



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **110983**

(13) **C2**

(51) МПК

C07D 409/06 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

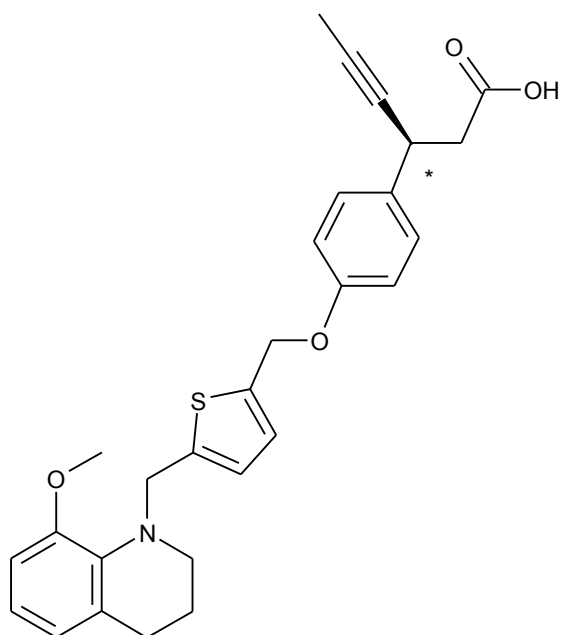
(21) Номер заявки:	а 2014 01073	(72) Винахідник(и):	Хамдоучі Чафік (US)
(22) Дата подання заявки:	09.08.2012	(73) Власник(и):	ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.03.2016	(74) Представник:	Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/524,462	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2011/066183 A1, 03.06.2011 US 2006/004012 A1, 05.01.2006
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	17.08.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.04.2014, Бюл.№ 8		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.03.2016, Бюл.№ 5		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/US2012/050051, 09.08.2012		

(54) ПОХІДНА 1,2,3,4-ТЕТРАГІДРОХІНОЛІНУ, ПРИДАТНА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДІАБЕТУ

(57) Реферат:

Цей винахід стосується сполуки наведеної нижче формули

UA 110983 C2



або її фармацевтично прийнятної солі, способу лікування діабету з використанням цієї сполуки і способу одержання згаданої сполуки.

Діабет становить серйозну проблему охорони здоров'я, з якою стикається світ, що розвивається. Бажаним було б надання безпечного та ефективного способу лікування діабету шляхом перерального введення лікарських засобів. Як вважають, деякі успішні наявні на ринку пероральні лікарські засоби для лікування діабету другого типу (T2D) діють шляхом модуляції PPAR-гамма-рецептора (гамма-рецептор, що активується проліфераторами пероксисом). Введення цих лікарських засобів пов'язане з небажаними побічними ефектами, які іноді включають гіпоглікемію, ураження печінки, шлунково-кишкові захворювання, збільшення маси тіла або інші небажані ефекти, які можуть бути пов'язані з активністю PPAR-гамма-рецептора. Нові варіанти лікарських засобів, які пропонують більш бажаний профіль безпеки для надання медичної допомоги у разі T2D, є бажаними для ефективного лікування або профілактики діабету у більшості пацієнтів. Зокрема, особливо бажаними є методи лікування на основі нових механізмів, які можуть звести до мінімального рівня або забезпечити уникнення наслідків, пов'язаних з активацією PPAR-гамма.

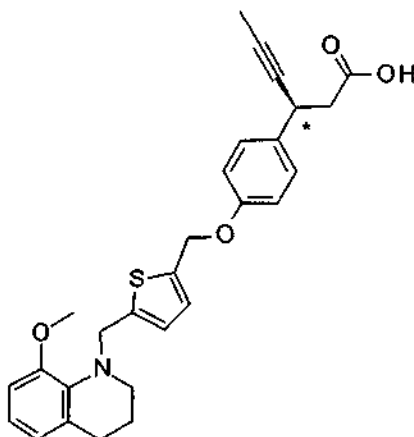
Є повідомлення, що G-білок-зв'язаний рецептор 40 (GPR-40), також відомий як рецептор 1 вільних жирних кислот (FFA1 або FFAR1), експресується на високих рівнях переважно бета-клітинами підшлункової залози гризунів, лініями клітин інсуліноми та панкреатичними острівцями людини. Цей рецептор активується середньоланцюговими і довголанцюговими жирними кислотами. Глюкозозалежна секреція інсуліну є важливою особливістю активації GPR-40, що робить цей рецептор відмінною мішенню для розробки ефективних методів лікування з бажаним профілем безпеки для використання при лікуванні цукрового діабету другого типу. Особливо бажаними можуть бути сполуки, які пропонують ефективність і більш бажаний профіль безпеки в порівнянні з існуючими лікарськими засобами, такими як інсулін і сульфонілсечовини.

Дві нещодавно опубліковані патентні заявки, US20110092531 і WO2011066183, розкривають сполуки, що мають спіро-біциклічну групу, яка проявляє GPR-40 активність.

Цей винахід пропонує сполуку для лікування діабету, зокрема T2D. Сполука за цим винаходом являє собою потужний активатор GPR-40. Цей винахід пропонує бажаний новий варіант лікарського засобу, фармакологічний механізм дії якого є специфічним у зіставленні з наявними на ринку лікарськими засобами, і також пропонує сполуку, яка селективно активує саме GPR-40 на противагу PPAR-гамма.

Фармакологічний профіль сполуки за цим винаходом, яка є селективним активатором GPR-40, може бути особливо бажаним для використання в лікуванні цукрового діабету другого типу. Крім того, селективна модуляція GPR-40 може забезпечити особливо бажаний профіль безпеки для використання при лікуванні цукрового діабету другого типу завдяки униканню впливу, пов'язаного з модуляцією PPAR-гамма.

Цей винахід пропонує наведену нижче сполуку формули I:



або її фармацевтично прийнятну сіль.

Сполука за цим винаходом може мати хіральний атом вуглецю, позначений у наведеній вище структурі зірочкою (*). Сполука, якій віддають перевагу, має конфігурацію, показану вище, яка традиційно позначається як S-конфігурація.

Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію, яка містить описану вище сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або наповнювачами.

Цей винахід також пропонує фармацевтичну композицію, яка містить описану вище сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або наповнювачами і факультативно одним або декількома терапевтичними засобами.

5 Цей винахід також пропонує спосіб лікування діабету у ссавця. Згаданий спосіб включає введення ссавцю, що потребує лікування, описаної вище сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, цей винахід пропонує спосіб лікування діабету другого типу у ссавця, що потребує лікування, шляхом введення ссавцю описаної вище сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі. За
10 варіантом, якому віддають перевагу, згаданий ссавець являє собою людину.

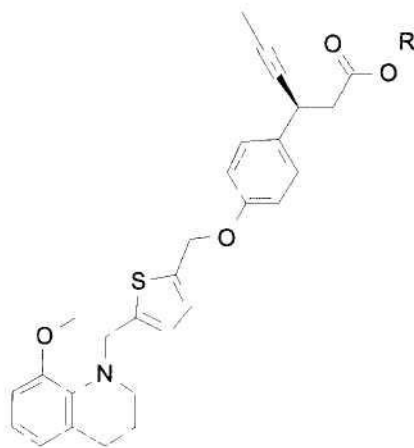
Цей винахід також пропонує спосіб лікування діабету у ссавця шляхом введення ссавцю, що потребує лікування, фармацевтичної композиції, яка містить описану вище сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, цей винахід пропонує спосіб лікування діабету другого типу у ссавця, що потребує лікування,
15 шляхом введення цьому ссавцю фармацевтичної композиції, яка містить описану вище сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль. За варіантом, якому віддають перевагу, згаданий ссавець являє собою людину.

Цей винахід пропонує описану вище сполуку Формули I або її фармацевтично прийнятну сіль для застосування в терапії.

20 За ще одним аспектом цей винахід пропонує описану вище сполуку Формули I, її фармацевтично прийнятну сіль або фармацевтичну композицію для застосування в лікуванні цукрового діабету у ссавця, що цього потребує. За варіантом, якому віддають перевагу, це застосування спрямоване на лікування діабету другого типу, і згаданим ссавцем є людина.

Цей винахід пропонує застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі у виготовленні лікарського засобу для лікування цукрового діабету. За варіантом, якому
25 віддають перевагу, згаданий лікарський засіб призначений для лікування діабету другого типу і для лікування ссавця, зокрема людини.

За ще одним аспектом цей винахід пропонує проміжну хімічну сполуку Формули II



II

30 де R вибраний з групи, яку складають C₁₋₄-алкіл, C₁₋₄-галогеналкіл, C₃₋₆-циклоалкіл, C₁₋₄-алкіл-C₃₋₆-Циклоалкіл, феніл і C₁₋₅-алкілфеніл, для одержання сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі. До груп R, яким віддають перевагу, належать C₁₋₂-алкіл, C₁₋₂-галогеналкіл, феніл і C₁₋₂-алкілфеніл. До груп R, яким віддають особливу перевагу, належать метил, етил, феніл та бензил.

35 Цей винахід також пропонує спосіб одержання описаної вище (3S)-3-[4-[[5-[(8-метокси-3,4-дигідро-2H-хінолін-1-іл)метил]-2-тієніл]метокси]феніл]гекс-4-инової кислоти Формули I. Цей спосіб включає відщеплення захисних груп або деестерифікацію проміжної хімічної сполуки Формули II з одержанням сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі.

40 Фахівець в цій галузі легко зрозуміє і зможе здійснити реакції відщеплення захисних груп без зайвого експериментування. Фахівцям у цій галузі буде зрозуміло, що крім карбонової кислоти або захищеної карбонової кислоти і замість них можуть бути використані інші функціональні групи, які можуть бути легко перетворені на карбонову кислоту. Такі функціональні групи, препаративні методики і перетворення цих груп на карбонові кислоти можна знайти в

"Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations" by Larock. R.C, Wiley VCH, 1999 та в "March's Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure" Smith, M.B., and March, J., Wiley-Interscience, 6th Ed. 2007.

Сполука за цим винаходом, (3S)-3-[4-[[5-[(8-метокси-3,4-дигідро-2H-хінолін-1-іл)метил]-2-тієніл]метокси]феніл]гекс-4-інова кислота, може бути надана у вигляді фармацевтично прийнятної солі. Словосполучення "фармацевтично прийнятна сіль" означає солі сполуки за цим винаходом, які вважаються прийнятними для клінічного та/або ветеринарного застосування. Фармацевтично прийнятні солі і загальна методологія їх одержання є добре відомими в цій галузі. Дивись, наприклад, P. Stahl, et al, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCH/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts, " Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977.

Словосполучення "фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач" означає, що носій, розріджувач та наповнювачі є фармацевтично сумісними з іншими інгредієнтами композиції.

Певні замісники на наведених нижче Схемах не показані заради ясності, що не має на меті будь-якого обмеження суті вказаних Схем. Крім того, окремі ізомери, енантіомери або діастереоізомери можуть бути виділені в будь-якій зручній точці у процесі синтезу сполуки Формули I такими методами, наприклад, як хіральна хроматографія. Крім того, проміжні хімічні сполуки, розкриті у наведених нижче Схемах і препаративних методиках, містять ряд азотних, гідроксильних та кислотних захисних груп, таких як складні ефіри. Різні захисні групи можуть бути однаковими або різними у кожному випадку, залежно від конкретних реакційних умов і конкретних перетворень, що відбуваються. Умови захисту та відщеплення захисних груп добре відомі фахівцю у цій галузі і описані у літературі. Дивись, наприклад, Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, (T. Greene and P. Wuts, eds., 2d ed. 1991).

Скорочення, які вжиті у цьому описі, визначені за Aldrichimica Acta, Vol. 17, No. 1, 1984. Інші скорочення визначені так: "ADDP" означає 1-(азодикарбоніл)дипіперидин; "BSA" означає бичачий сироватковий альбумін; "DIBAL-H" означає гібрид діізобутилалюмінію, "DIPEA" означає діізопропілетиламін; "DMEM" означає модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла; "DTT" означає дитіотреїтол; "ESI" означає іонізацію електророзпилюванням; "EtOAc" означає етилацетат; "EtOH" означає етиловий спирт або етанол; "F12" означає середовище Ham F12; "FBS" означає фетальну бичачу сироватку; "HEK" означає лінію клітин нирок людського зародка; "IC₅₀" означає концентрацію агента, яка спричинює 50 % максимальну пригнічувальну реакцію, можливу для цього агента; "MeOH" означає метиловий спирт або метанол; "NBS" означає N-бромсукцинімід; "PPAR" означає рецептор, що активується проліфераторами пероксисом; "PPRE" означає чутливий елемент проліфератора пероксисом; "RFU" означає відносну одиницю флуоресценції; "RPMI" означає Онкологічний інститут імені Розуелла Парка (Roswell Park Memorial Institute); "к.т." означає кімнатну температуру; "THF" означає тетрагідрофуран; і "TK" означає тимідинкіназу.

Термін "алкіл", вжитий у цьому описі, означає алкіл з нерозгалуженим ланцюгом, такий як етил або н-пропіл, чи алкіл з розгалуженим ланцюгом, такий як ізопропіл або трет-бутил. Термін "C₁₋₄-галогеналкіл" означає алкільну групу, яка має 1, 2, 3 або більше галогенових груп, приєднаних до атомів вуглецю алкільного ланцюга. За наявності двох або більше галогенів, ці галогени не повинні бути прикріпленими до одного й того самого атома вуглецю. Цей термін також означає пергалогеналкіли, де всі атоми водню алкільної групи замінені галогеном.

Усі замісники на наведених нижче схемах, якщо не зазначено інше, відповідають наведеному вище визначенню. Зазначені реагенти та вихідні матеріали є, як правило, легкодоступними для будь-якого фахівця у цій галузі. Інші можуть бути одержані за стандартними методами органічної хімії та хімії гетероциклів, що є аналогічними методам синтезу відомих структурно подібних сполук, та за методиками, описаними у наведених нижче Препаративних методиках та Прикладах, в тому числі будь-якими новими методиками.

Схема I

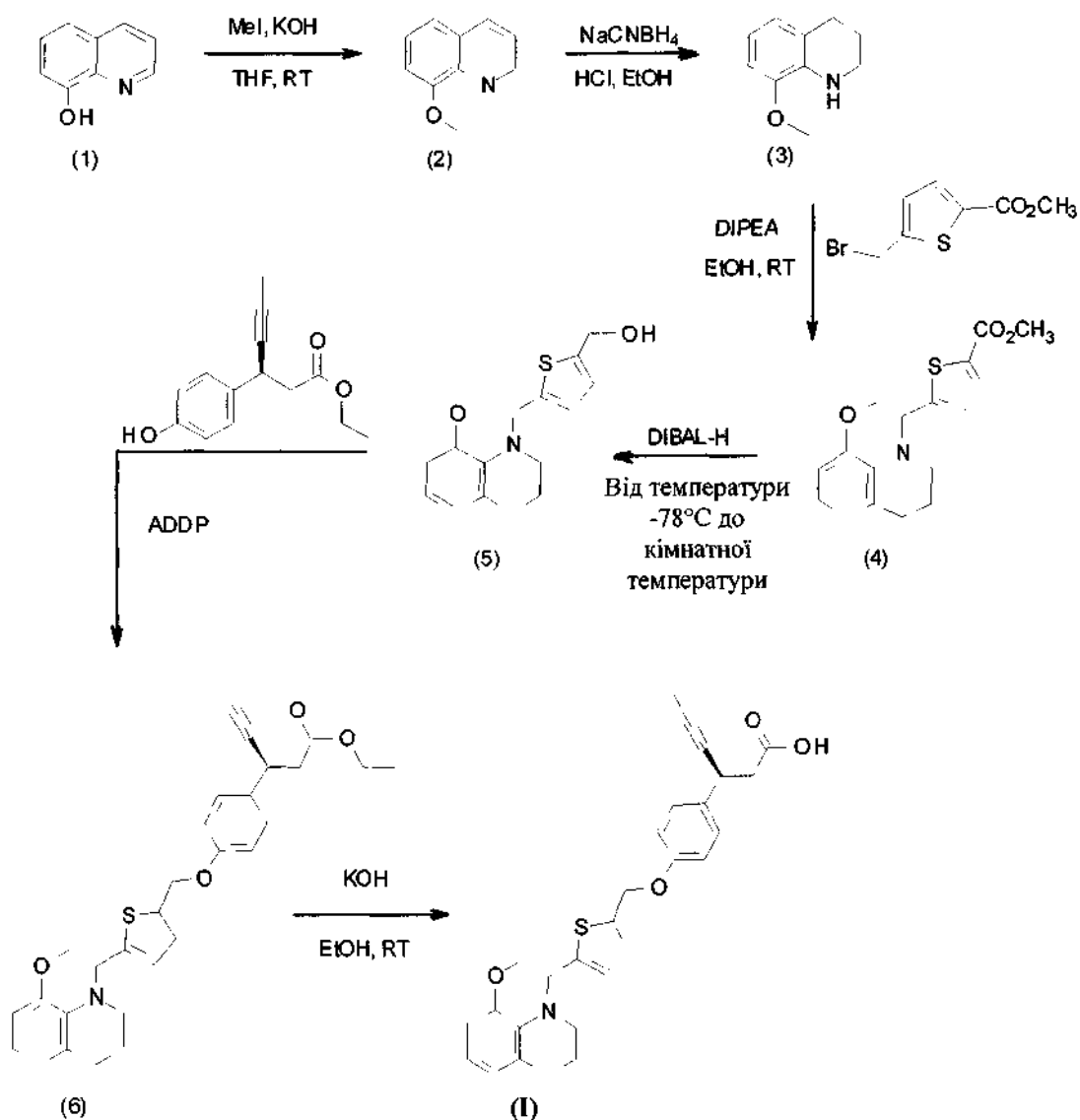
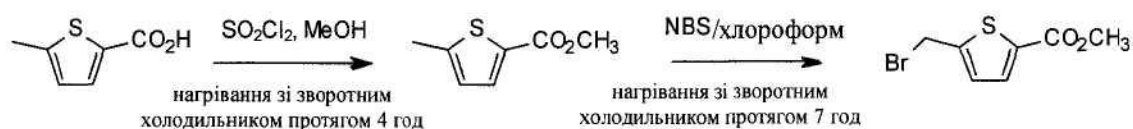


Схема 2



Препаративні методики і Приклади

- Наведені нижче Препаративні методики і Приклади ілюструють винахід і являють собою типовий синтез сполуки Формули (I). Сполуки названі із застосуванням пакетів програм IUPACNAME ACDLABS або Sympyx Draw 3.2.

Препаративна методика 1

8-Метоксигінолін

- До розчину 8-гідроксигіноліну (250 г, 1,724 моль) в THF (10 л) при температурі навколишнього середовища додають гідроксид калію (435 г, 7,76 моль), і перемішують. Додають

краплями метилйодид (435 г, 2,58 моль), і перемішують протягом ночі. Реакційну суміш фільтрують, і одержану тверду речовину промивають THF (2 л). Розчин концентрують досуха, додають воду, екстрагують дихлорметаном (2 × 3 л), органічні шари об'єднують, і промивають розсоллом. Органічні шари збирають, і сушать сульфатом натрію. Тверді речовини видаляють
 5 фільтруванням. Фільтрат збирають, концентрують при зниженому тиску до одержання червоного масла, яке твердне при відстоюванні, та одержують вказану в заголовку сполуку (281 г, 102 %), яка може бути використана без подальшого очищення. ESI (m/z) 160(M+H).

Препаративна методика 2

8-Метокси-1,2,3,4-тетрагідрохінолін

10 До розчину 8-метоксихіноліну (425 г, 2,673 моль) в EtOH (9 л) додають розчин ціаноборогідриду натрію (505 г, 8,11 моль) в EtOH (1 л), і перемішують. Реакційну суміш охолоджують до внутрішньої температури 0 °C, і впродовж 60 хв додають краплями HCl (35 %, 1,12 л, 10,962 моль) так, щоб внутрішня температура не піднімалася вище 20 °C. Реакційну суміш витримують для нагрівання до температури навколишнього середовища, після чого
 15 нагрівають зі зворотним холодильником протягом 2,5 год. Охолоджують до температури навколишнього середовища, і перемішують протягом ночі. Додають гідроксид амонію (25 %, 1 л), розбавляють водою (15 л), і одержану суміш екстрагують дихлорметаном (3 × 10 л). Органічні шари об'єднують, і сушать сульфатом натрію. Тверді речовини видаляють фільтруванням. Фільтрат збирають, і концентрують при зниженому тиску до одержання
 20 залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі, елюючи сумішшю етилацетат:гексан (1:10), та одержують вказану в заголовку сполуку (357 г, 82 %). ESI (m/z) 164(M+H).

Препаративна методика 3 Метил-5-метилтіофен-2-карбоксилат

25 До розчину 5-метилтіофен-2-карбонової кислоти (100 г, 0,703 моль) в MeOH (1л) протягом 20 хв при температурі 0 °C додають краплями тіонілхлорид (153 мл, 2,1 моль), і перемішують. Після закінчення додавання реакційну суміш нагрівають зі зворотним холодильником протягом 3,5 год. Охолоджують, і концентрують у вакуумі до одержання густого масла. Масло розбавляють етилацетатом (500 мл), і послідовно промивають водою (300 мл), потім розсоллом (300 мл). Органічний шар сушать сульфатом натрію. Тверді речовини видаляють
 30 фільтруванням. Фільтрат збирають, і концентрують при зниженому тиску до одержання вказаної в заголовку сполуки (106 г, 97 %), яку використовують без подальшого очищення. ESI (m/z) 156(M+H).

Препаративна методика 4 Метил-5-(бромметил)тіофен-2-карбоксилат

35 До розчину метил-5-метилтіофен-2-карбоксилату (258 г, 1,65 моль) в хлороформі (2,6 л) при кімнатній температурі додають свіжоперекристалізований NBS (323,8 г, 1,81 моль), і перемішують. Додають пероксид бензоїлу (3,99 г, 0,016 моль), і реакційну суміш нагрівають зі зворотним холодильником протягом 7 год. Реакційну суміш охолоджують до температури навколишнього середовища, і фільтрують через діатомову землю. Відфільтрований осад промивають хлороформом (250 мл). Органічні шари збирають, розчинник видаляють, та
 40 одержують вказану в заголовку сполуку (388 г, 100 %), яку використовують без подальшого очищення. ESI (m/z) 236(M+H).

Препаративна методика 5 Метил-5-[(8-метокси-3,4-дигідро-2H-хінолін-1-іл)метил]тіофен-2-карбоксилат

45 До розчину 8-метокси-1,2,3,4-тетрагідрохіноліну (300 г, 1,84 моль) в EtOH (1л) додають розчин метил-5-(бромметил)тіофен-2-карбоксилату (432,5 г, 1,84 моль) в EtOH (500 мл), і перемішують. Додають краплями DIPEA (641 мл, 3,67 моль), і перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Після завершення реакції EtOH видаляють у вакуумі, та додають воду (5 л). Водний шар екстрагують етилацетатом (3 × 3 л), органічні шари об'єднують, і сушать сульфатом натрію. Розчин фільтрують, і концентрують при зниженому тиску до одержання
 50 залишку. Залишок очищають хроматографією на силікагелі, елюючи сумішшю етилацетат:гексан (6:94), та одержують вказану в заголовку сполуку (325 г, 56 %). ESI (m/z) 318(M+H).

Препаративна методика 6

55 [5-[(8-Метокси-3,4-дигідро-2H-хінолін-1-іл)метил]-2-тієніл]метанол До розчину метил-5-(8-метокси-3,4-дигідрохінолін-1 (2H)-іл)метилтіофен-2-карбоксилату (281 г, 0,886 моль) в THF (4 л) при температурі -70 °C при перемішуванні повільно через канюлю протягом 1,5 год. додають DIBAL-H (1 M розчин в толуолі, 2,7 л, 2,66 моль). Завершення реакції контролюють за допомогою тонкошарової хроматографії (TLC). Після завершення реакції реакційну суміш витримують для нагрівання до температури 20 °C, і додають насичений розчин хлориду амонію.
 60 Додають розчин калійнатрійтартрату (1,3 кг в 5 л води), і перемішують протягом ночі.

Органічний шар відділяють, водну фазу екстрагують етилацетатом (2 × 5 л), потім органічні шари об'єднують, і об'єднані органічні шари сушать сульфатом натрію. Тверді речовини видаляють фільтруванням. Розчинник з фільтрату видаляють при зниженому тиску, та одержують вказану в заголовку сполуку у вигляді білої твердої речовини (252 г, 98 %). ESI (m/z) 290(M+H).

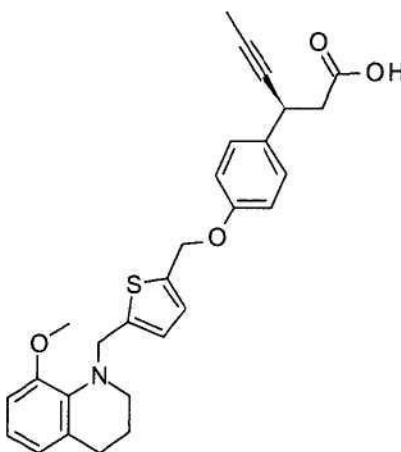
Препаративна методика 7

Етил-(38)-3-[4-[[5-[(8-метокси-3,4-дигідро-2Н-хінолін-1-іл)метил]-2-тієніл]метокси] феніл] гекс-4-іноат

До розчину ADDP (282,5 г, 1,5 екв.) у THF (3 л) додають трибутилфосфін (50 % розчин в ЕЮ Ас, 543 мл, 1,34 моль), і суміш охолоджують до внутрішньої температури 0 °С, після чого перемішують протягом 15 хв. Протягом 15 хв додають краплями розчин (8)-етил-3-(4-гідроксифеніл)гекс-4-іноату (173,5 г, 0,747 моль) в THF (3 л), потім додають краплями розчин 5-((8-метокси-3,4-дигідрохінолін-1 (2Н)-іл)метил)тіофен-2-іл)метанолу (216 г, 0,747 моль) в THF (5 л). Реакційну суміш витримують для нагрівання до температури навколишнього середовища, і перемішують протягом ночі. Реакційну суміш фільтрують через діатомову землю, і відфільтрований осад промивають етилацетатом (2 л). Органічний фільтрат концентрують досуха. Додають воду (4 л), екстрагують етилацетатом (3 × 5 л), органічні шари об'єднують, і об'єднані органічні шари сушать сульфатом натрію. Тверді речовини відфільтровують, і концентрують при зниженому тиску до одержання масла. Залишок очищають хроматографією на силікагелі, елюючи сумішшю етилацетат:гексан (6:94), та одержують вказану в заголовку сполуку (167 г, 44 %). ESI (m/z) 504(M+H).

Приклад 1 (3 S)-3 - [4- [[5 -[(8-Метокси-3,4-дигідро-2Н-хінолін-1 -іл)метил] -2-тієніл]метокси] феніл]гекс-

4-інова кислота



До розчину (S)-етил-3-(4-((5-8-метокси-3,4-дигідрохінолін-1 (2Н)-іл)метил)тіофен-2-іл)метокси)феніл]гекс-4-іноату (149 г, 0,296 моль) в EtOH (1,49 л) при кімнатній температурі додають розчин гідроксиду калію (49,76 г, 0,88 моль) у воді (372 мл), і перемішують протягом ночі. Реакційну суміш концентрують досуха, і додають воду (1,3 л). Одержаний розчин екстрагують етилацетатом (2 × 300 мл), і шари розділяють. Рівень pH водного шару доводять до pH=6, додаючи 2Н розчин HCl. Утворені тверді речовини збирають. Тверді речовини перекристалізують з гарячого MeOH (298 мл, 2 об'єми), та одержують вказану в заголовку сполуку (91 г, 65 %). ESI (m/z) 476(M+H).

GPR40: Інформація

Результати досліджень з використанням трансгенних мишей, що надекспресують ген GPR40 людини під контролем промотора інсуліну II, нещодавно повідомлені Nagasumi (Nagasumi), також підтверджують, що GPR40 відіграє важливу роль у регуляції GDIS (глюкозозалежна секреція інсуліну) і рівнів глюкози плазми in vivo, особливо в моделях інсулінової резистентності на гризунах. Nagasumi K., et al., Over expression of GPR40 in pancreatic β -cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice, Diabetes 58: 1067-1076, 2009. Див ісь також Briscoe CP et al., The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids, Journal Biological Chemistry 278: 11303-11311, 2003. Ці результати також підтверджують, що розробка нових модуляторних сполук GPR40

може бути особливо бажаною для використання в лікуванні цукрового діабету другого типу. Первісне дослідження надлишкового виділення кальцію.

Сполуку Прикладу 1 випробовують по суті так, як описано нижче. При проведенні первісного дослідження надлишкового виділення кальцію випробовувана сполука демонструє значення EC_{50} нижче ніж 1 мкМ.

Це дослідження використовується для скринінгу сполук шляхом визначення підвищення рівнів внутрішньоклітинного кальцію, яке відбувається, коли ліганд зв'язує і активує GPR40, демонструючи тим самим активність і ефективність агоністів GPR40. Для проведення цього дослідження використовують клітини HEK293, що надекспресують кДНК людського GPR40, які підтримують у модифікованому за способом Дульбекко середовищі Ігла із середовищем F12 у співвідношенні 3:1, доповнених 10 % FBS і 800 мкг/мл генетицину, при температурі 37 °C і 5 % CO₂. Дослідження агоністів виконують із застосуванням аналітичного набору Calcium 4 Dye assay kit (Molecular Devices) у присутності 0,1 % BSA без жирних кислот в аналітичному буфері (IxBSS (збалансований сольовий розчин Хенкса) і 20 мМ розчині ГЕПЕС-буфера (4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонова кислота). Активацію рецептора визначають як підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію із застосуванням флуорометричного томографічного планшет-рідера (FLIPR). Для визначення реакції агоніста використовують максимальну зміну флуоресценції в порівнянні з базовою лінією. EC_{50} (ефективна концентрація, що забезпечує половинне значення максимальної реакції) сполуки обчислюють за допомогою програми Excel Fit (версія 4; IDBS) шляхом побудови кривої залежності між концентрацією та відносними одиницями флуоресценції (RFU). Відсоткову ефективність обчислюють на основі максимальної реакції, продемонстрованої сполукою, у порівнянні з природним лігандом, лінолевою кислотою. Згадана досліджувана сполука Прикладу 1 у цьому дослідженні продемонструвала EC_{50} 152+/-52 нМ з 84+/-24 % ефективністю. Ці результати також демонструють бажану активність і ефективність цієї сполуки як агоніста GPR40.

Дослідження глюкозозалежної секреції інсуліну (GDIS)

Оскільки відомо, що активація GPR40 призводить до секреції інсуліну, яка залежить від високих концентрацій глюкози, були розроблені дві окремі аналітичні системи (лінія клітин інсуліноми і ембріональні острівці гризунів) для подальшого визначення характеристик сполук, які, як відомо, збільшують рівні внутрішньоклітинного кальцію в обговореному вище первісному дослідженні GPR40.

Дослідження GDIS виконують з використанням лінії клітин мишачої інсуліноми Min6. Клітини Min6 підтримують у модифікованому за методом Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), яке містить замінні амінокислоти, 10 % FBS, 50 мМ 2-меркаптоетанолу та 1 % пеніциліну і стрептоміцину, при температурі 37 °C, плюс 5 % CO₂. У день експерименту клітини двічі промивають 200 мкл попередньо підігрітого буферного розчину Кребса-Рінгера без глюкози. Додавання 200 мкл попередньо підігрітого буферного розчину Кребса-Рінгера, який містить 2,5 мМ глюкози, використовують для виснаження клітин з подальшим додаванням сполук у присутності високої концентрації глюкози (25 мМ). Планшет інкубують при температурі 37 °C протягом 2 год. Наприкінці 2 год. інкубації супернатант обережно переносять на фільтраційний планшет Milipore, і центрифугують при 200 g (гравітаційна сила) протягом 3 хв. Вміст інсуліну аналізують із застосуванням набору для визначення вмісту інсуліну Mercodia Insulin estimation kit. Додання сполуки Прикладу 1 (0,01 мкМ, 0,1 мкМ, 1,0 мкМ та 10,0 мкМ) і 25 мМ глюкози до клітин Min6 спричинює дозозалежне підвищення секреції інсуліну зі статистично значущим ($P < 0,01$) збільшенням (у 2,68 рази порівняно зі збільшенням, одержаним з 25 мМ розчином глюкози) в дозі 1,0 мкМ.

Для визначення характеристик взятої за приклад сполуки використовують також дослідження GDIS на ембріональних панкреатичних острівцях Лангерганса гризунів. Панкреатичні острівці виділяють від пацюків-самців лінії SD (Sprague Dawley) шляхом колагеназного гідролізу та відділення за допомогою градієнта густини Histopaque. Острівці культивують протягом ночі в середовищі RPMI-1640 з GlutaMAXn (стабілізована дипептидна форма L-глутаміну (Invitrogen, номер за каталогом: 61870-010)), щоб полегшити відновлення після процесу виділення. Секрецію інсуліну визначають шляхом інкубування протягом 90 хв в EBSS (збалансований сольовий розчин Ерла) буфері на 48-лунковому планшеті. Стисло, острівці спочатку попередньо інкубують в EBSS з 2,8 мМ розчином глюкози протягом 30 хв, після чого переносять на 48-лунковий планшет (чотири острівця на лунку), який вміщує 150 мкл 2,8 мМ розчину глюкози, і інкубують протягом 90 хв з 150 мкл EBSS з 2,8 мМ або 11,2 мМ розчином глюкози в присутності або за відсутності досліджуваної сполуки. Буфер видаляють з лунк в кінці інкубації, і досліджують на рівні інсуліну із застосуванням набору Rat Insulin ELISA kit (Mercodia). Результатом інкубування сполуки Прикладу 1 (1 мкМ, 3 мкМ і 10 мкМ) з острівцями

пацюків і 11,2 мМ розчином глюкози у цій аналітичній системі є статистично значуще ($P < 0,05$) підвищення рівня інсуліну при 3,0 мкМ (2,1 рази) у порівнянні з підвищенням, що досягається з 11,2 мМ розчином глюкози. Таким чином, сполука Прикладу 1 індукує продукування інсуліну в умовах цього дослідження.

5 Дослідження селективності Дослідження зв'язування і функціональні дослідження α -, δ - і γ -рецепторів, що активуються проліфераторами пероксисом (PPAR).

Оскільки, як відомо, GPR40 активується лігандами PPAR γ , згадану взяту за приклад сполуку перевіряють у дослідженнях зв'язування і функціональних дослідженнях PPAR α , PPAR δ і PPAR γ для визначення селективності сполуки Прикладу 1 стосовно GPR40. Сполуку Прикладу 10 1 випробовують по суті так, як описано нижче, для зв'язування PPAR, і вона демонструє значення зв'язування більші ніж 1000 нМ при 10 мкМ концентраціях досліджуваної сполуки, й тому вважається негативною щодо активності PPAR.

Зв'язувальну спорідненість згаданої сполуки до PPAR α , PPAR δ і PPAR γ рецепторів оцінюють за допомогою сцинтиляційного аналізу з використанням МІПів (молекулярно імпринтовані полімери) (SPA). Для зв'язування згаданих рецепторів зі SPA гранулами силікату ітрію, вкритими стрептавідином, використовують прямий повтор 2 (DR2) біотинільованого олігонуклеотиду. Клітини HEK293 надекспресують PPAR α , δ і γ та рецептор ретиноїдів X (RXR) а, і в окремих дослідженнях використовують клітинні лізати, що містять специфічні рецептори. Згаданий DR2 прикріплюють до SPA гранул протягом 30 хв у зв'язувальному буфері, який 20 містить 10 мМ HEPES з рН 7,8, 80 мМ KCl, 0,5 мМ MgCl₂, 1 мМ DDT, 0,5 % 3-[(3-холамідопропіл)диметиламоніо]пропансульфонової кислоти (CHAPS) і 4,4 % бичачої сироватки. Клітинні лізати інкубують у кожній лунці з однією з 11 концентрацій сполуки в присутності радіоактивно міченої (~0,0338 мкКі ³H (1,2506 кБк)) еталонної сполуки-подвійного агоніста PPAR α/δ (бутанова кислота, 2-[4-[2-[[[(2,4-дифторфеніл)аміно] карбоніл] гептиламіно] етил] фенокси] - 2-метил, дивись Burns T.P. et al., Molecular Pharmacology 2005, 67, (3) 948-954) для дослідження альфа- і дельта-рецепторів і радіоактивно міченої (~0,0373 мкКі ³H (1,3801 кБк)) еталонної сполуки-агоніста PPAR γ (пропанова кислота, 2-метил-2-[4-[3-[пропіл[[5-(2-піридиніл)-2-тієніл]сульфоніл]аміно]пропіл]фенокси], дивись Burris T.P. et al., Molecular Pharmacology 2005, 67, (3) 948-954) для дослідження гамма-рецепторів, 110,3 мкг ітрієвих SPA гранул, покритих стрептавідином, 0,126 нМ розчину HD Oligo DR2 і 0,3 мкг PPAR α з 0,5 мкг RXR α , 0,5 мкг PPAR δ з 0,5 мкг RXR α або 1,25 мкг PPAR γ з 3,03 мкг RXR α в наведеному вище зв'язувальному буфері плюс 14 % гліцерину і 5 мкг ДНК сперми лосося, фрагментованої в результаті гідродинамічного зсуву. Неспецифічне зв'язування визначають у присутності 10000 нМ розчину неміченої еталонної сполуки-подвійного агоніста PPAR α/δ для дослідження альфа- і дельта-рецепторів і еталонної сполуки-агоніста PPAR γ для дослідження гамма-рецепторів. Зв'язувальну реакційну суміш (100 мкл на лунку в 96-лунковому [Costar 3632] планшеті) інкубують протягом 10 год., і підраховують розпади на хвилину (dpm) із застосуванням лічильника Wallac Microbeta. Зв'язувальну спорідненість рецептора (IC₅₀) до сполуки визначають шляхом підгонки 11-точкової кривої "концентрація-реакція" до 4-параметричного логістичного рівняння. К_i визначають з IC₅₀, використовуючи рівняння Ченга-Прусса, й К_d визначають шляхом насичувального зв'язування. У жодному з трьох досліджень зв'язування PPAR з концентраціями до 10 мкМ для сполуки Прикладу 1 зв'язування не виявлено. Таким чином, результати досліджень, наведені в цьому описі, підтверджують, що сполука Прикладу 1 селективно активує GPR40, уникаючи при цьому небажаної активності PPAR. Відносні значення IC₅₀ для взятої за зразок сполуки при випробуванні до 30 мкМ є більшими ніж 10 мкМ для ізоформ PPAR, підтверджуючи, що взята за зразок сполука уникає активності PPAR із забезпеченням при цьому необхідної активації GPR40.

Для перевірки селективності взятої за зразок сполуки використовують також репортерні функціональні дослідження Ga14 PPAR α , Ga14 PPAR δ і PPAR γ . Клітини CV1, одержані з ниркової тканини африканської зеленої мавпи, трансфікують різними рецепторними і репортерними плазмідами з використанням FuGENE. Для дослідження Ga14 PPAR α і PPAR δ репортерну плазмиду, яка містить п'ять тандемних копій чутливого елемента дріжджового транскрипційного білка Ga14, клонованого вище гена люциферази світляків, стимульованого головним пізнім промотором аденовірусу, трансфікують разом зі стимульованою мавпячим вірусом 40 (SV40) плазмидою, яка конститутивно експресує гібридний білок, який містить зв'язувальний домен ДНК (DBD) Ga14 і зв'язувальний ліганд PPAR α або PPAR δ . Для дослідження PPAR γ плазмиди, які кодують PPAR γ і RXR α , обидві стимульовані цитомегаловірусним (CMV) промотором, трансфікують разом із плазмидою, яка містить люциферазну репортерну кДНК, стимульовану ТК промотором, і рецепторний реагуючий елемент (2X PPRE). Клітини трансфікують в Т-колбах для культивування клітин (225 см²) в 60

середовищі DMEM з 5 % FBS, десорбованої деревним вугіллям. Після інкубації протягом ночі трансфіковані клітини обробляють трипсином, висівають на 96-лункові непрозорі планшети (15000 клітин/лунка) в середовище DMEM, яке містить 5 % FBS, десорбованої деревним вугіллям, інкубують протягом 4 год., і вносять розчин (від 0,17 нМ до 10мкМ) досліджуваної сполуки або еталонної сполуки у напівлогарифмічних розведеннях. Після 24 год. інкубації зі сполукою клітини лізують, і визначають активність люциферази як критерій активації рецептора люмінесценцією. Дані підганяють до чотирипараметричної логістичної моделі для визначення значень EC_{50} . Максимальну відсоткову стимуляцію визначають у зіставленні з максимальною стимуляцією, одержаною з 10 мкМ розчином відповідної еталонної сполуки-агоніста PPAR. При перевірці із застосуванням описаних вище специфічних PPAR котрансфекційних (СТР)/функціональних досліджень зі Сполукою 1 з концентрацією до 10 мкМ функціональної активації PPAR α , PPAR δ або PPAR γ не виявлено. Таким чином, аналіз підтверджує, що взята за зразок сполука уникає агоністичної активності PPAR, як і очікувалося.

Ефективність *in vivo*: Внутрішньоочеревинний тест на толерантність до глюкози (IPGTT)

Для перевірки здатності взятої за зразок сполуки до активації GPR40 *in vivo*, результатом якої є антидіабетична ефективність, тобто зниження рівнів глюкози в плазмі крові, проводять 4-денний внутрішньоочеревинний тест на толерантність до глюкози (ipGTT), результати якого для випробуваної сполуки наведені нижче.

Мишей-самців лінії Balb/c (миші-альбіноси) (віком 8-9 тижнів) розміщують поодиночки, і годують нормальним раціоном для гризунів і водою *ad libitum*. Тварин зважують, довільно розподіляють за масою тіла, і масу тіла кожного дня реєструють. Тваринам один раз на день перорально протягом трьох днів вводять дозу композиції, яка містить метилцелюлозу і Твін-80. У ніч перед 4-м днем тварин не годують протягом ночі. Вранці 4-го дня тваринам перорально вводять лише сполуку або носій за 60 хв до тесту на толерантність до глюкози (глюкоза, 2 г/кг, внутрішньоочеревинно). Рівні глюкози в крові визначають за пробами крові, які відбирають із хвостової вени через 0 хв, 3 хв, 7 хв, 15 хв, 30 хв і 60 хв після цукрового навантаження. Профіль зміни рівнів глюкози в крові від $t=0$ хв до $t=60$ хв використовують для інтеграції площі під кривою (AUC) для кожної обробки. Відсоткове зниження глюкози обраховують за даними AUC сполуки по відношенню до AUC групи, яка одержувала носій. Досліджувану сполуку вводять пероральним шляхом у дозі 0,3 мг/кг, 1,0мг/кг, 3,0мг/кг, 10мг/кг або 30 мг/кг, а позитивний контроль (3-[4-(2-метилбензилокси)феніл]-гекс-4-инову кислоту, дивись WO2005/086661), вводять в дозі 10 мг/кг. Рівні глюкози значно знижуються в порівнянні з рівнями, які досягаються з контрольним носієм у 15 хв моменти часу з дозами в 3 мг/кг, 10 мг/кг і 30 мг/кг і у 30 хв і 60 хв моменти часу з дозами 1,0 мг/кг, 3,0 мг/кг, 10 мг/кг і 30 мг/кг сполуки Прикладу 1. Рівні глюкози знижені у 15 хв, 30 хв і 60 хв часових точках для позитивного контролю. ED50 для цієї сполуки, виходячи з AUC для зниження рівнів глюкози, становить 1,0 мг/кг. Результати цього дослідження показують, що наслідком активації GPR40 сполукою Прикладу 1 є *in vivo* антидіабетична ефективність.

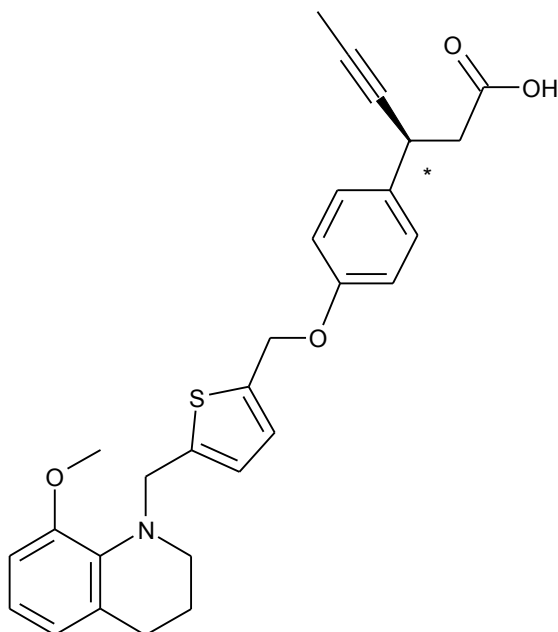
Взятій за приклад сполуці за цим винаходом може бути легко надана форма фармацевтичних композицій відповідно до загальноприйнятих способів, відомих в цій галузі, наприклад, наведених в Remington's "Pharmaceutical Sciences", Gennaro, Ed., Mack Publishing Co. Easton Pa. 1990, така як таблетки, тверді або заповнені гелем капсули, порошки, суспензії або розчини. Композиція може також містити один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, наповнювачів і розріджувачів. Необмежувальними прикладами фармацевтично прийнятних носіїв, наповнювачів і розріджувачів, придатних для таких композицій, є: крохмаль, цукор, маніт і похідні діоксиду кремнію; зв'язувальні агенти, такі як карбоксиметилцелюлоза та інші похідні целюлози, альгінати, желатин і полівінілпіролідон; зволожувальні агенти, такі як гліцерин; розпушувальні речовини, такі як карбонат кальцію і бікарбонат натрію; агенти, які уповільнюють розчинення, такі як парафін; прискорювачі ресорбції, такі як четвертинні амонієві сполуки; поверхнево-активні речовини, такі як цетиловий спирт, моностеарат гліцерину; адсорбтивні носії, такі як каолін та бентоніт; та змащувальні речовини, такі як тальк, стеарат кальцію і стеарат магнію, тверді поліетиленгліколи.

Фармацевтичними композиціями, яким віддається перевага, є композиції, виготовлені у формі таблетки або капсули для перорального введення. Така таблетка або капсула може містити сполуку за цим винаходом в кількості, ефективній для лікування діабету, зокрема, діабету другого типу.

Фармацевтичну композицію вводять пацієнту в кількості, ефективній для лікування діабету, конкретніше, діабету другого типу. Відповідна кількість або доза, ефективна для лікування пацієнта, може бути визначена медичним працівником.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Сполука, яка являє собою:



5 або її фармацевтично прийнятна сіль.

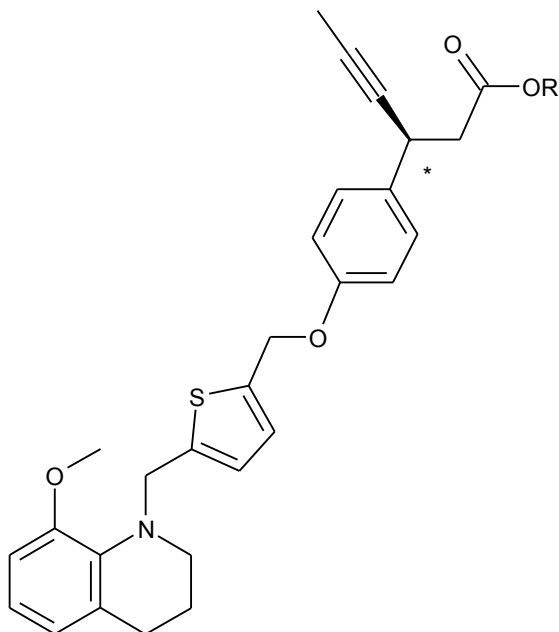
2. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за п. 1 або її фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

3. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за п. 1 для застосування в терапії.

10 4. Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль за п. 1 для застосування в лікуванні діабету у ссавця.

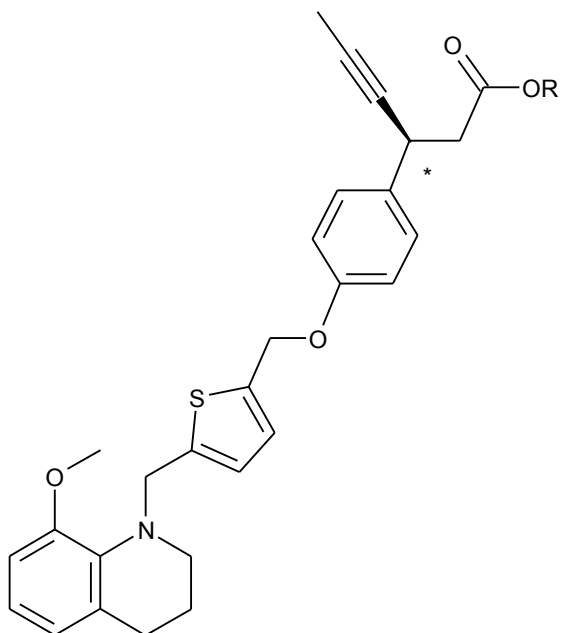
5. Застосування сполуки або її фармацевтично прийнятної солі за п. 1 при виготовленні лікарського засобу для лікування діабету.

6. Сполука, яка відповідає формулі II:



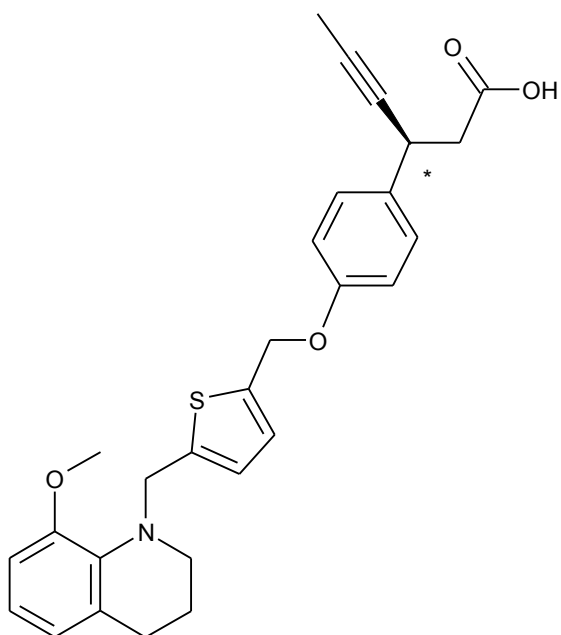
15 де R вибраний з групи, яку складають: C₁₋₄-алкіл, C₁₋₄-галогеналкіл, C₃₋₆-циклоалкіл, C₁₋₄-алкіл-C₃₋₆-циклоалкіл, феніл та C₁₋₅-алкілфеніл.

7. Спосіб одержання (3S)-3-[4-[[5-[(8-метокси-3,4-дигідро-2H-хінолін-1-іл)метил]-2-тієніл]метокси]феніл]гекс-4-инової кислоти або її фармацевтично прийнятної солі, який включає деестерифікацію сполуки формули II:



, II

де R вибирають з групи, яку складають: C_{1-4} -алкіл, C_{1-4} -галогеналкіл, C_{3-6} -циклоалкіл, C_{1-4} -алкіл- C_{3-6} -циклоалкіл, феніл та C_{1-5} -алкілфеніл, з одержанням сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі



5

I.

 Комп'ютерна верстка І. Скворцова

 Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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