



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.06

(21) Номер заявки
201891103

(22) Дата подачи заявки
2016.11.08

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/5025 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

(31) 15194297.6

(32) 2015.11.12

(33) EP

(43) 2018.11.30

(86) PCT/EP2016/076905

(87) WO 2017/080967 2017.05.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Ф. ХОФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Альзенц Йохем, Грассманн Олаф,
Кюль Петер, Мецгер Фридрих,
МакКарти Кэтлин Дороти, Моравски
Вианна Эдуарду Паулу, Вудхаус
Марвин Ллойд (CH)

(74) Представитель:
Липатова И.И., Хмара М.В.,
Новоселова С.В., Осипов К.В.,
Дошечкина В.В., Ильмер Е.Г.,
Пантелеев А.С. (RU)

(56) WO-A1-2015173181
WO-A1-2013112788
BRUNHILDE WIRTH ET AL.: "Moving
towards treatments for spinal muscular atrophy: hopes
and limits", EXPERT OPINION ON EMERGING

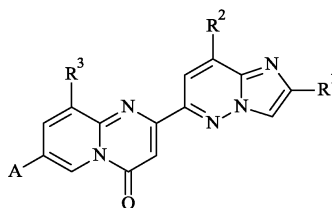
DRUGS, vol. 20, no. 3, 28 April 2015 (2015-04-28),
pages 353-356, XP055340211, UK, ISSN: 1472-8214,
DOI: 10.1517/14728214.2015.1041375, page 355,
paragraph 4. Expert opinion

ZANETTA CHIARA ET AL.: "Molecular
Therapeutic Strategies for Spinal Muscular
Atrophies: Current and Future Clinical
Trials", CLINICAL THERAPEUTICS, EXCERPTA
MEDICA, PRINCETON, NJ, US, vol. 36, no. 1,
17 December 2013 (2013-12-17), pages 128-140,
XP028670216, ISSN: 0149-2918, DOI: 10.1016/
J.CLINTHERA.2013.11.006, page 134; figure 2, page
138, paragraph "small molecules", page 130, right-
hand column, paragraph 3-4

SEISUKE MIMORI ET AL.: "Protective
Effects of 4-Phenylbutyrate Derivatives on the
Neuronal Cell Death and Endoplasmic Reticulum
Stress", BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL
BULLETIN (OF JAPAN), vol. 35, no. 1, 1 January
2012 (2012-01-01), pages 84-90, XP055340337, JP,
ISSN: 0918-6158, DOI: 10.1248/bpb.35.84, abstract,
second full sentence; page 84, right-hand column
FR-A1-2914188

N.A. NARYSHKIN ET AL.: "SMN2 splicing
modifiers improve motor function and longevity in
mice with spinal muscular atrophy", SCIENCE, vol.
345, no. 6197, 8 August 2014 (2014-08-08), pages
688-693, XP055227441, ISSN: 0036-8075, DOI:
10.1126/science.1250127, page 689; figure 1, abstract

(57) В изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие соединение формулы (I)



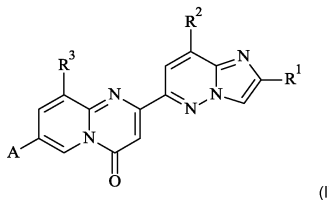
(I)

где A, R¹, R² и R³ являются такими, как описано в данном документе, а также их фармацевтически приемлемые соли. Кроме того, изобретение относится к изготовлению фармацевтических композиций, содержащих соединение формулы (I), и их применению в качестве лекарственных средств.

Область техники

В данном изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие соединения, которые представляют собой модуляторы сплайсинга гена SMN2, их изготовление и применение в лечении, замедлении прогрессирования или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА). Кроме того, фармацевтические композиции по изобретению могут дополнительно содержать цитопротекторы. Изобретение также относится к комбинированному применению модуляторов сплайсинга гена SMN2 и цитопротекторам для применения в лечении или облегчении спинальной мышечной атрофии (СМА).

В частности, данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединение 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он формулы (I)



где A, R¹, R² и R³ являются такими, как описано в данном документе, и их фармацевтически приемлемым солям.

Предшествующий уровень техники

Спинальная мышечная атрофия (СМА) в самом широком понимании описывает группу наследуемых и приобретенных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), характеризующихся прогрессирующей потерей двигательных нейронов в спинном мозге и стволе головного мозга, вызывающей мышечную слабость и атрофию мышц. Наиболее распространенная форма СМА вызвана мутациями в гене SMN (от англ. Survival Motor Neuron, выживаемость двигательных нейронов) и имеет проявления разной степени тяжести, затрагивая как детей, так и взрослых (Crawford and Pardo, Neurobiol. Dis., 1996, 3:97).

Младенческая СМА является наиболее тяжелой формой этого нейродегенеративного расстройства. Симптомы включают мышечную слабость, слабый мышечный тонус, слабый крик, вялость или склонность к обморокам, затрудненное сосание или глотание, накопление секретов в легких или горле, трудности с кормлением и повышенную предрасположенность к инфекциям дыхательных путей. Нижние конечности, как правило, слабее, чем верхние, и такие основные показатели развития, как поднимание головы или способность сидеть прямо, не достигаются. В целом, чем раньше проявляются симптомы, тем короче продолжительность жизни. Вслед за деградацией двигательных нейронов вскоре начинают проявляться симптомы. Тяжелые формы заболевания несовместимы с жизнью, и лечения ни одной из форм заболевания не существует. Течение СМА напрямую связано со скоростью деградации двигательных нейронов и обусловленной этим тяжестью заболевания. Младенцы с тяжелой формой СМА часто страдают респираторными заболеваниями вследствие слабости мышц, поддерживающих дыхание. Дети с более мягкими формами СМА имеют большую продолжительность жизни, несмотря на то, что они могут нуждаться в интенсивной медицинской помощи, особенно те, у которых заболевание протекает в более тяжелой форме. По тяжести клинических нарушений СМА условно подразделяют на пять групп.

(а) СМА типа 0 (внутриутробная СМА) является наиболее тяжелой формой заболевания и начинается в пренатальном периоде. Как правило, первым симптомом СМА типа 0 является пониженная двигательная активность плода, которая может впервые проявляться между 30 и 36 недель беременности. После рождения такие новорожденные проявляют слабую двигательную активность и имеют затрудненное глотание и дыхание.

(b) При СМА типа 1 (младенческая СМА или болезнь Верднига-Гоффманна) симптомы манифестируют между 0 и 6 месяцами. Эта форма СМА также является очень тяжелой. Пациенты никогда не достигают способности сидеть и без вспомогательной вентиляции легких обычно погибают в течение первых 2 лет жизни.

(с) СМА типа 2 (промежуточная СМА) в среднем возникает в возрасте 7-18 месяцев. Пациенты достигают способности самостоятельно сидеть, но не могут самостоятельно стоять или ходить. Прогноз в этой группе существенно зависит от степени поражения дыхательной системы.

(d) СМА типа 3 (юношеская СМА, или болезнь Кугельберга-Веландера) обычно диагностируется в возрасте старше 18 месяцев. Индивидуумы, имеющие СМА типа 3, способны самостоятельно ходить в некоторые периоды их заболевания, но часто становятся прикованными к инвалидной коляске в юношеском или взрослом возрасте.

(е) СМА типа 4 (СМА взрослых). Слабость обычно проявляется в позднем подростковом возрасте, затрагивая язык, кисти рук или ступни, и затем прогрессирует на другие части тела. Течение СМА взрослых более медленное и не влияет или незначительно влияет на ожидаемую продолжительность жизни.

Ген SMN картировали путем анализа сцепления с областью на хромосоме 5q. У человека эта область содержит инвертированный повтор приблизительно 500 тысяч пар оснований (тпн), в результате

чего образуются две практически идентичные копии гена SMN. СМА вызывает инактивирующая мутация или делеция теломерной копии гена (SMN1) на обеих хромосомах, приводящая к потере функции гена SMN1. Однако у всех пациентов сохраняется центромерная копия гена (SMN2), и число копий гена SMN2 у пациентов с СМА обычно обратно коррелирует с тяжестью заболевания; т.е. пациенты с менее тяжелыми формами СМА имеют больше копий SMN2. Тем не менее SMN2 не способен полностью компенсировать потерю функции SMN1 вследствие альтернативного сплайсинга экзона 7, обусловленную трансляционно молчащей мутацией С на Т в экзоне 7. В результате большинство транскриптов гена SMN2 лишены экзона 7 ($\Delta 7$ SMN2) и кодируют укороченный белок SMN с нарушенной функцией и быстро деградирующий.

Функция белка SMN подробно описана, полагают, что он играет роль в процессинге и метаболизме РНК, опосредуя сборку комплексов РНК с белками определенного класса, обозначаемыми snRNP. SMN может выполнять и другие функции в двигательных нейронах, однако его роль в предупреждении селективной дегенерации двигательных нейронов до конца не установлена.

В большинстве случаев диагностика СМА основана на клинических симптомах и по меньшей мере наличии одной копии гена SMN1 при генетическом анализе. Однако приблизительно в 5% случаев СМА вызвана генетической мутацией, отличной от инактивации SMN1, некоторые из них известны, а другие еще не установлены. В некоторых случаях, когда невозможно провести анализ гена SMN1 или он не выявляет каких-либо аномалий, могут быть рекомендованы другие тесты, такие как электромиография (ЭМГ) или биопсия мышц.

Медицинская помощь пациентам, страдающим СМА, в настоящее время ограничена поддерживающей терапией, включающей респираторную поддержку, диету и реабилитацию; не существует лекарственных препаратов, борющихся с причиной заболевания. В настоящее время лечение СМА заключается в предупреждении и контроле вторичных эффектов хронической утраты двигательных единиц. Основной проблемой при СМА 1 типа является предупреждение и раннее лечение проблем с легкими, которые являются причиной летального исхода в большинстве случаев. Если некоторые дети, пораженные СМА, могут достичь взрослого возраста, те, кто имеет СМА 1 типа, имеют ожидаемую продолжительность жизни менее двух лет.

Разработано несколько моделей СМА на мышах. В частности, в модели, в которой SMN лишен экзона 7 ($\Delta 7$ SMN) (Le et al., Hum. Mol. Genet, 2005, 14:845), животные несут и ген SMN2, и несколько копий кДНК $\Delta 7$ SMN2 и имеют многие фенотипические признаки СМА 1 типа. Модель $\Delta 7$ SMN может применяться как для исследования экспрессии SMN2, так и для оценки функции двигательных нейронов и выживаемости. Модель на мышах с аллелями C/C (Jackson Laboratory штамм #008714, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) является моделью менее тяжелого заболевания СМА, при этом у мышей снижены уровни полноразмерной мРНК SMN2 (FL SMN2) и белка SMN. Мыши с фенотипом, который обусловлен аллелями C/C, имеют ген SMN2 и гибридный ген mSMN1-SMN2, который подвергается альтернативному сплайсингу, но у них не отмечается явной мышечной слабости. Модель на мышах с аллелями C/C используют в исследованиях экспрессии SMN2.

Результатом лучшего понимания генетических основ и патофизиологии СМА стала разработка нескольких стратегий лечения, но ни одна из них не позволила добиться успехов в клинике.

Замена гена SMN1 с использованием для доставки вирусных векторов и замещение клеток с использованием дифференцированных SMN1^{+/+} стволовых клеток продемонстрировали эффективность в моделях СМА на животных. Прежде чем применять указанные подходы к человеку, необходимо оценить безопасность, иммунный ответ и изучить необходимость начала лечения на неонатальной стадии.

Коррекция альтернативного сплайсинга SMN2 в культивируемых клетках стала возможной благодаря применению в качестве терапевтических агентов синтетических нуклеиновых кислот: (i) антисмысловых олигонуклеотидов, мишенью которых являются элементы последовательности пре-мРНК SMN2, сдвигающих реакцию сплайсинга в сторону образования полноразмерной мРНК SMN2 (Passini et al., Sci. Transl. Med., 2011, 3:72ra18 и Hua et al., Nature, 2011, 478:123); и (ii) транс-сплайсинг молекул РНК с получением полностью функциональной последовательности РНК, которая при сплайсинге замещает мутантный фрагмент и обеспечивает образование полноразмерной мРНК SMN1 (Coady and Lorson, J. Neurosci, 2010, 30:126).

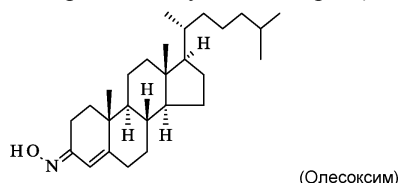
Изучаются и другие подходы, в том числе ведется поиск лекарственных средств, повышающих уровни SMN, улучшающих остаточную функцию SMN или компенсирующих ее потерю. Показано, что аминокликозиды повышают экспрессию стабилизированного белка SMN, полученного при трансляции мРНК $\Delta 7$ SMN2, обеспечивая сквозное прочтение абберрантного стоп-кодона, но плохо проникают в центральную нервную систему и являются токсичными после повторного введения. Показано увеличение белка SMN в культуре клеток под воздействием химиотерапевтических агентов, таких как акларубицин, однако профиль токсичности этих лекарственных средств не позволяет применять их у страдающих СМА пациентов в течение длительного времени. Некоторые лекарственные средства, проходящие клинические исследования для лечения СМА, включают активаторы транскрипции, такие как ингибиторы деацетилазы гистонов (HDAC, от англ. histone deacetylase) (например, бутираты, вальпроовую кислоту и

гидроксимочевину) и стабилизаторы мРНК (RG3039, ингибитор декапирования мРНК от компании Repligen) с целью увеличения количества общей мРНК, транскрибируемой с гена SMN2. Однако применение ингибиторов HDAC или стабилизаторов мРНК не воздействует на причину СМА и может привести к общему усилению транскрипции и экспрессии генов и может оказаться небезопасным для человека.

Альтернативный подход включает проведение исследований с цитопротекторными агентами, такими как олесоксим. Мишенью этих стратегий лечения СМА является не SMN, они были разработаны для защиты не только двигательных нейронов с дефицитом SMN от нейродегенерации, но также и других систем, страдающих при заболевании, таких как мышечные клетки. Олесоксим показал клиническую эффективность в лечении СМА 2 типа (промежуточная СМА) и СМА 3 типа (юношеская СМА, неамбулаторная).

Система, разработанная для идентификации соединений, повышающих включение 7 экзона SMN в РНК, транскрибированную с гена SMN2, и некоторые идентифицированные таким образом бензоксазолиновые и бензоизоксазолиновые соединения описаны в международной заявке на патент WO 2009/151546 A1. Система, разработанная для идентификации соединений, вызывающих сдвиг рамки считывания для образования стабилизированного белка SMN с мРНК $\Delta 7$ SMN2, и некоторые идентифицированные таким образом изоиндолиноновые соединения описаны в международных заявках на патент WO 2010/019236 A1 и WO 2013/119916 A2.

Олесоксим (холест-4-ен-3-он оксим, (EZ)-N-(холест-4-ен-3-илиден)гидроксиламин, регистрационный номер CAS 22033-87-0) представляет собой цитопротекторное лекарство, у которого обнаружили способность улучшать функцию и выживаемость нейронов и других типов клеток при связанных с заболеванием стрессовых условиях благодаря взаимодействиям с порой, увеличивающей проницаемость митохондрий (mPTP, от англ. mitochondrial permeability transition pore).



WO 2004/7082581 A2 описывает применение олесоксима для обеспечения нейропротекции у пациента, а WO 2008/142231 A2 описывает фармацевтические композиции, содержащие его.

Способы синтеза оксимов d6-холестенонов и олесоксима описали, например, лауреат Нобелевской премии Адольф Фридрих Йоган Бутенандт (Butenandt A. et al., Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft (1936), 69B, 882-8) или Ponsold K. et al. (Journal fuer Praktische Chemie (1964), 23(3-4), 173-6).

Механизм действия олесоксима, его токсичность, метаболизм и фармакодинамика описаны Martin L.J. (IDrugs (2010) 13(8):568-80). In vivo олесоксим спасает двигательные нейроны от клеточной гибели, индуцированной повреждением нервов у новорожденных крыс, и способствует регенерации нервов после размождения нервов у взрослых мышей. Способствуя регенерации аксонов и выживаемости двигательных нейронов, олесоксим представляет рациональный подход к лечению СМА. Кроме того, имеются сведения о функциональном улучшении в доклинических моделях СМА.

Данные о связывании на молекулярном уровне указывают, что олесоксим взаимодействует с двумя белками внешней мембраны митохондрий, которые, как предполагают, модулируют открытие комплекса поры, увеличивающей проницаемость митохондрий (mPTP). Связываясь с этими белками, олесоксим помогает митохондриям сохранять их существенные функции, такие как буферизация кальция в нейронах, подвергнутых стрессу, таким образом уменьшая дегенерацию и гибель клеток. Цитопротекторные эффекты наблюдались в первичных нейронах, подвергнутых физиологическому стрессу, первичных кардиомиоцитах, подвергнутых токсическому действию антрациклина, а также в гепатоцитах мыши, в которых индуцировали Fas-зависимый апоптоз. Таким образом, олесоксим обладает потенциалом сокращать патологический индуцированный стрессом апоптоз в нейронах, а также в клетках, не являющихся нейронами.

Следовательно, указанные сайты связывания могут играть роль в протекторном действии олесоксима в отношении нейронов, клеток и тканей, поскольку при большинстве нейродегенеративных заболеваний имеет место индуцированная стрессом митохондриальная дисфункция. Спасение двигательных нейронов и стимуляция регенерации нервов, наблюдавшиеся in vivo при лечении олесоксимом, подтверждают, что олесоксим действует как на уровне клеточного тела двигательных нейронов, так и на уровне аксонов и, возможно, обладает протекторным действием в отношении мышц (Pathak D. et al. J. Biological Chemistry (2015), 290(37):22325-36).

Олесоксим разрабатывался для лечения СМА 2 типа и 3 типа. Программы клинической разработки олесоксима направлены на то, чтобы продемонстрировать сохранение двигательной функции в течение 2-летнего периода наблюдений. Клинические испытания олесоксима для лечения СМА включают два клинических исследования: исследование фазы Ib для оценки фармакокинетики и безопасности

(TRO19622CLEQ1115-1) с использованием препарата в форме твердых капсул и исследование фазы II (TRO19622CLEQ1275-1) с использованием препарата в форме пероральной суспензии. Платебо-контролируемое исследование фазы II (TRO19622CLEQ1275-1) в настоящее время является самым крупным и продолжительным клиническим исследованием, проводившимся по данному показанию. Исследование показало сохранение двигательной функции в течение 2-летнего периода наблюдений в группе, получавшей лечение олесоксимом, по сравнению со снижением основного показателя эффективности (оценка двигательной функции) приблизительно на два пункта в группе плацебо, что согласуется с описанным естественным течением заболевания (Vuillerot C. et al. Arch. Phys. Med. Rehabil. (2013), 94(8):1555-61.). Исследование II фазы продемонстрировало благоприятное соотношение "польза/риск" при лечении олесоксимом пациентов, имеющих СМА 2 и 3 типа.

Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании генетических основ и патофизиологии СМА, по-прежнему актуальным является поиск соединений и комбинаций соединений, а также подходящих способов их введения, которые бы изменяли течение спинальный мышечной атрофии, одного из наиболее тяжелых неврологических заболеваний детского возраста.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют обычное значение, известное специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение. Ниже приведены способы и вещества, подходящие для осуществления изобретения, однако для воплощения или проверки изобретения можно применять способы и вещества, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе.

Все публикации, заявки на патенты и другие ссылки, приведенные в данном документе, включены во всей полноте путем ссылки.

Если не указано иное, используемая в документе номенклатура основана на систематической номенклатуре IUPAC.

Любая незанятая валентность на атоме углерода, кислорода, серы или азота в приведенных структурах означает присутствие водорода, если не указано иное.

Определения, приведенные в данном документе, применяют вне зависимости от того, указаны ли обсуждаемые термины в отдельности или в комбинации. Подразумевают, что приведенные в данном документе определения можно объединять с образованием соответствующих химических комбинаций, например, таких как "гетероциклоалкиларил", "галоалкилгетероарил", "арилалкилгетероциклоалкил" или "алкоксиалкил". Последний член комбинации представляет собой радикал, который связан с остальной частью молекулы. При словесном обозначении другие члены комбинации перечисляются в порядке, обратном порядку их присоединения к связанному радикалу, например комбинация амино-С₁₋₇-алкил относится к С₁₋₇-алкилу, который замещен амино, или, например, комбинация арилалкилгетероциклоалкил относится к радикалу гетероциклоалкил, замещенному алкилом, который замещен арилом.

Термин "группировка" относится к атому или группе химически связанных атомов, которые присоединены к другому атому или молекуле одной или несколькими химическими связями, таким образом формируя часть молекулы. Например, переменные A, R¹, R² и R³ формулы (I) относятся к группировкам, которые присоединены к основной структуре формулы (I) ковалентной связью.

При указании числа заместителей термин "один или более" относится к диапазону от одного заместителя до максимально возможного числа заместителей, т.е. к замещению от одного атома водорода до всех атомов водорода.

Термин "возможный" или "возможно" означает, что описываемое далее событие или обстоятельство могут, но необязательно будут иметь место, и охватывают случаи, когда событие или обстоятельство имеют место и случаи, когда они не имеют места.

Термин "заместитель" обозначает атом или группу атомов, замещающих атом водорода на родительской молекуле.

Термин "замещенный" обозначает, что определенная группа несет один или несколько заместителей. Если какая-либо группа несет множество заместителей и указан ряд возможных заместителей, заместители выбраны независимо и необязательно являются одинаковыми.

Термин "незамещенный" означает, что указанная группа не имеет заместителей.

Термин "возможно замещенный" означает, что указанная группа является незамещенной или замещенной одним или несколькими заместителями, независимо выбранными из группы возможных заместителей. При указании числа заместителей термин "один или более" обозначает от одного заместителя до максимально возможного числа заместителей, т.е. замещение от одного атома водорода до всех атомов водорода.

Термины "соединение(я) по изобретению" и "соединение(я) данного изобретения" обозначают соединения, изложенные в данном описании, и их стереоизомеры, таутомеры, сольваты и соли (например, фармацевтически приемлемые соли).

Когда соединения по изобретению представляют собой твердые вещества, специалисту в области техники понятно, что указанные соединения и их сольваты и соли могут существовать в различных твердых формах, в частности в различных кристаллических формах, все из которых входят в объем данного

изобретения и приведенных формул.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" обозначает соли, которые не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения. Фармацевтически приемлемые соли включают как соли присоединения основания, так и соли присоединения кислоты.

Термин "фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты" обозначает фармацевтически приемлемые соли, которые образованы неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная, бромистоводородная, серная, азотная, угольная, фосфорная, и органическими кислотами, выбранными из алифатических, циклоалифатических, ароматических, арилифатических, гетероциклических, карбоновых и сульфоновых органических кислот, таких как муравьиная, уксусная, пропионовая, гликолевая, глюконовая, молочная, пировиноградная, щавелевая, яблочная, малеиновая, малоновая, янтарная, фумаровая, винная, лимонная, аспарагиновая, аскорбиновая, глутаминовая, аминокислотная, бензойная, коричная, миндальная, эмбоновая, фенилуксусная, метансульфоновая, этансульфоновая, п-толуолсульфоновая и салициловая.

Термин "фармацевтически приемлемая соль присоединения основания" обозначает фармацевтически приемлемые соли, образованные органическими или неорганическими основаниями. Примеры приемлемых неорганических оснований включают соли натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца и алюминия. Соли, полученные при участии фармацевтически приемлемых нетоксических органических оснований, включают соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая природные замещенные амины, циклических аминов и основных ионообменных полимеров, таких как, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диэтиламиноэтанол, триметамин, бициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, пурины, пиперизин, пиперидин, N-этилпиперидин и полиаминные полимеры.

Стереохимические определения и условные обозначения, используемые в данном документе, обычно соответствуют приведенным S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984), McGraw-Hill Book Company, New York и Eliel, E. и Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. При описании оптически активного соединения для обозначения абсолютной конфигурации молекулы вокруг их хиральных центров используют префиксы D и L или R и S. Старшинство заместителей, присоединенных к рассматриваемому хиральному центру, устанавливают в соответствии с правилами Кана-Ингольда-Прелога (Cahn et al. Angew. Chem. Inter. Edit. 1966, 5, 385; опечатки 511). Префиксы D и L или (+) и (-) используют для обозначения знака вращения соединением плоскополяризованного света, при этом (-) или L обозначает, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или D является правовращающим.

Термин "хиральный центр" обозначает атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями. Термин "хиральный" обозначает способность не совпадать при наложении с зеркальным отображением, тогда как термин "ахиральный" относится к воплощениям, которые совпадают при наложении с их зеркальным отображением. Хиральные молекулы являются оптически активными, т.е. они способны вращать плоскость плоскополяризованного света. Соединения по данному изобретению могут иметь один или более хиральных центров и могут существовать в форме оптически чистых энантиомеров, смесей энантиомеров, например, таких как рацематы, оптически чистые диастереоизомеры, смеси диастереоизомеров, диастереоизомерные рацематы или смеси диастереоизомерных рацематов. Когда в химической структуре присутствует хиральный центр, предполагают, что все стереоизомеры, связанные с указанным хиральным центром, входят в объем данного изобретения.

Термины "галоген", "галоген" и "галид" используются в данном документе взаимозаменяемо и обозначают фтор, хлор, бром или йод. Одним из частных примеров галогена является фтор.

Термин "алкил" обозначает одновалентную линейную или разветвленную насыщенную углеводородную группу из 1-12 атомов углерода. В конкретных воплощениях алкил содержит от 1 до 7 атомов углерода, а в более частных воплощениях - от 1 до 4 атомов углерода. Примеры алкила включают метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил или трет-бутил. Частными примерами алкила являются метил и этил.

Термин "галогеналкил" обозначает алкильную группу, в которой по меньшей мере один атом водорода алкильной группы замещен одинаковыми или различными атомами галогена, в частности атомами фтора. Примеры галогеналкила включают монофтор-, дифтор- или трифтор-метил, -этил или -пропил, например 3,3,3-трифторпропил, 2-фторэтил, 2,2,2-трифторэтил, фторметил или трифторметил и т.п. Термин "пергалогеналкил" обозначает алкильную группу, в которой все атомы водорода алкильной группы замещены одинаковыми или различными атомами галогена.

Термин "бициклическая кольцевая система" обозначает два кольца, соединенных друг с другом посредством общей одинарной или двойной связи (аннелированные бициклические кольцевые системы), последовательности трех или более общих атомов (мостиковые бициклические кольцевые системы) или одного общего атома (спирокольцевые бициклические системы). Бициклические кольцевые системы могут быть насыщенными, частично ненасыщенными, ненасыщенными или ароматическими. Бициклические кольцевые системы могут содержать гетероатомы, выбранные из N, O и S.

Термин "циклоалкил" обозначает насыщенную моноциклическую или бициклическую углеводородную группу, содержащую от 3 до 10 атомов углерода в кольце. В частных воплощениях циклоалкил обозначает одновалентную насыщенную моноциклическую углеводородную группу, содержащую от 3 до 8 атомов углерода в кольце. Бициклический обозначает состоящий из двух насыщенных углеродных колец, имеющих один или более общих атомов углерода. Конкретные циклоалкильные группы являются моноциклическими. Примерами моноциклических циклоалкильных групп являются циклопропил, циклобутанил, циклопентил, циклогексил или циклогептил. Примерами бициклических циклоалкилов являются бицикло[2.2.1]гептанил или бицикло[2.2.2]октанил. Одним из частных примеров циклоалкила является циклопропил.

Термин "гетероциклоалкил" обозначает насыщенную или частично ненасыщенную моно-, би- или трициклическую кольцевую систему, содержащую от 3 до 9 атомов углерода в кольце, содержащую 1, 2 или 3 кольцевых гетероатома, выбранных из N, O и S, остальные атомы в кольце представляют собой углерод. В конкретных воплощениях гетероциклоалкил представляет собой одновалентную насыщенную моноциклическую кольцевую систему, содержащую от 4 до 7 атомов углерода в кольце, содержащую 1, 2 или 3 кольцевых гетероатома, выбранных из N, O и S, остальные атомы в кольце представляют собой углерод. Примерами моноциклических насыщенных гетероциклоалкилов являются азиридилил, оксиранил, азетидинил, оксетанил, пирролидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидро-тиенил, пиразолидинил, имидазолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, тиазолидинил, пиперидинил, тетрагидропиранил, тетрагидротииопиранил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, 1,1-диоксотииоморфолин-4-ил, азапанил, диазепанил, гомопиперазинил или оксазепанил. Примерами бициклических насыщенных гетероциклоалкилов являются 8-азабицикло[3.2.1]октил, хинуклидинил, 8-окса-3-азабицикло[3.2.1]октил, 9-азабицикло[3.3.1]нонил, 3-окса-9-азабицикло[3.3.1]нонил или 3-тиа-9-азабицикло[3.3.1]нонил. Примерами частично ненасыщенных гетероциклоалкилов являются дигидрофурил, имидазолинил, дигидрооксазолил, тетрагидропиперидинил или дигидропиранил. Конкретными примерами гетероциклоалкилов являются 1,4-дiazепанил, гексагидропирроло[1,2-a]пиперазинил, пиперидинил, пиперазинил и пирролидинил. Более частными примерами гетероциклоалкилов являются гексагидропирроло[1,2-a]пиперазинил и пиперазинил.

Термин "N-гетероциклоалкил" обозначает гетероциклоалкильный радикал, содержащий по меньшей мере один атом азота в кольце, где точкой присоединения гетероциклоалкильного радикала к остальной части молекулы является кольцевой атом азота. Частными примерами N-гетероциклоалкилов являются 1,4-дiazепанил, гексагидропирроло[1,2-a]пиперазинил, пиперидинил, пиперазинил и пирролидинил. Более конкретными примерами N-гетероциклоалкилов являются гексагидропирроло[1,2-a]пиперазинил и пиперазинил.

Термин "основность" применительно к соединению в данном документе обозначает отрицательный десятичный логарифм константы кислотности сопряженной кислоты ($pK_a = -\log K_a$). Чем больше значение pK_a сопряженной кислоты, тем сильнее основание ($pK_a + pK_b = 14$). В данном описании атом или функциональную группу обозначают "основными", если они могут быть акцепторами протона и если рассчитанное значение pK_a их сопряженной кислоты составляет по меньшей мере 7, более конкретно, если рассчитанное значение pK_a их сопряженной кислоты составляет по меньшей мере 7,8, более конкретно, если рассчитанное значение pK_a их сопряженной кислоты составляет по меньшей мере 8. Значения pK_a рассчитывают *in silico*, как описано F. Milletti et al., J. Chem. Inf. Model. (2007), 47:2172-2181.

Термин "алкилен" обозначает линейную насыщенную двухвалентную углеводородную группу из 1-7 атомов углерода или двухвалентную разветвленную насыщенную углеводородную группу из 3-7 атомов углерода. Примеры алкиленовых групп включают метилен, этилен, пропилен, 2-метилпропилен, бутилен, 2-этилбутилен, пентилен, гексилен. Конкретными примерами алкилена являются этилен, пропилен и бутилен.

Термин "амино" обозначает группу формулы $-NR'R''$, где R' и R'' независимо представляют собой водород, алкил, алкилокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, гетероарил или являются такими, как описано в данном документе. В альтернативном варианте R' и R'' вместе с атомом азота, к которому они присоединены, могут образовывать гетероциклоалкил. Термин "первичный амин" обозначает группу, в которой R' и R'' представляют собой водород.

Термин "вторичный амин" обозначает группу, в которой R' представляет собой водород, а R'' представляет собой группу, отличную от водорода.

Термин "третичный амин" обозначает группу, в которой R' и R'' являются отличными от водорода. Конкретными вторичными и третичными аминами являются метиламин, этиламин, пропиламин, изопропиламин, фениламин, бензиламин, диметиламин, диэтиламин, дипропиламин и диизопропиламин.

Термин "активная фармацевтическая субстанция" (или АФС) обозначает соединение или молекулу в составе фармацевтической композиции, которые обладают определенной биологической активностью.

Термины "фармацевтическая композиция" (или "композиция") используются взаимозаменяемо и обозначают смесь или раствор, содержащие терапевтически эффективное количество активной фармацевтической субстанции наряду с фармацевтически приемлемыми эксципиентами для введения млекопитающему, например человеку, которому это необходимо.

Термин "фармацевтически приемлемый" обозначает характеристику вещества, которое может найти применение для получения фармацевтической композиции, которое общепринято является безопасным, нетоксичным, не является биологически или каким-либо иным образом нежелательным и является пригодным для применения в ветеринарии, а также фармацевтического применения у человека.

Термины "фармацевтически приемлемый эксципиент", "фармацевтически приемлемый носитель" и "терапевтически инертный эксципиент" могут использоваться взаимозаменяемо и обозначают любой фармацевтически приемлемый ингредиент в фармацевтической композиции, не обладающий терапевтической активностью и являющийся нетоксичным для субъекта, которому осуществляют введение, такой как разрыхлители, связующие, наполнители, растворители, буферы, регуляторы тоничности, стабилизаторы, антиокислители, поверхностно-активные вещества, носители, разбавители или смазывающие агенты, применяющиеся при составлении фармацевтических продуктов.

Термины "индивидуум" или "субъект" относятся к млекопитающему. Млекопитающие включают одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и не являющихся человеком приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс), но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях индивидуумом или субъектом является человек.

Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество соединения или молекулы по данному изобретению, которое при введении субъекту (i) лечит или предупреждает конкретное заболевание, состояние или расстройство, (ii) смягчает, облегчает или устраняет один или более симптомов конкретного заболевания, состояния или расстройства или (iii) предупреждает или отсрочивает возникновение одного или более симптомов конкретного заболевания, состояния или расстройства, описанных в данном документе. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от соединения, от заболевания, лечение которого осуществляют, от тяжести заболевания, лечение которого осуществляют, от возраста и относительного здоровья субъекта, от способа и формы введения, от суждения специалиста-медика или ветеринара, осуществляющих лечение, и других факторов.

Термины "лечить" или "лечение" заболевания включают подавление заболевания, т.е. остановку развития заболевания или его клинических симптомов или облегчение заболевания, т.е. временную или стойкую регрессию заболевания или его клинических симптомов.

Термин "спинальная мышечная атрофия" (или СМА) относится к заболеванию, вызванному инактивирующей мутацией или делецией гена SMN1 на обеих хромосомах, что приводит к потере функции гена SMN1.

Симптомы СМА включают мышечную слабость, слабый мышечный тонус, слабый крик, слабый кашель, вялость или склонность к обморокам, затрудненное сосание или глотание, затрудненное дыхание, накопление секретов в легких или горле, сжатые кулачки с потными ладонями, трепетание/дрожание языка, часто наклон головы вбок, даже в положении лежа, как правило, большую слабость нижних конечностей по сравнению с верхними, характерное положение нижних конечностей в "позе лягушки", трудности с кормлением, повышенную предрасположенность к инфекциям дыхательных путей, слабость кишечника/мочевого пузыря, пониженную массу тела, неспособность сидеть без поддержки, неспособность ходить, неспособность ползать, гипотонию, арефлексию и многочисленные врожденные контрактуры (артрогрипоз), связанные с потерей клеток передних рогов спинного мозга.

Термин "лечить спинальную мышечную атрофию (СМА)" или "лечение спинальной мышечной атрофии (СМА)" включает один или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение тяжести СМА; (ii) отсрочивание возникновения СМА; (iii) подавление прогрессирования СМА; (iv) сокращение числа госпитализаций субъекта; (v) сокращение продолжительности госпитализаций субъекта; (vi) увеличение выживаемости субъекта; (vii) улучшение качества жизни субъекта; (viii) сокращение количества симптомов, ассоциированных с СМА; (ix) сокращение или облегчение тяжести одного или более симптомов, ассоциированных с СМА; (x) сокращение продолжительности симптомов, ассоциированных с СМА; (xi) предупреждение повторного возникновения симптомов, ассоциированных с СМА; (xii) подавление развития или возникновения симптомов СМА и/или (xiii) подавление прогрессирования симптомов, ассоциированных с СМА.

Более конкретно, термин "лечение СМА" обозначает один или более из следующих благотворных эффектов: (i) сокращение потери мышечной силы; (ii) увеличение мышечной силы; (iii) сокращение атрофии мышц; (iv) сокращение потери двигательной функции; (v) увеличение двигательных нейронов; (vi) сокращение потери двигательных нейронов; (vii) защита двигательных нейронов, лишенных SMN, от дегенерации; (ix) увеличение двигательной функции; (x) улучшение легочной функции и/или (xi) сокращение потери легочной функции.

Еще более конкретно, термин "лечение СМА" относится к функциональной способности или сохранению функциональной способности младенца или ребенка грудного возраста самостоятельно сидеть, способности младенца, ребенка грудного возраста, ребенка или взрослого самостоятельно стоять, самостоятельно ходить, самостоятельно бегать, самостоятельно дышать, самостоятельно поворачиваться во сне или самостоятельно глотать.

Термин "концентрация $EC_{1.5x}$ для образования полноразмерной мРНК мини-гена SMN2" (или " $EC_{1.5x}$ мини-гена") определяют как концентрацию исследуемого соединения, являющейся эффективной для увеличения количества полноразмерной мРНК мини-гена SMN2 до уровня, который в 1,5 раза превышает соответствующий уровень в клетках в присутствии несущей среды.

Термин "концентрация $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN" (или " $EC_{1.5x}$ белка SMN") определяют как концентрацию исследуемого соединения, эффективную для получения в 1,5 раза большего количества белка SMN в фибробластах пациента с СМА по сравнению с количеством, продуцируемым в присутствии несущей среды, служившей контролем.

Термин "полумаксимальная эффективная концентрация" (EC_{50}) обозначает концентрацию в плазме конкретного соединения или молекулы, необходимую для получения конкретного эффекта *in vivo*, составляющего 50% от максимального.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, являющемуся нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает буфер или подкислитель, эксципиент, стабилизатор или консервант, но не ограничивается ими.

Термин "буфер" или "буферная система" обозначает фармацевтически приемлемый эксципиент или смесь эксципиентов, стабилизирующие pH фармацевтического препарата. Подходящие буферы хорошо известны в области техники и могут быть найдены в литературе. Конкретные фармацевтически приемлемые буферы включают цитратный буфер, малатный буфер, малеатный буфер или тартратный буфер, более конкретно, тартратный буфер. Конкретные буферные системы по изобретению представляют собой комбинации органической кислоты и их определенных солей, например трехосновного цитрата натрия и лимонной кислоты, яблочной кислоты и малата натрия, натриево-калиевой соли винной кислоты и винной кислоты или динатриевой соли винной кислоты и винной кислоты, в частности натриево-калиевой соли винной кислоты и винной кислоты. В альтернативном варианте вместо комбинации кислоты и соответствующей соли в качестве "подкислителя" может применяться органическая кислота (в частности, винная кислота) в отдельности. Независимо от использованного буфера, pH можно доводить кислотой или основанием, известными в области техники, например соляной кислотой, уксусной кислотой, фосфорной кислотой, серной кислотой и лимонной кислотой, гидроксидом натрия и гидроксидом калия. Конкретным подкислителем является винная кислота.

Термин "антиокислитель" обозначает фармацевтически приемлемые эксципиенты, которые предупреждают окисление активного фармацевтического ингредиента. Антиокислители включают аскорбиновую кислоту, глутатион, цистеин, метионин, лимонную кислоту, ЭДТА.

Термин "поверхностно-активное вещество" обозначает фармацевтически приемлемый эксципиент, который применяют для защиты белковых композиций от механических стрессов, таких как встряхивание и напряжение сдвига. Примеры фармацевтически приемлемых поверхностно-активных веществ включают полоксамеры, полисорбаты, алкиловые эфиры полиэтиленоксида (BRIJ®), алкилфениловые эфиры полиэтиленоксида (TRITON-X®) или додецилсульфат натрия (SDS).

Термин "полоксамер" обозначает неионные три-блок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи поли(пропиленоксида) (PPO), фланкированной двумя гидрофильными цепями поли(этиленоксида) (PEO), каждая цепь PPO или PEO может иметь различную молекулярную массу. Полоксамеры также известны под торговым наименованием Pluronic. Конкретными полоксамерами являются полоксамер 188, полоксамер, в котором цепь PPO имеет молекулярную массу 1800 г/моль и содержание PEO 80% (мас./мас.).

Термин "полисорбат" обозначает эфиры олеиновой кислоты с сорбитом и его ангидридами, как правило, сополимеризованными с окисью этилена. Конкретными полисорбатами являются полисорбат 20 (поли(этилен оксид) (20) сорбитан монолаурат, TWEEN 20®) или полисорбат 80 (поли(этиленоксид) (80) сорбитан монолаурат, TWEEN 80®).

Значение "гидрофильно-липофильного баланса" (ГЛБ) означает степень гидрофильности неионного поверхностно-активного вещества. Значение ГЛБ определяют по отношению молекулярной массы гидрофильной части молекулы поверхностно-активного вещества к его общей молекулярной массе согласно описанию Griffin W.C., Journal of the Society of Cosmetic Chemists (1949), 1:311.

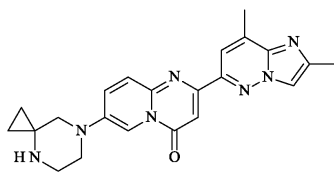
Термин "гидрофильный" обозначает способность молекулы или части молекулы взаимодействовать с полярными растворителями, в частности с водой, или с другими полярными группировками благодаря водородным связям, диполь-ионным взаимодействиям и/или диполь-дипольным взаимодействиям.

Термины "липофильный" и "гидрофобный" могут использоваться взаимозаменяемо и обозначают предрасположенность молекулы или части молекулы растворяться в неполярном окружении, таком как жиры, масла и неполярные растворители, благодаря лондоновским дисперсионным силам.

Значение "logP" обозначает десятичный логарифм коэффициента распределения P и является показателем липофильности нейтрального незаряженного соединения. В данном описании коэффициент распределения P определяют как отношение концентрации вещества, растворенного в органической фазе, в частности в 1-октаноле, к его концентрации в водной фазе в состоянии равновесия.

Соединения формулы (I)

В частности, данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I)



7-(4,7-дизаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он или его фармацевтически приемлемую соль.

Способы изготовления.

Соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли, описанные в данном документе, могут быть получены согласно стандартным способам, известным в области техники.

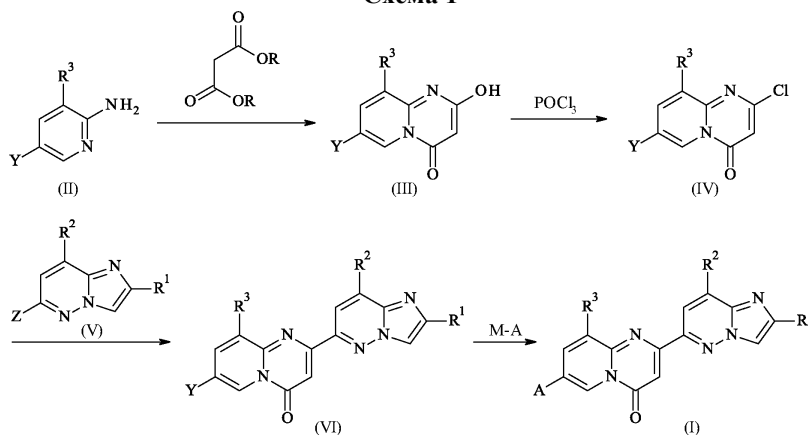
Как показано на Схеме 1, доступный для приобретения аминопиридин формулы (II) может вступать в реакцию с малоновым эфиром с образованием промежуточного соединения формулы (III), где Y и R³ являются такими, как описано в данном документе, а R представляет собой C₁₋₂алкил, в частности, метил. Соединение формулы (III) затем обрабатывают хлорирующим реагентом (таким как POCl₃ и т.п.) с получением соединения формулы (IV). Соединение формулы (IV) затем вступает в реакцию кросс-сочетания Сузуки с соединением формулы (V), где R¹ и R² являются такими, как описано в данном документе и Z представляет собой B(OH)₂ или эфир C₁₋₇алкилбороновой кислоты, такой как 4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил, в присутствии катализатора (такого как (1,1'-бис-(дифенилфосфин)ферроцен)-палладия(II) дихлорид (Pd(dppf)Cl₂) и т.п.) и основания (такого как K₂CO₃ и т.п.) в подходящем растворителе (таком как DMF и т.п.) с образованием соединения формулы (VI). Наконец, соединение формулы (VI) вступает в реакцию с соединением M-A:

а) в реакции нуклеофильного ароматического замещения (в частности, когда Y представляет собой фтор) при нагревании до температуры от 80 до 200°C или

б) в реакции аминирования по Бухвальду-Хартвигу в присутствии палладиевого катализатора (например, тетраakis-(трифенилфосфин)палладия (Pd(PPh₃)₄) или бис-(дибензилиденацетон)палладия (Pd(dba)₃) при нагревании до температуры от 20 до 100°C;

в растворителе (например, диметилсульфоксиде (DMSO), N-метилпирролидоне (NMP) или диметилформамиде (DMF)) с получением соединения формулы (I), где A является таким, как описано в данном документе, M представляет собой водород, натрий или калий, в частности водород, и где M связан с A через атом азота A.

Схема 1

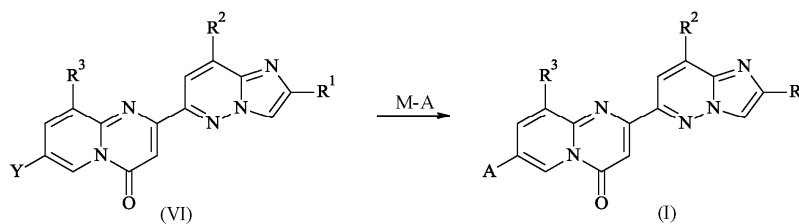


В одном воплощении изобретение также относится к способу получения соединений формулы (I) и их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе, включающему реакцию соединения формулы (VI) с соединением M-A:

а) в реакции нуклеофильного ароматического замещения (в частности, когда Y представляет собой фтор) при нагревании до температуры от 80 до 200°C или

б) в реакции аминирования по Бухвальду-Хартвигу в присутствии палладиевого катализатора (например, тетраakis-(трифенилфосфин)палладия (Pd(PPh₃)₄) или бис-(дибензилиденацетон)палладия (Pd(dba)₃) при нагревании до температуры от 20 до 100°C;

в растворителе (например, диметилсульфоксиде (DMSO), N-метилпирролидоне (NMP) или диметилформамиде (DMF)), где A, Y, R¹, R² и R³ являются такими, как описано в данном документе, M представляет собой водород, натрий или калий, в частности водород, и где M связан с A через атом азота A.



В конкретном воплощении изобретение относится к способу получения соединений формулы (I) и их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе, включающему реакцию нуклеофильного ароматического замещения между соединением формулы (VI), как описано выше, с соединением формулы M-A при нагревании в растворителе, где A, R¹, R², R³ и Y являются такими, как описано выше, M представляет собой водород, натрий или калий и где M связан с A через атом азота A.

Конкретное воплощение изобретения относится к способу получения соединений формулы (I) и их фармацевтически приемлемых солей согласно описанию выше, где реакцию нуклеофильного ароматического замещения осуществляют при температуре от 80 до 200°C.

Конкретное воплощение изобретения относится к способу получения соединений формулы (I) и их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе, где растворитель в реакции нуклеофильного ароматического замещения выбран из диметилсульфоксида (DMSO), N-метилпирролидона (NMP) и диметилформамида (DMF).

Конкретное воплощение изобретения относится к способу получения соединений формулы (I) и их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе, где M представляет собой водород.

В частности, соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли могут быть получены согласно способам, приведенным в данном документе в разделе "Примеры".

Применения в медицине.

Как описано выше, соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли обладают важными фармакологическими свойствами и, как было обнаружено, улучшают включение экзона 7 SMN1 и/или SMN2 в мРНК, транскрибированную с гена SMN1 и/или SMN2, таким образом повышая экспрессию белка SMN у человека, которому это необходимо.

Соединения по данному изобретению можно применять по отдельности или в комбинации с другими лекарственными средствами для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1. Указанные заболевания включают спинальную мышечную атрофию (СМА), но не ограничиваются ей.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, описанные выше, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения СМА.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, описанные выше, для применения в качестве терапевтически активных субстанций, в частности, для применения в качестве терапевтически активных субстанций для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, описанные выше, для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности, для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к способу для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении спинальной мышечной атрофии (СМА), включающем введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, описанных выше.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, описанные вы-

ше, для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом гена SMN1, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, описанные выше, для получения лекарственных средств для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА). Указанные лекарственные средства содержат соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, описанные выше.

Комбинации.

Цитопротекторы (такие как олесоксим) и модуляторы сплайсинга гена SMN2 (такие как соединения формулы (I)) представляют собой дополняющие друг друга подходы к лечению спинальной мышечной атрофии (СМА). Существующие данные позволяют предположить, что совместное введение цитопротекторов и модуляторов сплайсинга гена SMN2 в качестве комбинированной терапии принесет дополнительную пользу пациентам со всеми типами СМА. Масштаб дополнительной пользы можно оценить в исследованиях комбинированной терапии в моделях СМА у мышей.

Конкретным модулятором сплайсинга гена SMN2 по изобретению является соединение формулы (I), описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль.

Конкретным цитопротектором по изобретению является олесоксим.

Систематически низкие уровни белка SMN вызывают СМА. α -мотонейроны спинного мозга считают особенно уязвимыми при этом генетическом нарушении, и их дисфункция и потеря вызывают прогрессирующую мышечную слабость, паралич и в конечном счете приводят к преждевременной гибели больных. Традиционно СМА считали заболеванием, затрагивающим исключительно двигательные нейроны. Однако истощение SMN в двигательных нейронах нормальных мышей вызывало заболевание лишь с очень слабо выраженным фенотипом (Park et al., J. Neurosci. 2010, Sep 8; 30(36):12005-19). И наоборот, восстановление SMN в двигательных нейронах в модели СМА у мышей оказывало лишь умеренное влияние на фенотип СМА и выживаемость (Hua et al., Nature. 2011 Oct 5; 478(7367):123-6). Совместно эти результаты позволяют предположить, что в патогенез СМА вносят вклад клетки других типов, и понимание дополнительного вклада является основополагающим для разработки эффективной терапии.

В настоящем исследовании СМА рассматривают как расстройство, затрагивающее различные клетки, ткани и системы. В нескольких исследованиях *in vitro*, *in vivo*, а также в клинических наблюдениях у человека показано, что при СМА поражаются различные ткани, такие как чувствительные нервы, мышцы, сосуды, головной мозг, сердце и поджелудочная железа (Hamilton and Gillingwater, et al., Trends Mol. Med. 2013 Jan; 19(1):40-50. Например, существуют работы, демонстрирующие, что при СМА существуют специфические присущие мышцам дефекты, указывая на то, что SMN играет роль в развитии мышц и регенерации (Boyer et al., Front Physiol. 2013 Dec 18; 4:356; Hayhurst M. et al., Dev Biol. 2012 Aug 15; 368(2):323-34; Briccino et al., Hum. Mol. Genet. 2014 Sep 15; 23(18):4745-57; Shafey et al., Exp. Cell Res. 2005 Nov 15; 311(1):49-61, Cifuentes-Diaz et al., J. Cell Biol. 2001 Mar 5; 152(5):1107-14; Martinez et al., J. Neurosci. 2012 Jun 20; 32(25):8703-15. Это подчеркивает важность для пациентов, имеющих СМА, лечения, направленно действующего на мышцы. Многие терапевтические стратегии направлены на восстановление белка SMN. Возможное лечение с применением антисмысловых олигонуклеотидов и генной терапии нацелены на повышение SMN только в ткани ЦНС. Эффективное лечение, мишенью которого будут другие пораженные клетки и ткани, по-прежнему представляет трудную задачу.

Цитопротектор олесоксим и модуляторы сплайсинга гена SMN2 формулы (I) можно вводить как перорально, так и системно. Кроме того, механизмы их действия дополняют друг друга. Олесоксим является цитопротектором, защищающим митохондриальную мембрану и предотвращающим дисфункцию митохондрий, важный элемент патофизиологии заболевания СМА. Митохондрии особенно многочисленны в клетках, потребляющих большое количество энергии, таких как двигательные нейроны и мышечные клетки, и те, и другие являются тканями, на которые должно быть направлено лечение СМА. Модуляторы сплайсинга гена SMN2 формулы (I) нацелены на системное увеличение белка SMN.

Модуляторы сплайсинга гена SMN2 формулы (I) корректируют белок SMN на уровне РНК путем коррекции ошибочного сплайсинга пре-мРНК SMN. При максимальном повышении белка SMN в двигательных нейронах и фибробластах при СМА по сравнению с клетками при отсутствии лечения наблюдалось сопоставимое увеличение в клетках обоих типов (60-80%). Кроме того, на моделях СМА выраженной и умеренной степени тяжести у мышей, получавших модуляторы сплайсинга гена SMN2 формулы (I), повышение белка SMN достигало приблизительно 43% (головной мозг) и 55% (мышцы) от уровней белка у гетерозиготных мышей. Повышение белка было достаточным для обеспечения существенной пользы, восстановления проводимости нервно-мышечных синапсов (НМС) и выживаемости у мышей с тяжелым заболеванием, получавших соединения формулы (I). Принимая во внимание тот факт, что уро-

вень белка не корректировался до 100% от уровня у гетерозиготных мышей или мышей дикого типа, резонно полагать, что комбинированное лечение может привести к дополнительному улучшению, особенно лечение, нацеленное на разные патогенетические механизмы заболевания.

Исследования связывания *in vitro* и исследования с применением окислительного стресса указывают, что цитопротектор олесоксим защищает мембрану митохондрий при заболеваниях, при которых имеются свидетельства митохондриальной дисфункции (СМА), таким образом предотвращая гибель клеток.

Эксперименты с визуализацией флуоресценции *in vitro* показали, что олесоксим накапливается на уровне мембраны в митохондриях нейронов. Кроме того, раннее начало лечения позволяло сохранить нервно-мышечные синапсы (НМС) у мышей SOD1 (модель тяжелого наследственного бокового амиотрофического склероза, БАС), получавших олесоксим. Таким образом, олесоксим может принести дополнительную и дополняющую пользу опосредовано через митохондриальные и цитопротекторные механизмы.

Дополнительная польза комбинированного лечения цитопротектором олесоксимом и модуляторами сплайсинга гена SMN2 формулы (I) подтверждена на модели СМА умеренной тяжести у мышей. Модель умеренной тяжести создали, вводя низкие дозы модулятора сплайсинга мышам SMN Δ 7, представляющим модель тяжелой СМА. В исследовании цитопротектор олесоксим и модуляторы сплайсинга гена SMN2 формулы (I) исследовали в отдельности и в комбинации. Учитывая важность указанного фенотипа, основным показателем эффективности в указанных исследованиях является влияние лечения на НМС мышей. Кроме того, оценивали маркеры окислительного стресса в тканях мышц.

Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль можно комбинировать с олесоксимом в единой фармацевтической композиции (например, комбинации с фиксированной дозировкой) или соединение формулы (I) и его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим можно вводить последовательно один за другим.

Согласно данному описанию совместное введение соединения формулы (I) и олесоксима может оказывать благотворное и синергетическое действие при лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также при защите клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности при лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении спинальной мышечной атрофии (СМА).

В контексте данного изобретения "совместное введение" двух АФИ может быть одновременным, практически одновременным или разделенным во времени несколькими днями или неделями, например вплоть до 4 или 5 недель.

Соединения по данному изобретению можно применять в комбинации с цитопротекторами, такими как олесоксим, для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания. Указанные заболевания включают спинальную мышечную атрофию (СМА), но не ограничиваются ей.

В конкретном воплощении данного изобретения демонстрируется синергизм комбинации соединения формулы (I) и олесоксима, в отдельности или в комбинации, при лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также при защите клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности при лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим, а также один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим, для применения в качестве терапевтически активных субстанций, в частности для применения в качестве терапевтически активных субстанций для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим, для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении заболеваний, вызван-

ных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к способу лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА), включающему введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и олесоксима.

Конкретное воплощение данного изобретения относится к применению фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим, для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА).

Конкретное воплощение данного изобретения относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли и олесоксима для получения лекарственных средств для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, а также для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, в частности для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии (СМА). Указанные лекарственные средства содержат соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли и олесоксим.

Таким образом, данное изобретение также охватывает набор для получения фармацевтических композиций, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим.

В одном воплощении изобретения предложен набор, содержащий (а) первую фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество (i) соединения формулы (I) и (ii) фармацевтически приемлемый носитель; (б) вторую фармацевтическую композицию, содержащую (i) олесоксим и (ii) фармацевтически приемлемый носитель; (в) инструкцию по применению и (г) контейнер, где инструкция по применению содержит информацию для пациента, касающуюся совместного введения двух АФИ.

В другом воплощении изобретения предложен набор, содержащий композицию, содержащую терапевтически эффективное количество соединения формулы (I) и олесоксим, инструкцию по применению, также известную как "аннотация", блистерную упаковку или флакон (из полиэтилена высокой плотности или стекла) и контейнер.

Термин "набор" в данном документе относится к совокупности указанных компонентов, которые могут находиться раздельно или в составе общего контейнера. Контейнер возможно содержит инструкции по осуществлению способа по данному описанию.

В одном воплощении изобретения предложена комбинация модулятора сплайсинга гена SMN2 и цитопротектора.

В одном воплощении изобретения предложена комбинация модулятора сплайсинга гена SMN2 и цитопротектора для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания.

В одном воплощении изобретения предложена комбинация соединения формулы (I) по любому из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой соли и олесоксима для применения в лечении, предупреждении, замедлении прогрессирования и/или облегчении заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания.

В одном воплощении изобретения предложен способ лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания, включающий введение субъекту комбинации модулятора сплайсинга гена SMN2 и цитопротектора.

В одном воплощении изобретения предложен способ лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, во-

влеченных в патогенез заболевания, включающий введение субъекту комбинации соединения формулы (I) по любому из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой соли и олесоксима.

В одном воплощении изобретения предложено применение комбинации модулятора сплайсинга гена SMN2 и цитопротектора для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания.

В одном воплощении изобретения предложено применение комбинации соединения формулы (I) по любому из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой соли и олесоксима для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания.

В одном воплощении изобретения предложено применение комбинации модулятора сплайсинга гена SMN2 и цитопротектора для получения лекарственных средств для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания.

В одном воплощении изобретения предложено применение комбинации соединения формулы (I) по любому из пп.1-9 или его фармацевтически приемлемой соли и олесоксима для получения лекарственных средств для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, и/или для защиты клеток, вовлеченных в патогенез заболевания.

Фармацевтические композиции.

Обнаружили, что соединения формулы (I) по данному изобретению имеют хорошую растворимость в воде. Из-за затруднений в глотании пациентов всех возрастных групп, страдающих СМА, введение раствора оказалось предпочтительным.

Соединения формулы (I) можно изготавливать в форме водных растворов для перорального приема путем растворения лекарственной субстанции в буферной системе с pH менее чем 4, в частности менее чем 3,8, более конкретно менее чем 3,6, наиболее конкретно 3,4, для обеспечения достаточно высокой концентрации лекарственного средства, например, в цитратной буферной системе, малатной буферной системе, малеатной буферной системе или тартратной буферной системе, более конкретно, тартратной буферной системе.

Долгосрочная стабильность композиций соединений формулы (I) может достигаться благодаря получению сухого порошка или гранулята для приготовления раствора для перорального приема. Буферную систему можно включать в сухую композицию, выбирая органическую кислоту и ее соли в виде тонкодисперсных порошков, например трехосновного цитрата натрия и лимонной кислоты, динатриевой соли яблочной кислоты и яблочной кислоты, натриево-калиевой соли винной кислоты и винной кислоты или динатриевой соли винной кислоты и винной кислоты, в частности натриево-калиевой соли винной кислоты и винной кислоты. В альтернативном варианте вместо комбинации кислоты и соответствующей соли в качестве подкислителя может применяться органическая кислота (в частности, винная кислота) в отдельности.

Порошки или гранулы, содержащие соединение формулы (I), могут содержать разбавитель, такой как сорбит, изомальт или, в частности, маннит и их комбинации, которые обеспечивают быстрое растворение порошкообразной смеси при приготовлении раствора для перорального приема. При введении наполнителя можно осуществлять грануляцию порошкообразной смеси посредством уплотнения в сухом окружении для улучшения текучести и для обеспечения полной гомогенности.

Ингредиенты для приготовления системы растворителей для соединений формулы (I) могут входить в состав отдельной композиции. Приготовленный растворитель можно применять для растворения соединений формулы (I) во флаконе в начале периода применения раствора для перорального приема.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, в форме порошка для приготовления раствора для перорального приема.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтической композицией, которая содержит соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, заполняют многодозовый флакон с адаптером для применения пероральных диспенсеров. Установили, что такие многодозовые флаконы с адаптером для применения пероральных диспенсеров обеспечивают гибкость дозирования, например, дозирование с корректировкой в зависимости от массы тела, и обеспечивают безопасное и удобное введение доз.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, получают посредством сухой грануляции путем уплотнения прокаткой и последующего заполнения во флаконы. Установили, что указанная технология является предпочтительной (в частности, для водорастворимых наполнителей) для предотвращения раз-

деления смеси.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция является водным раствором для перорального приема или сухим порошком, подходящим для приготовления водного раствора для перорального приема.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция является водным раствором для перорального приема, не включая аэрозоли, или сухим порошком, подходящим для приготовления водного раствора для перорального приема.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, не является аэрозолем.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, не содержит регулятор тоничности, например, такой как соль хлорид натрия.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция является водным раствором для перорального приема или сухим порошком, подходящим для приготовления водного раствора для перорального приема и где водный раствор для перорального приема имеет рН менее 4, в частности менее 3,8, более конкретно, менее 3,6, наиболее конкретно 3,4.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и цитратную, малатную, малеатную или тартратную буферную систему, в частности малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно, тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту; где композиция является водным раствором для перорального приема или сухим порошком, подходящим для приготовления водного раствора для перорального приема.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция является водным раствором для перорального приема.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция является водным раствором для перорального приема в буферной системе с рН менее 4, в частности менее 3,8, более конкретно менее 3,6, наиболее конкретно 3,4.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция представляет собой водный раствор для перорального приема в цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системе, в частности малатной или тартратной буферной системе, наиболее конкретно в тартратной буферной системе; или, в альтернативном варианте, в соответствующей кислоте буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винной кислоте.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция представляет собой сухой порошок, подходящий для приготовления водного раствора для перорального приема.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция представляет собой сухой порошок, содержащий буферную систему, подходящий для приготовления водного раствора для перорального приема, с рН менее 4, в частности менее 3,8, более конкретно менее 3,6, наиболее конкретно 3,4.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где композиция представляет собой сухой порошок, содержащий цитратную, малатную, малеатную или тартратную буферную систему, в частности малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту; подходящий для приготовления водного раствора для перорального приема.

В одном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, возможно дополнительно содержит внегранулярный наполнитель, такой как лактоза, крахмал, гидролизованный крахмал, мальтодекстрин, микрокристаллическая целлюлоза, маннит, сорбит, сахароза, декстроза, двухосновной фосфат кальция, сульфат кальция или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения внегранулярный наполнитель представляет собой сорбит, изомальт, маннит или их комбинации, в частности маннит, более конкретно кристаллический маннит, наиболее конкретно кристаллический маннит со средним диаметром 160 мкм (Pearlitol® 160C).

При введении разбавителя можно осуществлять грануляцию порошкообразной смеси посредством уплотнения в сухом окружении для улучшения текучести и для обеспечения полной гомогенности.

В одном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, возможно дополнительно содержит разбавитель, такой как лактоза, крахмал, гидролизованный крахмал, мальтодекстрин, микрокристаллическая целлюлоза, маннит, изомальт (Е 953, (2 ξ)-6-О- α -D-глюкопиранозил-D-арабино-гекситол), сорбит, сахароза, декстроза, двухосновной фосфат кальция, сульфат кальция или их комбинации.

В одном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, возможно дополнительно содержит разбавитель, такой как лактоза, крахмал, гидролизованный крахмал, микрокристаллическая целлюлоза, маннит, сорбит, сахароза, декстроза, двухосновной фосфат кальция, сульфат кальция или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения разбавитель представляет собой маннит, в частности, D-маннит, подходящий для прямого прессования, такой как Parateck®M100.

В конкретном воплощении изобретения разбавитель представляет собой смесь маннита и изомальта, в частности D-маннит и (2 ξ)-6-О- α -D-глюкопиранозил-D-арабино-гекситол.

Авторы данного изобретения обнаружили, что изомальт в качестве второго разбавителя улучшает свойства гранул.

Приготовленный в буфере раствор соединений формулы (I) для перорального приема может обеспечить применение на протяжении более двух недель благодаря использованию консервантов, стабилизаторов и антиокислителей, таких как витамин А, витамин С, витамин Е, витамин Е ТПГС, ретинилпальмитат, селен, цистеин, метионин, лимонная кислота, цитрат натрия, метилпарабен, пропилпарабен, динатрия эдетат, бутилгидрокситолуол, рибофлавин, аскорбиновая кислота или их комбинации.

Приготовленный в буфере раствор соединений формулы (I) для перорального приема может обеспечить применение на протяжении более двух недель благодаря использованию консервантов, стабилизаторов и антиокислителей, таких как витамин Е ТПГС, динатрия эдетат, бутилгидрокситолуол, рибофлавин, аскорбиновая кислота или их комбинации.

В одном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, возможно дополнительно содержит консервант, антиокислитель и/или стабилизатор, такой как витамин Е ТПГС (D- α -токоферилполиэтиленгликоль 1000 сукцинат), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (динатрия эдетат, Na₂ EDTA), бутилгидрокситолуол, рибофлавин, аскорбиновая кислота или их комбинации. Обнаружили, что консервант, антиокислитель и/или стабилизатор могут быть полезными для пролонгирования времени применения в многодозовых контейнерах или для улучшения стабильности лекарственного средства в растворе на протяжении всего времени применения.

В конкретном воплощении изобретения консервантом является сорбиновая кислота или бензоат натрия (Е211), в частности бензоат натрия.

Для композиций, применяющихся в педиатрии, количество содержащегося консерванта должно быть как можно более низким. Обнаружили, что композиции по изобретению, в которых концентрации консервантов составляют всего 1 мас.%, дают стабильные растворы.

В конкретном воплощении данного изобретения антиокислителем является аскорбиновая кислота ((5R)-[(1S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидроксифуран-2(5H)-он).

В конкретном воплощении данного изобретения стабилизатором является динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (динатрия эдетат, Na₂ EDTA).

В одном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, возможно дополнительно содержит смазывающий агент. Обнаружили, что смазывающий агент можно применять в качестве вспомогательного вещества в процессе уплотнения прокаткой. Кроме того, смазывающий агент может применяться для водорастворимых ингредиентов, таких как ПЭГ, для обеспечения надлежащего внешнего вида.

В конкретном воплощении изобретения смазывающим агентом является поли(этиленгликоль), в частности, поли(этиленгликоль), имеющий среднечисленную молекулярную массу Mn 6000 (ПЭГ 6000).

В одном воплощении изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, возможно дополнительно содержит подсластитель и/или корригент для улучшения вкусовых качеств.

В конкретном воплощении данного изобретения корригентом является клубничный корригент или ванильный корригент.

В конкретном воплощении данного изобретения подсластителем является сукралоза (1,6-дихлор-1,6-дидезокси- β -D-фруктофуранозил-4-хлор-4-дезокси- α -D-галактопиранозид, Е955) или натрия сахарин.

В конкретном воплощении данного изобретения соединение формулы (I) представляет собой 7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он.

стабилизатор, в частности динатрия эдетат;
 смазывающий агент, в частности ПЭГ 6000;
 консервант, в частности сорбиновую кислоту или бензоат натрия, наиболее конкретно бензоат натрия;

возможно, подсластитель, в частности сукралозу или сахарин натрия, более конкретно сукралозу; и
 возможно, корригент, в частности клубничный корригент или ванильный корригент.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит
 от 1 до 10 мас.% соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли;
 от 5 до 15 мас.% буферной системы, в частности буферной системы, выбранной из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатной или тартратной буферной системы, наиболее конкретно тартратной буферной системы; или, в альтернативном варианте, соответствующей кислоты буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винной кислоты;

от 40 до 70 мас.% разбавителя, в частности маннита или смеси маннита и изомальта, более конкретно маннита;

от 1 до 4 мас.% антиокислителя, в частности аскорбиновой кислоты;

от 0,5 до 2 мас.% стабилизатора, в частности динатрия эдетата;

от 0,5 до 2 мас.% смазывающего агента, в частности ПЭГ 6000;

от 1 до 8 мас.% консерванта, в частности, сорбиновой кислоты или бензоата натрия, наиболее конкретно бензоата натрия,

от 0 до 3 мас.% подсластителя, в частности сукралозы или сахараина натрия, наиболее конкретно сукралозы; и

от 0 до 20 мас.% корригента, в частности клубничного корригента или ванильного корригента;

где общее количество ингредиентов не превышает 100 мас.%.
 В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит

от 2 до 6 мас.% 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она или его фармацевтически приемлемой соли;

от 9 до 13 мас.% тартратной буферной системы;

от 45 до 55 мас.% маннита в качестве первого разбавителя и от 8 до 10 мас.% изомальта в качестве второго разбавителя;

от 1 до 3 мас.% аскорбиновой кислоты в качестве антиокислителя;

от 0,5 до 2 мас.% динатрия эдетата в качестве стабилизатора;

от 0,5 до 2 мас.% ПЭГ 6000 в качестве смазывающего агента;

от 1 до 7 мас.% натрия бензоата в качестве консерванта,

от 1,5 до 2 мас.% сукралозы в качестве подсластителя и

от 13 до 17 мас.% клубничного корригента,

где общее количество ингредиентов не превышает 100 мас.%.
 Другое воплощение изобретения относится к набору для получения фармацевтических композиций,

содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где набор содержит порошкообразную смесь, содержащую соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль; и

воду в качестве растворителя для разведения.

Другое воплощение изобретения относится к набору для получения фармацевтических композиций, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где набор содержит

соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

порошкообразную смесь в качестве несущей среды для разведения и

возможно, воду в качестве растворителя для разведения.

Другое воплощение изобретения относится к порошкообразной смеси в качестве несущей среды для разведения соединения формулы (I), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, содержащей:

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, в частности малатной или тартратной буферной системы, наиболее конкретно тартратной буферной системы; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту; и

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит.

Другое воплощение изобретения относится к порошкообразной смеси в качестве несущей среды для разведения соединения формулы (I), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, содержащей

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту;

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;
 антиокислитель, в частности аскорбиновую кислоту;
 стабилизатор, в частности динатрия эдетат;
 смазывающий агент, в частности ПЭГ 6000; и
 консервант, в частности сорбиновую кислоту или бензоат натрия, наиболее конкретно бензоат натрия.

Другое воплощение изобретения относится к порошкообразной смеси в качестве несущей среды для разведения соединения формулы (I), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, содержащей

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту;

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;
 антиокислитель, в частности аскорбиновую кислоту;
 стабилизатор, в частности динатрия эдетат;
 смазывающий агент, в частности ПЭГ 6000;
 консервант, в частности сорбиновую кислоту или бензоат натрия, наиболее конкретно бензоат натрия;

возможно, подсластитель, в частности сукралозу или сахарин натрия, более конкретно сукралозу; и
 возможно, корригент, в частности клубничный корригент или ванильный корригент.

Другое воплощение изобретения относится к порошкообразной смеси в качестве несущей среды, подходящей для разведения соединения формулы (I), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, содержащей

от 4 до 15 мас.% буферной системы, в частности буферной системы, выбранной из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатной или тартратной буферной системы, наиболее конкретно тартратной буферной системы; или, в альтернативном варианте, соответствующей кислоты буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винной кислоты;

от 40 до 70 мас.% разбавителя, в частности маннита или смеси маннита и изомальта, более конкретно маннита;

от 1 до 4 мас.% антиокислителя, в частности аскорбиновой кислоты;
 от 0,2 до 2 мас.% стабилизатора, в частности динатрия эдетата;
 от 0,5 до 2 мас.% смазывающего агента, в частности ПЭГ 6000;
 от 1 до 8 мас.% консерванта, в частности сорбиновой кислоты или бензоата натрия, наиболее конкретно бензоата натрия;

от 0 до 3 мас.% подсластителя, в частности сукралозы или сахара натрия, наиболее конкретно сукралозы; и

от 0 до 20 мас.% корригента, в частности клубничного корригента или ванильного корригента;
 где общее количество ингредиентов не превышает 100 мас.%.

Другое воплощение изобретения относится к порошкообразной смеси в качестве несущей среды, подходящей для разведения соединения формулы (I), описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, содержащей

от 9 до 13 мас.% тартратной буферной системы или винной кислоты;
 от 45 до 55 мас.% маннита в качестве первого разбавителя и от 8 до 10 мас.% изомальта в качестве второго разбавителя;

от 1 до 3 мас.% аскорбиновой кислоты в качестве антиокислителя;

от 0,3 до 0,9 мас.% динатрия эдетата в качестве стабилизатора;

от 0,5 до 2 мас.% ПЭГ 6000 в качестве смазывающего агента;

от 3 до 7 мас.% натрия бензоата в качестве консерванта,

от 0,8 до 2,0 мас.% сукралозы в качестве подсластителя и

от 7,5 до 19 мас.% клубничного корригента;

где общее количество ингредиентов не превышает 100 мас.%.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль согласно данному описанию и, дополнительно, олесоксим.

В конкретном воплощении изобретения олесоксим имеет гранулометрический состав частиц, где значение d_{90} составляет менее 200 мкм, в частности значение d_{90} менее 100 мкм, более конкретно значение d_{90} 50-100 мкм.

Термин "значение d_{90} " обозначает такое значение диаметра, меньше которого эквивалентный сферический диаметр у 90 мас.% частиц совокупности.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей со-

единение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль согласно данному описанию, олесоксим и масло, выбранное из кунжутного масла, оливкового масла, соевого масла, хлопкового масла, касторового масла, орехового масла, рапсового масла, кукурузного масла, миндального масла, подсолнечного масла и их комбинаций.

Конкретное воплощение изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль согласно данному описанию, олесоксим, масло, выбранное из кунжутного масла, оливкового масла, соевого масла, хлопкового масла, касторового масла, орехового масла, рапсового масла, кукурузного масла, миндального масла, подсолнечного масла и их комбинаций; эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, выбранные из глицерилмоноолеата (PecelTM, Inwitor 948TM, Capmul GMOTM), глицерилмоноолеата (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеата (Span 80TM), олеиновой кислоты и их комбинаций; и, возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно, полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) и их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, в частности малатной или тартратной буферной системы, наиболее конкретно тартратной буферной системы; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту.

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Capmul GMOTM), глицерилмоноолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту и их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещества, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту;

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Capmul GMOTM), глицерилмоноолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещества, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит

соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Capmul GMOTM), глицерилмоноолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещества, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит

соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту;

антиокислитель, в частности аскорбиновую кислоту;

стабилизатор, в частности динатрия эдетат;

олесоксим,

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Carmul GMOTM), глицерилмонолинолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит

соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно, тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту;

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;

антиокислитель, в частности аскорбиновую кислоту;

стабилизатор, в частности динатрия эдетат;

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Carmul GMOTM), глицерилмонолинолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно, полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит

соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно, малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту;

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;

антиокислитель, в частности аскорбиновую кислоту;

стабилизатор, в частности динатрия эдетат;

смазывающий агент, в частности, ПЭГ 6000;

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Carmul GMOTM), глицерилмонолинолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности, поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит

соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы, более конкретно малатную или тартратную буферную систему, наиболее конкретно тартратную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую ки-

слоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности винную кислоту;
 разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;
 антиокислитель, в частности аскорбиновую кислоту;
 стабилизатор, в частности динатрия эдетат;
 смазывающий агент, в частности, ПЭГ 6000;
 консервант, в частности, сорбиновую кислоту или бензоат натрия, наиболее конкретно бензоат натрия;

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Capmul GMOTM), глицерилмоноолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

В конкретном воплощении изобретения фармацевтическая композиция содержит соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

буферную систему, в частности буферную систему, выбранную из цитратной, малатной, малеатной или тарtratной буферной системы, более конкретно малатную или тарtratную буферную систему, наиболее конкретно тарtratную буферную систему; или, в альтернативном варианте, соответствующую кислоту буферной системы в отдельности в качестве подкислителя, в частности, винную кислоту;

разбавитель, в частности маннит или смесь маннита и изомальта, более конкретно маннит;

антиокислитель, в частности аскорбиновую кислоту;

стабилизатор, в частности динатрия эдетат;

смазывающий агент, в частности ПЭГ 6000;

консервант, в частности сорбиновую кислоту или бензоат натрия, наиболее конкретно бензоат натрия;

возможно, подсластитель, в частности сукралозу или сахарин натрия, наиболее конкретно сукралозу;

возможно, корригент, в частности клубничный корригент или ванильный корригент;

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Capmul GMOTM), глицерилмоноолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

Другое воплощение изобретения относится к набору для получения фармацевтических композиций, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим, где набор содержит

порошкообразную смесь, содержащую соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;

воду в качестве растворителя для разведения;

олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (PecelTM, Inwitor 948TM, Capmul GMOTM), глицерилмоноолеат (Maisine 35-1TM), сорбитанмоноолеат (Span 80TM), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80TM), каприлокапроилполиоксилглицериды (LabrasolTM) или их комбинации.

Другое воплощение изобретения относится к набору для получения фармацевтических композиций, содержащих соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и олесоксим, где набор содержит

соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль;
 порошкообразную смесь в качестве несущей среды для разведения;
 возможно, воду в качестве растворителя для разведения;
 олесоксим;

масло, в частности кунжутное масло, оливковое масло, соевое масло, хлопковое масло, касторовое масло, ореховое масло, рапсовое масло, кукурузное масло, миндальное масло, подсолнечное масло или их комбинации, наиболее конкретно кунжутное масло;

эмульгирующие и/или липофильные солюбилизующие агенты, в частности глицерилмоноолеат (Pecelol™, Inwitor 948™, Capmul GMO™), глицерилмонолинолеат (Maisine 35-1™), сорбитанмоноолеат (Span 80™), олеиновую кислоту или их комбинации; и

возможно, полярное поверхностно-активное вещество, в частности поверхностно-активное вещество со значением ГЛБ менее 7, более конкретно полисорбат 80 (Tween 80™), каприлокапроилполиоксилглицериды (Labrasol™) или их комбинации.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. 7-(4,7-Диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (Пример 20) повышает мРНК SMN и продукцию белка *in vitro*.

(А) сплайсинг SMN2 в фибробластах при SMA 1 типа (В) белок SMN в фибробластах при SMA 1 типа (С) белок SMN в двигательных нейронах при SMA 1 типа (D) сплайсинг SMN1 и SMN2 в цельной крови, полученной у здоровых добровольцев. Фибробласты пациентов SMA 1 типа культивировали в течение 24 ч (А) или 48 ч (В); двигательные нейроны из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) пациентов, имеющих SMA 1 типа, культивировали в течение 72 ч (С), а цельную кровь здоровых добровольцев (ЗД) в течение 4 ч (D) в присутствии соединения по Примеру 20. Сплайсинг SMN оценивали посредством ОТ-ПЦР, а уровни белка SMN оценивали посредством гомогенной флуоресценции с временным разрешением (ГФВР) в лизатах фибробластов и посредством иммунохимического окрашивания на SMN двигательных нейронов. Результаты представлены как средние $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM) по 3 измерениям в каждой точке и выражены как кратность изменений по сравнению с контролем без воздействия.

Фиг. 2. 7-(4,7-Диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (Пример 20) индуцирует экспрессию белка SMN *in vivo*.

(А) белок SMN в головном мозге мышей с аллелями C/C (В) белок SMN в головном мозге мышей SMNΔ7 (С) белок SMN в четырехглавых мышцах мышей с аллелями C/C (D) белок SMN в четырехглавых мышцах мышей SMNΔ7. Мыши с аллелями C/C и мыши SMNΔ7 получали соединение по Примеру 20. Через 1 ч после введения последней дозы выделяли головной мозг и четырехглавые мышцы и оценивали уровни белка SMN посредством ГФВР. Результаты представлены как средние $\pm$ SEM для группы из 5-6 животных и выражены как кратность изменений по сравнению с контролями, получавшими несущую среду. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с нелечеными контролями.

Фиг. 3. Эффект лечения мышей SMNΔ7 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-оном (Пример 20) *in vivo*.

Мыши SMNΔ7 получали соединение по Примеру 20, начиная с P3, выживаемость (А) и массу тела животных (В) оценивали ежедневно до P100. Результаты представлены как среднее $\pm$ SEM для группы из 10-12 мышей. HET = гетерозиготные сородичи

Фиг. 4. Защита цепей двигательных нейронов и защита от мышечной атрофии 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-оном (Пример 20) у мышей SMNΔ7 *in vivo*.

Мыши SMNΔ7 получали соединение по Примеру 20 начиная от P3 до P14, проводили иммуногистохимическую оценку нейромышечной проводимости и мышечной атрофии. (А) vGlut1-положительные синапсы с отростками, несущими проприоцептивные сигналы, в сегментах L3-5 спинного мозга (В) аксоны двигательных нейронов в вентральных корешках в сегментах L3-5 спинного мозга; (С) иннервация нервно-мышечных синапсов длиннейшей мышцы (D) площадь поперечного сечения длинного разгибателя пальцев. Результаты представлены как средние $\pm$ SEM для группы из 4-5 животных. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с мышами SMNΔ7, получавшими несущую среду.

Фиг. 5. Альтернативный сплайсинг FoxM1 *in vitro*.

Соединение по Примеру 20 воздействовало на фибробласты пациентов, имеющих SMA I типа, в течение 24 ч, полноразмерную (FL) и не имеющую экзона 9 (Δ9) мРНК FoxM1 анализировали посредством ОТ-ПЦР. Результаты представлены как средние $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM) в 6 повторностях и выражены как кратность изменений по сравнению с контролями без воздействия.

Фиг. 6. Эмульсии масло-в-воде.

Фотографии композиции 4А до (А) и немедленно после добавления 20% (В) или 30% (С) тартратного буферного раствора (композиция 5А) с получением эмульсий вода-в-масле.

Фиг. 7. Стабильность эмульсий масло-в-воде.

Фотографии эмульсий вода-в-масле, содержащих 70% композиции 4А и 30% композиции 5А через

15 мин после приготовления (А) (встряхивание 10 раз) и через 30 мин после приготовления (В) (встряхивание 10 раз).

Фиг. 8. Эмульсии масло-в-воде.

Фотографии композиции 4F до (А) и немедленно после добавления 20% (В, слева), 25% (В, справа) или 30% (В, справа) тартратного буферного раствора (композиция 5А) с получением эмульсий вода-в-масле.

Фиг. 9. Стабильность эмульсий масло-в-воде.

Фотографии эмульсий вода в масле, содержащих 70% композиции 4F и 30% композиции 5А через 15 мин после приготовления (А) (встряхивание 10 раз) и 30 мин после приготовления (В) (встряхивание 10 раз).

Описание примеров осуществления изобретения

Ниже приведены примеры, позволяющие лучше понять изобретение. Однако их не следует считать ограничивающими объем изобретения.

Список сокращений:

ACN: ацетонитрил;

CH_2Cl_2 : дихлорметан (DCM);

DIPEA: диизопропилэтиламин;

DMA: диметилацетамид;

TEA: триэтиламин;

RT: комнатная температура;

$\text{B}_2(\text{pin})_2$: бис-(пинаcolato)диборон;

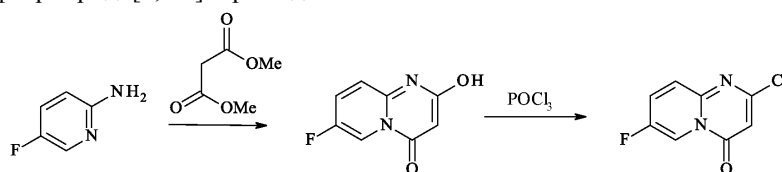
$\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$: (1,1'-бис-(дифенилфосфин)ферроцен)палладия(II) дихлорид;

PPTS: пиридиния п-толуолсульфонат.

Промежуточное соединение 1.

7-Фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он.

а) 2-Хлор-7-фторпиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



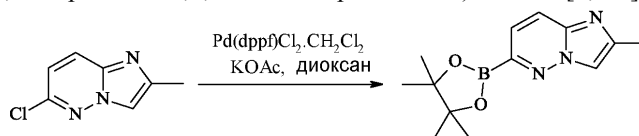
Смесь 2-амино-5-фторпиридина (11,20 г, 0,10 моль) и диметилмалоната (57,0 мл, 0,50 моль) нагревали при 230°C в течение 1,5 ч. После охлаждения до комнатной температуры преципитат отфильтровывали и промывали ACN (3×) с получением 7-фтор-2-гидрокси-4Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она в виде твердого вещества темной окраски (14 г), которое использовали непосредственно на следующей стадии.

MS m/z 181,3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Смесь темной окраски из неочищенного 7-фтор-2-гидрокси-4Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она (14 г, ~77 ммоль) в POCl_3 (50 мл) и DIPEA (13,3 мл, 77 ммоль) нагревали до 110°C в течение 15 ч. Растворитель удаляли и осадок, имеющий темную окраску, обрабатывали ледяной водой, промывали водой (3×) и высушивали с получением твердого вещества коричневого цвета. Твердое вещество коричневого цвета хроматографировали (5% MeOH в CH_2Cl_2) с получением 2-хлор-7-фтор-4Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она в виде желтого твердого вещества (9,84 г, 50%, 2 стадии).

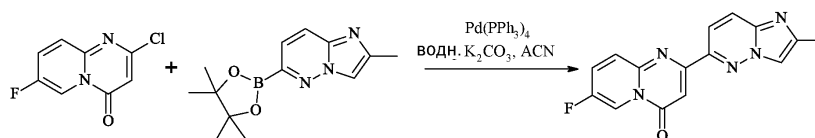
MS m/z 199,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

б) 2-Метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазин



Смесь 6-хлор-2-метилимидазо[1,2-б]пиридазина (900 мг, 5,37 ммоль), 4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолана) (1,36 г, 5,37 ммоль, 1,0 экв.), KOAc (1,05 г, 10,7 ммоль) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (393 мг, 0,54 ммоль) в диоксане (50 мл) дегазировали и нагревали в атмосфере N_2 при 95°C . Через 15 ч смесь разводили EtOAc, фильтровали через целит и концентрировали под вакуумом с получением 2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазина, который использовали непосредственно на следующей стадии.

с) 7-Фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



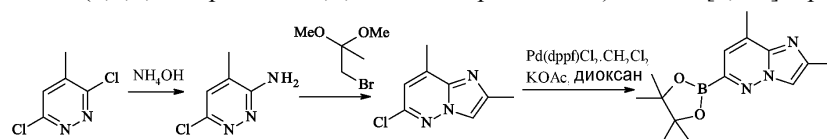
К раствору 2-хлор-7-фтор-4Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она (750 мг, 3,78 ммоль) в ACN (36 мл) добавляли 2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазин (1,17 г, 4,53 ммоль, экв: 1,2), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (218 мг, 0,189 ммоль, 0,05 экв.) и водный раствор K_2CO_3 (3,78 мл, 7,55 ммоль, 2,0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 105°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Преципитат промывали Et_2O и затем водой, высушивали под вакуумом с получением 250 мг (22%) 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого твердого вещества.

MS m/z 296.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение 2.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-а]пиримидин-4-он.

а) 2,8-Диметил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазин

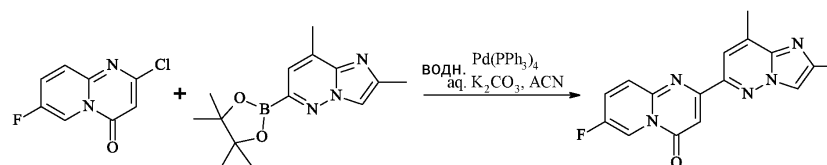


В закупоренной колбе суспендировали 3,6-дихлор-4-метилпиридазин (27 г, 161 ммоль) в водном растворе аммиака (25%, 300 мл). Реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 48 ч (превращалась в раствор через 1 ч). После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь вливали в CH_2Cl_2 , отделяли органическую фазу, высушивали над Na_2SO_4 , и концентрировали под вакуумом с получением 22,4 г 6-хлор-4-метил-пиридазин-3-амин и 6-хлор-5-метил-пиридазин-3-амин в виде смеси региоизомеров, которую использовали непосредственно на следующей стадии.

Смесь региоизомеров 6-хлор-4-метил-пиридазин-3-амин и 6-хлор-5-метил-пиридазин-3-амин (22,4 г) суспендировали в 2-пропанол (300 мл). Добавляли 1-бromo-2,2-диметоксипропан (36,0 г, 26,6 мл, 193 ммоль, 1,2 экв.) и PPTS (2,96 г, 11,6 ммоль, 0,0725 экв.) и полученный раствор нагревали при 105°C в течение ночи. Растворитель удаляли в вакууме и осадок переносили в CH_2Cl_2 и промывали NaHCO_3 . Органические фазы высушивали над Na_2SO_4 , концентрировали под вакуумом и неочищенное светло-коричневое твердое вещества хроматографировали (EtOAc /гептан 1/2-1/1) с получением отдельно 6,1 г 6-хлор-2,8-диметил-имидазо[1,2-б]пиридазина MS m/z 182.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (21%) в виде белого твердого вещества и 5,9 г 6-хлор-2,7-диметил-имидазо[1,2-б]пиридазина MS m/z 182.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (20%) в виде белого твердого вещества.

Смесь 6-хлор-2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазина (0,9 г, 4,96 ммоль), 4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолана) (1,26 г, 4,96 ммоль, 1,0 экв.), KOAc (0,97 г, 9,91 ммоль) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (363 мг, 0,49 ммоль) в диоксане (50 мл) дегазировали и нагревали в атмосфере N_2 при 110°C. Через 15 ч смесь разводили EtOAc , фильтровали через целит и концентрировали под вакуумом с получением 2,8-диметил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазина, который использовали непосредственно на следующей стадии.

б) 2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



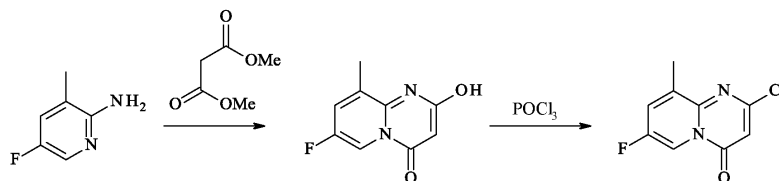
К раствору 2-хлор-7-фтор-4Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она (750 мг, 3,78 ммоль, описан выше) в ACN (36 мл) добавляли 2,8-диметил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазин (1,24 г, 4,53 ммоль, 1,2 экв.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (218 мг, 0,189 ммоль, 0,05 экв.) и водный раствор K_2CO_3 (3,78 мл, 7,55 ммоль, 2,0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 100°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Преципитат промывали Et_2O и затем водой, высушивали под вакуумом с получением 700 мг (60%) 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-а]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого твердого вещества.

MS m/z 310.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение 3.

7-Фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он.

а) 2-Хлор-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



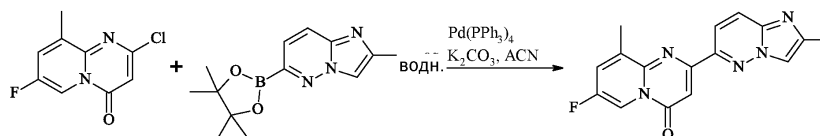
Смесь 5-фтор-3-метилпиридин-2-амин (3,3 г, 26,2 ммоль) и диметилмалоната (15,0 мл, 0,13 моль, 5,0 экв.) нагревали при 210°C в течение 1,5 ч. После охлаждения до комнатной температуры преципитат отфильтровывали и промывали ACN (3×) с получением 7-фтор-2-гидрокси-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-она в виде твердого вещества темной окраски (2,3 г), которое использовали непосредственно на следующей стадии.

MS m/z 195.1 [M+H]⁺.

Смесь неочищенного 7-фтор-2-гидрокси-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (2,3 г, 11,8 ммоль) в POCl₃ (7,7 мл, 82,9 ммоль) и DIEA (2,07 мл, 11,8 ммоль) нагревали при 110°C в течение 15 ч. Растворитель удаляли и осадок обрабатывали ледяной водой, промывали водой (3×) и высушивали с получением коричневого твердого вещества. Неочищенное коричневое твердое вещество хроматографировали (5% MeOH в CH₂Cl₂) с получением 2-хлор-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-она в виде желтого твердого вещества (1,77 г, 70% в 2 стадиях).

MS m/z 213.1 [M+H]⁺.

б) 7-Фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

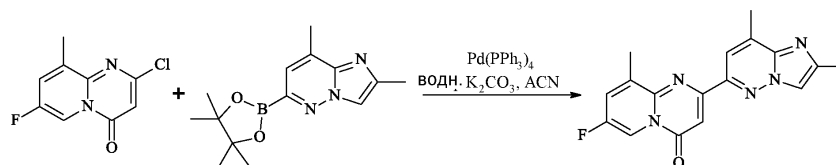


К раствору 2-хлор-7-фтор-9-метил-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (2,2 г, 10,3 ммоль) в ACN (80 мл) добавляли 2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-b]пиридазин (3,22 г, 12,4 ммоль, 1,2 экв., описан выше), Pd(PPh₃)₄ (1,20 г, 1,03 ммоль, 0,1 экв.) и водный раствор K₂CO₃ (10,3 мл, 20,7 ммоль, 2,0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 100°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Преципитат промывали Et₂O и затем водой, высушивали под вакуумом с получением 1,80 г (56%) 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого твердого вещества.

MS m/z 310.1 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение 4.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

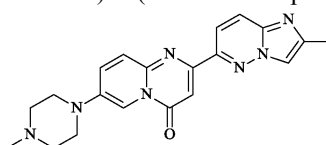


К раствору 2-хлор-7-фтор-9-метил-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (0,98 г, 4,61 ммоль, описан выше) в ACN (50 мл) добавляли 2,8-диметил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-b]пиридазин (1,51 г, 5,53 ммоль, 1,2 экв., описан выше), Pd(PPh₃)₄ (0,32 г, 0,277 ммоль, 0,06 экв.) и водный раствор K₂CO₃ (4,61 мл, 9,22 ммоль, 2,0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 100°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Преципитат промывали Et₂O и водой, затем высушивали под вакуумом с получением 0,89 г (60%) 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого твердого вещества.

MS m/z 324.4 [M+H]⁺.

Пример 1.

2-(2-Метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-(4-метилпиперазин-1-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

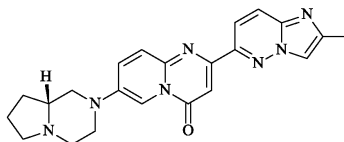


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 35 мг, 0,119 ммоль) и 1-метилпиперазин (47,5 мг, 0,474 ммоль, 4 экв.) в DMSO (1 мл) при 120°C в течение ночи. По данным ЖХ-МС превращение было полным. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 9/1) с получением указанного в заголовке продукта (25 мг, 56%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 376.3 [M+H]⁺.

Пример 2.

7-[(8*aR*)-3,4,6,7,8,8*a*-Гексагидро-1Н-пирроло[1,2-*a*]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

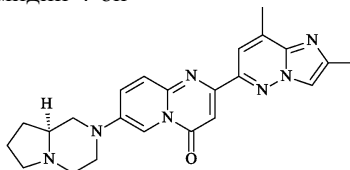


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 125 мг, 0,426 ммоль) и (R)-октагидропирроло-[1,2-*a*]пиазин (160 мг, 1,27 ммоль, 3 экв.) в DMSO (5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли и высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 95/5) с получением указанного в заголовке продукта (65 мг, 38%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 402.5 [M+H]⁺.

Пример 3.

7-[(8*aS*)-3,4,6,7,8,8*a*-Гексагидро-1Н-пирроло[1,2-*a*]пиазин-2-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

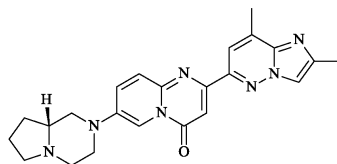


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 200 мг, 0,647 ммоль) и (S)-октагидропирроло-[1,2-*a*]пиазин (286 мг, 2,26 ммоль, 3,5 экв.) в DMSO (5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 95/5) с получением указанного в заголовке продукта (115 мг, 43%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 416.3 [M+H]⁺.

Пример 4.

7-[(8*aR*)-3,4,6,7,8,8*a*-Гексагидро-1Н-пирроло[1,2-*a*]пиазин-2-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

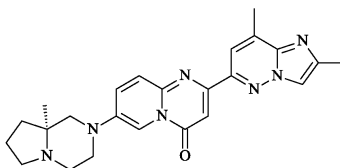


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 200 мг, 0,647 ммоль), DIPEA (0,113 мл, 0,67 ммоль, 1 экв.) и (R)-октагидропирроло[1,2-*a*]пиазин (245 мг, 1,95 ммоль, 3,0 экв.) в DMSO (2,5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 95/5) с получением указанного в заголовке продукта (132 мг, 49%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 416.3 [M+H]⁺.

Пример 5.

7-[(8aS)-8a-Метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-а]пиразин-2-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он

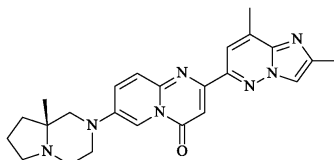


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 90 мг, 0,291 ммоль), DIPEA (0,05 мл, 0,29 ммоль, 1 экв.) и (S)-8a-метилоктагидропирроло[1,2-а]пиразин (81 мг, 0,58 ммоль, 2,0 экв.) в DMSO (2,5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (55 мг, 44%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 430.3 [M+H]⁺.

Пример 6.

7-[(8aR)-8a-Метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-а]пиразин-2-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он

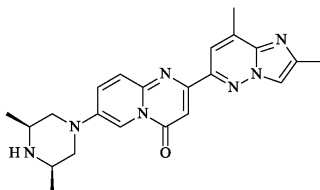


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 90 мг, 0,291 ммоль), DIPEA (0,05 мл, 0,29 ммоль, 1 экв.) и (R)-8a-метилоктагидропирроло[1,2-а]пиразин (81 мг, 0,58 ммоль, 2,0 экв.) в DMSO (2,5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (50 мг, 40%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 430.4 [M+H]⁺.

Пример 7.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3S,5R)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он

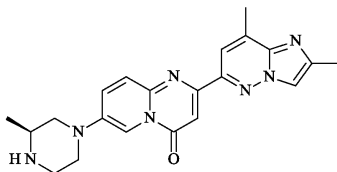


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0,162 ммоль) и *cis*-2,6-диметилпиперазин (74 мг, 0,647 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (1,5 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (32 мг, 49%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 404.4 [M+H]⁺.

Пример 8.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3S)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

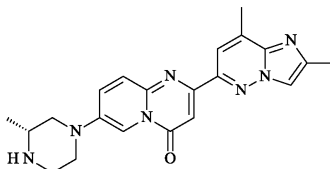


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 33 мг, 0,107 ммоль) и (S)-2-метилпиперазин (43 мг, 0,427 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 120°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (18 мг, 43%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 9.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3R)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

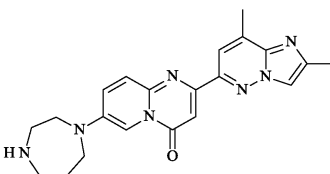


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 85 мг, 0,275 ммоль) и (R)-2-метилпиперазин (110 мг, 1,10 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (5 мл) при 120°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (35 мг, 33%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 10.

7-(1,4-Диазепан-1-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

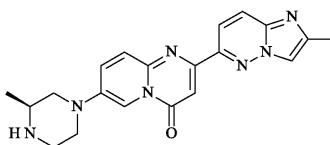


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 33 мг, 0,107 ммоль) и 1,4-диазепан (32 мг, 0,320 ммоль, 3,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 120°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (20 мг, 48%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 11.

2-(2-Метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3S)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



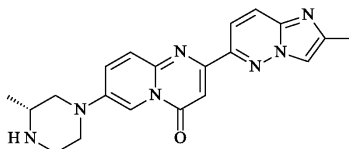
В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0,169 ммоль) и

(S)-2-метилпиперазин (68 мг, 0,677 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (40 мг, 63%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 376.2 [M+H]⁺.

Пример 12.

2-(2-Метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3R)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

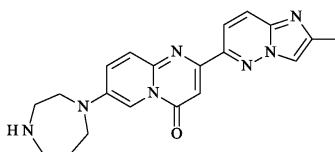


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0,169 ммоль) и (R)-2-метилпиперазин (68 мг, 0,677 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (48 мг, 75%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 376.3 [M+H]⁺.

Пример 13.

7-(1,4-Диазепан-1-ил)-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

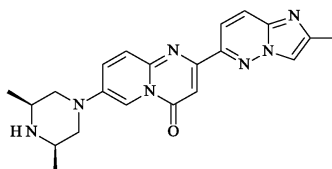


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0,169 ммоль) и 1,4-дiazепан (68 мг, 0,677 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (41 мг, 65%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 376.2 [M+H]⁺.

Пример 14.

7-[(3R,5S)-3,5-Диметилпиперазин-1-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

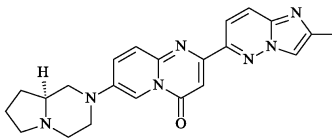


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0,169 ммоль) и cis-2,6-диметилпиперазин (77 мг, 0,677 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (41 мг, 62%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 15.

7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-Гексагидро-1H-пирроло[1,2-a]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

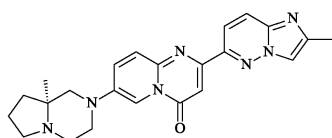


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0,169 ммоль) и (S)-октагидропирроло[1,2-a]пиазин (85 мг, 0,677 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (36 мг, 53%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 402.3 [M+H]⁺.

Пример 16.

7-[(8aS)-8a-Метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-a]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

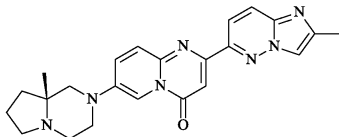


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0,169 ммоль) и (S)-8a-метилоктагидропирроло[1,2-a]пиазин (95 мг, 0,677 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (45 мг, 64%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 416.3 [M+H]⁺.

Пример 17.

7-[(8aR)-8a-Метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-a]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

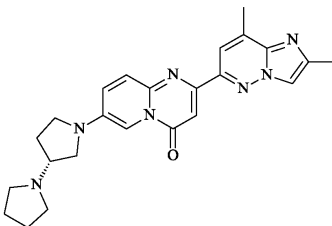


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 100 мг, 0,339 ммоль) и (R)-8a-метилоктагидропирроло[1,2-a]пиазин (190 мг, 1,35 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (4 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (45 мг, 64%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 416.3 [M+H]⁺.

Пример 18.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3R)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

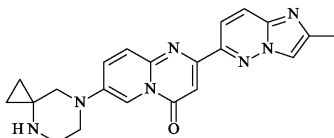


Перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 45 мг, 0,145 ммоль), (R)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (62 мг, 0,291 ммоль, 2,0 экв.) и DIPEA (0,20 мл, 1,16 ммоль, 8 экв.) в NMP (3 мл) при 220°C в СВЧ-печи в течение 1 часа. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (25 мг, 40%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 430.3 [M+H]⁺.

Пример 19.

7-(4,7-Диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

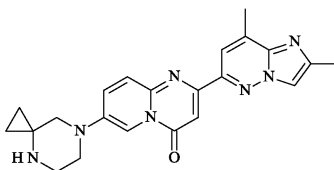


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0,169 ммоль), DIPEA (0,24 мл, 1,35 ммоль, 8 экв.) и 4,7-дiazаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (62,7 мг, 0,339 ммоль, 2,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение 2 суток. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (22 мг, 33%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 388.3 [M+H]⁺.

Пример 20.

7-(4,7-Диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

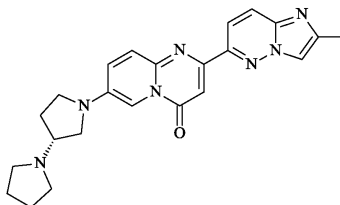


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0,162 ммоль), DIPEA (0,22 мл, 1,29 ммоль, 4 экв.) и 4,7-дiazаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (32 мг, 0,320 ммоль, 3,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 130°C в течение 48 ч. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 95/5) с получением указанного в заголовке продукта (12 мг, 18%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 402.3 [M+H]⁺.

Пример 21.

2-(2-Метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3R)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

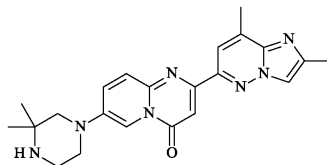


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 40 мг, 0,135 ммоль), DIPEA (0,19 мл, 1,08 ммоль, 8 экв.) и (R)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (58 мг, 0,271 ммоль, 2,0 экв.) в DMSO (4 мл) и нагревали при 220°C в течение 40 мин в СВЧ-печи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (30 мг, 53%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 416.3 [M+H]⁺.

Пример 22.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-(3,3-диметилпиперазин-1-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

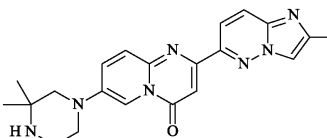


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 40 мг, 0,129 ммоль) и 2,2-диметилпиперазин (59 мг, 0,517 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (1,6 мл) при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 9/1) с получением указанного в заголовке продукта (29 мг, 55%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 404.3 [M+H]⁺.

Пример 23.

7-(3,3-Диметилпиперазин-1-ил)-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

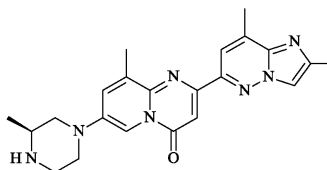


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 40 мг, 0,135 ммоль) и 2,2-диметилпиперазин (62 мг, 0,542 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (26 мг, 49%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 24.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-9-метил-7-[(3S)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

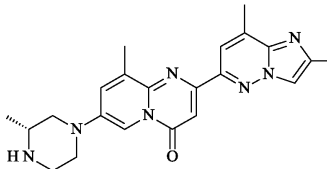


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0,155 ммоль) и (S)-2-метилпиперазин (62 мг, 0,619 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (45 мг, 72%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 404.3 [M+H]⁺.

Пример 25.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-9-метил-7-[(3R)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

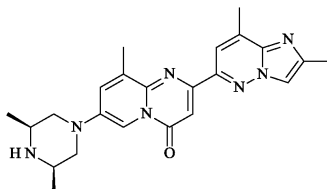


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0,155 ммоль) и (R)-2-метилпиперазин (62 мг, 0,619 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (40 мг, 70%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 404.3 [M+H]⁺.

Пример 26.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3R,5S)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

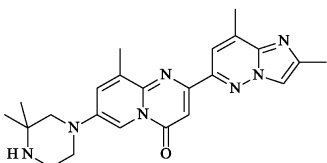


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0,155 ммоль) и cis-2,6-диметилпиперазин (70 мг, 0,619 ммоль, 4,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (26 мг, 40%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 418.3 [M+H]⁺.

Пример 27.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-(3,3-диметилпиперазин-1-ил)-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

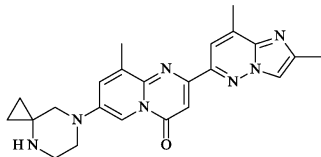


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0,155 ммоль) и 2,2-диметилпиперазин (35 мг, 0,309 ммоль, 2,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (36 мг, 56%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 418.3 [M+H]⁺.

Пример 28.

7-(4,7-Диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

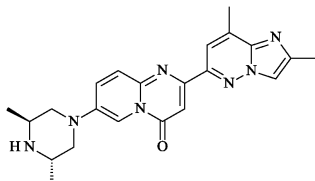


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метилпиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0,155 ммоль), DIPEA (0,21 мл, 1,24 ммоль, 8 экв.) и 4,7-дiazаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (57 мг, 0,309 ммоль, 2,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 125°C в течение 2 суток. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (17 мг, 26%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 416.3 $[M+H]^+$.

Пример 29.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*S*,5*S*)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

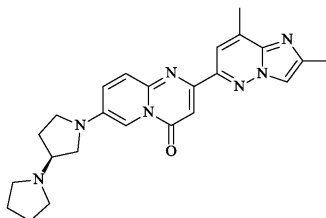


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0,162 ммоль), TEA (0,18 мл, 1,29 ммоль, 8 экв.) и (2*S*,6*S*)-2,6-диметилпиперазина дигидрохлорид (90 мг, 0,485 ммоль, 3,0 экв.) в DMSO (2 мл) при 140°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH_2Cl_2 и промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$. Органический слой отделяли, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ до 9/1) с получением указанного в заголовке продукта (20 мг, 30%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 404.3 $[M+H]^+$.

Пример 30.

2-(2,8-Диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*S*)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

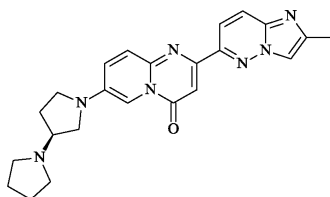


В закупоренной пробирке перемешивали 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фторпиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0,162 ммоль), DIPEA (0,22 мл, 1,29 ммоль, 8 экв.) и (S)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (103 мг, 0,485 ммоль, 3,0 экв.) в NMP (2 мл) при 140°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH_2Cl_2 и промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$. Органический слой отделяли, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ до 9/1) с получением указанного в заголовке продукта (22 мг, 32%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 430.3 $[M+H]^+$.

Пример 31.

2-(2-Метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*S*)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

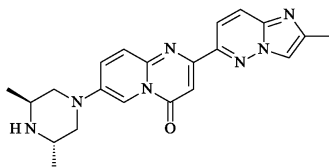


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 75 мг, 0,254 ммоль), TEA (0,28 мл, 2,03 ммоль, 8 экв.) и (S)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (162 мг, 0,762 ммоль, 3,0 экв.) в NMP (4 мл) при 220°C в течение 1 ч в СВЧ-печи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH_2Cl_2 и промывали насыщенным водным раствором $NaHCO_3$. Органический слой отделяли, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (12 мг, 11%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 416.2 $[M+H]^+$.

Пример 32.

7-[(3S,5S)-3,5-Диметилпиперазин-1-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



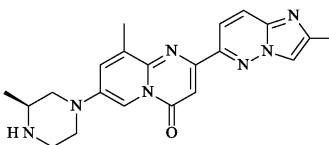
В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 75 мг, 0,254 ммоль), ТЕА (0,28 мл, 2,03 ммоль, 8 экв.) и (2S,6S)-2,6-диметилпиперазина дигидрохлорид (143 мг, 0,762 ммоль, 3,0 экв.) в DMSO (3 мл) при 140°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (10 мг,

10%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 33.

9-Метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3S)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

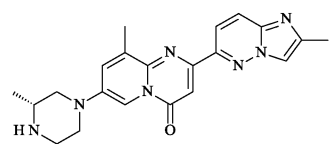


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0,808 ммоль) и (S)-2-метилпиперазин (405 мг, 4,04 ммоль, 5,0 экв.) в DMSO (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 85/15) с получением указанного в заголовке продукта (135 мг, 43%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 34.

9-Метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3R)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

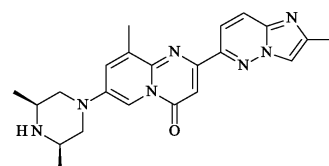


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0,808 ммоль) и (R)-2-метилпиперазин (405 мг, 4,04 ммоль, 5,0 экв.) в DMSO (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 85/15) с получением указанного в заголовке продукта (100 мг, 32%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.3 [M+H]⁺.

Пример 35.

7-[(3R,5S)-3,5-Диметилпиперазин-1-ил]-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он

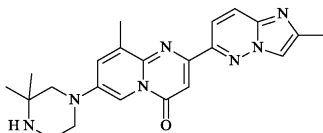


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0,808 ммоль) и (2*S*,6*R*)-2,6-диметилпиперазин (461 мг, 4,04 ммоль, 5,0 экв.) в DMSO (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 85/15) с получением указанного в заголовке продукта (101 мг, 31%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 404.3 [M+H]⁺.

Пример 36.

7-(3,3-Диметилпиперазин-1-ил)-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

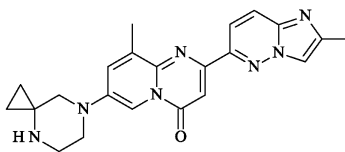


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0,808 ммоль) и 2,2-диметилпиперазин (461 мг, 4,04 ммоль, 5,0 экв.) в DMSO (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 85/15) с получением указанного в заголовке продукта (120 мг, 36%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 404.3 [M+H]⁺.

Пример 37.

7-(4,7-Диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

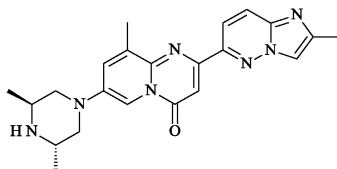


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 125 мг, 0,404 ммоль), K₂CO₃ (223 мг, 1,62 ммоль, 4 экв.) и 4,7-дiazаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (112 мг, 0,606 ммоль, 1,5 экв.) в DMA (2 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (75 мг, 46%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 402.2 [M+H]⁺.

Пример 38.

7-[(3*S*,5*S*)-3,5-Диметилпиперазин-1-ил]-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он

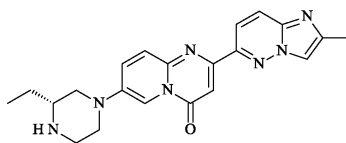


В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 125 мг, 0,404 ммоль), K₂CO₃ (223 мг, 1,62 ммоль, 4 экв.) и (2*S*,6*S*)-2,6-диметилпиперазина дигидрохлорид (113 мг, 0,606 ммоль, 1,5 экв.) в DMA (2 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Осадок переносили в CH₂Cl₂ и промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Органический слой отделяли, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением указанного в заголовке продукта (50 мг, 31%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS *m/z* 404.3 [M+H]⁺.

Пример 39.

7-[(3R)-3-Этилпиперазин-1-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закупоренной пробирке перемешивали 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 200 мг, 0,677 ммоль), K_2CO_3 (374 мг, 2,71 ммоль, 4 экв.) и (R)-2-этилпиперазина дигидрохлорид (238 мг, 0,606 ммоль, 1,5 экв.) в DMA (3 мл) и нагревали при 100°C в течение 4 суток. Растворитель удаляли в условиях высокого вакуума. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ до 8/2) с получением указанного в заголовке продукта (168 мг, 64%) в виде светло-желтого твердого вещества.

MS m/z 390.2 $[M+H]^+$.

Пример 40.

Исследование сплайсинга мРНК мини-гена SMN2 в культивируемых клетках посредством количественной ОТ-ПЦР.

Для более подробного описания и помощи в понимании данного изобретения предлагаются следующие не являющиеся исчерпывающими биологические примеры, иллюстрирующие изобретение, но не ограничивающие его объем. Такие варианты по данному описанию, которые известны в настоящее время или будут разработаны в будущем, находящиеся в компетенции специалиста в данной области техники, считаются подпадающими под объем настоящего описания и представленной ниже формулы изобретения. Такие примеры иллюстрируют тестирование некоторых соединений по данному описанию *in vitro* и/или *in vivo* и демонстрируют пользу соединений для лечения СМА за счет усиленного включения экзона 7 SMN2 в мРНК, которая транскрибируется с гена SMN2. Соединения формулы (I) улучшают включение экзона 7 SMN2 в мРНК, транскрибированную с гена SMN2 и повышают уровни белка SMN, продуцируемого с гена SMN2, и, следовательно, могут применяться для лечения СМА у человека, которому это необходимо. Указанные примеры также иллюстрируют тестирование некоторых соединений по данному описанию *in vitro* и/или *in vivo* и демонстрируют пользу соединений для усиления включения экзона 7 SMN1 в мРНК, которая транскрибируется с гена SMN1. Соответственно, соединения формулы (I) также улучшают включение экзона 7 SMN1 в мРНК, транскрибированную с гена SMN1 и повышают уровни белка SMN, продуцируемого с гена SMN1.

Для количественного определения уровня полноразмерной мРНК мини-гена SMN2 (обозначаемой в данном документе термином "FL SMN2mini"), содержащей экзон 7 SMN2, в клетках линии HEK293H, стабильно трансфицированных указанным мини-геном и подвергавшихся воздействию исследуемого соединения, применяли количественную ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Использованные материалы и их соответствующие источники перечислены ниже в табл. 1.

Таблица 1. Материалы и их соответствующие источники, использованные в исследовании сплайсинга мРНК мини-гена SMN2 в культивируемых клетках посредством количественной ОТ-ПЦР.

Материал	Источник
Клетки HEK293H	Life Technologies, Inc. (бывш. Invitrogen) кат. номер 11631-017
Лизирующий буфер Cells-To-Ct	Life Technologies, Inc. (бывш. Applied Biosystems) компонент номер 4399002
DMEM	Life Technologies, Inc. (бывш. Invitrogen) кат. номер 11960-044
96-луночные плоскодонные планшеты	Becton Dickinson Catalog No. 353072
Смесь ферментов для ОТ-ПЦР	Life Technologies, Inc. (бывш. Applied Biosystems) компонент номер 4388520
Буфер для ОТ-ПЦР	Life Technologies, Inc. (бывш. Applied Biosystems) компонент номер No. 4388519
Набор для	Life Technologies, Inc. (бывш. Applied Biosystems) компонент
одностадийной ОТ-ПЦР AgPath-ID	номер 4387391
Термоциклер	Life Technologies, Inc. (бывш. Applied Biosystems) 7900HT

Конструкцию мини-гена SMN2-A получали, как описано в международной заявке на патент WO2009/151546A1, с. 145 пар. [00400] - с. 147 пар. [00412] (включая фиг. 1 и 3).

Клетки HEK293H, стабильно трансфицированные конструкцией мини-гена SMN2-A (10000 клеток/лунку) высевали в 200 мкл культуральной среды (DMEM + 10% FBS (эмбриональной телячьей сыво-

ротки, от англ. fetal calf serum) с добавлением 200 мкг/мл гигромицина) в 96-луночные плоскодонные планшеты и немедленно перемешивали путем вращения планшета для равномерного распределения клеток и образования ровного монослоя клеток. Клетки оставляли прикрепиться в течение 6 ч. Готовили серию 3,16-кратных разведений исследуемых соединений в 100% ДМСО для построения концентрационной кривой по 7 точкам. В каждую лунку с клетками добавляли раствор исследуемого соединения (1 мкл, 200× в ДМСО) и инкубировали в течение 24 ч в инкубаторе для культивирования клеток (37°C, 5% CO₂, относительная влажность 100%). Каждую концентрацию исследуемого соединения анализировали в двух повторностях. Затем клетки лизировали в лизирующем буфере Cells-To-Ct и хранили лизат при -80°C.

Проводили количественное определение полноразмерной мРНК мини-гена SMN2-A и мРНК GAPDH, используя праймеры и зонды, указанные в WO 2014/209841A2 на с. 80 в табл. 1. Прямой праймер SMN A (SEQ ID NO: 1) гибридизовался с нуклеотидной последовательностью в экзоне 7 (от нуклеотида 22 до нуклеотида 40), обратный праймер SMN A (SEQ ID NO: 2) гибридизовался с нуклеотидной последовательностью в кодирующей последовательности люциферазы светлячка, зонд SMN A (SEQ ID NO: 3) гибридизовался с нуклеотидной последовательностью в экзоне 7 (от нуклеотида 50 до нуклеотида 54) и экзоне 8 (от нуклеотида 1 до нуклеотида 21). Комбинация этих трех олигонуклеотидов детектировала только мини-гены SMN1 или SMN2 (количественная ОТ-ПЦР) и не детектировала эндогенные гены SMN1 или SMN2.

Прямой и обратный праймеры SMN использовали в конечных концентрациях 0,4 мкМ. Зонд SMN использовали в конечной концентрации 0,15 мкМ. Праймеры GAPDH использовали в конечных концентрациях 0,2 мкМ, а зонд - 0,15 мкМ.

Реакционную смесь для мини-гена SMN2-GAPDH (общий объем 15 мкл) получали путем объединения 7,5 мкл 2× буфера для ОТ-ПЦР, 0,4 мкл 25× смеси ферментов для ОТ-ПЦР, 0,75 мкл 20× смеси праймеров и зонда для GAPDH, 4,0075 мкл воды, 2 мкл разведенного в 10 раз клеточного лизата, 0,06 мкл 100 мкМ прямого праймера SMN, 0,06 мкл 100 мкМ обратного праймера SMN и 0,225 мкл 10 мкМ зонда SMN.

ПЦР проводили при следующих температурах в течение указанного времени:

стадия 1: 48°C (15 мин);

стадия 2: 95°C (10 мин);

стадия 3: 95°C (15 с);

стадия 4: 60°C (1 мин);

затем стадии 3 и 4 повторяли, выполняя в общей сложности 40 циклов.

Каждая реакционная смесь содержит наборы праймеров/зонда для мини-гена SMN2-A и GAPDH (мультиплексная технология), что позволяет одновременно измерять уровни двух транскриптов.

Увеличение количества мРНК FL SMN2mini по сравнению с клетками, на которые воздействовала несущая среда, служившая контролем, определяли по результатам ПЦР в реальном времени, используя модифицированный метод $\Delta\Delta C_t$ (как описано Livak and Schmittgen, Methods, 2001, 25:402-8). Эффективность амплификации E рассчитывали отдельно FL SMN2mini и GAPDH по углу наклона кривой амплификации. Затем рассчитывали количество мРНК FL SMN2mini и мРНК GAPDH как $(1+E)^{-C_t}$, где C_t представляет собой пороговое значение для каждого ампликона. Количество мРНК FL SMN2mini нормализовали относительно количества мРНК GAPDH. Затем нормализованное количество мРНК FL SMN2mini для образцов, на которые воздействовало исследуемое соединение, делили на нормализованное количество мРНК FL SMN2mini для клеток, на которые воздействовала несущая среда, чтобы определить уровень мРНК FL SMN2mini в сравнении с контролем, которым служила несущая среда.

В табл. 2 приведены концентрации EC_{1.5x} для продукции полноразмерной мРНК мини-гена SMN2, полученные по концентрационным кривым, построенным по 7 точкам, в соответствии с описанной выше процедурой, для конкретных соединений по данному изобретению.

У конкретных соединений по данному изобретению концентрация EC_{1.5x} для продукции полноразмерной мРНК мини-гена SMN2 составляет ≤ 1 мкМ.

У отдельных соединений по данному изобретению концентрация EC_{1.5x} для продукции полноразмерной мРНК мини-гена SMN2 составляет $\leq 0,1$ мкМ.

У некоторых соединений по данному изобретению концентрация EC_{1.5x} для продукции полноразмерной мРНК мини-гена SMN2 составляет $\leq 0,02$ мкМ.

Таблица 2. Концентрации $EC_{1.5x}$ для продукции полноразмерной мРНК мини-гена SMN2.

Пример	$EC_{1.5x}$ для мини-гена (нМ)	Пример	$EC_{1.5x}$ для мини-гена (нМ)	Пример	$EC_{1.5x}$ для мини-гена (нМ)
1	3,5	14	4,1	27	39,9
2	3,8	15	4	28	5
3	3,2	16	1,1	29	0,3
4	1,8	17	6,4	30	3
5	0,6	18	3,6	31	6,7
6	2,8	19	10,2	32	1,6
7	3,7	20	4,3	33	0,5
8	0,3	21	9,6	34	0,9
9	0,1	22	0,9	35	4,7
10	6,4	23	3,4	36	5
11	1,4	24	0,4	37	4,4
12	1,2	25	0,5	38	0,3
13	5	26	327	39	0,9

Пример 41.

Определение белка SMN в культивируемых клетках.

Для количественного определения уровня белка SMN в фибробластах пациентов, имеющих СМА, после воздействия исследуемых соединений, использовали метод гомогенной флуоресценции с временным разрешением (ГФВР). Используемые материалы и их соответствующие источники приведены ниже в табл. 3.

Таблица 3. Материалы и их соответствующие источники, использованные в исследовании белка SMN в культивируемых клетках.

Материал	Источник
Человеческие клетки SMA 1 типа	GM03813 (Coriell Institute)
Коктейль ингибиторов протеаз	Roche Applied Science, кат. номер 11836145001
Антитело к SMN, меченое d2	Blue cap Cisbio, кат. номер 63IDC002-SMN
Антитело к SMN, меченое криптоном	Red cap Cisbio, кат. номер 63IDC002-SMN
Буфер для разбавления SMN	Cisbio, кат. номер 63IDC002-SMN-Buffer
DMEM	Life Technologies (бывш. Invitrogen), кат. номер 11960-044
Лизирующий буфер RIPA	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% раствор детергента Thermo Scientific NP-40 Surfact-Amps (Fisher Scientific, Pittsburgh/PA), 1% дезоксихолат натрия
Буфер для разведения	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl
Считывающее устройство для планшетов Envision	Perkin Elmer модель # 2103

Клетки размораживали и культивировали в DMEM-10% FBS в течение 72 ч. Клетки трипсинизировали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации 25 000 клеток/мл в DMEM-10% FBS. Клеточную суспензию высаживали в концентрации 5000 клеток на лунку в 96-луночный планшет для микротитрования и инкубировали в течение 3-5 ч. Готовили серию 3,16-кратных разведений исследуемых соединений в 100% ДМСО для построения концентрационной кривой по 7 точкам. В лунки с клетками переносили 1 мкл раствора исследуемого соединения и инкубировали в течение 48 ч в инкубаторе для культивирования клеток (37°C, 5% CO₂, относительная влажность 100%). Каждую концентрацию исследуемого соединения исследовали в трипликатах. Через 48 ч надосадочную жидкость удаляли из лунок и добавляли в лунки 25 мкл лизирующего буфера RIPA с ингибиторами протеаз и инкубировали при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли 25 мкл разбавителя и затем 35 мкл полученного лизата переносили в 384-луночный планшет, в котором каждая лунка содержала 5 мкл раствора антител (антитело к SMN, меченое d2, и антитело к SMN, меченое криптоном, в разведении 1:100 в буфере для разведения SMN). Планшет центрифугировали в течение 1 мин, чтобы собрать раствор на дне лунок, и затем инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Определяли флуоресценцию в каждой лунке при 665 и 620 нм с помощью многоканального ридера EnVision (Perkin-Elmer).

Для каждой лунки с образцами, холостой пробой и инертным контролем рассчитывали нормализованный флуоресцентный сигнал путем деления сигнала при 665 нм на сигнал при 620 нм. Нормализация

сигнала позволяет нивелировать возможное тушение флуоресценции, обусловленное матричным эффектом лизата. Значение ΔF (измерение количества белка SMN в процентах) для каждого образца рассчитывали путем вычитания нормализованной средней флуоресценции в лунках с холостой пробой из нормализованной флуоресценции в каждой лунке с образцом, деления полученной разности на нормализованную среднюю флуоресценцию в лунках с холостой пробой и умножения полученного значения на 100. Значение ΔF для каждой лунки с образцом отражает количество белка SMN в образцах, на которые воздействовало исследуемое соединение. Чтобы рассчитать кратность увеличения количества белка SMN по сравнению с контролем, которым служила несущая среда, значение ΔF каждой лунки с образцом делили на значение ΔF лунок с несущей средой. В табл. 4 представлены концентрации $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN, полученные по концентрационной кривой, построенной по 7 точкам, как описано выше, для конкретных соединений по данному изобретению.

У конкретных соединений по данному изобретению концентрация $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN составляет ≤ 1 мкМ.

У отдельных соединений по данному изобретению концентрация $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN составляет ≤ 100 нМ.

У некоторых соединений по данному изобретению концентрация $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN составляет ≤ 30 нМ.

В табл. 5 показана максимальная кратность увеличения белка SMN конкретными соединениями по данному изобретению, полученная по концентрационной кривой, построенной по 7 точкам, как описано выше.

У конкретных соединений по данному изобретению максимальная кратность увеличения составляет $>1,5$.

У отдельных соединений по данному изобретению максимальная кратность увеличения составляет $>1,7$.

У некоторых соединений по данному изобретению максимальная кратность увеличения составляет $>1,8$.

Таблица 4. Концентрации соединений, увеличивающие экспрессию белка SMN в 1,5 раза по сравнению с контролем ($EC_{1.5x}$).

Пример	$EC_{1.5x}$ для белка SMN (нМ)	Пример	$EC_{1.5x}$ для белка SMN (нМ)	Пример	$EC_{1.5x}$ для белка SMN (нМ)
1	10,8	14	17,6	27	126,5
2	19,8	15	21,2	28	49,7
3	25,6	16	3	29	2,1
4	15,7	17	20,2	30	13,6
5	4,1	18	25	31	27,7
6	11	19	29,8	32	4
7	15,5	20	37	33	4
8	5,9	21	68,7	34	4,4
9	2,5	22	13,8	35	19,5
10	22,8	23	23,9	36	34,4
11	7	24	4,7	37	45
12	7,5	25	11,9	38	3,1
13	3	26	1230	39	15,8

Таблица 5. Максимальные значения кратности увеличения белка SMN.

Пример	Макс. кратность увел-я	Пример	Макс. кратность увел-я	Пример	Макс. кратность увел-я
1	1,84	14	1,86	27	1,57
2	1,76	15	1,94	28	1,72
3	1,81	16	1,83	29	1,81
4	1,76	17	1,98	30	1,84
5	1,71	18	1,75	31	1,65
6	1,84	19	1,83	32	1,88
7	1,76	20	1,72	33	1,82
8	1,85	21	1,54	34	1,89
9	1,92	22	1,69	35	1,79
10	1,95	23	1,63	36	1,77
11	1,9	24	1,77	37	1,87
12	1,77	25	1,79	38	1,85
13	1,91	26	1,52	39	1,81

Пример 42.

Исследование 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (Пример 20) *in vitro*.

Соединение по Примеру 20 представляет собой пероральный низкомолекулярный модулятор сплайсинга SMN2 для лечения СМА. Обнаружили, что соединение по Примеру 20 эффективно осуществляет коррекцию дисфункционального сплайсинга пре-мРНК SMN2 человека в культивируемых клетках пациентов (фибробласты пациентов с СМА 1 типа), полностью сдвигая равновесие реакции альтернативного сплайсинга в сторону включения экзона 7 SMN2 и образования полноразмерной мРНК (фиг. 1A: EC₅₀ 29±8 нМ для полноразмерной мРНК, 12±1 нМ для Δ7 мРНК). Воздействие на клетки, экспрессирующие мини-ген SMN2, соединения по Примеру 20 в нарастающих концентрациях приводило к дозозависимому увеличению количества полноразмерной мРНК мини-гена SMN2. EC1.5х составляло 4,7±0,7 нМ, а максимальное увеличение было 20-кратным. Результаты исследования мини-гена подтверждают, что соединение по Примеру 20 является мощным модулятором сплайсинга SMN2.

Для исследования продукции белка SMN в результате альтернативного сплайсинга проводили исследование *in vitro* для оценки уровней белка SMN в фибробластах и двигательных нейронах спинного мозга, полученных из iPSCs (индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) пациентов, имеющих СМА (EC₅₀ 12±3 нМ и EC₅₀ 182±114 нМ соответственно). Максимальное увеличение белка SMN по сравнению с клетками, не подвергавшимися воздействию, достигало одинаковых уровней в клетках обоих типов (60-80%; фиг. 1B и 1C), что позволяло предположить, что в результате коррекции дисфункционального сплайсинга SMN2 *in vitro* соединение по Примеру 20 одинаковым образом увеличивает уровень белка SMN в различных типах клеток пациентов с СМА.

Для дальнейшего изучения сплайсинга SMN2 как потенциального биомаркера крови разработали исследование *ex vivo*, в котором использовали клетки крови здоровых добровольцев, в которых сплайсинг SMN1 и SMN2 оценивали после 4-часового воздействия соединения по Примеру 20 (в указанный момент времени достигалось максимальное изменение сплайсинга). Сплайсинг SMN1 по существу оставался без изменений, при этом наблюдалось дозозависимое изменение сплайсинга SMN2 в сторону включения экзона 7 (фиг. 1D). Влияние на сплайсинг было очевидным, когда концентрации соединения по Примеру 20 превышали 100 нМ, что позволяло предположить, что для изучения фармакодинамических (ФД) эффектов на сплайсинг SMN2 *in vivo* с помощью такого исследования концентрации соединения в крови должны быть на указанном уровне.

Пример 43.

Исследование 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (Пример 20) *in vivo*.

In vivo соединение по Примеру 20 повышает белок SMN в головном мозге и мышцах трансгенных мышей, несущих человеческий SMN2, на модели тяжелой формы заболевания SMNΔ7 и модели более мягкой формы с аллелями C/C. Взрослые мыши, несущие аллели C/C, получали в течение 10 дней несущую среду или соединение по Примеру 20 (1, 3 или 10 мг/кг в сутки, перорально), а мыши SMNΔ7 в возрасте 3 дней (P3) получали в течение 7 дней несущую среду или соединение по Примеру 20 (0,1, 0,3, 1 или 3 мг/кг в сутки, внутрибрюшинно). Соединение по Примеру 20 приводило к дозозависимому увеличению уровней белка SMN в головном мозге и мышечной ткани, у взрослых мышей с аллелями C/C максимальный эффект с 2-3 кратным увеличением достигался при введении 10 мг/кг, а у новорожденных мышей SMNΔ7 при введении 1-3 мг/кг (фиг. 2). Таким образом, в мышцах мышей с аллелями C/C при дозе 10 мг/кг уровни SMN достигали значений, не отличавшихся от таковых у гетерозиготных мышей. У мышей SMNΔ7 увеличение белка SMN было только частичным как в головном мозге, так и в мышцах, достигая приблизительно 43% (головной мозг) и 55% (мышцы) от уровней белка у гетерозиготных мышей. Эти результаты демонстрируют, что на модели СМА у трансгенных мышей соединение по Примеру 20 повышает уровень белка SMN как в головном мозге, так и в мышечных тканях.

Функциональный эффект оценивали на моделях тяжелой и умеренной СМА у мышей. Мыши SMNΔ7 получали несущую среду или соединение по Примеру 20 посредством внутрибрюшинной инъекции один раз в сутки на протяжении от P3 до P23 и через желудочный зонд один раз в сутки, начиная от P24 и далее. В ходе лечения регистрировали массу тела и выживаемость животных. На протяжении 100-дневного периода наблюдений погибли только два гетерозиготных сородича. Напротив, все животные, получавшие несущую среду, погибли до P21, при этом медиана времени выживания (MBV) составляла 10,5 суток. Лечение соединением по Примеру 20 приводило к дозозависимому увеличению выживаемости животных (Фиг. 3A). Незначительное, но достоверное увеличение MBV до P26 наблюдалось при более низкой дозе (0,1 мг/кг внутрибрюшинно до P23 и затем 0,3 мг/кг перорально). В группах, получавших средние (0,3 мг/кг внутрибрюшинно до P23 и затем 1 мг/кг перорально), средние/высокие (1 мг/кг внутрибрюшинно до P23 и затем 3 мг/кг перорально) и высокие дозы (3 мг/кг внутрибрюшинно до P23 и затем 10 мг/кг перорально), 80, 82 и 73% животных, соответственно, доживали до P100, при этом не наблюдалось отличий с гетерозиготными сородичами, среди которых 83% доживали до P100.

У мышей SMN Δ 7 прибавка массы тела на протяжении исследования происходила с сильным отставанием, и низкие дозы соединения по Примеру 20 приводили только к умеренной коррекции. При лечении средними, средне/высокими и высокими дозами соединения по Примеру 20 прибавка массы тела восстанавливалась на 71, 82 и 85% соответственно по сравнению с гетерозиготными сородичами, у которых отсутствовали какие-либо фенотипические проявления СМА (фиг. 3B). Эти результаты позволяют предположить, что лечение соединением по Примеру 20, начатое на P3, дозозависимым образом предотвращает фенотипические проявления СМА у мышей SMN Δ 7 с тяжелой формой заболевания.

Наконец, соединение по Примеру 20 улучшает нервно-мышечную проводимость *in vivo* на модели тяжелой формы СМА у мышей. Мыши SMN Δ 7 получали внутрибрюшинное введение инертного вещества или соединения по Примеру 20 по 0,1, 0,3, 1 мг/кг один раз в сутки на протяжении от P3 до P14. На P14, через 1 ч после последнего введения спинной мозг и мышечные ткани подготавливали для гистологической оценки. По сравнению с гетерозиготными сородичами у мышей SMN Δ 7 на двигательных нейронах было значительно снижено число синапсов с отростками, несущими проприоцептивные импульсы, маркером которых является везикулярный переносчик глутамата (vGlut1), наблюдалась потеря двигательных аксонов, нарушение иннервации нервно-мышечных синапсов (NMJ) в длиннейшей мышце и атрофия мышц. Соединение по Примеру 20 приводит к дозозависимому и существенному увеличению числа синапсов, положительных по vGlut1, числа двигательных аксонов, процентной доли NMJ с полной иннервацией и размера фибрилл в длинном разгибателе пальцев (EDL) по сравнению с мышцами SMN Δ 7, получавшими несущую среду (Фиг. 4). Эти результаты позволяют предположить, что лечение соединением по Примеру 20, начатое на P3, оказывает защитное действие как на центральные, так и периферические аспекты денервации NMJ и защищает мышей SMN Δ 7 с тяжелыми поражениями от мышечной атрофии.

Пример 44.

Влияние 7-(4,7-диазааспиридо[2,5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (Пример 20) на транскрипционный профиль *in vivo*.

Чтобы идентифицировать другие гены, которые могут подвергаться альтернативному сплайсингу под воздействием соединения по Примеру 20, анализировали транскрипционный профиль и обнаружили влияние на события сплайсинга некоторых генов при терапевтически значимой концентрации 121 нМ (EC_{90} , в 10 раз превышающая EC_{50}): STRN3, SLC25A17 и GGCT при сравнении с контролем. Специфические функции STRN3, SLC25A17 и GGCT и последствия нарушения их регуляции в настоящее время пока не изучены. Более высокая доза (в 5 раз превышающая EC_{90}), которую использовали для иллюстрации максимального эффекта данного соединения, также оказывала стабильное влияние на эти три гена. Более высокая доза влияла на события сплайсинга 11 генов, включая гены FoxM1 и MADD, более низкая доза не оказывала влияния. Известно, что FoxM1 и MADD задействованы в регуляции клеточного цикла и в апоптозе, соответственно. Недавно опубликованное сообщение о модуляторах сплайсинга SMN2 позволяет предположить, что соединение по Примеру 20 является относительно специфичным по сравнению с другой молекулой, NVS-SM1, в ответ на терапию которой изменение сплайсинга затрагивало 39 возможных событий сплайсинга [Palacino et al., Nat. Chem. Biol. 2015 Jul; 11(7):511-7].

Кроме того, анализ транскрипционного профиля показал, что при терапии соединением по Примеру 20 в дозе 121 нМ изменялись уровни экспрессии 0 генов ($p < 0,01$). Эти данные указывают на относительную специфичность соединения по сравнению с опубликованными данными по изменениям уровня экспрессии под влиянием другой вызывающей альтернативный сплайсинг SMN2 молекулы, NVS-SM1, вызывающей более чем ± 2 -кратные ($p < 0,05$) изменения уровня экспрессии 175 генов, и NVS-SM3, вызывающей существенные изменения экспрессии 23 генов [Palacino et al., Nat. Chem. Biol. 2015 Jul; 11(7):511-7].

FoxM1, ген, альтернативный сплайсинг которого происходит под действием других модуляторов сплайсинга, кодирует регулятор клеточного цикла. Только у человека и высших приматов транскрипционно неактивный вариант FoxM1a содержит экзон 9 (FL), а у транскрипционно активных вариантов FoxM1b/c экзон 9 отсутствует ($\Delta 9$) [Ye et al., Future Oncol. 2007 Feb; 3(1):1-3. Laoukili et al., Biochim Biophys Acta. 2007 Jan; 1775(1):92-102]. Количественная ОТ-ПЦР со специфическими праймерами для FoxM1a (FL) и FoxM1b/c ($\Delta 9$) подтвердила изменение альтернативного сплайсинга FoxM1 после воздействия соединения по Примеру 20 (EC_{50} 67 ± 32 нМ для мРНК FL, 139 ± 43 нМ для мРНК $\Delta 9$; см. фиг. 5). Повышенная экспрессия изоформы FoxM1A наряду с пониженной экспрессией изоформ FoxM1, не имеющих экзона 9, способна нарушить и подавить прохождение клеточного цикла, если уровень изменений сплайсинга является биологически значимым. Таким образом, соединение по Примеру 20 действует аналогичным образом на механизм сплайсинга SMN2 и FoxM1, однако эффект на функцию белка противоположный и степень влияния различается. Значение EC_{50} для гена MADD, который вовлечен в процессы апоптоза и также подвержен влиянию модуляторов сплайсинга, включая соединение по Примеру 20 в высоких концентрациях, не известно.

Пример 46. Фармацевтические композиции, содержащие олесоксим.

Примеры композиций, содержащих олесоксим, описаны в US2010099652A1. Олесоксим является стабильным в твердом состоянии (> 36 месяцев при 25°C/относительной влажности 60%), демонстрируя отсутствие изменений в профиле чистоты при долгосрочном хранении и испытании в экстремальных условиях. Олесоксим имеет низкую растворимость в воде (менее 5 мкг/мл) в диапазоне физиологических значений pH. Он является хорошо растворимым или растворимым в различных неводных растворителях.

Для обеспечения соответствующих возрасту композиций для различных возрастов разработали жидкую композицию для перорального приема. Обнаружили, что наиболее эффективная фармацевтическая композиция получается при приготовлении суспензии для перорального приема или для приема внутрь порошка олесоксима в кунжутном масле благодаря лучшей стабильности. Растворимость олесоксима в кунжутном масле (приблизительно 35 мг/мл) недостаточна для получения раствора, при этом количество масла, принимаемого субъектом, ограничено. Вкусовые качества (вкус, запах и текстура) приемлемы без дополнительных эксципиентов. 7,5 г кристаллического порошка олесоксима (гранулометрический состав частиц характеризуется значениями d₉₀ 70-90 мкм) суспендировали в 75 мл (61,6 г) кунжутного масла (рафинированного) в качестве несущей среды при перемешивании (например, встряхивании) для получения гомогенной суспензии (конечная концентрация олесоксима 100 мг/мл). В том, что касается деградации, внешнего вида, цвета, однородности содержимого и микробиологической чистоты, указанная суспензия для перорального приема оказалась стабильной по меньшей мере в течение 3 месяцев при 25°C/относительной влажности 60%.

Пример 45.

Растворы для перорального приема, содержащие 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он.

Соединение по Примеру 20, 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он, можно изготавливать в виде водных растворов для перорального приема путем растворения лекарственной субстанции в буферной системе с pH менее чем pH 4, в частности, менее чем pH 3,4, для обеспечения достаточно высокой концентрации лекарственного средства, например, в цитратном буфере, малатном буфере, малеатном буфере или тартратном буфере, более конкретно, малеатном или тартратном буфере, наиболее конкретно, тартратном буфере.

Долгосрочная стабильность композиций соединения по Примеру 20 обеспечивается получением сухого порошка или гранулята для приготовления раствора для перорального приема. Буферную систему можно включать в сухую композицию, выбирая органическую кислоту и ее соли в виде тонкодисперсных кристаллических порошков, например двухводного трехосновного цитрата натрия и безводной лимонной кислоты, малата натрия и яблочной кислоты или предпочтительно натриево-калиевой соли винной кислоты и винной кислоты.

Порошки или гранулы, содержащие соединение по Примеру 20, могут содержать внегранулярный наполнитель, такой как сорбит, изомальт или маннит и их комбинации, что обеспечивает быстрое растворение порошкообразной смеси при приготовлении раствора для перорального приема. При введении разбавителя можно осуществлять грануляцию порошкообразной смеси посредством уплотнения в сухом окружении для улучшения текучести и для обеспечения полной гомогенности.

Ингредиенты, составляющие систему растворителей для соединения по Примеру 20, могут входить в состав отдельной композиции. Приготовленный растворитель можно применять для растворения соединения по Примеру 20 во флаконе в начале периода применения раствора для перорального приема.

Приготовленный в буфере раствор соединения по Примеру 20 для перорального приема может обеспечить применение в течение более двух недель благодаря применению стабилизаторов и антиокислителей, таких как витамин Е ТПГС, динатрия эдетат, бутилгидрокситолуол, рибофлавин, или, предпочтительно, аскорбиновая кислота и их комбинаций.

В табл. 6 представлен ряд растворов для перорального приема, обеспечивающих стабильность раствора на протяжении более 2 недель.

Таблица 6. Растворы 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она с концентрацией 0,1, 1,0 и 3,0 мг/мл.

Ингредиенты	Композиция 1А 0,1 мг/мл (мг)	Композиция 1В 1,0 мг/мл (мг)	Композиция 1С 3,0 мг/мл (мг)	Композиция 1D 1,0 мг/мл (мг)
7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	20,0	200,0	600,0	200
лимонная кислота, безводная	1077,2	1077,2	1921,2	--
цитрат натрия двухводный	115,6	115,6	0,0	--
винная кислота, безводная	--	--	--	1274,0
калиево-натриевая соль винной кислоты $\times 4H_2O$	--	--	--	347,6
аскорбиновая кислота	70,5	70,5	211,5	70,5
динатрия эдетат	33,6	33,6	100,8	33,6
вода для инъекций	до 200,0 мл	до 200,0 мл	до 200,0 мл	до 200,0 мл

Пример 46.

Порошкообразные смеси как несущие среды для приготовления растворов 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для перорального приема.

В табл. 7 представлена гранулированная порошкообразная смесь для приготовления растворителя, который подходит для растворения 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она и для получения раствора для перорального приема с pH 3,5, который является стабильным на протяжении более чем 2 недель. Смесь содержит полиэтиленгликоль 6000 в качестве водорастворимого смазывающего агента, бензоат натрия в качестве консерванта, сукралозу в качестве подсластителя и клубничным корригент для улучшения вкуса, в частности, для применения в педиатрии.

Композиции по табл. 7 вместе с 80 мл воды образуют растворители, подходящие для растворения 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (80, 240 и 400 мг соответственно).

Таблица 7. Порошкообразная смесь как несущая среда для приготовления раствора 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для перорального приема с концентрациями АФИ 1,0, 3,0 и 5,0 мг/мл.

Предназначено для концентрации 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она в растворе:	Композиция 2А 1 мг/мл (мг)	Композиция 2В 3 мг/мл (мг)	Композиция 2С 5 мг/мл (мг)
внутригранулярные:			
маннит	1525,78	1554,58	1566,58
винная кислота	148,00	180,00	194,00
калиево-натриевая соль винной кислоты $\times 4H_2O$	173,60	112,80	86,80
микроинизированный бензоат натрия	80,00	80,00	80,00
тонкодисперсная аскорбиновая кислота	28,18	28,18	28,18
динатрия эдетат	13,44	13,44	13,44
ПЭГ 6000	25,00	25,00	25,00
сукралоза	16,00	16,00	16,00
Итого внутригранулярные:	2'010,0	2'010,0	2'010,0
внегранулярные:			
маннит 160С	250,00	250,00	250,00
корригент «клубника»	240,00	240,00	240,00
Итого :	2500,0	2500,0	2500,0

Пример 47.

Порошкообразные смеси, содержащие 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он для приготовления растворов для перорального приема.

В табл. 8 представлены растворы для перорального приема, содержащие 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он, которые были приготовлены с применением приготовленного раствора несущей среды из Примера 46 для растворения активного соединения. Несущая среда подходит для приготовления раствора для перорального приема с pH 3,4, стабильного на протяжении более чем 2 недель. Композиции по табл. 8 наряду с 80 мл воды образуют растворы для перорального приема, содержащие соответственно 1, 3 и 5 мг/мл 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она.

Таблица 8. Приготовление раствора для перорального приема, содержащего 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он с pH 3,5 с концентрациями АФИ 1,0, 3,0 и 5,0 мг/мл.

	Композиция 2А 1 мг/мл (мг)	Композиция 2В 3 мг/мл (мг)	Композиция 2С 5 мг/мл (мг)
7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	80	240	400
маннит	1525,78	1554,58	1566,58
винная кислота	148,00	180,00	194,00
калиево-натриевая соль винной кислоты *4H ₂ O	173,60	112,80	86,80
микронизированный бензоат натрия	80,00	80,00	80,00
тонкодисперсная аскорбиновая кислота	28,18	28,18	28,18
динатрия эдетат	13,44	13,44	13,44
ПЭГ 6000	25,00	25,00	25,00
сукралоза	16,00	16,00	16,00
маннит 160С	250,00	250,00	250,00
корригент «клубника»	240,00	240,00	240,00
Вода	до 80 мл	до 80 мл	до 80 мл
Итого :	80 мл	80 мл	80 мл

Пример 48.

Порошкообразные смеси 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для приготовления растворов для перорального приема.

В табл. 9 представлены порошкообразные смеси, содержащие 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он, которые могут применяться для приготовления растворов для перорального приема при добавлении 90 мл воды. Композиции по табл. 9 также могут быть приготовлены из растворителя, полученного из несущей среды, приготовленной в виде порошкообразной смеси (аналогично Примеру 46), с последующим растворением АФИ.

Таблица 9. Растворы 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для перорального приема с концентрацией 1,0 мг/мл во флаконе, содержащем 90 мл.

	Композиция 3А (мг)	Композиция 3В (мг)
7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	90,0	90,0
маннит	1200,0	1200,0
мальтодекстрин	--	450,0
лактоза	450,0	--
D-L винная кислота	573,3	573,3
двузамещенный тартрат натрия, двухводный	156,4	156,4
аскорбиновая кислота	31,7	31,7
динатрия эдетат * 4H ₂ O	15,1	15,1
сукралоза	18,0	--
натрия сахарин		18,0
натрия бензоат	90,0	--
сорбиновая кислота	--	90,0
ПЭГ 6000	18,0	--
корригент «клубника»	180,0	
корригент «ваниль»	--	180,0
Итого на флакон (мг):	2822,5	2804,5

Пример 49.

Порошкообразные смеси 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для приготовления растворов для перорального приема.

В табл. 10 представлены порошкообразные смеси, содержащие 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он, которые могут применяться для приготовления растворов для перорального приема при добавлении 80 мл воды. Композиции по табл. 10 также могут быть приготовлены из растворителя, полученного из несущей среды, приготовленной в виде порошкообразной смеси (аналогично Примеру 46), с последующим растворением АФИ.

Таблица 10. Порошкообразная смесь для получения раствора 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она с концентрацией 1 мг/мл для перорального приема во флаконе, содержащем 80 мл воды.

	Количество на флакон (мг)	Процентное содержание твердых веществ (%)
<u>внутригранулярные:</u>		
7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	80,00	3,20
маннит (Parteck M100)	1445,94	57,84
D-L винная кислота	147,68	5,91
калиево-натриевая соль винной	173,76	6,95

кислоты		
бензоат натрия	80,00	3,20
аскорбиновая кислота	28,18	1,13
динатрия эдетат	13,44	0,54
сукралоза	16,00	0,64
ПЭГ 6000	25,00	1,00
Итого сухих веществ:	2010,00	80,40
<u>внегранулярные:</u>		
корригент «клубника» PHS-180152	240,00	10,00
маннит 160С	250,00	9,60
Итого на флакон (мг):	2500,00	100,00

Пример 50.

Стабильность растворов 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для перорального приема.

В табл. 11 сравнивается стабильность различных растворов 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она, выраженная как чистота АФИ в процентах. Обнаружили, что АФИ стабилен во всех исследованных растворах для перорального приема, без заметной деградации на протяжении нескольких недель при комнатной температуре, а также при 5°C.

Композиция 1А по Примеру 45 содержит 0,1 мг/мл АФИ в цитратной буферной системе наряду с аскорбиновой кислотой в качестве антиокислителя и динатрия эдетатом в качестве стабилизатора.

Композиция 2А по Примеру 46 приготовлена с использованием 200 мл воды для растворения 200 мг АФИ (1 мг/мл).

Композиции 3А и 3В по Примеру 48 приготовлены из порошкообразной смеси АФИ с добавлением 90 мл воды (1 мг/мл).

Таблица 11. Стабильность раствора различного состава, хранившегося при 5 или 25°C во флаконах из темного стекла.

Композиция	Чистота 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (%)			
	исходно	через 7 суток при 25°C	через 17 суток при 5°C	через 17 суток при 25°C
1А	99,29	99,17	99,26	--
2А	99,33	99,23	99,29	--
3А	99,32	99,20	99,29	--
3А	99,34	--	--	99,28
3В	99,33	--	--	99,21

Пример 51.

Эмульсии вода-в-масле, содержащие 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он и олесоксим.

Для совместного введения соединения по Примеру 20 и олесоксима в составе единой композиции водные растворы соединения по Примеру 20 для перорального приема можно объединять с масляным раствором олесоксима с получением суспензии для перорального приема. Масляный раствор олесоксима (например, как в Примере 46) можно переносить во флакон, содержащий приготовленный раствор соединения по Примеру 20 и затем, встряхивая закрытые флаконы вручную 5-20 раз, предпочтительно 10 раз, можно получать эмульсию. Масляный раствор олесоксима представляет собой раствор в кунжутном масле, который может содержать эмульгирующие и/или липофильные растворяющие агенты, такие как глицерилмоноолеат (Pecelol™, Inwitor 948™, Capmul GMO™), глицерилмоноинолеат (Maisine 35-1™), сорбитанмоноолеат (Span 80™) или олеиновую кислоту, для увеличения растворимости олесоксима в масляном растворителе и для обеспечения образования эмульсии из масляного раствора при объединении с растворами соединения по Примеру 20. Эмульгаторы и растворяющие агенты, диспергированные в масляном растворителе, возможно до растворения олесоксима с применением нагревания, можно объединять с более полярными поверхностно-активными веществами, имеющими значение ГЛБ менее 7, например полисорбатом 80 (Tween 80™), каприлокапроилполиоксилглицеридами (Labrasol™) для получения эмульсии с более высокой диспергируемостью и более длительной физической стабильностью после приготовления. В зависимости от выбранного соотношения между липофиль-

ным поверхностно-активным веществом с низким значением ГЛБ и более гидрофильным поверхностно-активным веществом с высоким значением ГЛБ дисперсной фазой эмульсии может быть либо водная фаза, либо масляная фаза.

В табл. 12 представлены примеры масляной несущей среды, подходящей для образования эмульсии вода-в-масле, содержащей 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он в водной фазе и олесоксим в липидной фазе.

Таблица 12. Масляные несущие среды для олесоксима для приготовления эмульсии вода-в-масле с раствором 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для перорального приема.

Ингредиенты	Композиция 4А (%)	Композиция 4F (%)
Кунжутное масло	90,0	90,0
Сорбитана моноолеат	7,0	
Ресеол™ (глицерилмоноолеат)		6,1
полисорбат 80	3,0	
Labrasol™ (каприлокапроилполиоксилглицериды)		3,9

Для диспергирования композиции 4А и 4F использовали до 30% (мас./мас.) водного тартратного буферного раствора с pH 3,3 с образованием эмульсии после встряхивания 10 раз. Эмульсии были визуальными гомогенными по меньшей мере в течение 15 мин.

В табл. 13 (композиция 5А) представлен раствор, использованный для получения водного раствора 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она.

Таблица 13. Водный растворитель для 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она.

Композиция 5А	
Ингредиенты:	мг
винная кислота	184,6
калиево-натриевая соль	217,2
винной кислоты $\times 4H_2O$	
аскорбиновая кислота	35,23
динатрия эдетат безводный	16,81
очищенная вода	до 100 мл

На фиг. 6 представлены фотографии композиции 4А до (А) и немедленно после добавления 20% (В) или 30% (С) тартратного буферного раствора (композиция 5А) с получением эмульсий вода-в-масле.

На фиг. 7 представлены фотографии эмульсий вода-в-масле, содержащих 70% композиции 4А и 30% композиции 5А через 15 мин после приготовления (А) (встряхивание 10 раз) и через 30 мин после приготовления (В) (встряхивание 10 раз).

На фиг. 8 представлены фотографии композиции 4F до (А) и немедленно после добавления 20% (В, слева), 25% (В, в середине) или 30% (В, справа) тартратного буферного раствора (композиция 5А) с получением эмульсий вода-в-масле.

На фиг. 9 представлены фотографии эмульсий вода-в-масле, содержащих 70% композиции 4F и 30% композиции 5А через 15 мин после приготовления (А) (встряхивание 10 раз) и через 30 мин после приготовления (В) (встряхивание 10 раз).

Все полученные эмульсии оставались стабильными по меньшей мере в течение 30 мин.

Пример 52.

Масляные растворы, содержащие 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он и олесоксим.

В качестве альтернативы эмульсиям комбинированные препараты соединения по Примеру 20 и олесоксима могут быть получены путем растворения обеих лекарственных субстанций в масляном растворителе, содержащем кунжутное масло и липофильные поверхностно-активные вещества, такие как глицерилмоноолеат (Ресеол™, Inwitor 948™, Capmul GMO™), глицерилмоноолеат (Maisine 35-1™), сорбитанмоноолеат (Span 80™), или олеиновую кислоту, для улучшения растворимости в растворителе.

В табл. 14 представлены системы масляных растворителей, которые обеспечивают повышенную растворимость обоих лекарственных средств и обеспечивают достаточную стабильность в течение всего применения после приготовления, как показано в табл. 15.

Таблица 14. Масляные растворы 100 мг/мл олесоксима и 10 мг/мл 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она.

Ингредиенты	Композиция 6А	Композиция 6В
7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	10,0 мг	10,0 мг
олесоксим	100,0 мг	100,0 мг
бутилгидроксианизол	18,9 мг (0,02% мас./мас.)	--
витамин Е	--	236,25 мг (0,25% мас./мас.)
олеиновая кислота	9,45 г (10% мас./мас.)	9,45 г (10% мас./мас.)
Maisine™ глицерилмоноолеат	до 100,0 мл	до 100,0 мл

Таблица 15. Стабильность композиций 6А и 6В в форме масляных растворов.

Композиция				
	исходно	через 1 сутки при комн. темп.	через 7 суток при 4°C	через 7 суток при комн. темп.
Содержание 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (%)				
6А	99,5	97,0	99,0	96,5
6В	99,5	95,4	98,7	96,3
Содержание олесоксима (%)				
6А	98	98	98	98
6В	98	98	98	97

Пример 53.

Несущие среды в виде порошкообразных смесей и стабильность приготовленных из них растворов для перорального приема.

В табл. 16 представлены несущие среды в виде сухих гранулированных порошкообразных смесей, подходящие для приготовления растворов для перорального приема, содержащих 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (например, 0,25 или 1,5 мг/мл) с рН 3,4.

В указанных композициях вместо буфера, состоящего из кислоты и соответствующей соли, использовали точное количество винной кислоты, необходимое для достижения целевых значений рН. Как свидетельствуют данные табл. 17, достигалась стабильность раствора при применении в течение по меньшей мере 17 дней.

Таблица 16. Несущие среды в виде сухих гранулированных порошкообразных смесей для разведения.

Ингредиенты	Композиция 7а (несущая среда для 0,25 мг/мл)	Композиция 7б (несущая среда для 1,5 мг/мл)
мг на флакон		
маннит	2019,93	1948,63
винная кислота	92,00	163,30
бензоат натрия	64,00	64,00
аскорбиновая кислота	28,18	28,18
полиэтиленгликоль 6000	25,00	25,00
динатрия эдетат	14,89	14,89
сукралоза	16,00	16,00
корригент «клубника»	240,00	240,00
итого на флакон (мг)	2500,0	2500,0

Таблица 17. Стабильность растворов для перорального приема, содержащих приблизительно 0,25 мг/мл или приблизительно 1,5 мг/мл 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (указанного в таблице как АФИ) в растворе несущей среды Композиции 7a или 7b, разведенной в 80 мл воды для инъекций.

сутки	Композиция несущей среды	5°C		25°C	
		Содержание АФИ [мг/мл]	Чистота АФИ [%]	Содержание АФИ [мг/мл]	Чистота АФИ [%]
0	7a	0,24	99,56	0,24	99,56
10		0,24	99,57	0,24	99,55
17		0,24	99,60	0,24	99,50
0	7b	1,42	99,56	1,43	99,54
10		1,45	99,57	1,43	99,56
17		1,45	99,50	1,45	99,50

Пример 54.

Порошкообразные смеси 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она и стабильность приготовленных из него растворов для перорального приема.

Сухие гранулированные порошкообразные смеси композиций 8a, 8b, 8c и 8d из табл. 18 уже включают АФИ для упрощения процедуры приготовления раствора. У композиций 8a и 8b масса порошка была снижена, а в качестве второго растворителя содержался изомальт для улучшения свойств гранул. Как показано в табл. 19, и вода для инъекций, и питьевая вода позволяли достигнуть превосходную стабильность раствора до 1 месяца включительно.

Таблица 18. Сухие гранулированные порошкообразные смеси для приготовления растворов 7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она для перорального приема (0,25 или 0,75 мг/мл), разводимые в 80 мл воды для инъекций с pH 3,4.

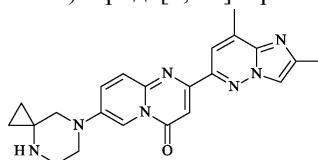
Ингредиенты	Композиция 8a	Композиция 8b	Композиция 8c	Композиция 8d
	мг на флакон			
7-(4,7-дiazаспи́ро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он	20,0	60,0	20	20
маннит	514,2	474,25	364,19	1373,99
изомальт	90,7	83,7	64,27	242,47
тонкодисперсная винная кислота	92,0	120,5	92,00	92,00
микрометризованный бензоат натрия	64,0	64,0	64,00	64,00
тонкодисперсная аскорбиновая кислота	28,2	14,1	14,09	14,09
сукралоза	16,0	16,0	16,00	16,00
динатрия эдетат *2H ₂ O	14,9	7,45	7,45	7,45
ПЭГ 6000	10,0	10,0	8,00	8,00
корригент «клубника»	150,0	150,0	150	150
итого	1000,0	1000,0	800,0	2000,0

Таблица 19. Стабильность растворов для перорального приема, содержащих приблизительно 0,25 мг/мл 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она (указанного в таблице как АФИ) в растворе несущей среды Композиции 8а, разведенной в 80 мл воды для инъекций (т.е. бидистиллированной воды, не содержащей электролитов) или питьевой воды (содержащей электролиты).

Сутки хранения при 5°C	Композиция 8а			
	с водой для инъекций		с питьевой водой	
	содержание АФИ [мг/мл]	чистота АФИ [%]	содержание АФИ [мг/мл]	чистота АФИ [%]
0	96,0	99,9	96,0	99,9
17	96,0	99,8	96,0	99,9
25	96,0	99,8	92,0	99,9
31	92,0	99,9	92,0	99,9

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

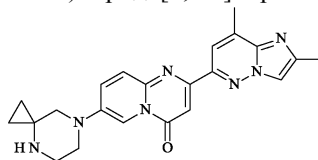
1. Фармацевтическая композиция для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, содержащая 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



или его фармацевтически приемлемую соль,

где композиция является водным раствором для перорального приема.

2. Фармацевтическая композиция для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1, содержащая 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



или его фармацевтически приемлемую соль,

где композиция является сухим порошком, подходящим для приготовления водного раствора для перорального приема.

3. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1, 2, где пероральный водный раствор имеет pH менее чем 4.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит цитратную, малатную, малеатную или тартратную буферную систему или, в альтернативном варианте, винную кислоту.

5. Фармацевтическая композиция по п.2, где композиция дополнительно содержит разбавитель, выбранный из лактозы, крахмала, гидролизованного крахмала, мальтодекстрина, микрокристаллической целлюлозы, маннита, изомальта, сорбита, сахарозы, декстрозы, двухосновного фосфата кальция, сульфата кальция и их комбинаций.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, где композиция дополнительно содержит консервант, стабилизатор или антиокислители, выбранные из витамина А, витамина С, витамина Е, витамина Е ТПГС (D-альфа-токоферилполиэтиленгликоль 1000 сукцината), ретинилпальмитата, селена, цистеина, метионина, лимонной кислоты, цитрата натрия, метилпарабена, пропилпарабена, динатрия эдетата, бутилгидрокситолуола, рибофлавина, аскорбиновой кислоты и их комбинаций.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6, где композиция дополнительно содержит консервант, выбранный из сорбиновой кислоты и бензоата натрия.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-7, где композиция дополнительно содержит антиокислитель, выбранный из аскорбиновой кислоты.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, где композиция дополнительно содержит стабилизатор, выбранный из динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-9, где композиция дополнительно содержит смазывающий агент, выбранный из поли(этиленгликоля).

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, где композиция содержит:

от 1 до 10 мас.% 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она или его фармацевтически приемлемой соли;

от 5 до 15 мас.% буферной системы или, в альтернативном варианте, только соответствующей кислоты буферной системы;

от 40 до 70 мас.% разбавителя;

от 1 до 4 мас.% антиокислителя;

от 0,5 до 2 мас.% стабилизатора;

от 0,5 до 2 мас.% смазывающего агента;

от 1 до 8 мас.% консерванта;

от 0 до 3 мас.% подсластителя и

от 0 до 20 мас.% корригента,

где общее количество ингредиентов не превышает 100 мас.%.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-11, где композиция содержит:

от 1 до 10 мас.% 7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-она или его фармацевтически приемлемой соли;

от 5 до 15 мас.% буферной системы, выбранной из цитратной, малатной, малеатной или тартратной буферной системы или, в альтернативном варианте, винной кислоты;

от 40 до 70 мас.% разбавителя, выбранного из маннита или смеси маннита и изомальта;

от 1 до 4 мас.% аскорбиновой кислоты;

от 0,5 до 2 мас.% динатрия эдетата;

от 0,5 до 2 мас.% ПЭГ 6000;

от 1 до 8 мас.% консерванта, выбранного из сорбиновой кислоты или бензоата натрия;

от 0 до 3 мас.% подсластителя, выбранного из сукралозы или сахараина натрия и

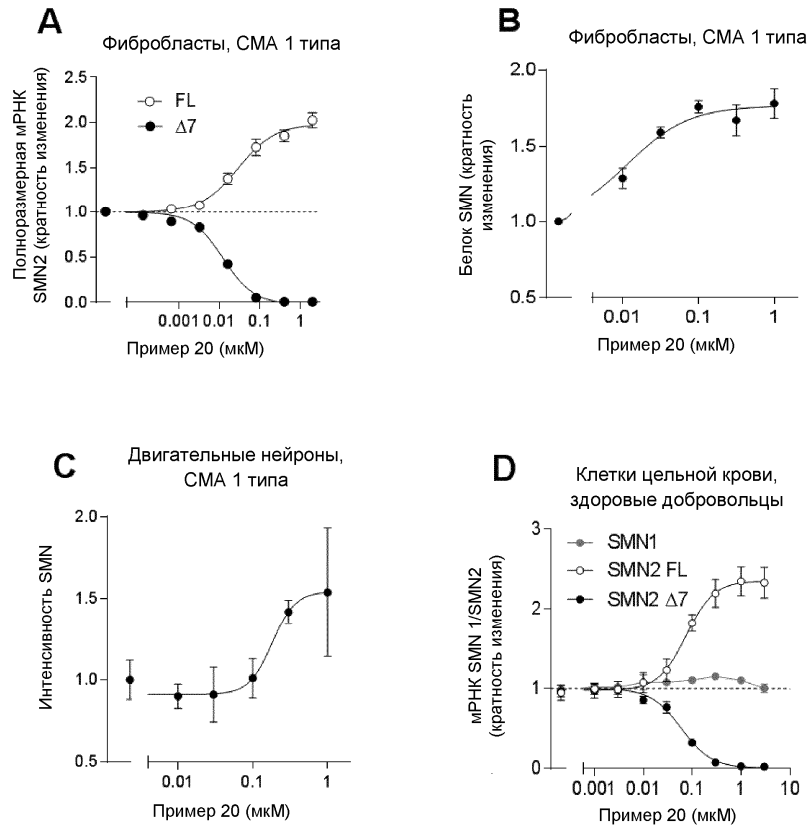
от 0 до 20 мас.% корригента, выбранного из клубничного корригента или ванильного корригента;

где общее количество ингредиентов не превышает 100 мас.%.

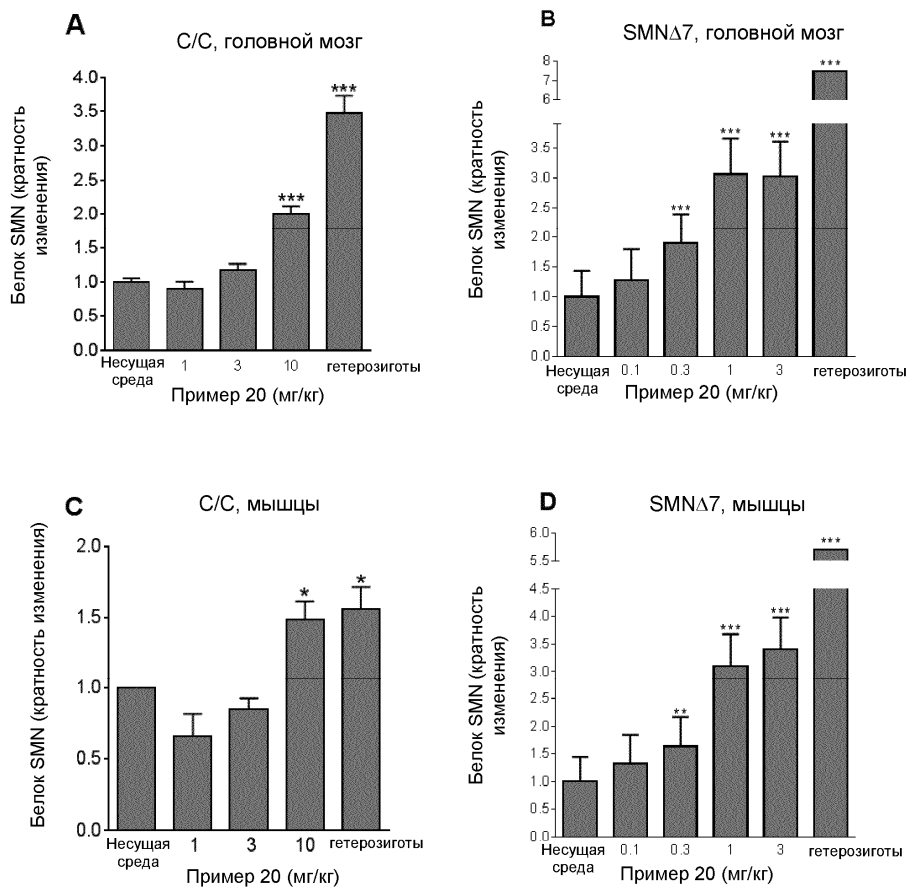
13. Набор для получения фармацевтической композиции по п.1, содержащий фармацевтическую композицию по п.2 и воду в качестве растворителя для разведения.

14. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-12 для получения лекарственных средств для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения заболеваний, вызванных инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанных с потерей или дефектом функции гена SMN1.

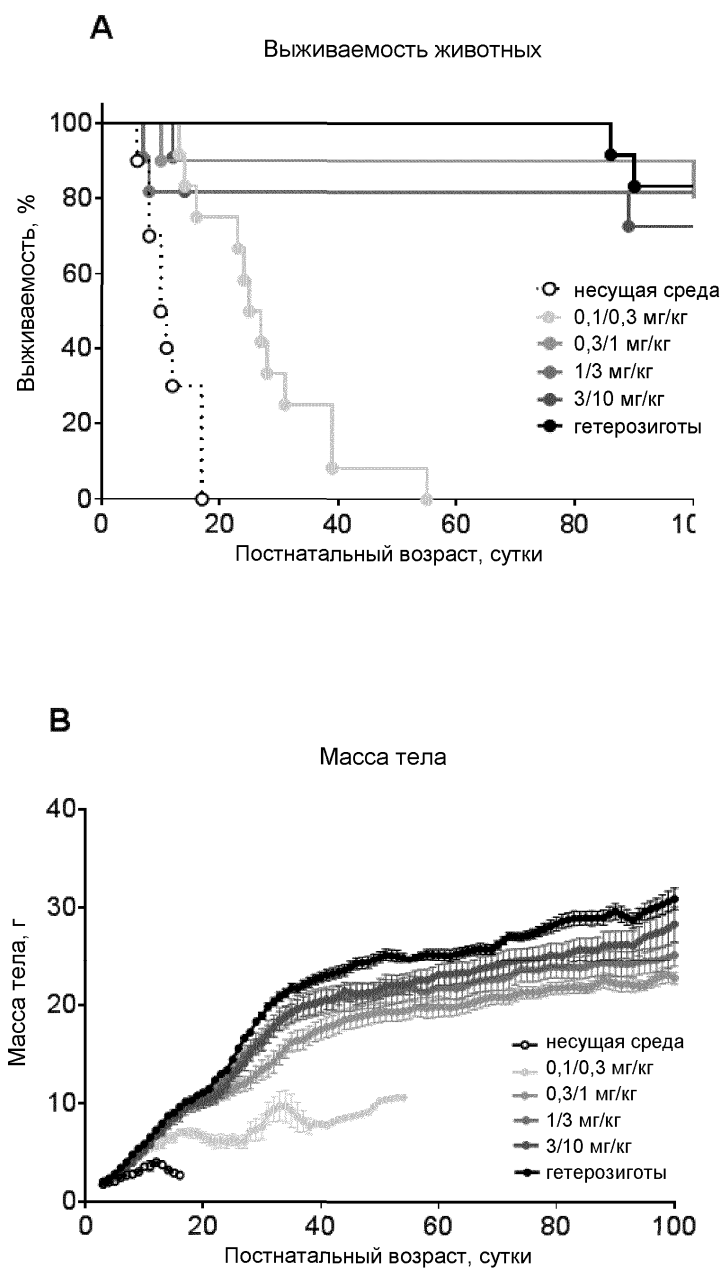
15. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-12 для получения лекарственных средств для лечения, предупреждения, замедления прогрессирования и/или облегчения спинальной мышечной атрофии.



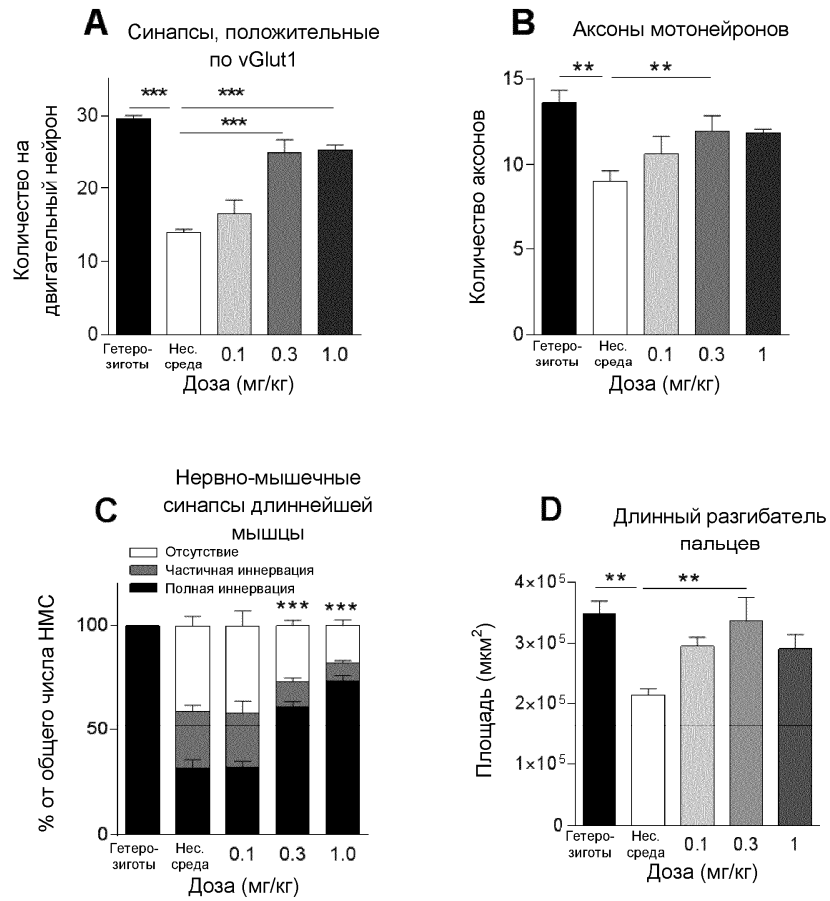
Фиг. 1



Фиг. 2

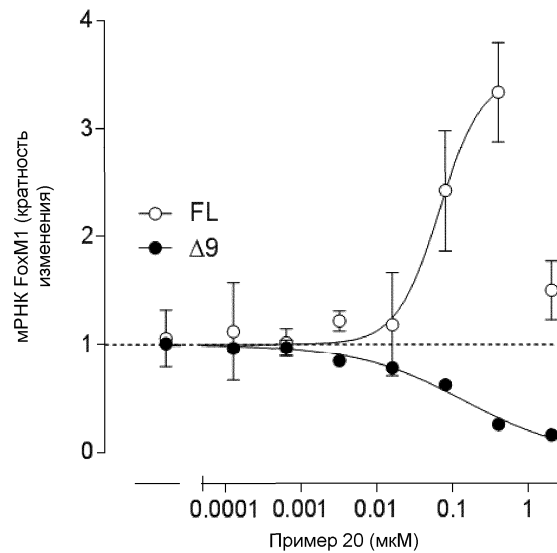


Фиг. 3

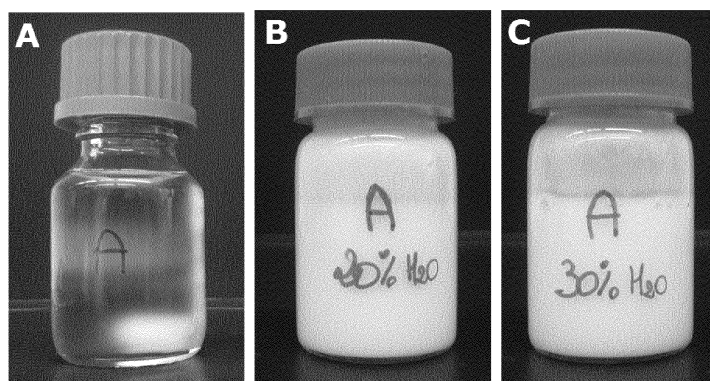


Фиг. 4

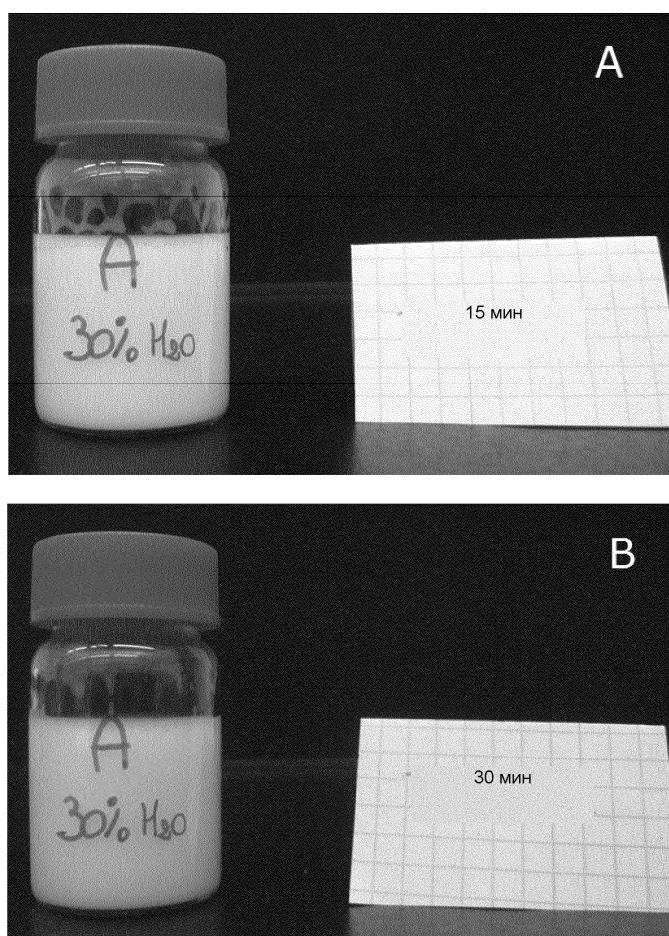
Фибробласты, СМА 1 типа



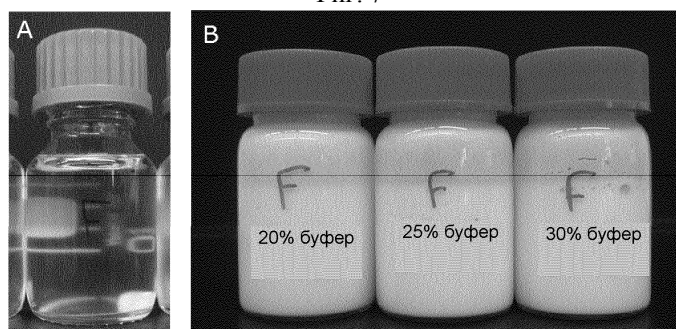
Фиг. 5



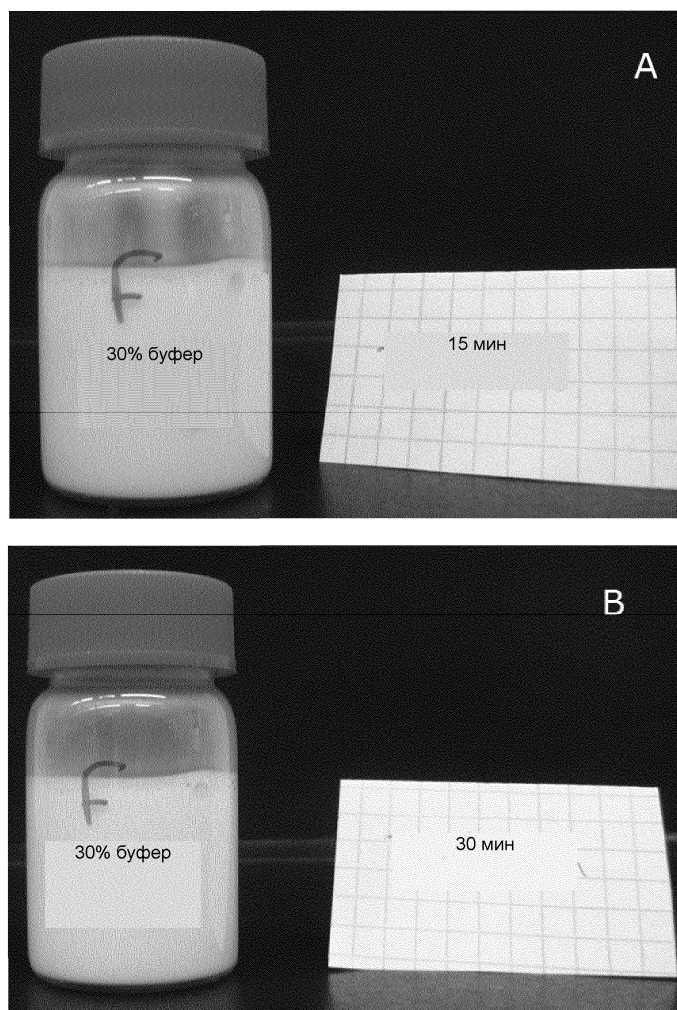
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

