессового раствора готовят контрольные растворы, чтобы однозначно идентифицировать пики разложения посредством сравнения соответствующих хроматограмм. Растворы до и после хранения вводятся непосредственно в ВЭЖХ без дополнительной обработки. Для оценки данных соответствующие хроматограммы интегрируют и сравнивают друг с другом. В зависимости от образовавшегося количества органических примесей (<2%, 2–5% или >5%) стабильность характеризуют дескрипторами «стабильный», «слегка нестабильный» или «нестабильный».

### **d.3) Стабильность плазмы**

Подготовка образцов для определения стабильности плазмы выполняется вручную или с помощью роботизированной системы Hamilton.

Описание анализа с ручной подготовкой образцов:

1 мг тестируемого соединения растворяют в 0,5 мл смеси ацетонитрил/диметилсульфоксид (возможно различное соотношение) Для полного

растворения флакон для ВЭЖХ встряхивают и обрабатывают ультразвуком. 20 мкл данного раствора, содержащего тестируемое соединение, добавляют к 1 мл плазмы, температуру которой поддерживают на 37°C, и смесь непосредственно перемешивают на вортексе. Через 0,17, 0,5, 1, 1,5, 2 и 4 часа ферментативную реакцию останавливают добавлением 100 мкл раствора соединения в плазме во флакон, содержащий 300 мкл ацетонитрил/цитратного буфера с рН 3 (80:20) или ацетонитрила при комнатной температуре или при 10°C. Смесь центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант анализируют с помощью ВЭЖХ для определения количества тестируемого соединения и до двух побочных продуктов. Значения  $t(0)$  получены из обработанного образца, взятого сразу после перемешивания на вортексе с плазмой при комнатной температуре. Площади пиков (в процентах) используются для количественного определения. Анализы ВЭЖХ, ЖХ/МС: Исходный материал анализируют на чистоту с помощью ВЭЖХ. 4-часовой образец дополнительно анализируют методом ЖХ/МС.

Описание анализа с автоматической подготовкой образца (Hamilton Starlet и H-Motion-System):

1 мг испытуемого соединения вручную растворяют в 0,5 мл смеси ацетонитрил/ диметилсульфоксид (возможно различное соотношение) Для полного растворения флакон для ВЭЖХ вручную встряхивают и обрабатывают ультразвуком. Затем с помощью робота выполняются стадии автоматического пипетирования следующим образом: 20 мкл данного раствора, содержащего тестируемое соединение, добавляют к 1

мл плазмы, температуру которой поддерживают на 37°C, и смешивают пипеткой. Через 0,17, 0,5, 1, 1,5, 2 и 4 часа ферментативную реакцию останавливают добавлением 100 мкл раствора соединения в плазме во флакон, содержащий 300 мкл ацетонитрил/цитратного буфера с рН 3 (80:20) или ацетонитрил при 10°C. Смесь центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 минут при 10°C. Супернатант анализируют с помощью ВЭЖХ для определения количества тестируемого соединения и до двух побочных продуктов. Значения  $t(0)$  получены из обработанного образца, взятого сразу после перемешивания на вортексе с плазмой при комнатной температуре. Площади пиков (в процентах) используются для количественного определения. Анализы ВЭЖХ, ЖХ/МС: Исходный материал анализируют на чистоту с помощью ВЭЖХ. 4-часовой образец дополнительно анализируют методом ЖХ/МС.

Условия ВЭЖХ: Колонка: Nucleodur 100 C18ec 3 мкм 50 x 2 мм; температура: 37°C; Различные градиентные системы с 1 мл TFA/л воды и 1 мл TFA/л ацетонитрила.

Репрезентативные данные о стабильности человеческой плазмы из данного испытания приведены в таблицах 6a и 6b ниже:

Таблица 6а:

Сравнительное соединение №	Степень извлечения [%] 0,17 ч	Степень извлечения [%] 0,50 ч	Степень извлечения [%] 1,0 ч	Степень извлечения [%] 1,5 ч	Степень извлечения [%] 2,0 ч	Степень извлечения [%] 4,0 ч
Сравнительное соединение 1	99	100	98	99	98	99
Сравнительное соединение 4	100	98	96	93	90	79
Сравнительное соединение 9	100	98	91	88	84	68
Сравнительное соединение 10	98	91	82	72	62	39
Сравнительное соединение 14	97	90	82	73	66	43
Сравнительное соединение 15	100	99	95	94	90	78

Таблица 6б

Пример №	Степень извлечения [%] 0,17 ч	Степень извлечения [%] 0,50 ч	Степень извлечения [%] 1,0 ч	Степень извлечения [%] 1,5 ч	Степень извлечения [%] 2,0 ч	Степень извлечения [%] 4,0 ч
Пример 1	95	88	76	65	55	27
Пример 2	97	90	79	68	59	32

#### **d.4) Стабильность плазмы и крови**

Стабильность плазмы и крови исследовали на мышах, крысах, собаках, кроликах, мини-свиньях, обезьянах и людях с использованием 1 мл обработанной гепарином лития плазмы или крови с номинальной тестируемой концентрацией 1000 мкг/л при 37°C в течение 5 часов. В

моменты времени 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 3 и 5 часов аликвоту объемом 50 мкл осаждают 150 мкл ацетонитрила + 1% муравьиной кислоты, к которой добавляют два внутренних стандарта. После перемешивания на вортексе и центрифугирования в течение 10 мин при 1300 g аликвоту 50 мкл супернатанта разбавляют 1/10 10 мМ аммонийно-ацетатным буфером при pH 3 и анализируют с помощью ЖХ-МС/МС. Профиль концентрация-время описывают в Excel, и выполняют соответствующий расчет периода полувыведения с использованием  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .

#### **d.5) Пер-окислительная стабильность**

Лекарственное вещество выдерживают в пер-окислительных условиях (0,25 мг/мл лекарственного вещества в 50% цитратного буфера pH 4, содержащего 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и 50% тетрагидрофурана, ацетонитрила, метанола или цитратного буфера pH 4 для улучшения растворимости) в течение 24 часов при комнатной температуре. Кроме того, готовят те же растворы без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и выдерживают их при комнатной температуре в течение 24 часов. Кроме того, для каждого стрессового раствора готовят контрольные растворы, чтобы однозначно идентифицировать пики разложения посредством сравнения соответствующих хроматограмм. После выдерживания растворы с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> гасят платиной, чтобы остановить дальнейшие реакции H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Растворы до и после выдерживания (включая гашение) непосредственно впрыскивают в ВЭЖХ без дополнительной обработки. Для оценки данных соответствующие хроматограммы интегрируют и сравнивают друг с другом. В зависимости от образовавшегося количества органических примесей (<2%, 2–5% или >5%)

стабильность характеризуют дескрипторами «стабильный», «слегка нестабильный» или «нестабильный».

#### **d.6) Формальдегидная стабильность**

Лекарственное вещество выдерживают в пер-окислительных условиях (0,25 мг/мл лекарственного вещества в 50% цитратного буфера pH 4, содержащего 3%  $\text{CH}_2\text{O}$ , и 50% тетрагидрофурана, ацетонитрила, метанола или цитратного буфера pH 4 для улучшения растворимости) в течение 24 часов при комнатной температуре. Кроме того, готовят те же растворы без  $\text{CH}_2\text{O}$  и выдерживают их при комнатной температуре в течение 24 часов. Кроме того, для каждого стрессового раствора готовят контрольные растворы, чтобы однозначно идентифицировать пики разложения посредством сравнения соответствующих хроматограмм. Растворы до и после хранения вводятся непосредственно в ВЭЖХ без дополнительной обработки. Для оценки данных соответствующие хроматограммы интегрируют и сравнивают друг с другом. В зависимости от образовавшегося количества органических примесей (<2%, 2–5% или >5%) стабильность характеризуют дескрипторами «стабильный», «слегка нестабильный» или «нестабильный».

#### **d.7.) Термическая стабильность**

Лекарственное вещество хранят в твердом виде при температуре 90°C в течение суток и одной недели и в течение одной недели при температуре 60°C. После хранения образцы растворяют в тетрагидрофуране с

концентрацией 0,25 мг/мл. Данные растворы вводят в ВЭЖХ. Для оценки данных соответствующие хроматограммы интегрируют и сравнивают друг с другом. В зависимости от образовавшегося количества органических примесей (<2%, 2–5% или >5%) стабильность характеризуют дескрипторами «стабильный», «слегка нестабильный» или «нестабильный».

### **е.1.) Растворимость**

Суспензии лекарственного вещества до 12,5 мг/мл перемешивают в воде, 0,1М HCl, Буфере рН 2, Буфере рН 3, Буфере рН 4, Буфере рН 4,5, Буфере рН 5, Буфере рН 6, Буфере рН 7, Буфере рН 8, ацетонитриле и 0,9% растворе NaCl при 25°C в течение 24 часов  $\pm$  4 часов перед фильтрацией и анализом с помощью ВЭЖХ, за исключением полностью растворенных образцов, для которых указана растворимость «> 12500 мкг/мл».

Для анализа ВЭЖХ образцы разбавляют растворителем в соотношении 1:10 и 1:100, чтобы соответствовать калибровке. Кроме того, готовят три раствора стандартов для калибровочной кривой, имеющие концентрацию 500 мкг/мл (5 мг/10 мл), 50 мкг/мл (1 мг/20 мл) и 1 мкг/мл (0,4 мл смеси 50 мкг/мл стандарта/20 мл). Все растворы образцов и стандартов вводятся в ВЭЖХ в определенном порядке. Растворимость определяют посредством сравнения общей площади пика вещества в образце с калибровочной кривой (внешний стандарт).

Также проводится SST (тест на пригодность системы) с растворами стандартов, который должен соответствовать следующим требованиям:

Минимум 6 инъекций одного и того же стандарта должны иметь коэффициент вариации  $\leq 2,0\%$ .

Минимум 4 инъекций калибровочных стандартов должны иметь точность  $\leq 5,0\%$ .

Участок нелинейной калибровочной кривой должен быть  $\leq 3,0\%$ .

Калибровочная кривая для расчета должна проходить через ноль.

Расчеты растворимости выполняются с использованием наименее разбавленной пробы, находящейся в пределах калибровочных точек.

Используются следующие буфферы:

<b>pH 2,0</b>	30 мМ (цитратный)	Fluka 31045 (6,43 г лимонной кислоты + 3,58 г NaCl + 0,30 г HCl в 1 л воды)
<b>pH 3,0</b>	40 мМ (цитратный)	Fluka 31046 (6,43 г лимонной кислоты + 3,49 г NaCl + 0,82 NaOH в 1 л воды)
<b>pH 4,0</b>	50 мМ (цитратный)	9,61 г лимонной кислоты + 6,00 г NaCl + 62,5 мл 1н NaOH в 1 л воды
<b>pH 4,5</b>	50 мМ (ацетатный)	2,9 г $\text{NaCH}_3\text{COO} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ + 1,66 мл ледяной уксусной кислоты в 1 л воды
<b>pH 5,0</b>	50 мМ (цитратный)	9,61 г лимонной кислоты + 6,00 г NaCl + 105 мл 1н NaOH в 1 л воды
<b>pH 6,0</b>	50 мМ (цитратный)	9,61 г лимонной кислоты + 6,00 г NaCl + 140 мл 1н NaOH в 1 л воды
<b>pH 7,0</b>	67 мМ (фосфатный)	3,52 г $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 7,26 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды
<b>pH 8,0</b>	67 мМ (фосфатный)	0,34 г $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 11,43 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды
<b>0,9% NaCl</b>	0,9% (NaCl)	9,0 г NaCl в 1 л воды

Растворимость/стабильность в цитратном буфере pH 4

Растворимость лекарственного вещества определяют визуально, растворяя 4 мг вещества в 50 мкл цитратного буфера pH 4. Затем добавляют лекарственное вещество до достижения концентрации 400 мг/мл или до образования суспензии. За раствором наблюдают в течение семи дней для обнаружения потенциального образования осадка. Через семь дней раствор разбавляют до 10 мг/мл и исследуют стабильность.

Стабильность лекарственного вещества исследуют методами ВЭЖХ и ЖХ/МС. Содержание и разложение исследуют с помощью внешнего стандарта. Для проведения исследования образец разбавляют до концентрации 0,1 мг/мл и готовят два раствора стандарта (120 мкг/мл и 50 мкг/мл). Все растворы образцов и стандартов вводятся в ВЭЖХ в определенном порядке. Содержание определяют посредством сравнения общей площади пика вещества с калибровочной кривой (внешний стандарт). Степень разложения указывается как % площади от всей хроматограммы образца. Кроме того, образец исследуют методом ЖХ/МС для определения продуктов разложения.

## **е.2.) Растворимость**

25 мг соединения помещают в 2 мл растворителя. В зависимости от растворимости соединения в растворителе (выше или ниже 12,5 мг/мл) образуется раствор или суспензия. Данный раствор или суспензию перемешивают при 25°C в течение 24 ± 4 часов. После этого раствор или суспензию фильтруют, а оставшийся раствор анализируют с помощью ВЭЖХ. Растворимость определяют посредством сравнения общей

площади пика вещества с калибровочной кривой (внешний стандарт). Степень разложения указывается как % площади от всей хроматограммы образца и используется как дескриптор гидролиза сложного эфира. Растворителями, протестированными при оценке растворимости, являются водные буферы (диапазон pH от 1 до 8), изотонический солевой раствор и ацетонитрил.

Пример 2: 440 мг соединения примера 2 поместили в 0,5 мл цитратного буфера. Полученный раствор имел объем примерно 0,9 мл и был подвергнут перемешиванию при 25°C в течение 24 ч ± 4 ч. После этого раствор центрифугировали и анализировали с помощью ВЭЖХ. Растворимость определяли посредством сравнения общей площади пика вещества с калибровочной кривой (внешний стандарт). Измерения проводились при трехкратном повторении. Растворимость соединения из примера 2 в цитратном буфере pH 4 составила >500 мг/мл.

#### **f) Ингибирование CYP**

Потенциал тестируемых соединений ингибировать CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 и CYP3A4 человека будет исследован с использованием объединенных микросом печени человека в качестве источника ферментов и соответствующих стандартных субстратов. Ингибирующие эффекты определяют при 6 концентрациях (0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 мкМ) тестируемого соединения и сравнивают со степенью образования метаболита в отсутствие потенциального ингибитора. В конце рассчитывают значения IC<sub>50</sub>. Стандартный ингибитор, ингибирующий

исключительно одну изоформу CYP, всегда включается, чтобы гарантировать сопоставимость результатов в разных сериях экспериментов. Методика анализа: Инкубация фенацетина, амодиахина, диклофенака, декстрометорфана и мидазолама с микросомами печени человека в присутствии шести концентраций потенциального ингибитора. Стандартные инкубационные смеси содержали 1 мМ НАДФ, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ глюкозо-6-фосфата, 1,5 ед/мл глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) в общем объеме 200 мкл. Тестируемые соединения растворяют в ацетонитриле. 96-Луночные планшеты инкубируют в течение соответствующего периода времени при 37°C и реакции останавливают добавлением 100 мкл ацетонитрила, содержащего соответствующий внутренний стандарт. Осажденные белки удаляют центрифугированием луночного планшета (3000 об/мин, 10 мин). Супернатанты объединяют и анализ проводят с помощью ЖХ-МС/МС или RapidFire-МС/МС.

Репрезентативные данные об ингибировании CYP из данного испытания приведены в таблицах 7a и 7b ниже:

Таблица 7а:

Сравнительное соединение №	CYP3A4 IC50 [мкМ]	CYP1A2 IC50 [мкМ]	CYP2C8 IC50 [мкМ]	CYP2C9 IC50 [мкМ]	CYP2D6 IC50 [мкМ]
Сравнительное соединение 9	0,37	> 20	0,34	2,32	1,66
Сравнительное соединение 10	4,07	> 20	> 20	> 20	> 20
Сравнительное соединение 11	6,90	> 20	> 20	> 20	> 20
Сравнительное соединение 14	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
Сравнительное соединение 15	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20

Таблица 7b

Пример №	CYP3A4 IC50 [мкМ]	CYP1A2 IC50 [мкМ]	CYP2C8 IC50 [мкМ]	CYP2C9 IC50 [мкМ]	CYP2D6 IC50 [мкМ]
Пример 1	14,93	> 20	> 20	> 20	> 20
Пример 2	18,49	> 20	> 20	> 20	> 20

### **g) Индукция CYP**

Человеческие гепатоциты высеивают с плотностью ~ 10 000 клеток/384 лунки в 3D и культивируют в течение одного дня перед обработкой соединением. Клетки обрабатывают 1:3 серийным разведением 8 концентраций в течение двух дней подряд с ежедневной сменой среды. После 48 часов обработки соединением клетки лизируют и мРНК получают

с помощью современного метода магнитных шариков. После выделения мРНК кДНК транскрибируют непосредственно из шариков, покрытых мРНК, и далее обрабатывают для кПЦР. Относительные уровни экспрессии СУР определяют с помощью зондов TaqMan посредством мультиплексирования СУР3А4, СУР1А2, актина и тубулина. Индукцию СУР рассчитывают на основе метода  $\Delta\Delta C_t$  и выражают как кратность индукции по сравнению с контролем, обработанным носителем.

#### **h) Метаболическая стабильность в гепатоцитах**

Метаболическую стабильность в гепатоцитах определяют посредством инкубации соединений при концентрации 1 мкМ и при низком количестве клеток  $1 \cdot 10^6$  клеток/мл для обеспечения линейной кинетики. Для минимизации влияния органических растворителей на инкубационную смесь их содержание ограничивается макс. 1% для ацетонитрила или макс. 0,2% для диметилсульфоксида. Из инкубационной смеси для анализа отбирают семь проб в разные временные точки для определения периода полураспада соединения по значению наклона  $t_{1/2} = -0,693/k$ . Преобразование  $t_{1/2}$  *in vitro* (в мин.) в истинный клиренс ( $CL'_{intr,hep}$ , в л/ч/кг) рассчитывают по следующему уравнению:

$$CL'_{intr,hep} = kV/N \times \text{коэффициент корреляции}$$

$CL'_{intr,hep}$ : Истинный клиренс печени для удаления лекарственного средства при отсутствии ограничений кровотока и связывания с клетками или белками в крови.

$V$  = инкубационный объем (0,25 мл)

$N$  = количество гепатоцитов на лунку ( $0,25 \times 10^6$  клеток)

Истинный клиренс преобразуют в прогнозируемый печеночный клиренс ( $CL'_{\text{blood,hep,ws}}$ , в л/час/кг) с помощью следующего уравнения в соответствии с хорошо перемешиваемой моделью:

$$CL'_{\text{blood,hep,ws}} = Q_H * CL'_{\text{intr,hep}} / (Q_H + CL'_{\text{intr,hep}})$$

$Q_H$  = печеночный кровоток

$CL'_{\text{blood,hep,ws}}$ : Расчет печеночного клиренса на основе хорошо перемешиваемой модели. «Хорошо перемешиваемая» модель предполагает, что печень представляет собой единый хорошо перемешиваемый компартмент и что концентрация несвязанного лекарственного средства в выходящей крови находится в равновесии с несвязанным лекарственным средством в печени.

Величина  $F_{\text{max}}$  ((максимально возможная биодоступность) рассчитывается по уравнению:

$$F_{\text{max}} \text{ хорошо перемешиваемой } [\%] = (1 - (CL_{\text{blood}} \text{ хорошо перемешиваемой} / Q_H)) * 100$$

Коэффициенты корреляции для прогнозирования истинного клиренса *in vivo* с использованием различных видов гепатоцитов перечислены ниже:

Виды	Масса печени (г печени/кг массы тела)	Концентрация гепатоцитов ( $10^6$ клеток/г печени)	Печеночный кровоток ( $Q_H$ , л/(ч·кг))	Коэффициент корреляции
Человек	21	110	1,32	2310,0
Мини-свинья	24,4	124	2,6	3025,6
Собака	39	110	2,1	4290,0
Крыса	32	110	4,2	3520,0
Кролик	26	110	2,9	2860,0

### **i) Связывание с белками**

Для определения связывания с белками с помощью ультрафильтрации используют систему микроперегородок Centrifree®, содержащую фильтрующие мембраны с размером пор 30 кДа, для разделения плазмы и ультрафильтрата, не содержащего белков. Движущей силой фильтрации является центрифугирование. Перед исследованиями связывания с белками проверяют адсорбцию (извлечение) тестируемого соединения в устройстве для ультрафильтрации и способность тестируемого соединения проходить через мембрану фильтра посредством фильтрации тестируемого соединения, растворенного в плазме и буфере в одной концентрации. Количество органического растворителя, добавляемого в плазму, не должно превышать 1% от общего инкубационного объема. После инкубации соединения в плазме с ЭДТА калия при концентрации 2000 мкг/л в течение 15 минут, 37°C и 7% CO<sub>2</sub>, систему микроразделения Centrifree® центрифугируют в течение 12 минут при 1800 g. Полученные фильтраты осаждают ацетонитрилом и разбавляют для анализа ЖХ-МС/МС. Несвязанная доля рассчитывается следующим образом:

$$f_u = \frac{C_u}{C} \cdot 100 \%$$

где C = общая концентрация в плазме (или буфере)

C<sub>u</sub> = несвязанная концентрация (концентрация в ультрафильтрате)

### **j) Оценка (*in vivo*) фармакокинетики**

Для оценки фармакокинетики тестируемых веществ *in vivo* вещества

растворяют в соответствующих носителях композиции (плазма, смеси этанола, диметилсульфоксид, ПЭГ400; препарат на физиологической основе). Затем испытываемые вещества непрерывно вводят в течение 10 минут крысам и собакам в низких дозах 0,1 – 2 мг/кг/ч. 50 мкл крови отбирают в соответствующие моменты времени в течение 24 часов через катетер (крыса) или подкожную вену правой или левой ноги (собака) и собирают в пробирки, содержащие антикоагулянт КЗ-ЭДТА и 150 мкл ацетонитрила, который дополнен внутренним стандартом, для непосредственного осаждения образца крови. После центрифугирования в течение 10 мин при 1300 g аликвоту 50 мкл супернатанта разбавляют 1/10 10 мМ аммонийно-ацетатным буфером при рН 3 и анализируют с помощью ЖХ-МС/МС. Оценка зависимости концентрации в плазме от времени проводится с помощью утвержденной программы оценки фармакокинетики. Кроме того, можно также получить образцы органов, тканей и мочи.

### С. Демонстрационные примеры фармацевтических композиций

Вещества согласно настоящему изобретению можно превратить в фармацевтические препараты следующим образом:

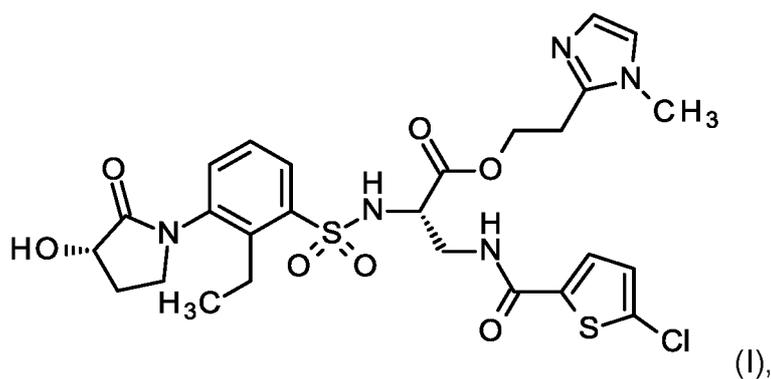
#### Внутривенный раствор:

Соединение согласно настоящему изобретению растворяют при концентрации ниже растворимости при насыщении в физиологически приемлемом растворителе (например, изотоническом растворе хлорида

натрия, 5% растворе глюкозы и/или 30% растворе ПЭГ 400). Раствор стерилизуют фильтрованием и заполняют в стерильные и апирогенные инъекционные контейнеры.

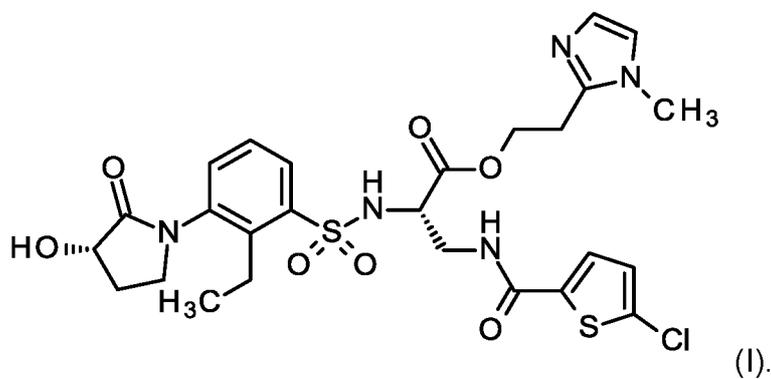
### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. 2-(1-Метил-1*H*-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-*N*-{2-этил-3-[(3*S*)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-*S*-аланинат формулы (I)



или одна(один) из его солей, его сольватов или сольватов его солей.

2. 2-(1-Метил-1*H*-имидазол-2-ил)этил 3-[(5-хлортиофен-2-карбонил)амино]-*N*-{2-этил-3-[(3*S*)-3-гидрокси-2-оксопирролидин-1-ил]бензол-1-сульфонил}-*S*-аланинат по п.1 формулы (I)





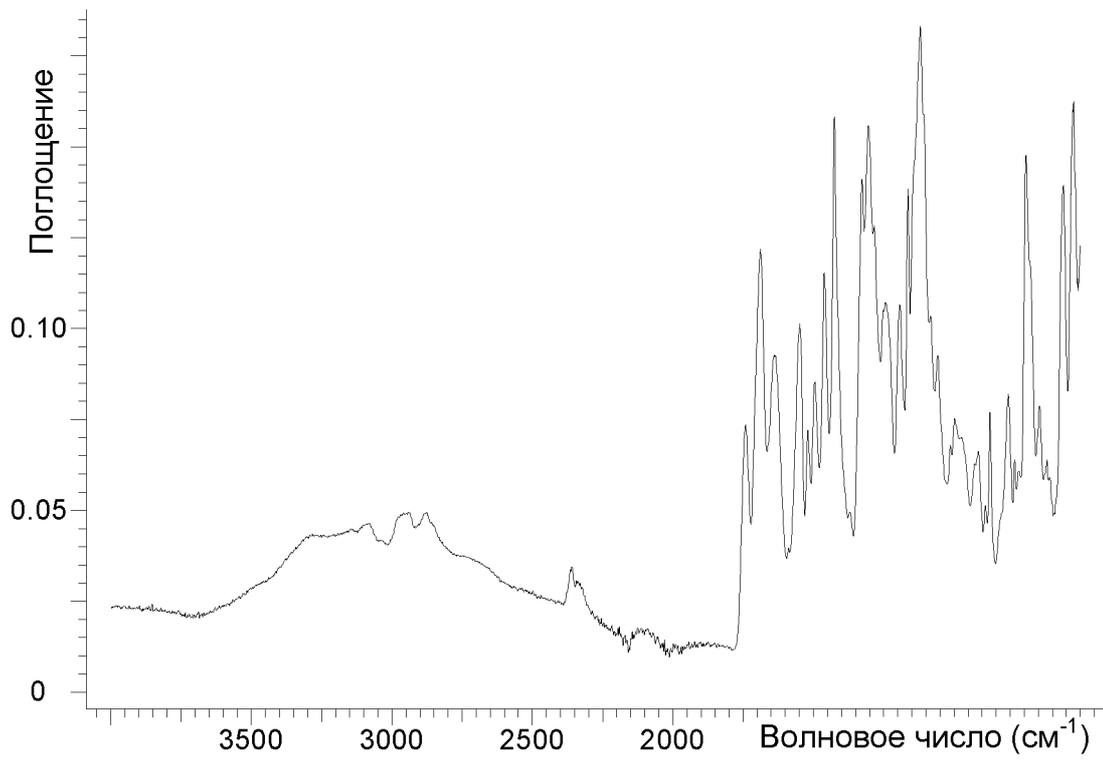
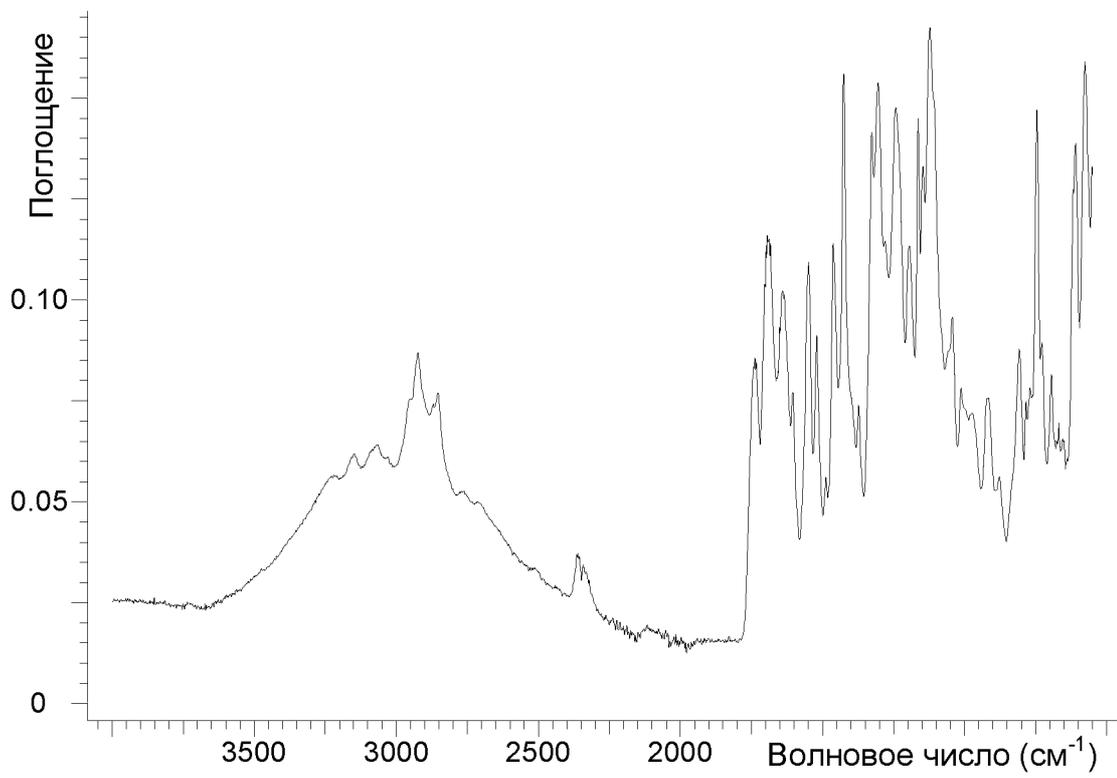


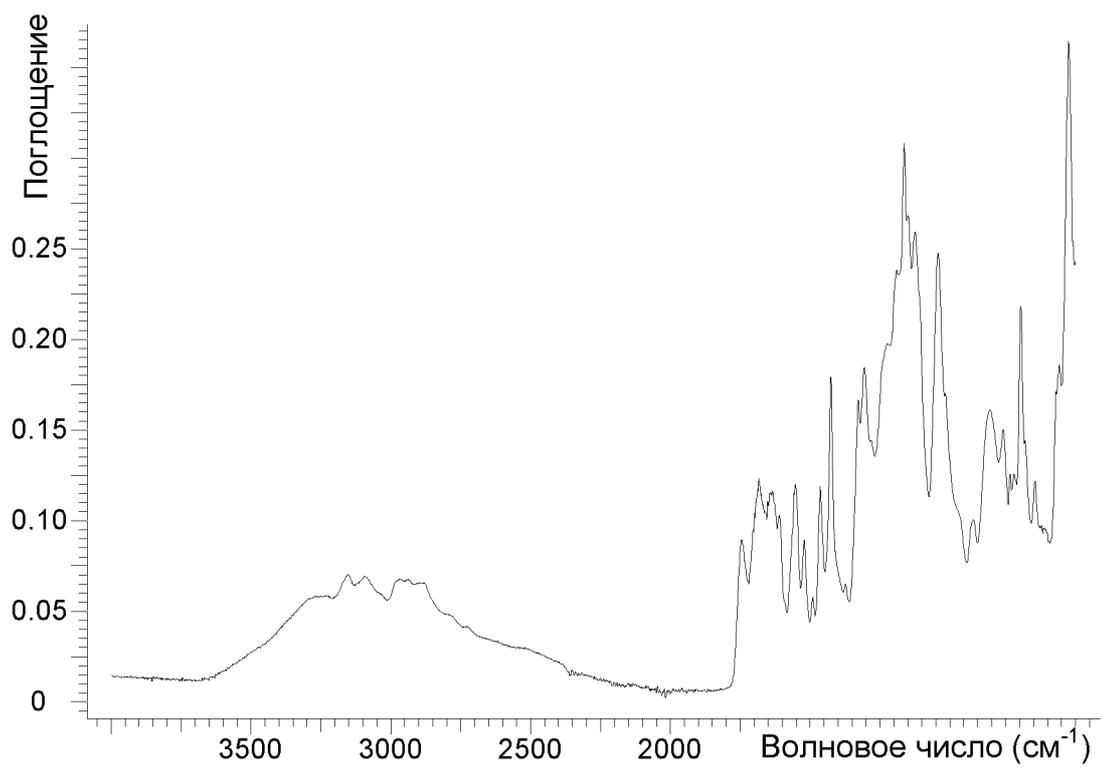
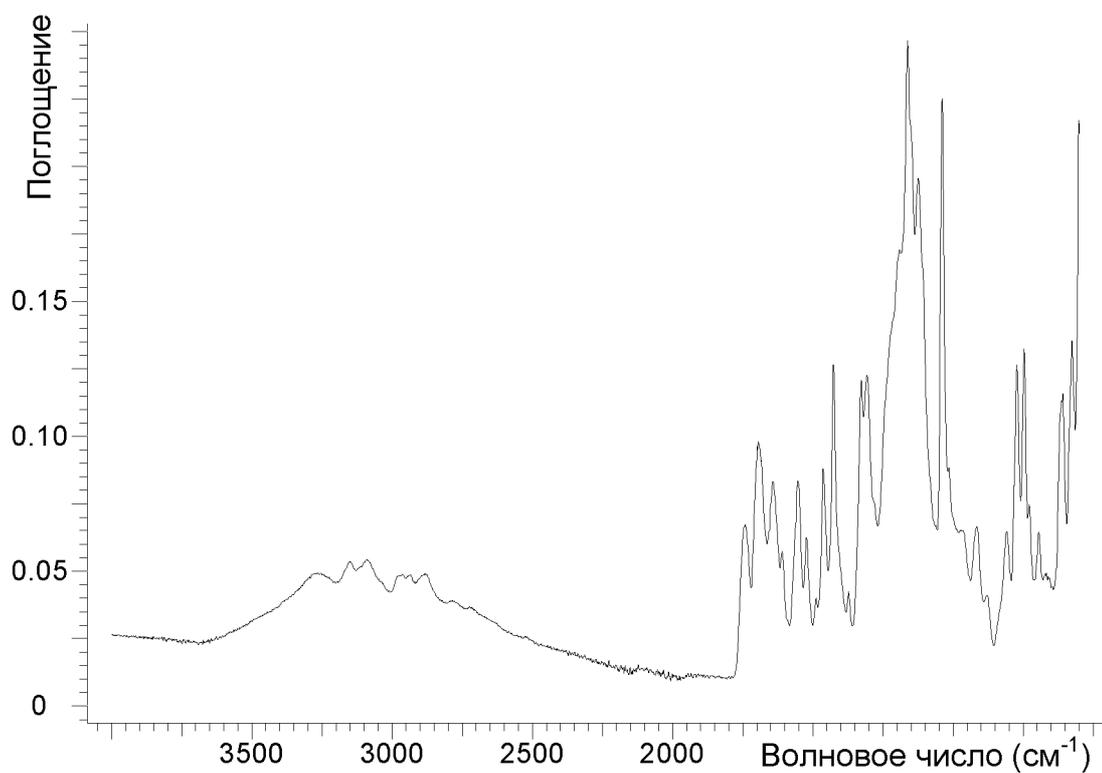
в присутствии дегидратирующего средства с получением соединения формулы (I).

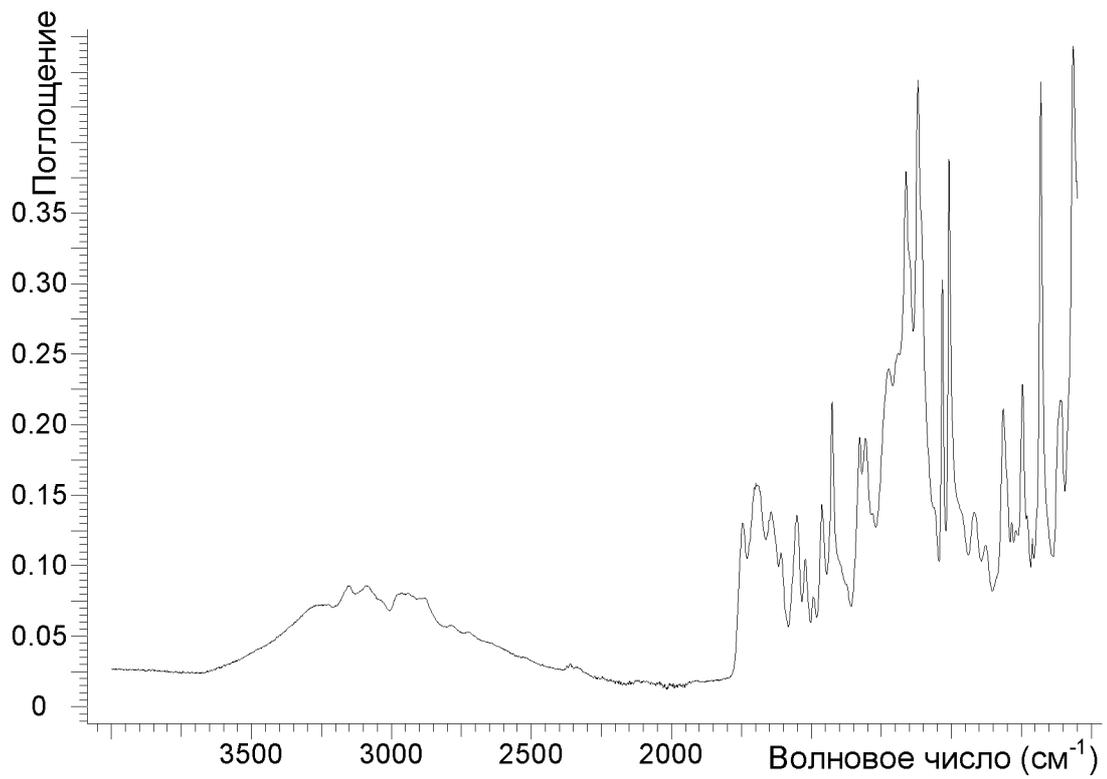
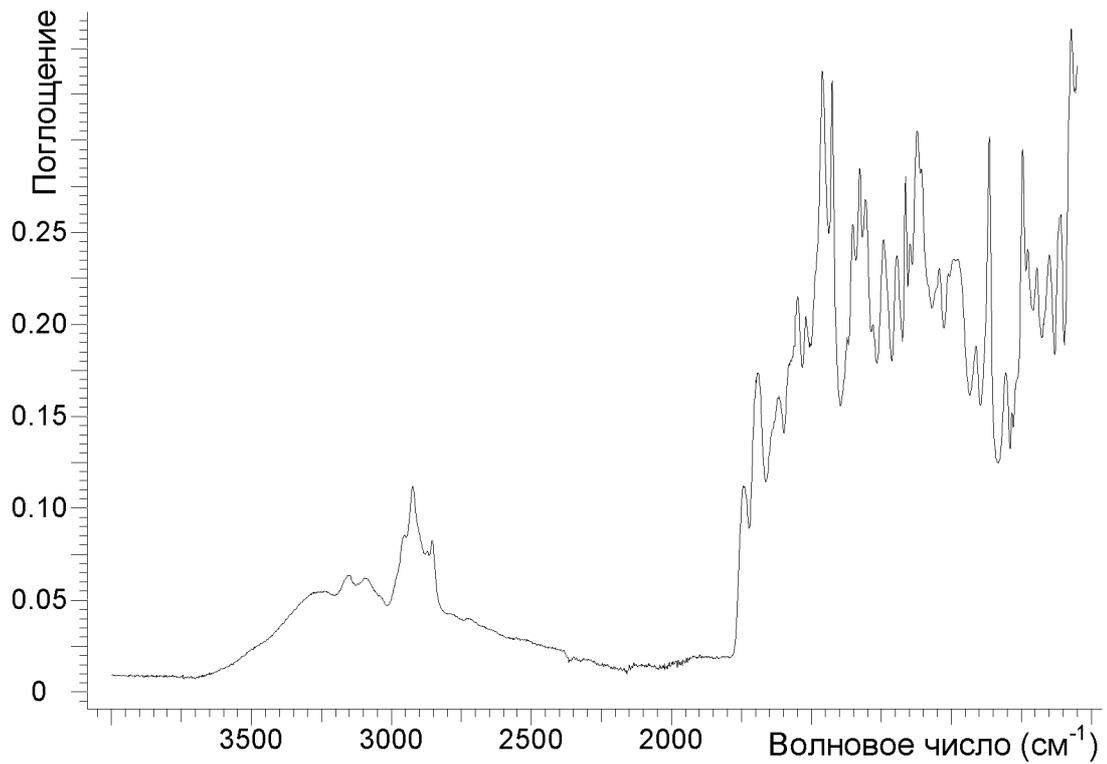
и соединение формулы (I) при необходимости превращают с помощью соответствующих (i) растворителей и/или (ii) оснований или кислот в его сольваты, соли и/или сольваты солей.

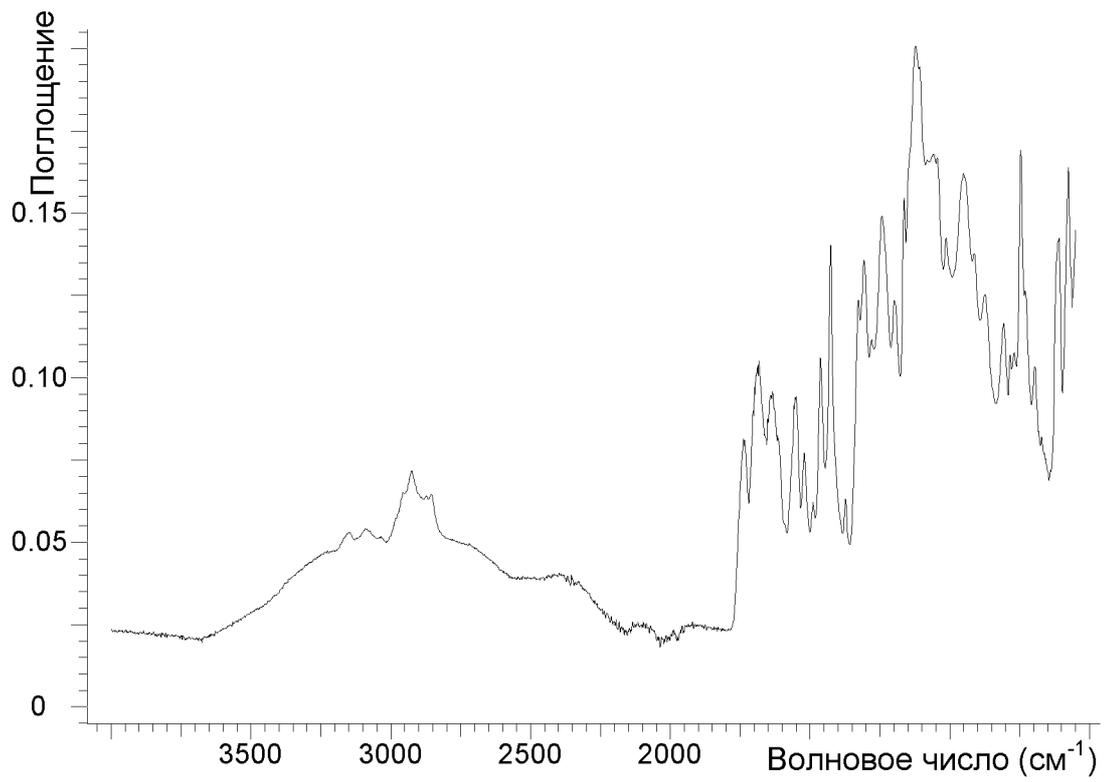
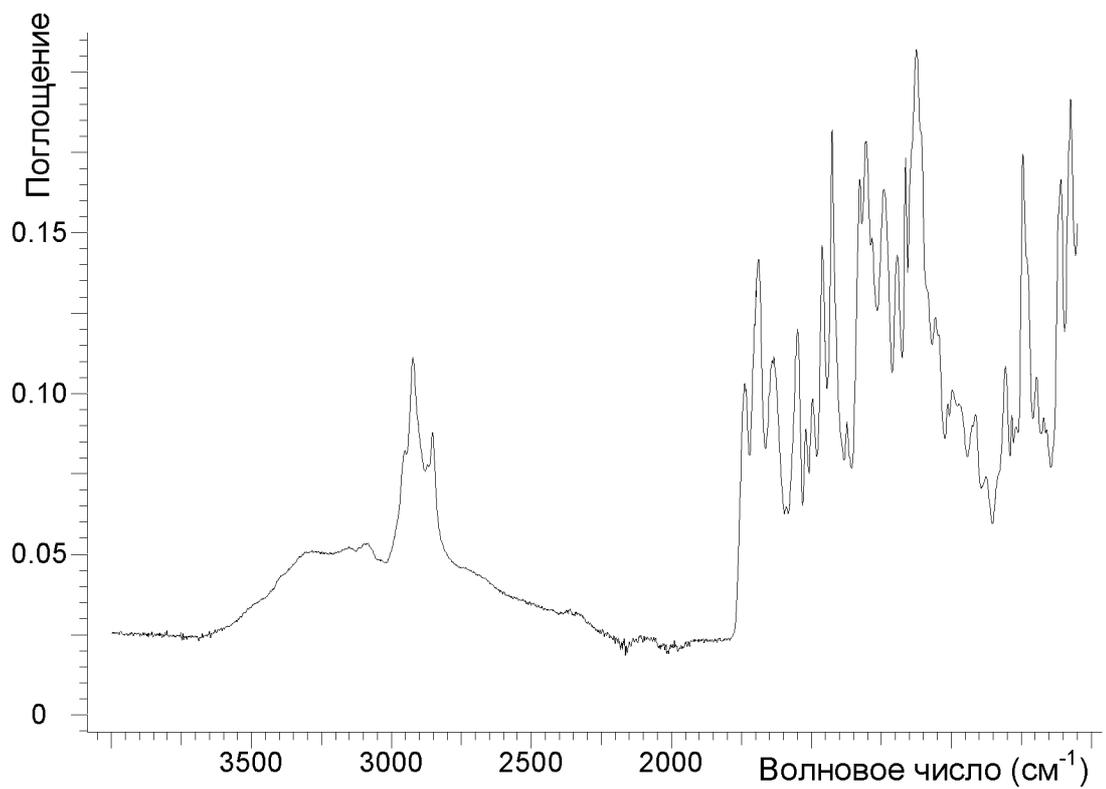
6. Соединение по любому из пп. 1 - 4 для лечения и/или профилактики заболеваний.
7. Применение соединения по любому из пп. 1 - 4 для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболеваний.
8. Применение соединения по любому из п.п. 1- 4 для получения лекарственного средства для лечения и/или профилактики тромботических или тромбоэмболических нарушений и/или тромботических или тромбоэмболических осложнений, таких как диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и/или воспалительные нарушения.
9. Лекарственное средство, содержащее соединение по любому из пп. 1 - 4 в комбинации с инертным нетоксичным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом.

10. Лекарственное средство по п. 9 для лечения и/или профилактики тромботических или тромбозмболических нарушений и/или тромботических или тромбозмболических осложнений, таких как диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и/или воспалительные нарушения.
11. Соединение по любому из п.п. 1- 4 для применения в способе лечения и/или профилактики тромботических или тромбозмболических нарушений и/или тромботических или тромбозмболических осложнений, таких как диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и/или воспалительные нарушения с использованием терапевтически эффективного количества соединения согласно изобретению.
12. Способ лечения и/или профилактики тромботических или тромбозмболических нарушений и/или тромботических или тромбозмболических осложнений, таких как диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, и/или воспалительные нарушения у людей и животных посредством введения терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного соединения по любому из пп. 1- 4, лекарственного средства по п. 9 или лекарственного средства, полученного по п. 7 или 8.

Фигура 1:Фигура 2:

Фигура 3:Фигура 4:

Фигура 5:Фигура 6:

Фигура 7:Фигура 8:

Фигура 9: