

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091821 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.23

(51) Int. Cl. C07D 403/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.22

(54) ИНГИБИТОРЫ CD73

(31) 62/636,978; 62/775,553

(32) 2018.03.01; 2018.12.05

(33) US

(86) PCT/US2019/019074

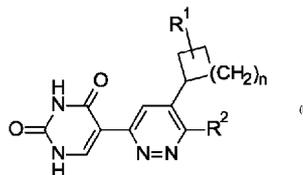
(87) WO 2019/168744 2019.09.06

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(74) Представитель:
Парамонова К.В., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Лебедев В.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Глухарёва А.О., Костюшенкова М.Ю.,
Лыу Т.Н. (RU)

(72) Изобретатель:
Дэлли Роберт Дин, Гарсия Паредес
Мария Кристина, Хайнц Лоуренс
Джозеф П, Хоувелл Дженнифер Мари,
Нджорродж Фрэнк Джордж, Ванг Ян,
Чжао Гэньши (US)

(57) В данном изобретении предложены соединения 5-[5-[2-циклоалкил]-6-пиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона или их фармацевтически приемлемые соли, которые ингибируют активность CD73 и пригодны для лечения рака.



202091821

A1

A1

202091821

ИНГИБИТОРЫ CD73

Данное изобретение относится к соединениям 5-[5]-[2-циклоалкил]-6-пиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона или их фармацевтически приемлемым солям, а также к фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения, которые ингибируют активность CD73 и пригодны для лечения рака.

CD73, также известный как 5'-нуклеотидаза или экто-5'-нуклеотидаза (ЕС 3.1.3.5), представляет собой фермент, который превращает 5'-мононуклеотиды в нуклеозиды. CD73 экспрессируется во многих тканях и активируется в раковых тканях, а каскад CD73 промотирует рост опухоли вследствие лимитирования противоопухолевого Т-клеточного иммунитета посредством передачи сигналов через аденозиновый рецептор (Zhang B, *Cancer Research* 2010; 70: 6407-6411; Antonioli L, *et al.*, *Drug Discovery Today* 2017; 22: 1686-1696).

У мышей с дефицитом CD73 повышен противоопухолевый иммунитет, и они резистентны к экспериментальному метастазу (Stagg J, *et al.*, *Cancer Research* 2011; 71: 2892-2900). Внеклеточный аденозин, выработанный опухолевым CD73, накапливается в микроокружении опухоли, нарушает противоопухолевый Т-клеточный иммунитет (Zhang B, *Cancer Research* 2010; 70: 6407-6411; Antonioli L, *et al.*, *Drug Discovery Today* 2017; 22: 1686-1696) и связан с ускользанием опухолей от иммунного ответа, пролиферацией, миграцией, неоваскуляризацией, метастазом и химиорезистентностью опухолевых клеток (Inoue Y, *et al.*, *Oncotarget* 2017; 8: 8738-8751).

Описано также, что повышенная экспрессия CD73 связана с повышенным угнетением иммунитета (Jin D, *et al.*, *Cancer Res.* 70: 2245–2255 (2010); Beavis PA, *et al.*, *Trends Immunol* 33: 231-7 (2012); Beavis, PA, *et al.*, *Cancer Immunol Res.* 3: 506-17 (2015); Loi S, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 11091–11096 (2013)).

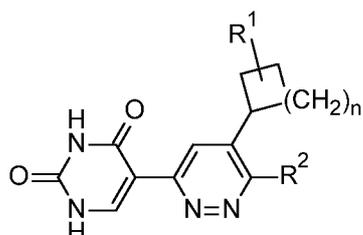
Таким образом, каскад CD73 оказывает иммуносупрессивное действие, и сделано предположение, что блокирование пути CD73 может быть пригодным для лечения рака (Antonioli L, *et al.*, *Oncoimmunol.* 2016; 5: e1216292, doi: 10.1080/2162402X.2016.1216292; Antonioli L, *et al.*, *Trends in Cancer* 2016; 2: 95-109; Allard D, *et al.*, *Immunotherapy* 2016; 8: 145-163). Ингибиторы CD73 проходят клинические испытания для лечения рака (Hay CM, *et al.*, *Oncoimmunol.* 2016; 5(8): e1208875; Allard D, *et al.*, *Immunotherapy* 2016; 8: 145-163).

Сохраняется потребность в обеспечении альтернативных ингибиторов CD73, более конкретно, для лечения рака. В частности, сохраняется потребность в перорально

доступных низкомолекулярных ингибиторах CD73, которые демонстрируют более полное ингибирование мишени в микроокружении опухоли.

Соответственно, в данном изобретении предложены соединения-ингибиторы CD73, которые могут быть пригодны для лечения рака. В данном изобретении предложено

5 соединение формулы I:



где n равен 0-3;

где R¹ представляет собой -H, -F, -гем-дифтор, -гем-диметил, -C₁₋₄ алкил, -CHF₂, -CHF₂CH₃ или -CH₂CH₂F;

10 и

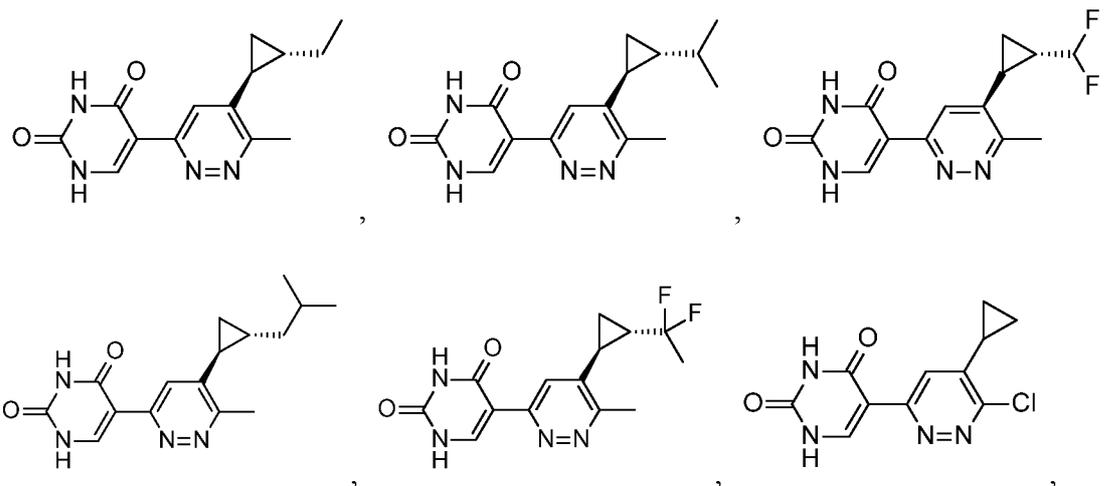
R² выбран из -H, -CH₃, -F, -Cl, -CN или -OCH₃;

или его фармацевтически приемлемая соль.

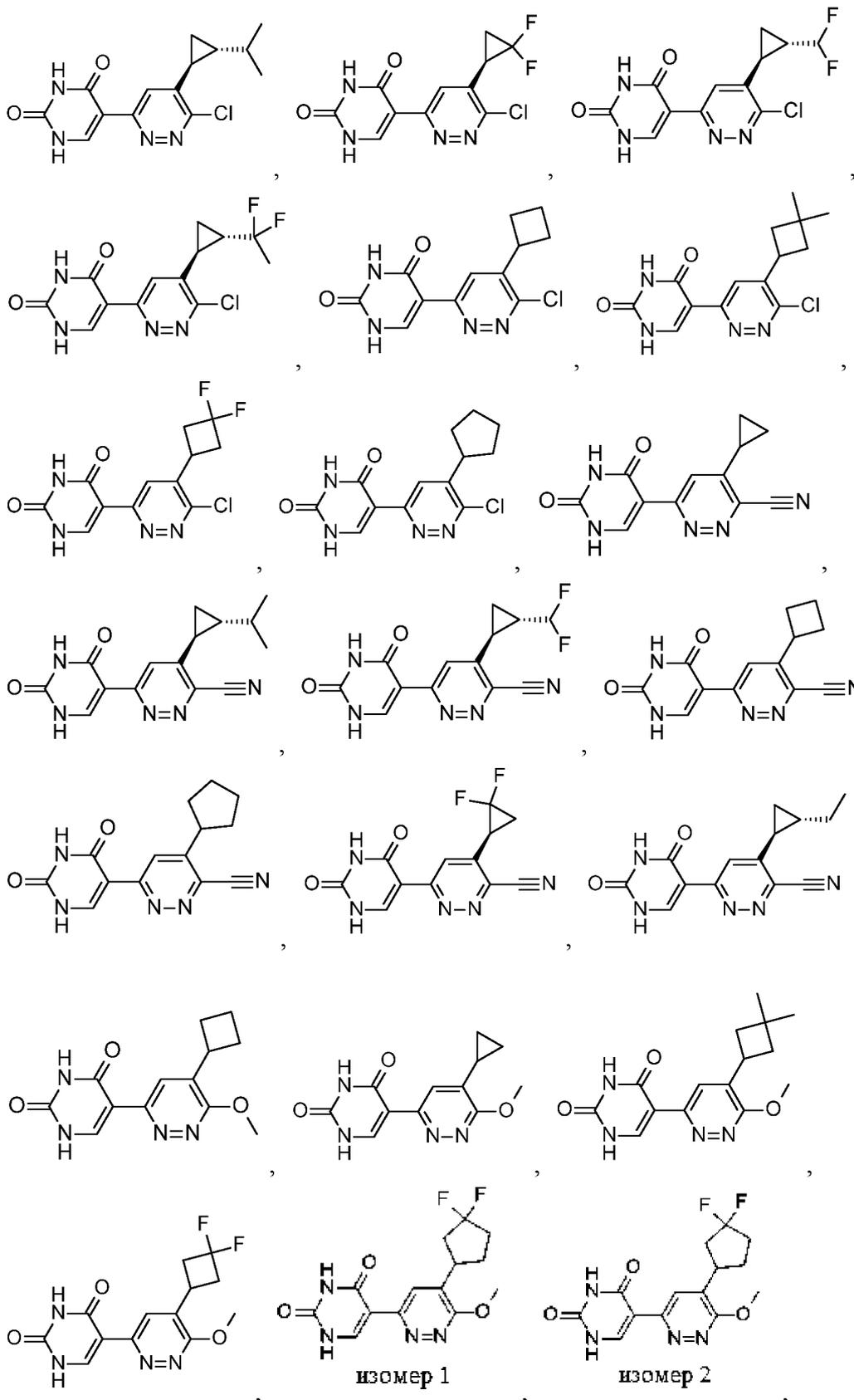
В другом варианте реализации данного изобретения предложено соединение формулы I, где n равен 0, R¹ представляет собой -C₁₋₄ алкил, и R² представляет собой -

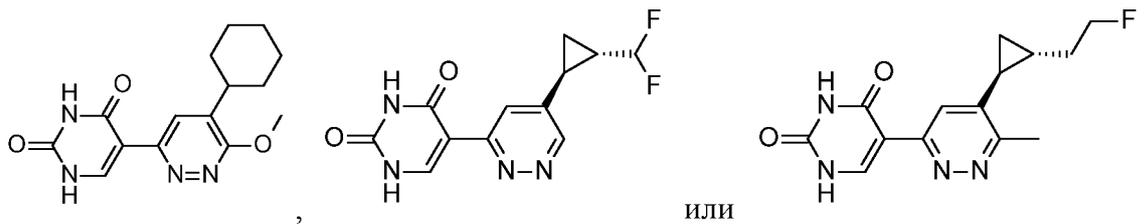
15 CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте реализации предложенное соединение представляет собой



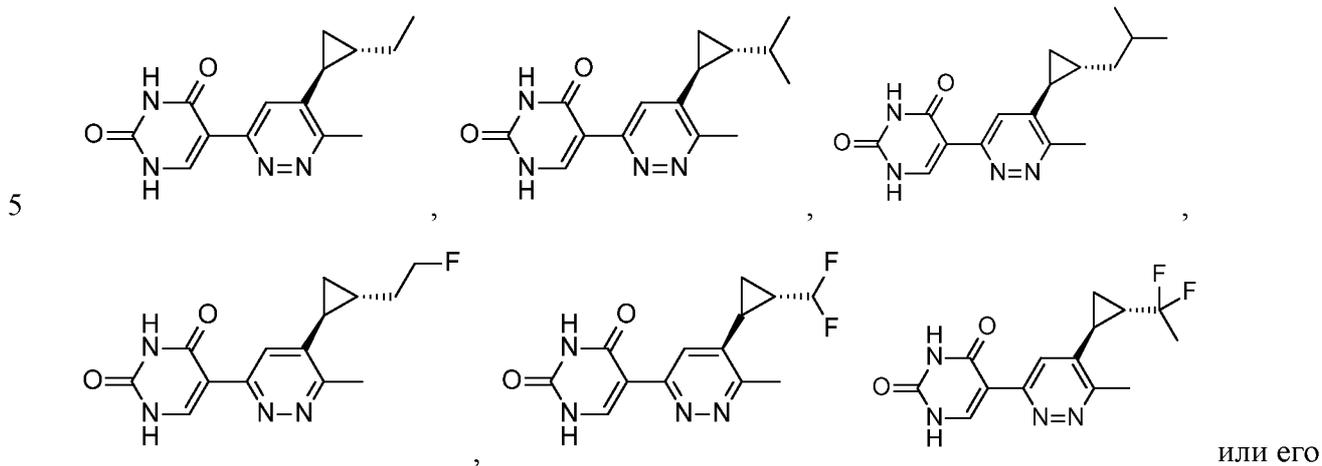
20





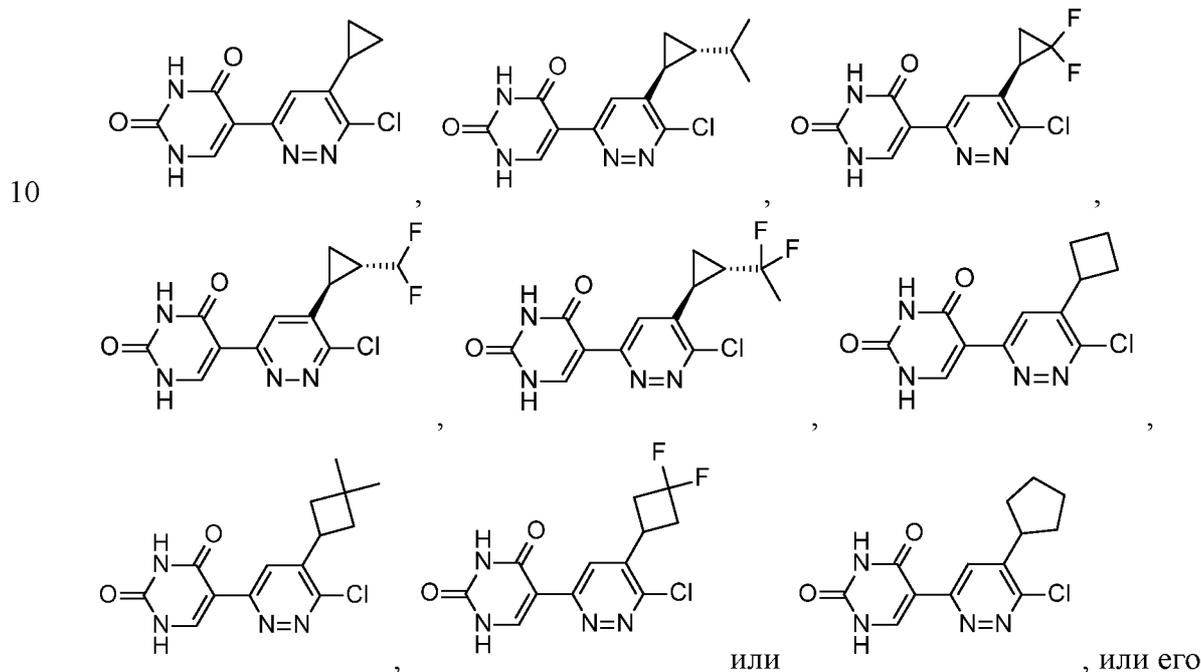
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации предложенное соединение представляет собой



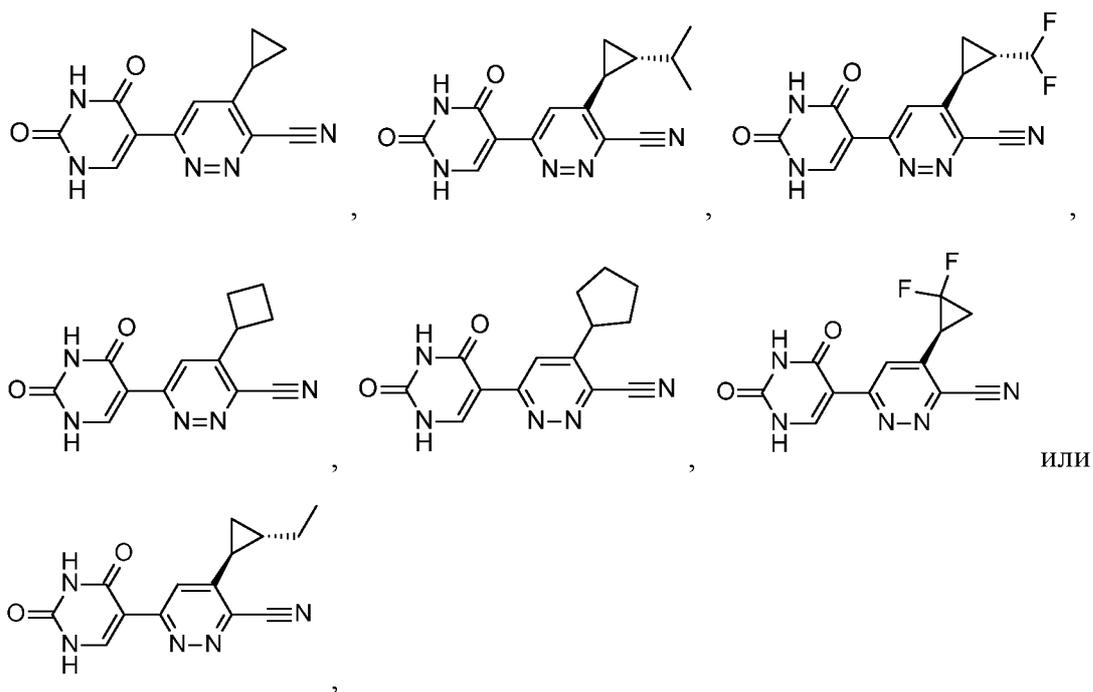
фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации предложенное соединение представляет собой



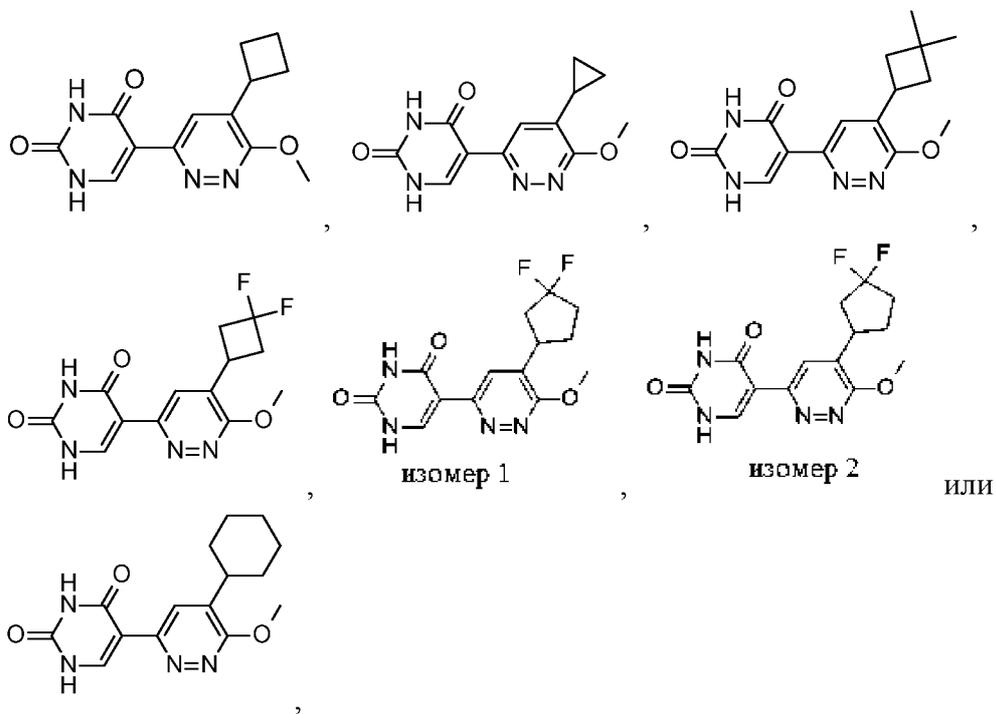
фармацевтически приемлемую соль.

15 В другом варианте реализации предложенное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемая соль.

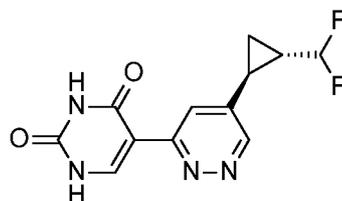
5 В другом варианте реализации предложенное соединение представляет собой



10

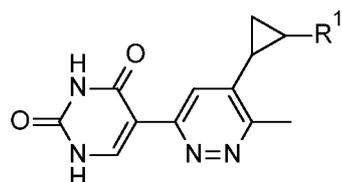
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации предложенное соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации соединение формулы I имеет формулу:

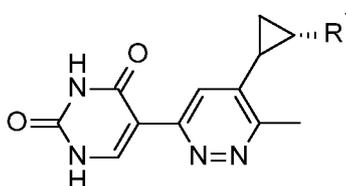


5

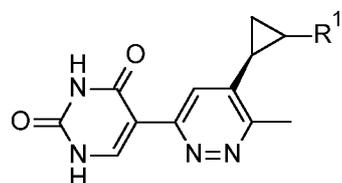
где R¹ представляет собой -CH₂CH₃ или -CH(CH₃)₂, или его фармацевтически приемлемая соль. В другом варианте реализации R¹ представляет собой -CH₂CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль. В другом варианте реализации R¹ представляет собой -CH(CH₃)₂, или его фармацевтически приемлемая соль.

10

В другом варианте реализации соединение формулы I имеет формулу:



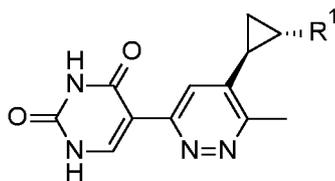
или



15

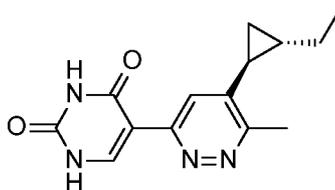
где R¹ представляет собой CH₂CH₃ или CH(CH₃)₂, или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте реализации соединение формулы I имеет формулу:



где R¹ представляет собой -CH₂CH₃ или -CH(CH₃)₂, или его фармацевтически приемлемая соль.

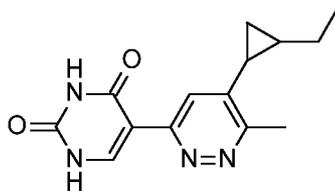
В другом варианте реализации данного изобретения предложено соединение:



5

или его фармацевтически приемлемая соль.

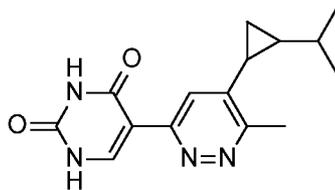
В одном варианте реализации данного изобретения предложено соединение:



или его фармацевтически приемлемая соль.

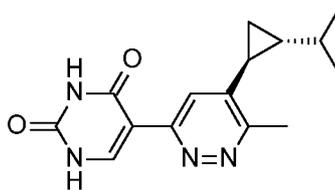
10

В другом варианте реализации данного изобретения предложено соединение:



или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте реализации данного изобретения предложено соединение:



15

или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте реализации данного изобретения предложено соединение, которое представляет собой 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте реализации данного изобретения предложено соединение, которое представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион, или его фармацевтически приемлемая соль.

5 В одном варианте реализации данного изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион или его фармацевтически приемлемую соль и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

10 В другом варианте реализации данного изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

15 В одном варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона или его фармацевтически приемлемой соли.

20 В одном варианте реализации данного изобретения предложен 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

25 В другом варианте реализации данного изобретения предложен 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

В одном варианте реализации данного изобретения предложен 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения рака.

30 В другом варианте реализации данного изобретения предложен 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения рака.

В одном варианте реализации данного изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения для лечения рака, содержащая 5-[5-[(1S,2S)-2-

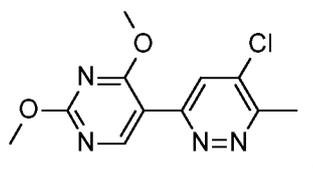
этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте реализации данного изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения для лечения рака, содержащая 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте реализации данного изобретения предложено применение 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения рака.

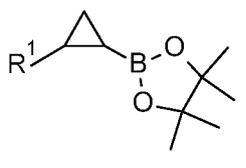
В другом варианте реализации данного изобретения предложено применение 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения рака.

В одном варианте реализации данного изобретения предложено получение и применение 4-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазина, который может быть структурно представлен как:



который пригоден для производства соединения или лекарственного средства для лечения рака. В другом варианте реализации данного изобретения предложен 4-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин для применения в производстве соединения или лекарственного средства.

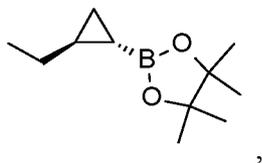
В одном варианте реализации данного изобретения предложено получение и применение 4,4,5,5-тетраметил-2-(2-замещенный циклопропил)-1,3,2-диоксаборолана, который может быть структурно представлен как:



где $R^1 = CH_2CH_3$ или $CH(CH_3)_2$, который пригоден для производства лекарственного средства для лечения рака. В одном варианте реализации $R = CH_2CH_3$. В другом варианте реализации $R = CH(CH_3)_2$. В другом варианте реализации данного изобретения предложен

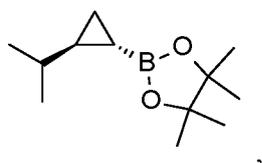
4,4,5,5-тетраметил-2-(2-замещенный циклопропил)-1,3,2-диоксаборолан для применения в производстве соединения или лекарственного средства.

В одном варианте реализации данного изобретения предложено получение и применение 2-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана, который может быть структурно представлен как:



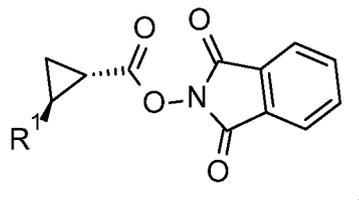
который пригоден для производства соединения или лекарственного средства для лечения рака. В другом варианте реализации данного изобретения предложен 2-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан для применения в производстве соединения или лекарственного средства.

В одном варианте реализации данного изобретения предложено получение и применение 2-[(1S,2S)-2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана, который может быть структурно представлен как:



который пригоден для производства соединения или лекарственного средства для лечения рака. В другом варианте реализации данного изобретения предложен 2-[(1S,2S)-2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан для применения в производстве соединения или лекарственного средства.

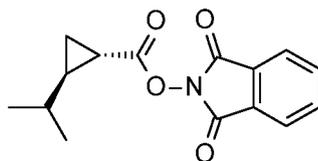
В одном варианте реализации данного изобретения предложен хиральный синтез 2-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана с применением (1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-(1S,2S)-2-этилциклопропанкарбоксилата, который может быть структурно представлен как:



где $R^1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ или $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, который пригоден для производства соединения или лекарственного средства для лечения рака. В другом варианте реализации данного изобретения предложен (1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-(1S,2S)-2-

этилциклопропанкарбоксилат для применения в производстве соединения или лекарственного средства.

В одном варианте реализации данного изобретения предложен хиральный синтез 2-[(1S,2S)-2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана с применением (1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилата, который может быть структурно представлен как:



который пригоден для производства соединения или лекарственного средства для лечения рака. В другом варианте реализации данного изобретения предложен (1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилат для применения в производстве соединения или лекарственного средства.

Белок CD73 экспрессируется во многих тканях, включая головной мозг, щитовидную железу, надпочечники, костный мозг, лимфоузлы, миндалины, селезенку, сердечную мышцу, гладкие мышцы, легкие, носоглотку, печень, желчный пузырь, поджелудочную железу, слюнные железы, слизистую оболочку рта, пищевод, желудок, двенадцатиперстную кишку, тонкий кишечник, толстую кишку, прямую кишку, почки, мочевого пузыря, семенники, предстательную железу, фаллопиевы трубы, влагалище, молочные железы, шейку матки, матку, эндометрий, яичники, мягкие ткани и кожу (proteinatlas.org/ENSG00000135318-NT5E/tissue). CD73 сверхэкспрессируется во многих видах опухолей (Antonioli L, *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 13, 842–857 (2013); Antonioli L, *et al.*, *Trends Cancer* 2: 95–109 (2016). CD73 также экспрессируется в нормальных и патологических гепатобилиопанкреатических тканях, включая гепатоциты, аденокарциному протоков поджелудочной железы и внепеченочную холангиоцеллюлярную карциному (Sciarra, A., *et al.*, *Cancer Immunol Immunother* 2019; doi.org/10.1007/s00262-018-2290-1).

Повышенная экспрессия и активность CD73 связаны с инвазивностью и метастазом опухоли, а также с более коротким периодом выживания пациентов (Jin D, *et al.*, *Cancer Research* 2010; 70: 2245-2255). Повышенная экспрессия CD73 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом (Inoue K, *et al.*, *Oncotarget* 8: 8738–8751 (2017); Turcotte K, *et al.*, *Cancer Res.* 5: 4494–4503 (2015); Lu YT, *et al.*, *World J. Gastroenterol.* 19: 1912–1918

(2013); Wu XR, *et al.*, *J. Surg. Oncol.* 106: 130–137 (2012); Buisseret S, *et al.*, *Ann. Oncol.* 29: 1056–1062 (2017); Leclerc R, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 22: 158-66 (2016)).

Сверхэкспрессия CD73 в трижды негативном раке молочной железы связана с худшими клиническими исходами и повышенной резистентностью к антрациклиновой химиотерапии (Allard B, *et al.*, *Expert Opin. Ther. Targets* 2014; 18: 863-881). CD73 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при плоскоклеточной карциноме головы и шеи (Ren Z-H, *et al.*, *Oncotargets* 2016; 7: 61690-61702). Сверхэкспрессия CD73 также связана с прогрессированием почечноклеточной карциномы (Yu Y, *et al.*, *Oncol. Lett.* 2015; 9: 2485-2494).

CD73 сверхэкспрессируется в опухолях эндометрия (Aliagas E, *et al.*, *Mediators of Inflammation* 2014; doi: 10.1155/2014/509027), в ткани опухоли предстательной железы (Leclerc BG, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2016; 22: 158-166), в ткани немелкоклеточного рака легких (Inoue Y, *et al.*, *Oncotarget* 2017; 8: 8738-8751). Описано, что CD73 сверхэкспрессируется в опухолях, включая рак молочной железы, рак толстой и прямой кишок, рак яичников, рак желудка и рак желчного пузыря (Gao Z-W and Zhang H-Z, *Biomed Res. Int.* 2014; doi: 10.1155/2014/460654). Описано, что CD73 сверхэкспрессируется в раковых клеточных линиях, включая клеточные линии глиобластомы, меланомы, рака молочной железы, рака яичников, медуллобластомы и рака мочевого пузыря (Gao Z-W and Zhang H-Z, *Biomed Res. Int.* 2014; doi: 10.1155/2014/460654).

Описано, что CD73-аденозин снижает иммунный ответ и выживаемость у пациентов с раком яичников (Gaudreau P-O, *et al.*, *Oncoimmunology* 2016; 5(5): e1127496).

Описано, что блокада CD73 *in vivo* селективным ингибитором CD73 α , β -метиленаденозин-5'-дифосфатом замедляет рост опухоли у сингенных мышей с подкожной инъекцией опухолевых клеток EG7 (лимфома), MC38 (рак толстой кишки), AT-3 (рак молочной железы) и B16F10 (меланома) (Stagg J, *et al.*, *Cancer Research* 2011; 71: 2892-2900; Forte G, *et al.*, *J. Immunol.* 2012; 189: 2226-2233). Описано, что терапия с анти-CD73 антителами подавляет рост опухоли и метастаз молочной железы (Stagg J, *et al.*, *PNAS* 2010; 107: 1547-1552; Terp MG, *J. Immunol.* 2013; 191: 4165-4173).

Кроме того, описано, что активность аденозина и фермента CD73 повышена у онкологических пациентов (Huang N, *et al.*, *Cancer Res.* 75:1538 (2015), а также описано, что пациенты, которые не отвечают на ингибиторы иммунных контрольных точек, имеют более высокий уровень аденозина, чем пациенты, отвечающие на них (Giannakis HX, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 35: 15 Suppl. 3036-3036 (2017)).

Описано, что онкогенная активация и потеря эстрогеновых рецепторов ассоциированы с повышенной экспрессией CD73 (Reinhardt J, *et al.*, *Cancer Res.* 77: 4697–4709 (2017); Szychala J, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 10:708-17 (2004); Ascierto and McArthur J., *Transl. Med.* 15: 173 (2017); Young A, *et al.*, *Cancer Res.* 77:4684-4696 (2017)).

5 Субъекты, для которых лечение ингибитором CD73 является эффективным, включают субъектов с опухолями, резистентными или невосприимчивыми к анти-PD1/PDL-1 ингибиторам, такими как немелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря и меланома; субъектов с раковыми заболеваниями с мутацией EGFR/BRAF/Kras, такими как немелкоклеточный рак легких, рак мочевого пузыря, меланома, рак толстой кишки и
10 поджелудочной железы; субъектов с раком, отрицательным (-) по эстрогеновому рецептору, таким как трижды негативный рак молочной железы; субъектов с высоким уровнем экспрессии CD73, например, с раком поджелудочной железы и раком толстой и прямой кишок. При необходимости такой субъект может быть выбран для терапии с применением соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически
15 приемлемой соли, на основании наличия высоких уровней экспрессии CD73 в их опухолях, по результатам иммуногистохимического (ИГХ) анализа; или на основании наличия мутаций EGFR и BRAF в их опухолях, обнаруженных в анализе ПЦР-РВ; или на основании потери эстрогенового рецептора в их опухолях, по результатам ИГХ или ПЦР-РВ анализа; или на основании наличия высоких уровней аденозина и АМФ в их опухолях
20 или в плазме, по результатам ЖХ-МС анализа. Для фармакодинамической оценки можно использовать *ex vivo* анализ на основе ЖХ-МС, описанный в данном документе, для измерения влияния ингибитора CD73 на превращение АМФ в аденозин в крови.

В данном изобретении также предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества
25 соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

В данном изобретении также предложен способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы,
30 холангиокарциному, рак толстой и прямой кишок, рак толстой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, лимфому, медуллобластому, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак почек. В одном варианте реализации рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В другом варианте

реализации рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В одном предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион.

В одном варианте реализации пациентом является пациент, у которого определена
5 активность CD73 в сыворотке. В одном предпочтительном варианте реализации «определение активности CD73» означает определение факта наличия активности CD73. Способы определения уровня экспрессии CD73 или активности CD73 известны специалистам в данной области техники, например, см. S Morello, *et al.*, *J. Trans. Med.* 2017; 15:244. В другом предпочтительном варианте реализации «определение активности
10 CD73» означает количественное определение степени превращения АМФ в аденозин под действием CD73, и в данном документе предложен анализ на основе ЖХ-МС, облегчающий количественное определение уровня активности CD73.

В другом варианте реализации пациентом является пациент, у которого определена экспрессия CD73 в ткани. В другом варианте реализации ткань представляет собой
15 опухолевую ткань. Способы определения уровня экспрессии CD73 в ткани известны специалистам в данной области техники, например, с применением вестерн-блоттинга или иммуногистохимии (X-R Wu, *et al.*, *J. Surg. Oncol.* 2012; 106: 130-137).

В данном изобретении также предложен способ, включающий определение экспрессии CD73 в ткани пациента, которому введено соединение по любому из пп. 1-12
20 или его фармацевтически приемлемая соль. В предпочтительном варианте реализации ткань представляет собой опухолевую ткань.

В данном изобретении также предложен способ, включающий определение активности CD73 в сыворотке, полученной от пациента, которому введено соединение формулы I, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль.
25 Предложенный способ является чувствительным, не включает биопсию опухоли, не включает использование антител или иммуногистохимии, облегчает количественное определение активности CD73 (например, посредством облегчения расчета EC₅₀). В одном предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион.
30 В другом предпочтительном варианте реализации предложенный способ дополнительно включает оценку активности CD73 с применением аденозинмонофосфата (АМФ) с радиоактивной меткой и определение концентрации АМФ с радиоактивной меткой с помощью масс-спектрометрии. В другом предпочтительном варианте реализации АМФ с радиоактивной меткой представляет собой ¹³C₅-¹⁵N₅-АМФ.

В другом предпочтительном варианте реализации предложенный способ включает (а) получение сыворотки от пациента в каждом из множества контейнеров (например, микротитровальный планшет), выполненных с возможностью вмещения различных концентраций соединения, введенного пациенту, (b) введение 13C10_15N5_АМФ в
5 каждый контейнер в указанном множестве контейнеров, (c) инкубацию множества контейнеров в условиях, способствующих смешиванию (например, при встряхивании), (d) центрифугирование указанного множества контейнеров, (e) перенос надосадочного раствора из каждого контейнера в новый соответствующий контейнер, (f) введение экстракционного раствора, содержащего внутренний стандарт, в каждый из новых
10 соответствующих контейнеров, (g) центрифугирование новых соответствующих контейнеров, (h) перенос надосадочного раствора из каждого нового соответствующего контейнера в соответствующий аналитический контейнер, (i) анализ надосадочного раствора в каждом соответствующем аналитическом контейнере на содержание 13C10_15N5_аденозина, 13C10_15N4_инозина и 15N4 гипоксантина с помощью ЖХ/МС,
15 как описано в данном документе («Масс-спектрометрия для определения аденозина и очистка аденозина»), и (j) расчет EC₅₀. В одном предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион. В предпочтительном варианте реализации внутренний стандарт представляет собой 13C5-АМФ, 13C5-аденозин, 15N4-инозин и
20 13C5-гипоксантин.

В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I, предложенного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли в терапии. В одном варианте реализации терапия представляет собой лечение рака. В
25 другом варианте реализации рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак толстой и прямой кишок, рак толстой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, лимфому, медуллобластому, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак почек. В одном варианте реализации рак молочной
30 железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В другом варианте реализации рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В одном предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион.

В данном изобретении также предложено применение соединения формулы I,

описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения рака. В одном варианте реализации рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак толстой и прямой кишок, рак толстой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, лимфому, медуллобластому, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак почек. В одном варианте реализации рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В другом варианте реализации рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В одном предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион.

В одном варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более противоопухолевыми агентами. Неограничивающие примеры противоопухолевых агентов включают рамуцирумаб, нецитумумаб, оларатумаб, гемцитабин, пеметрексед, галунисертиб, абемациклиб, gefitinib, вемурафениб, dabrafenib, trametinib, cisplatin, carboplatin, dacarbazine, liposomal doxorubicin, docetaxel, cyclophosphamide и doxorubicin, naveltinib, eribulin, paclitaxel, частицы связанного с белком паклитаксела для инъекционной суспензии, ixabepilone, capecitabine, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), cetuximab и ингибитор EGFR, ингибитор Raf, ингибитор B-Raf, ингибитор ERK, ингибитор CDK4/6, ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы, ингибитор TGF β и ингибитор рецептора TGF β .

В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более иммуноонкологическими агентами. В одном предпочтительном варианте реализации иммуноонкологический агент представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело, антитело-агонист анти-CD137 или анти-CTLA4 антитело. Неограничивающие примеры иммуноонкологических агентов включают nivolumab, ipilimumab, pidilizumab, pembrolizumab, tremelimumab, urelumab, liratumab, atezolizumab,

дурвалумаб и анти-PD-L1 антитело LY3300054 (последовательности тяжелой и легкой цепей которого описаны в WO 2017/034916 и US 2017/0058033 как SEQ ID NO: 10 и 11, соответственно). В одном предпочтительном варианте реализации иммуноонкологический агент представляет собой анти-PD-1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации иммуноонкологический агент представляет собой анти-PD-L1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, и иммуноонкологический агент представляет собой LY3300054.

В одном варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения немелкоклеточного рака легких, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим агентом. В одном предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой осимертиниб, цетуксимаб или абемациклиб. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой осимертиниб. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой цетуксимаб. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой абемациклиб.

В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения меланомы, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим агентом. В одном предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой ингибитор BRAF, анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой ингибитор BRAF. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой анти-PD-1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой анти-PD-L1 антитело. В другом предпочтительном варианте реализации анти-PD-L1 антитело представляет собой LY3300054. В другом предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, и другой агент представляет собой анти-PD-L1 антитело, представляющее собой LY3300054.

В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака толстой и прямой кишок, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим агентом. В одном предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой абемациклиб. В другом предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, а другой агент представляет собой абемациклиб.

10 В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака поджелудочной железы, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим агентом. В одном предпочтительном варианте реализации другой агент представляет собой абемациклиб. В другом предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, а другой агент представляет собой абемациклиб.

20 В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения трижды негативного рака молочной железы, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с другим агентом. В одном предпочтительном варианте реализации предложенное соединение представляет собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион.

25 В данном изобретении также предложен способ ингибирования ферментативной активности CD73 у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли. В данном изобретении также предложен способ ингибирования превращения АМФ в аденозин у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли.

30 В другом варианте реализации данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества соединения формулы I, описанного

в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более агентами, модулирующими аденозин. Неограничивающие примеры агентов, модулирующих аденозин, включают анти-CD73 антитело и антагонист рецептора аденозина.

5 В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль, с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. В данном изобретении дополнительно предложен способ получения фармацевтической композиции, включающий смешивание соединения

10 формулы I или его фармацевтически приемлемой соли с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Данное изобретение также включает новые промежуточные соединения и способы синтеза соединений формулы I.

15 Следует понимать, что следующие термины, упомянутые выше и во всем описании данного изобретения, если не указано иное, имеют следующие значения:

«Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество» представляет собой среду, общепринятую в данной области техники для доставки биологически активных агентов млекопитающим, например, людям.

20 Термины «лечение», «лечить», «лечащий» и т.п. включают замедление или реверсирование прогрессирования расстройства. Указанные термины включают также облегчение, улучшение, снижение, исключение или ослабление одного или более симптомов расстройства или патологического состояния, даже если указанное расстройство или патологическое состояние фактически не исключено и даже если прогрессирование расстройства или патологического состояния само по себе не замедлено

25 или не реверсировано.

«Эффективное количество» означает такое количество соединения или его фармацевтически приемлемой соли по данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей соединение или его фармацевтически приемлемую соль по данному изобретению, которое вызывает биологический или медицинский ответ или

30 требуемый терапевтический эффект у пациента, наблюдаемый лечащим клиницистом. В одном варианте реализации предложенное соединение или его фармацевтически приемлемая соль ингибирует превращение АМФ в аденозин в анализе фермента CD73 *in vitro* или *ex vivo*. В другом варианте реализации предложенное соединение или его фармацевтически приемлемая соль ингибирует превращение АМФ в аденозин в цельной

крови мышей, полученной от животных, которым введены различные дозы указанного соединения.

«Гем-дифтор» относится к двум атомам фтора, связанным с одним и тем же атомом углерода.

5 «Гем-диметил» относится к двум метильным группам, связанным с одним и тем же атомом углерода.

В данном контексте термин «пациент» относится к человеку.

10 Эффективное количество может быть без труда установлено лечащим врачом-диагностом как специалистом в данной области техники, с использованием известных технологий и посредством наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного для пациента количества наблюдающий врач-диагностик учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: биологический вид пациента; его размер, возраст и общее состояние здоровья; конкретное вовлеченное заболевание или расстройство; степень вовлеченности или тяжесть

15 заболевания или расстройства; реакция отдельного пациента; конкретное введенное соединение; способ введения; характеристики биодоступности введенного препарата; выбранная схема лечения; применение сопутствующих лекарственных препаратов; и другие релевантные обстоятельства.

Соединения по данному изобретению можно использовать в широком диапазоне

20 доз. Например, суточные дозы обычно составляют от около 0,01 до около 50 мг/кг массы тела.

Соединения по данному изобретению предпочтительно составляют в фармацевтические композиции, которые вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения, включая пероральный, внутривенный и трансдермальный

25 способы. Наиболее предпочтительно, указанные композиции предназначены для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, ред., 21е издание, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

30 Специалистам в данной области техники понятно, что соединения по данному изобретению могут образовывать соли. Соединения по данному изобретению содержат основные гетероциклы и, соответственно, вступают в реакцию с любыми из множества неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот. Такие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот и общие методики их получения известны в данной области техники. См.,

например, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008).

«Фармацевтически приемлемые соли» или «фармацевтически приемлемая соль» относится к относительно нетоксичной неорганической и органической соли и солям соединения по данному изобретению (S.M. Berge, *et al.*, “Pharmaceutical Salts”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, том 66, № 1, январь, 1977).

Обозначение «изомер 1» в названии соединения означает, что соответствующее промежуточное соединение или соединение по данному изобретению представляет собой первый из двух элюированных энантиомеров при разделении пары энантиомеров хиральной хроматографией в условиях, описанных ниже в разделе «Подготовительные синтезы и примеры». Обозначение «изомер 2» в названии соединения означает, что соответствующее промежуточное соединение или соединение по данному изобретению представляет собой второй из двух элюированных энантиомеров при разделении пары энантиомеров хиральной хроматографией в условиях, описанных ниже в разделе «Подготовительные синтезы и примеры».

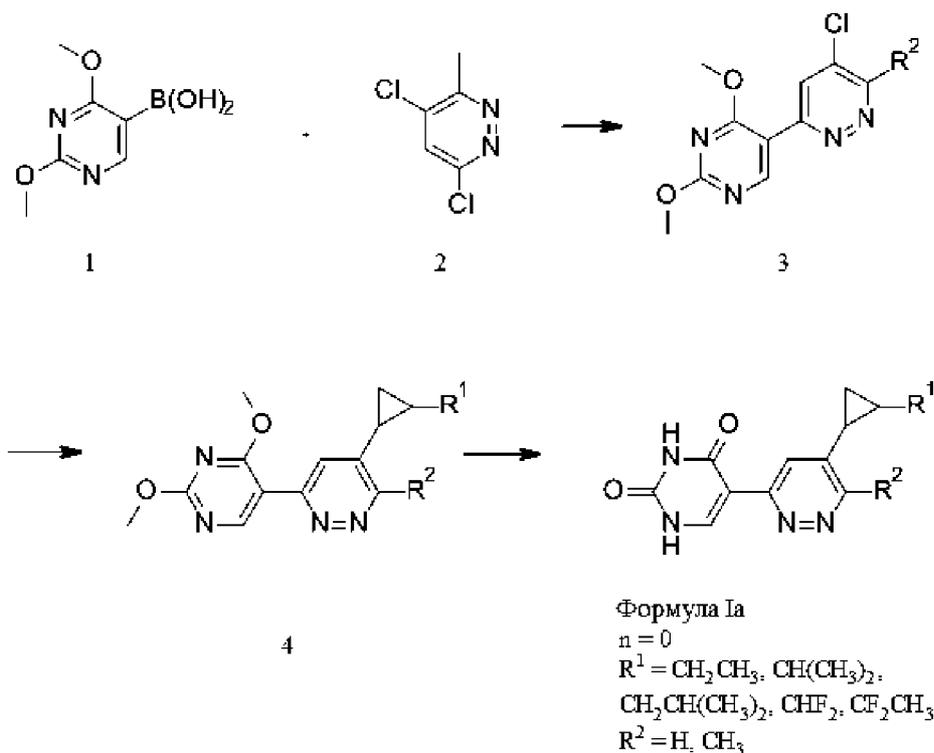
Соединения по данному изобретению могут быть получены синтетическими способами, известными и признанными в данной области техники. Пригодные условия реакций для различных стадий указанных реакций известны в данной области техники, и соответствующие замены растворителей и совместных реагентов общеизвестны в данной области техники. Также специалистам в данной области техники понятно, что синтетические промежуточные соединения могут быть выделены и/или очищены различными известными технологиями, по необходимости или по желанию, и что часто можно использовать различные промежуточные соединения на следующих стадиях синтеза напрямую, с незначительной очисткой или без очистки. Кроме того, специалистам в данной области техники понятно, что в некоторых случаях порядок введения фрагментов не является критичным. Конкретный порядок стадий, необходимых для получения соединений по данному изобретению, зависит от конкретного синтезируемого соединения, исходного соединения и относительной подвижности замещенных фрагментов, и это известно опытным химикам. Все заместители, если не указано иное, являются такими, как описано выше, и все реагенты являются общеизвестными и общепризнанными в данной области техники.

В данном контексте следующие термины имеют указанные значения: «ACN» относится к ацетонитрилу; «DAST» относится к трифториду диэтиламиносеры, «DCM» относится к дихлорметану; «DMAP» относится к 4-диметиламинопиридину; «дмсо» или

«ДМСО» относится к диметилсульфоксиду; «э.и.» относится к энантиомерному избытку; «ЭР/МС» относится к масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением; «EtOAc» относится к этилацетату; «Et₂O» относится к диэтиловому эфиру; «FBS» относится к эмбриональной бычьей сыворотке; «ГХ-МС» относится к газовой хроматомасс-спектрометрии; «HBSS» относится к сбалансированному солевому раствору Хэнкса; «IC₅₀» относится к полумаксимальной ингибирующей концентрации; «ЛАН» относится к алюмогидриду лития; «ЖХ-ЭР/МС» относится к жидкостной хроматомасс-спектрометрии с ионизацией электроспреем; «МС» относится к масс-спектрометрии; «MeOH» относится к метанолу; «МТБЭ» относится к метил-трет-бутиловому эфиру; «nBuLi» относится к *n*-бутиллитию; «нм» относится к нанометру или нанометрам; «ЯМР» относится к ядерному магнитному резонансу; «OAc» относится к ацетату; «фунт/кв.дюйм» относится к фунтам на квадратный дюйм; «комн. т-ра» относится к комнатной температуре или к температуре окружающей среды; «СКО» относится к сильному катионообмену; «СЖХ» относится к сверхкритической жидкостной хроматографии; «S_NAr» относится к нуклеофильному ароматическому замещению; «ТЭА» относится к триэтиламину; «ТГФ» относится к тетрагидрофурану; «t_R» относится к времени удерживания», и «мас./мас.» относится к масса/массовым отношениям в растворе.

Соединения по данному изобретению можно синтезировать так, как показано на следующих схемах.

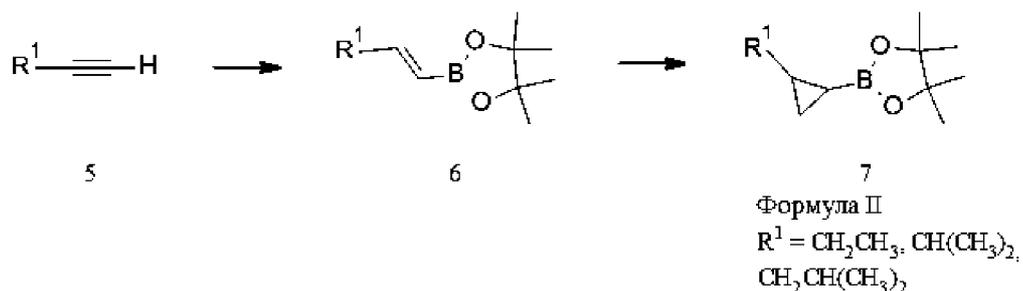
Схема 1



На схеме 1 показано получение соединений формулы Ia. Используя общеизвестные условия реакции Сузуки, доступную в продаже (2,4-диметоксипиримидин-5-ил)бороновую кислоту 1 можно конденсировать с 4,6-дихлор-3-метилпиридразином.

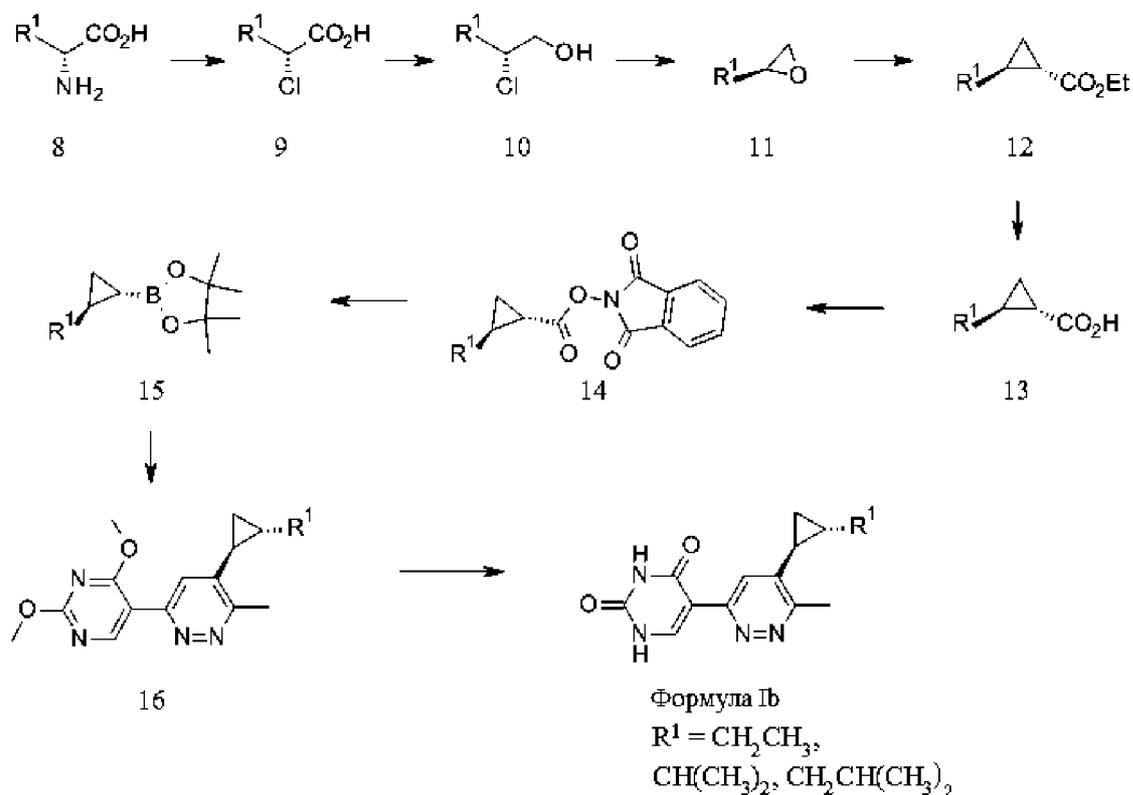
Можно выполнить следующее сочетание Сузуки хлор-фрагмента соединения 3 с транс-циклопропилборонатом, замещенным соответствующим образом, с получением соединения 4. Опытным специалистам понятно, что энантиомеры соединения 4 можно разделить с помощью технологий хирального разделения, известных в данной области техники. Соединения формулы Ia могут быть получены посредством снятия защитных метокси-групп в соединении 4 в ряде условий деметилирования, подробно описанных в известном уровне техники.

Схема 2



На схеме 2 показаны обязательные циклопропилбороновые сложные эфиры, необходимые для получения соединений формулы II. Специалистам в данной области техники понятно, что гидроборирование соответствующим образом замещенного алкина 5 может быть осуществлено в ряде условий, в частности, в присутствии катализатора на основе переходного металла, такого как Cu или Zr, с получением алкенилбороната 6. Алкенилборонат можно подвергать циклопропанированию в условиях получения стабилизированных карбеноидов, известных в данной области техники, например, циклопропанирования Симмонса-Смита, реакции Кори-Чайковского и способа циклопропанирования с диазометаном (или диазосоединениями), как с катализаторами на основе переходных металлов (например, Cu, Pd или Ni), так и без них (например, термически или фотохимически), с получением соответствующим образом замещенного транс-циклопропилбороната 7. Специалистам в данной области техники понятно, что термодинамический благоприятный продукт циклопропанирования представляет собой смесь транс-энантиомеров в соединении 7.

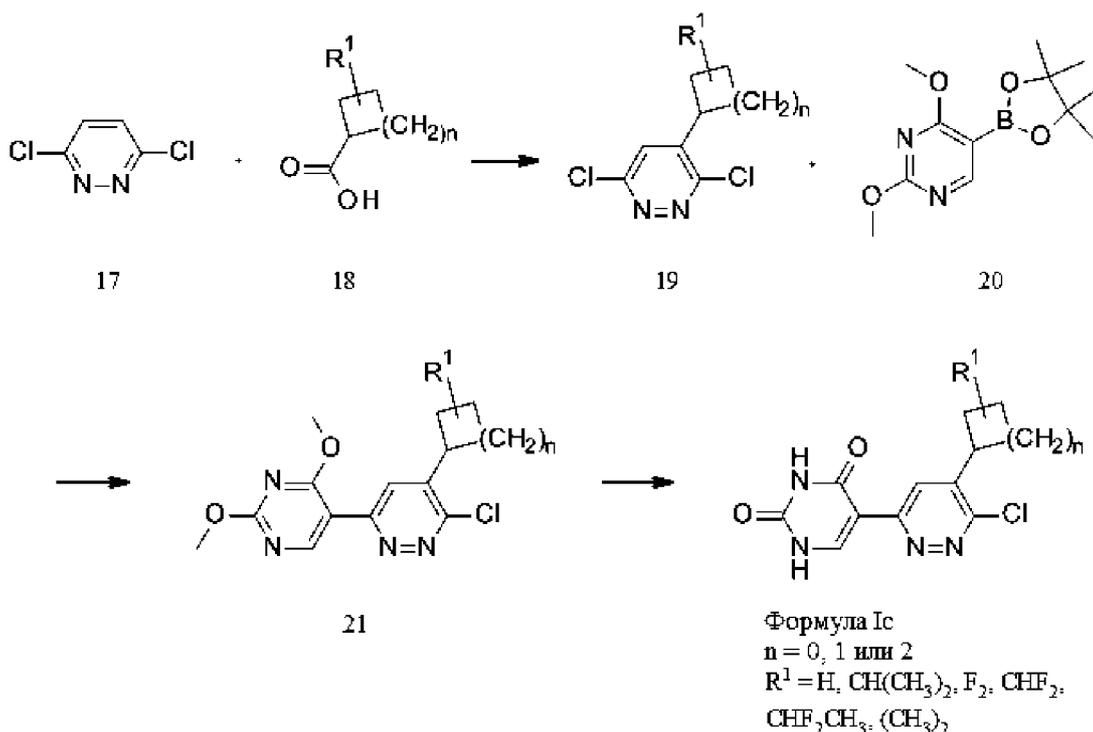
Схема 3



На схеме 3 показан хиральный синтез соединений формулы Ib. Диазотирование соответствующим образом замещенной аминокислоты 8 в модифицированных условиях Зандмейера (радикальное S_NAr), приводящее к образованию соединения 9, известно в данной области техники. Последующее восстановление до спирта 10 можно провести с использованием ряда восстановительных агентов, известных в данной области техники, включая гидриды алюминия и диборан в качестве восстановительных агентов. Циклизация до хирального эпоксида 11 в щелочных условиях подробно описана в известном уровне техники. Можно использовать стереоселективную реакцию Хорнера-Вадсворта-Эммонса с обработкой хирального эпоксида 11 пригодным фосфонатным сложным эфиром (например, этил-2-диэтоксифосфорилацетатом или триэтилфосфоацетатом) и пригодным основанием (например, алкиллитием, алкоксидами металлов или гидридами металлов) для получения транс-циклопропанового производного 12 (см., например, L. Delhaye; A. Merschaert; P. Delbeke; W. Brione. *Org. Proc. Res. & Dev.* 2007, 11, 689-692). Гидролиз соединения 12 до соответствующей кислоты 13 можно осуществлять в широком диапазоне основных условий, подробно описанных в данной области техники. Последующее связывание кислоты 13 с соответствующим образом замещенным N-гидроксифталимидом подробно описано в данной области техники, с применением пригодного агента для активации кислоты,

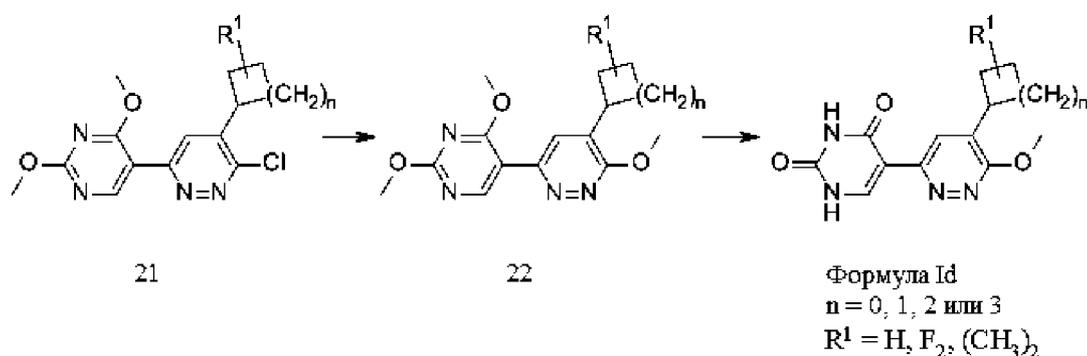
например, карбонилдиимидазола, в присутствии слабого нуклеофильного основания, с получением соединения 14. Декарбоксилирующее борилирование N-гидроксифталиimidного сложного эфира 14 можно осуществлять в различных условиях, известных в данной области техники, в том числе в присутствии катализатора на основе переходного металла (например, по реакции Сузуки-Мияура), в фотолитических условиях, или посредством реакций с переносом одного электрона, включая, например, образование комплекса N-гидроксифталиimidного сложного эфира с дибором по реакции радикальной конденсации, ускоряемой радикалом пиридин-бора, с получением транс-циклопропанбороната 15. (См., например, W.-M. Cheng; S. Rui; B. Zhao; W.-L. Xing; Y. Fu. *Org. Lett.* 2017, 19, 4291–4294). Связывание бороната 15 с арилхлоридом 4 и последующее деметилирование можно осуществлять таким же образом, как описано на схеме 1, с получением типов хиральных соединений формулы Ib.

Схема 4



На схеме 4 показан синтез соединений формулы 1c. Нуклеофильное замещение дихлорпиридазина 17 можно осуществлять в радикальных условиях (например, по реакции Миниши), известных в данной области техники, с получением замещенного пиридазина 19. Связывание бороната 20 с арилхлоридом 19 и последующее деметилирование можно осуществлять таким же образом, как описано на схеме 1, с получением типов соединений формулы 1c.

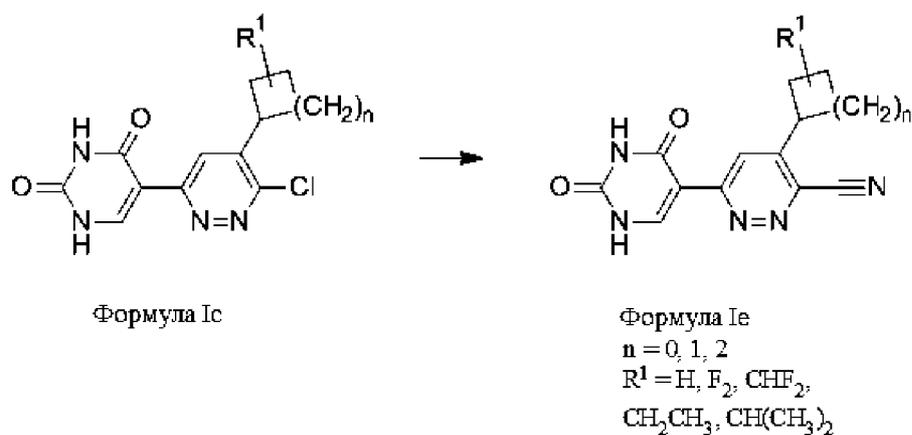
Схема 5



5 На схеме 5 представлен синтез соединений формулы Id. Замещение 2-хлорпиридазина 21 можно осуществлять в нуклеофильных условиях, широко известных в данной области техники, с получением метоксипиридазина 22. Последующее деметилирование соединения 22 можно осуществлять таким же образом, как описано на схеме 1, с получением типов соединений формулы Id.

10

Схема 6



15 На схеме 6 показан синтез соединений формулы Ie. Цианирование соединений формулы Ic можно осуществлять в различных условиях, известных в данной области техники, включая реакции, катализируемые переходными металлами (например, Pd, Cu, Rh), с получением соединений формулы Ie.

Схема 7

превращать во фторид 30 с помощью технологий замещения, известных специалистам в данной области техники, с применением таких реагентов, как фторид калия или фторид трет-бутиламмония. Последующее деметилирование можно осуществлять таким же образом, как описано на схеме 1, с получением хирального соединения формулы Ig.

5

Синтезы и примеры

Следующие синтезы и примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение и представляют типичные способы синтеза соединений по данному изобретению, но их никоим образом не следует толковать как ограничение объема данного изобретения.

10 Реагенты и исходные материалы без труда доступны или могут быть легко синтезированы специалистами в данной области техники. Следует понимать, что приведенные ниже подготовительные синтезы и примеры представлены с целью иллюстрации, но не ограничения, и что специалисты в данной области техники могут делать различные модификации.

15 ЖХ-ЭР/МС проводили на жидкостной хроматографической системе Agilent HP1100. Измерения масс-спектрометрии с электрораспылением (записанные в положительном и/или отрицательном режиме) проводили на квадрупольном масс-спектрометре с масс-селективным детектором, подключенном к системе ВЭЖХ РН 1100. Условия для ЖХ-МС (низкий рН): колонка: PHENOMENEX® GEMINI® NX C-18 2,1 × 50
20 мм, 3,0 мкм; градиент: 5-100% В за 3 минуты, затем 100% В в течение 0,75 минуты, температура колонки: 50 °С +/-10 °С; скорость потока: 1,2 мл/мин.; растворитель А: деионизированная вода с 0,1% HCOOH, растворитель В: ACN с 0,1% муравьиной кислоты; длина волны 214 нм. Альтернативные условия для ЖХ-МС (высокий рН):
25 колонка: колонки WATERS™ XTERRA® MS C-18, 2,1 × 50 мм, 3,5 мкм; градиент: 5% растворителя А в течение 0,25 минуты, градиент от 5% до 100% растворителя В за 3 минуты и 100% растворителя В в течение 0,5 минуты, или от 10% до 100% растворителя В за 3 минуты и при 100% растворителя В в течение 0,75 минуты; температура колонки: 50 °С +/-10 °С; скорость потока: 1,2 мл/мин.; растворитель А: 10 мМ NH₄HCO₃ рН 9; растворитель В: ACN; длина волны: 214 нм.

30 Препаративную обращенно-фазовую хроматографию проводили на системе ЖХ-ЭР/МС Agilent 1200, оснащенной масс-спектрометром с масс-селективным детектором и автоматическим пробоотборником Leap. Методы при высоком рН осуществляли на колонке 75 X 30 мм PHENOMENEX® GEMINI®-NX с размером частиц 5 мкм с защитой 10

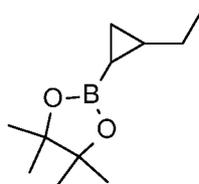
X 20 мм. Скорость потока 85 мл/мин. В качестве элюента использовали 10 мМ бикарбонат аммония (pH 10) в ACN.

Спектры ЯМР записывали на ЯМР спектрометре Bruker AVIII HD при 400 МГц, образцы получали в виде растворов в CDCl_3 или $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, результаты записывали в м.д.,
5 используя остаточный растворитель [CDCl_3 , 7,26 м.д.; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 2,50 м.д.] в качестве эталонного стандарта. При записи мультиплетности пиков могут быть использованы следующие сокращения: с (синглет), д (дублет), т (триплет), к (квартет), м (мультиплет), шс (широкий синглет), дд (дублет дублетов), дт (дублет триплетов). Константы связывания (J), в случае их указания, записаны в герцах (Гц).

10

Синтез 1

Рац-транс-2-(2-этилциклопропил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан



К раствору 2-[(E)-бут-1-енил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (1,65 г, 9,06
15 ммоль) в Et_2O (45,30 мл) добавляли $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,20 г, 0,90 ммоль). Обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут и охлаждали до $-5\text{ }^\circ\text{C}$.

В колбу Эрленмейера объемом 250 мл добавляли 40% водный раствор KOH (162
мл), затем Et_2O (245 мл). Охлаждали двухфазную смесь до $-5\text{ }^\circ\text{C}$ на бане изо
льда/насыщенного водного раствора NaCl. По частям добавляли N-нитрозо-N-
20 метилмочевину (36,1 г, 350 ммоль) в течение 10 минут. Перемешивали 15 минут и помещали на баню из сухого льда/ацетона. Декантировали эфирный слой в мерный цилиндр и добавляли смесь Et_2O (71 мл, ~ 10 экв. CH_2N_2) к раствору, описанному выше, при $-5\text{ }^\circ\text{C}$. Через 2 часа отфильтровывали содержимое реакционной смеси через диатомовую землю, сушили над MgSO_4 и концентрировали *in vacuo* с получением
25 указанного в заголовке соединения (1,08 г, 58%). ^1H ЯМР (d_6 -DMCO) δ : -0,51 (дт, J = 9,3, 5,7 Гц, 1H), 0,33-0,37 (м, 1H), 0,50-0,54 (м, 1H), 0,76-0,84 (м, 1H), 0,91 (т, J = 7,4 Гц, 3H), 1,14 (с, 12H), 1,21-1,30 (м, 2H).

Альтернативный способ подготовительного синтеза 1

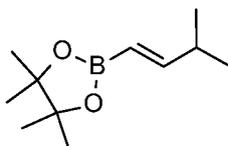
Добавляли 1 М раствор триэтилборгидрида лития в ТГФ (41,3 мл, 41,3 ммоль) к раствору бис(пентаметилциклопентадиенил)циркония дихлорида (11,1 г, 25,5 ммоль) в ТГФ (3,4 л) в атмосфере азота, охлаждали при 0 °С. Нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 часа, защищая колбу от света алюминиевой фольгой.

5 В отдельной колбе, охлажденной в атмосфере азота при -78 °С, конденсировали 1-бут-1-ин (50,6 г, 936 ммоль) и добавляли пинаколборан (55,0 г, 425 ммоль). Перемешивали полученную смесь при -78 °С в течение 30 минут и через канюлю добавляли содержимое первой колбы. Добавляли ТЭА (5,93 мл, 42,6 ммоль) и перемешивали реакционную смесь, нагревая до комнатной температуры, в течение 20 часов. Гасили реакцию посредством
10 добавления через канюлю смеси льда/воды (1,5 л), добавляли EtOAc (300 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Разделяли полученные слои и повторно экстрагировали водную фазу EtOAc (2 x 200 мл). Объединяли органические экстракты, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали *in vacuo* с получением 2-[(E)-бут-1-енил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (53 г, 65%) в виде
15 желтого маслянистого вещества. ГХ-МС (m/z): 182 (M+).

Добавляли раствор диэтилцинк в толуоле (15% мас./мас., 550 мл, 611 ммоль) к хлориодметану (55 мл, 755 ммоль) при -20 °С за 10 минут и перемешивали 35 минут. По каплям добавляли раствор 2-[(E)-бут-1-енил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (53 г, 277 ммоль) в толуоле (100 мл) за 20 минут, поддерживая внутреннюю температуру
20 реакции при -20 °С. Перемешивали смесь в течение 2 часов, нагревая до 0 °С. Гасили реакцию, медленно добавляя насыщенный водный раствор NH₄Cl (750 мл). Отделяли органический слой и повторно экстрагировали водную фазу EtOAc (2 x 250 мл). Объединяли органические экстракты, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали с получением указанного в заголовке соединения (48 г, 84%) в виде маслянистого вещества,
25 пригодного для использования без дополнительной очистки. ГХ-МС (m/z): 180 (M-16).

Синтез 2

4,4,5,5-Тетраметил-2-[(E)-3-метилбут-1-енил]-1,3,2-диоксаборолан

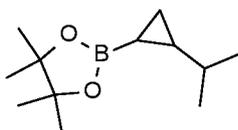


30 В течение 5 минут по каплям добавляли пинаколборан (9,5 мл, 64 ммоль) к ледяному 3-метилбут-1-ину (4,91 г, 72,0 ммоль). Закрывали емкость для работы под

давлением, нагревали до комнатной температуры и перемешивали 18 часов. Добавляли хлорид-гидрид бис(циклопентадиенил)циркония (IV) (2,0 г, 7,4 ммоль) и ТЭА (1,1 мл, 7,9 ммоль). Закрывали емкость для работы под давлением, помещали на масляную баню при 60 °С и перемешивали 10 минут. Охлаждали полученный красный раствор до комнатной температуры в течение 2,5 часа. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (200 мл), промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 (100 мл), насыщенным водным раствором NaCl (50 мл), сушили над MgSO_4 , фильтровали через слой силикагеля (150 мл), промывали силикагель ДХМ (700 мл) и концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения (11,5 г, 82%). ЭР/МС (m/z): 196 (M+H). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ : 1,03 (д, J= 6,7 Гц, 6H), 1,29 (с, 12H), 2,37 (м, 1H), 5,40 (дд, 1H), 6,64 (дд, 1H).

Синтез 3

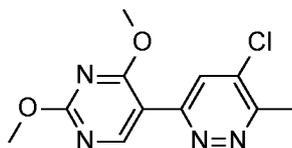
Рац-транс-2-[2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан



По частям добавляли N-нитрозо-N-метилмочевину к ледяной двухфазной смеси Et_2O (70 мл) и водного раствора KOH (30,5 г, 435 ммоль, 70 мл H_2O). Перемешивали до растворения твердого вещества (< 5 минут). Пипеткой переносили полученный раствор диазометана в быстро перемешиваемую ледяную суспензию $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (237 мг, 1,05 ммоль) и 4,4,5,5-тетраметил-2-[(E)-3-метилбут-1-енил]-1,3,2-диоксаборолана (4,00 г, 20,4 ммоль) в Et_2O (70 мл). После завершения добавления нагревали реакционную смесь до комнатной температуры, фильтровали через диатомовую землю и концентрировали фильтрат *in vacuo*. Растворяли полученный остаток в ДХМ, фильтровали через слой силикагеля (25 г) и концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения (4,32 г, >99%). ЭР/МС (m/z): 210 (M+H). ^1H ЯМР (CDCl_3) δ : -0,35 (м, 1H), 0,45 (м, 1H), 0,65 (м, 1H), 0,78 (м, 1H), 0,98 (м, 7H), 1,23 (с, 12H).

Синтез 4

4-Хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин



В колбе для работы под давлением смешивали 2,4-диметокси-5-
5 пиримидинилбороновую кислоту (6,75 г, 36,7 ммоль), 4,6-дихлор-3-метилпиридазин (5,98
г, 36,7 ммоль), [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (0,55 г, 0,73
ммоль), Cs₂CO₃ (29,9 г, 91,8 ммоль) в 4:1 смеси 1,4-диоксан/H₂O (151 мл). Откачивали
воздух и закачивали N₂. Закрывали емкость и нагревали при 70 °С в течение 3 часов.
Фильтровали остаток через диатомовую землю и промывали EtOAc. Промывали
10 органическую смесь водой, затем насыщенным водным раствором NaCl, сушили над
MgSO₄ и выпаривали досуха. Очищали полученный черный остаток хроматографией на
силикагеле, используя 330 г колонку REDISEP® с градиентом 0-30% ДХМ/(33% MeOH в
ДХМ) за 15 минут при скорости потока 200 мл/мин. с получением указанного в заголовке
соединения (6,2 г, 63%) после выпаривания хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z)
15 (³⁵Cl/³⁷Cl) 267/269 [M+1]⁺ Н ЯМР (d₆-DMCO) δ: 2,74 (с, 3H), 4,00 (с, 3H), 4,03 (с, 3H), 8,20
(с, 1H), 8,87 (с, 1H).

Альтернативный способ синтеза 4

Поток азота пропускали через смесь (2,4-диметоксипиримидин-5-ил)бороновой
20 кислоты (85 г, 439 ммоль), 4,6-дихлор-3-метилпиридазина (75 г, 437 ммоль) и Cs₂CO₃ (358
г, 1099 ммоль) в 1,4-диоксане (1175 мл) и H₂O (340 мл) в течение 5 минут. Добавляли [1,1'-
бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (6,6 г, 8,7 ммоль) и перемешивали
полученную смесь при 75 °С в течение 16 часов. Охлаждали реакционную смесь до
комнатной температуры, фильтровали смесь через диатомовую землю и промывали
25 осадок на фильтре EtOAc. Разделяли полученные слои и дважды промывали
органическую фазу насыщенным водным раствором NaCl, сушили над MgSO₄,
фильтровали и концентрировали *in vacuo*. К полученному остатку добавляли воду (500
мл), перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре и отфильтровывали
полученное твердое вещество. Промывали собранное твердое вещество H₂O и сушили под
30 вакуумом в течение 16 часов с получением требуемого соединения (70 г, 54%) в виде
коричневого твердого вещества. ЭР/МС (m/z) (³⁵Cl/³⁷Cl) 267/269 [M+1]⁺

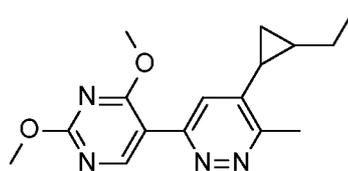
Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в подготовительном синтезе 4.

№ подготовительного синтеза	Химическое название	Химическая структура	ЭР/МС (m/z) (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
5	5-(5-хлорпиридазин-3-ил)-2,4-диметоксипиримидин		253/255

5

Синтез 6

транс-5-[2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидин



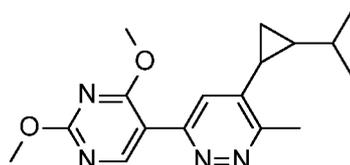
В колбу для работы под давлением объемом 20 мл добавляли 4-хлор-6-(2,4-
 10 диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин (0,6 г, 2,0 ммоль), бис(ди-трет-бутил-(4-
 диметиламинофенил)фосфин)дихлорпалладий (II) (114 мг, 0,16 ммоль), K₂CO₃ (0,69 г, 4,9
 ммоль), H₂O (2,25 мл) и рацемический транс-2-[2-этилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-
 1,3,2-диоксаборолан (0,66 г, 3,37 ммоль). Вакуумировали колбу и закачивали N₂.
 Закрывали емкость и нагревали при 90 °С в течение ночи. Фильтровали реакциюнную
 15 смесь через диатомовую землю, промывали органический слой водой, затем насыщенным
 водным раствором NaCl, сушили над MgSO₄ и концентрировали *in vacuo*. Очищали
 полученный остаток обращенно-фазовой хроматографией, используя 275 г колонку
 REDISEP® Gold C18, элюируя градиентом 30-50% 10 mM NH₄HCO₃/ACN в течение 20
 минут при скорости потока 150 мл/мин., с получением указанного в заголовке соединения,
 20 по существу рацемической смеси изомеров (475 мг, 70%), в виде белого твердого
 вещества после выпаривания хроматографических фракций.

Полученные изомеры подвергали очистке СЖХ (колонка: PHENOMENEX® LUX®
 Cellulose-4, 4,6 x 150 мм; изократическое элюирование 40% MeOH/CO₂; скорость потока:
 5 мл/мин., УФ 250 нм) с получением 0,197 г изомера 1: t_R = 2,71 мин. (УФ); и 0,195 г

изомера 2: t_R 3,55 мин. (УФ), оба с >98% э.и. ЭР/МС (m/z): 301 (M+H).

Синтез 7

транс-5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидин



5

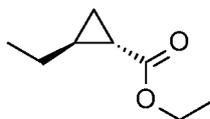
Объединяли 4-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин (1,97 г, 7,39 ммоль), рац-транс- 2-[2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (3,32 г, 15,8 ммоль), бис(ди-трет-бутил(4-
10 диметиламинофенил)фосфин)дихлорпалладий (II) (1,35 г, 1,85 ммоль), 1,4-диоксан (37 мл) и 1 М водный раствор Na_2CO_3 (18 мл, 18 ммоль). Продували реакционную емкость N_2 и нагревали до 90°C в течение 18 часов. Охлаждали до комнатной температуры, разбавляли EtOAc (150 мл) и разделяли слои. Органический слой последовательно промывали 1 М
15 водным раствором Na_2CO_3 , насыщенным водным раствором NaCl , сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали фильтрат *in vacuo*. Полученный остаток очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя градиентом 60-100% $\text{EtOAc}/\text{ДХМ}$, с получением указанного в заголовке соединения в виде по существу рацемической смеси изомеров (1,48 г, 64%) после выпаривания хроматографических фракций.

Изомеры подвергали очистке СЖХ (колонка: PHENOMENEX[®] LUX[®] Cellulose-4, 20 4,6 x 150 мм; изократическое элюирование 40% MeOH/CO_2 ; скорость потока: 5 мл/мин., УФ 250 нм) с получением 647 мг изомера 1: $t_R = 2,56$ мин. и 647 мг изомера 2: $t_R = 3,75$ мин. ЭР/МС (m/z): 315 (M+H).

Подготовительный синтез 8

25

Этил-(1S,2S)-2-этилциклопропанкарбоксилат



К раствору этил-2-диэтоксифосфорилацетата (62,2 г, 277 ммоль) в 1,4-диоксане (400 мл), охлажденному на ледяной бане (внутренняя температура: 8°C), по каплям добавляли 2,5 М раствор $n\text{BuLi}$ в гексанах (110 мл, 280 ммоль) за 10 минут. Убирали

охлаждающую баню и перемешивали 30 минут при комнатной температуре. Через канюлю переносили раствор в колбу для работы под давлением объемом 1 л и добавляли (2R)-2-этилоксиран (20 г, 280 ммоль). Перемешивали полученную смесь при 150 °С (давление 50 фунт/кв.дюйм (345 кПа)) в течение 17 часов. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры и добавляли воду (250 мл). Отделяли органическую фазу и повторно экстрагировали водную фазу МТБЭ (2 x 200 мл). Объединяли органические экстракты, промывали насыщенным водным раствором NaCl (2 x 150 мл), сушили над MgSO₄ и концентрировали *in vacuo* с получением неочищенного указанного в заголовке соединения (49,1 г, количественно) в виде желтого маслянистого вещества, пригодного для использования без дополнительной очистки. ГХ-МС (m/z): 142 (M⁺), 97 (M-45).

Подготовительный синтез 9

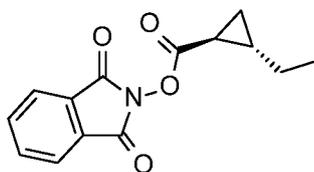
(1S,2S)-2-этилциклопропанкарбоновая кислота



Перемешивали смесь этил-(1S,2S)-2-этилциклопропанкарбоксилата (39,44 г, 277,4 ммоль), 1,4-диоксана (315 мл) и 25% водного раствора гидроксида натрия (315 мл) при 100 °С в течение 16 часов. Охлаждали смесь до комнатной температуры, экстрагировали МТБЭ (2 x 300 мл) и отбрасывали органическую фазу. Водную фазу подкисляли 37% водным раствором HCl до pH ~ 1-2, экстрагировали МТБЭ (3 x 300 мл), разделяли слои, органический слой промывали насыщенным водным раствором NaCl, сушили над MgSO₄ и концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения (25,1 г, 75%) в виде маслянистого вещества янтарного цвета. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 0,79-0,85 (м, 1H), 1,00 (т, J=7,5 Гц, 3H), 1,22-1,26 (м, 1H), 1,32-1,42 (м, 3 H), 1,43-1,48 (м, 1H), 9,0-12,0 (шс, 1H).

Подготовительный синтез 10

(1,3-Диоксиизоиндолин-2-ил)-(1S,2S)-2-этилциклопропанкарбоксилат

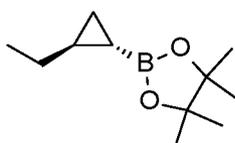


5 Перемешивали суспензию (1S,2S)-2-этилциклопропанкарбоновой кислоты (25,1 г, 209 ммоль), 2-гидроксиизоиндолин-1,3-диона (34,8 г, 209 ммоль) и DMAP (2,58 г, 20,9 ммоль) в ДХМ (360 мл) при 0 °С и по каплям добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (29,3 г, 230 ммоль). Убирали охлаждающую баню и перемешивали реакционную смесь в течение 2 часов при комнатной температуре. Фильтровали суспензию через слой силикагеля, элюируя ДХМ. Выпаривали растворитель и очищали полученный остаток
10 хроматографией на силикагеле, элюируя 15% смесью гексан/ацетон, с получением указанного в заголовке соединения (51,56 г, 84%) в виде бледно-желтого твердого вещества после удаления растворителя из хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): 260 (M+1).

15

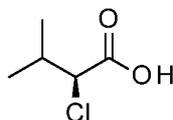
Подготовительный синтез 11

2-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан



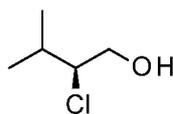
20 Пропускали поток N₂ через раствор (1,3-диоксиизоиндолин-2-ил)-(1S,2S)-2-этилциклопропанкарбоксилата (51 г, 173,1 ммоль) и бис(пинаколато)дибора (87,9 г, 346 ммоль) в EtOAc (1 л) в течение 5 минут. Добавляли этилизоникотинат (5,34 г, 35 ммоль) и перемешивали смесь при 85 °С в течение 24 часов. Полученную суспензию охлаждали, фильтровали и удаляли твердое вещество, и концентрировали коричневый фильтрат при пониженном давлении. Полученный неочищенный остаток фильтровали через слой силикагеля, элюируя 2% смесью EtOAc/гексаны. Из фильтрата удаляли растворитель и
25 повторно очищали полученный остаток хроматографией на силикагеле, элюируя 3% смесью EtOAc/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения (17,1 г, 49%) в виде бесцветного маслянистого вещества после удаления растворителя из хроматографических фракций. ГХ-МС (m/z): 180 (M-16).

Подготовительный синтез 12
(2S)-2-Хлор-3-метилбутановая кислота



Охлаждали раствор L-валина (286 г, 2,44 моль) и 5 М водного раствора HCl (3,25 л,
5 16,3 моль) при 0 °С. По каплям добавляли 4 М водный раствор NaNO₂ (1 л, 4 моль) за 2
часа, поддерживая внутреннюю температуру ниже 5 °С. Перемешивали реакционную
смесь в течение 2 часов, нагревая до комнатной температуры, и перемешивали еще 16
часов при комнатной температуре. В течение 30 минут по частям добавляли Na₂CO₃ (242
г, 2,28 моль). Полученный раствор экстрагировали МТБЭ (3 x 1000 мл), промывали
10 объединенные органические экстракты насыщенным водным раствором NaCl (500 мл),
органические экстракты сушили над MgSO₄ и концентрировали *in vacuo*. Полученный
остаток очищали вакуумной перегонкой (15 мбар (1,5 кПа)/140 °С) с получением
указанного в заголовке соединения (248 г, 68%) в виде маслянистого вещества. ¹H ЯМР
(400 МГц, CDCl₃) δ: 1,1 (дт, J=6,6, 2,6 Гц, 6H), 2,34-2,42 (м, 1H), 4,19-4,23 (м, 1H), 10,0-
15 12,0 (шс, 1H).

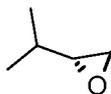
Подготовительный синтез 13
(2S)-2-Хлор-3-метилбутан-1-ол



Охлаждали раствор (2S)-2-хлор-3-метилбутановой кислоты (137 г, 1 моль) в 2-
метилтетрагидрофуране (500 мл) до 0 °С. По каплям добавляли 2,3 М раствор ЛАН в
метилтетрагидрофуране (480 мл, 1,1 моль) в течение 2,5 часа, поддерживая внутреннюю
температуру ниже 10 °С. Нагревали до комнатной температуры и перемешивали смесь 1
час при комнатной температуре и 1 час при 50 °С. Охлаждали реакционную смесь до 0 °С
25 и последовательно и медленно добавляли H₂O (1,48 мл), 15% водный раствор NaOH (1,48
мл) и H₂O (4,46 мл). Оставляли смесь нагреваться до комнатной температуры,
фильтровали через слой диатомовой земли и выпаривали растворитель *in vacuo* с
получением указанного в заголовке соединения (110 г, 81%) в виде бесцветного
маслянистого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 0,97- 1,1 (м, 6H), 1,94-2,18 (м, 1H),
30 2,60-3,09 (шс, 1H), 3,71-3,78 (м, 1H), 3,80-3,85 (м, 1H), 3,90-3,96 (м, 1H).

Подготовительный синтез 14

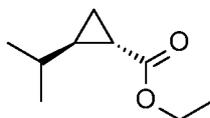
(2R)-2-Изопропилоксиран



Охлаждали раствор KOH (195 г, 3,48 моль) в H₂O (195 мл) до 0 °С и в течение 20 минут добавляли неразбавленный (2S)-2-хлор-3-метилбутан-1-ол (110 г, 801 ммоль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5 °С. Оставляли реакционную смесь нагреваться до комнатной температуры. Реакционную смесь очищали вакуумной перегонкой при 100 мбар (10 кПа), нагревая с 23 °С до 50 °С, с получением указанного в заголовке соединения (47 г, 64%) в виде бесцветного маслянистого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 0,98 (д, J=6,9 Гц, 3H), 1,05 (д, J=6,9 Гц, 3H), 1,51 (о, J=6,9 Гц, 1H), 2,52-2,54 (м, 1H), 2,70-2,75 (м, 2H).

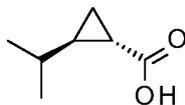
Подготовительный синтез 15

Этил-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилат



2,5 М раствор nBuLi в гексанах (310 мл, 780 ммоль) по каплям в течение 25 минут добавляли к раствору этил-2-диэтоксифосфорилацетата (153 мл, 772 ммоль) в 1,4-диоксане (870 мл), охлажденному на ледяной бане (внутренняя температура: 8 °С). Нагревали до комнатной температуры и перемешивали 40 минут. Через канюлю переносили раствор в колбу для работы под давлением объемом 3 л и добавляли (2R)-2-изопропилоксиран (70 г, 772 ммоль) в 1,4-диоксане (180 мл). Перемешивали реакционную смесь при 150 °С при давлении 50 фунт/кв.дюйм (345 кПа) в течение 14 часов. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры и добавляли H₂O (700 мл). Разделяли слои и повторно экстрагировали водную фазу МТБЭ (2 x 500 мл). Объединяли органические фазы, промывали насыщенным водным раствором NaCl (2 x 350 мл), сушили над MgSO₄ и концентрировали *in vacuo* с получением неочищенного указанного в заголовке соединения (107,7 г, >99%) в виде желтого маслянистого вещества, пригодного для дальнейшего использования без дополнительной очистки. ГХ-МС (m/z): 156 (M+).

(1S,2R)-2-Изопропилциклопропанкарбоновая кислота

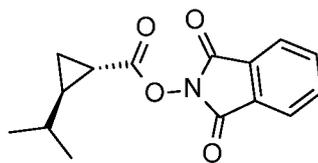


5 Перемешивали смесь этил-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилата (107,7 г, 482,6 ммоль) в 1,4-диоксане (800 мл), содержащем 25% водный раствор NaOH (800 мл), при 100 °С в течение 7 часов. Охлаждали смесь до комнатной температуры, добавляли воду (300 мл), экстрагировали МТБЭ (2 x 500 мл) и отбрасывали органическую фазу. Водную фазу подкисляли 37% водным раствором HCl (приблизительно 500 мл) до pH ~ 1-2.

10 Подкисленную водную смесь экстрагировали МТБЭ (2 x 600 мл), органический слой промывали насыщенным водным раствором NaCl, сушили над MgSO₄ и концентрировали *in vacuo* с получением указанного в заголовке соединения (54,2 г, 75%) в виде маслянистого вещества янтарного цвета. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 0,81-0,86 (м, 1H), 1,01 (дд, J=5,9, 3,7 Гц, 6H), 1,04-1,13 (м, 1H), 1,20-1,24 (м, 1H), 1,28-1,37 (м, 1H), 1,39-15 1,44 (м, 1H).

Подготовительный синтез 17

(1,3-Диоксоизоиндолин-2-ил)-(1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоксилат

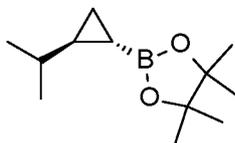


20 Перемешивали суспензию (1S,2R)-2-изопропилциклопропанкарбоновой кислоты (54,2 г, 359 ммоль), 2-гидроксиизоиндолин-1,3-диона (59,8 г, 359 ммоль) и DMAP (4,44 г, 35,9 ммоль) в ДХМ (690 мл) при 0 °С. По каплям добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (50,4 г, 395 ммоль), нагревали до комнатной температуры и 25 перемешивали полученную реакцию смесь в течение 2 часов при комнатной температуре. Добавляли H₂O (600 мл) и разделяли фазы. Водную фазу экстрагировали ДХМ (2 x 300 мл), объединяли органические фазы, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали. Полученный твердый остаток очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя 100% ДХМ, с получением указанного в заголовке соединения (96 г,

88%) в виде бледно-желтого твердого вещества, после выпаривания хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): 274 (M+1).

Подготовительный синтез 18

2-[(1S,2S)-2-Изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан

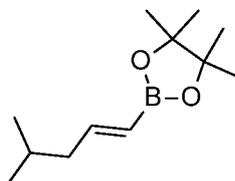


5
Пропускали поток азота через раствор (1,3-диоксиизоиндолин-2-ил)-(1S,2S)-2-изопропилциклопропанкарбоксилата (96 г, 316 ммоль) и бис(пинаколато)дибора (160 г, 630 ммоль) в EtOAc (480 мл) в течение 15 минут. Перемешивали смесь при 85 °С и по каплям добавляли этилизоникотинат (24,38 г, 157 ммоль) за 10 минут. Полученную смесь
10 перемешивали при 85 °С в течение 16 часов. Полученную суспензию охлаждали, фильтровали и отбрасывали твердое вещество, и выпаривали коричневый фильтрат при пониженном давлении. Неочищенный остаток фильтровали через слой силикагеля, элюируя 2% смесью EtOAc/гексаны. Из фильтрата удаляли растворитель и повторно очищали полученный остаток хроматографией на силикагеле, элюируя 3% смесью
15 EtOAc/гексаны, с получением указанного в заголовке соединения (25,3 г, 38%) в виде бесцветного маслянистого вещества после удаления растворителя из хроматографических фракций. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): -0,33 – -0,38 (м, 1H), 0,42-0,47 (м, 1H), 0,63-0,67 (м, 1H), 0,75-0,82 (м, 1H), 0,89-1,02 (м, 1H), 0,98 (м, 6H), 1,24 (с, 12H).

20

Подготовительный синтез 19

4,4,5,5-Тетраметил-2-[(E)-4-метилпент-1-енил]-1,3,2-диоксаборолан

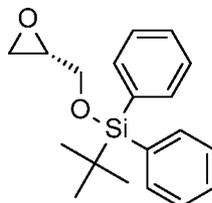


25 Растворяли [(E)-4-метилпент-1-енил]бороновую кислоту (0,975 г, 7,62 ммоль) и пинакол (1,11 г, 9,14 ммоль) в сухом ДХМ (9,7 мл). Добавляли MgSO₄ (0,7313 г, 6,05 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней. Отфильтровывали нерастворимое твердое вещество и удаляли растворитель при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения в виде прозрачного маслянистого вещества (1,6 г, 100%). ¹H ЯМР (400,13 МГц, ДМСО): 0,86 (д, J=6,6 Гц, 6H), 1,08 (с, 6H),

1,19 (с, 12H), 1,62-1,72 (м, 1H), 2,01 (тд, J=6,9, 1,4 Гц, 2H), 3,92 (с, 1H), 5,31 (дт, J=17,9, 1,3 Гц, 1H), 6,47 (дт, J=17,9, 6,9 Гц, 1H).

Подготовительный синтез 20

трет-Бутил-[[[(2S)-оксиран-2-ил]метокси]дифенилсилан

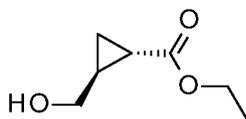


5 К ледяному раствору [(2R)-оксиран-2-ил]метанола (15,0 г, 202,6 ммоль) в ДМФА (135 мл) добавляли имидазол (33,34 г, 489,8 ммоль) и перемешивали в течение 15 минут. По каплям добавляли трет-бутил-хлордифенилсилан (77 мл, 302,5 ммоль) за 30 минут и перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Разбавляли гексанами (1 л),
10 эфиром (500 мл) и водой (1 л). Разделяли слои и экстрагировали водный слой эфиром (2 x 1 л). Органические слои объединяли и промывали водой (3 x 750 мл), насыщенным раствором NaHCO₃, насыщенным водным раствором NaCl и сушили над MgSO₄. Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Очищали хроматографией на силикагеле: элюент 0-10% EtOAc в гексанах, с получением указанного в заголовке
15 соединения (11,77 г, 18%) в виде маслянистого вещества, после удаления растворителя из хроматографической фракции. ¹H ЯМР (400,13 МГц, CDCl₃): 1,08 (с, 9H), 2,64 (дд, J=2,6, 5,1 Гц, 1H), 2,77 (т, J=4,6 Гц, 1H), 3,15 (квинтет, J=3,5 Гц, 1H), 3,73 (дд, J=4,7, 11,8 Гц, 1H), 3,88 (дд, J=3,2, 11,9 Гц, 1H), 7,40-7,48 (м, 6H), 7,71 (м, 4H).

20

Подготовительный синтез 21

Этил-(1S,2S)-2-(гидроксиметил)циклопропанкарбоксилат



25

Медленно добавляли триэтилфосфоацетат (7,5 мл, 38 ммоль) к суспензии трет-бутоксид натрия (3,67 г, 37,82 ммоль) в 1,4-диоксане (40 мл) при комнатной температуре. Через 1 час добавляли трет-бутил-[[[(2S)-оксиран-2-ил]метокси]дифенилсилан (11,77 г, 33,76 ммоль) и нагревали при 140 °С в течение ночи в закрытой емкости для работы под давлением. Добавляли дополнительное количество триэтилфосфоацетата (2 мл) и нагревали при 160 °С в течение часа. Смесь оставляли остывать и разбавляли ДХМ (300

мл) и водой (150 мл). Разделяли слои, экстрагировали водный слой ДХМ (3 x 150 мл). Органические слои объединяли и промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 , насыщенным водным раствором NaCl и сушили над MgSO_4 . Фильтровали через диатомовую землю и выпаривали растворитель при пониженном давлении с получением

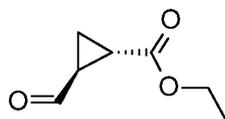
5 этил-(1S,2S)-2-[[трет-бутил(дифенил)силлил]оксиметил]циклопропанкарбоксилата (18,45 г) в виде маслянистого вещества. Растворили в ТГФ (75 мл) и добавляли фторид тетрабутиламмония (1 М в ТГФ, 67 мл, 67 ммоль, 1,0 М) при комнатной температуре. Перемешивали в течение 48 часов и удаляли растворитель при 130 мбар (13 кПа) и 30 °С. Очищали хроматографией на силикагеле, элюент: 0-50% EtOAc в гексанах, с выделением

10 указанного в заголовке соединения (3,35 г, 62%) в виде маслянистого вещества, после удаления растворителя из хроматографической фракции. ЭР/МС (m/z): 142 (M+1). ^1H ЯМР (400,13 МГц, CDCl_3): 0,90-0,86 (м, 1H), 1,23 (дд, J=4,5, 8,9 Гц, 1H), 1,28 (т, J=7,2 Гц, 4H), 1,56-1,60 (м, 1H), 1,69-1,77 (м, 2H), 2,06 (с, 2H), 3,50 (дд, J=6,9, 11,5 Гц, 1H), 3,64 (дд, J=6,0, 11,4 Гц, 1H), 4,14 (кд, J=7,1, 2,9 Гц, 3H).

15

Подготовительный синтез 22

Этил-(1S,2S)-2-формилциклопропанкарбоксилат



20 К охлажденному на ледяной бане раствору этил-(1S,2S)-2-(гидроксиметил)циклопропанкарбоксилата (12,25 г, 84,9 ммоль) в ДХМ (425 мл) одной порцией добавляли хлорхромат пиридиния (26,09 г, 118,6 ммоль). Через 30 минут убрали ледяную баню и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Добавляли

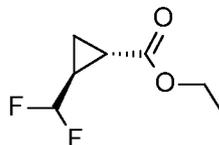
25 воду (200 мл) и фильтровали через диатомовую землю. Промывали дополнительным количеством воды (100 мл) и ДХМ (800 мл). Суспендировали отфильтрованный диатомовой землей слой в ДХМ и отфильтровывали. Указанный прием повторяли

30 дважды. Объединяли органические слои, отделяли водный слой, и фильтровали органические слои через слой диоксида кремния. Промывали дополнительным количеством ДХМ и выпаривали растворитель при пониженном давлении с получением

указанного в заголовке соединения (11,0 г, 91%) в виде маслянистого вещества. ^1H ЯМР (400,13 МГц, CDCl_3): 1,30 (т, J=7,3 Гц, 3H), 1,57-1,50 (м, 1H), 1,60-1,65 (м, 2H), 2,26-2,30 (м, 1H), 2,45 (тд, J=9,0, 4,2 Гц, 1H), 4,13-4,22 (м, 3H), 9,32 (д, J=4,2 Гц, 1H).

Подготовительный синтез 23

Этил-(1S,2S)-2-(дифторметил)циклопропанкарбоксилат

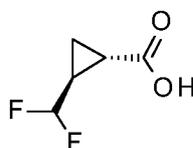


5 Трифторид диэтиламиносеры (24 мл, 172,3 ммоль) добавляли к охлажденному на ледяной бане раствору этил-(1S,2S)-2-формилциклопропанкарбоксилата (11,00 г, 77,38 ммоль) в ДХМ (220 мл) за 3 минуты. Через 1 час снимали с ледяной бани и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Добавляли трифторид диэтиламиносеры (3,5 мл) и перемешивали еще один час. Смесь охлаждали на ледяной бане и осторожно
10 выливали в насыщенный водный раствор NaHCO_3 . Разделяли слои и экстрагировали водный слой ДХМ (2 x 50 мл).

Объединяли органические слои и сушили над MgSO_4 . Фильтровали образец через небольшой слой диоксида кремния и выпаривали растворитель при пониженном давлении (250 мбар (25 кПа) и 30°C) с получением указанного в заголовке соединения (11,10 г,
15 87%) в виде маслянистого вещества. $^1\text{H ЯМР}$ (400,13 МГц, CDCl_3): 1,14-1,19 (м, 1H), 1,29 (м, 1H), 1,30 (т, $J=7,2$ Гц, 3H), 1,97-1,89 (м, 2H), 4,22 (к, $J=7,2$ Гц, 3H), 5,79 (тд, $J_{\text{H-F}}=56,8$ Гц, $J=3,6$ Гц, 1H).

Подготовительный синтез 24

20 (1S,2S)-2-(Дифторметил)циклопропанкарбоновая кислота



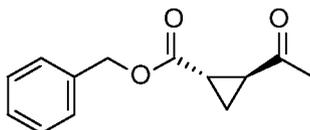
1 н. раствор NaOH (75 мл) добавляли к раствору этил-(1S,2S)-2-(дифторметил)циклопропанкарбоксилата (11,10 г, 67,62 ммоль) в MeOH (75 мл) и
25 перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Добавляли ДХМ (70 мл) и разделяли слои. Водный слой экстрагировали ДХМ (70 мл). Водный слой охлаждали на ледяной бане и доводили до pH 1 посредством добавления 35% HCl . Добавляли ДХМ (50 мл) и разделяли два слоя. Водный слой экстрагировали ДХМ. Объединяли органические слои, сушили над MgSO_4 и выпаривали растворитель при пониженном давлении (200 мбар
30 (20 кПа), 30°C) с получением указанного в заголовке соединения (6,25 г, 68%) в виде

маслянистого вещества. ¹H ЯМР (400,13 МГц, CDCl₃): 1,26 (дт, J= 8,4, 5,9 Гц, 1H), 1,34-1,39 (м, 1H), 1,92-1,96 (м, 1H), 2,01-2,07 (м, 1H), 5,82 (тд, JH-F=59 Гц, J=3,2 Гц, 1H).

Подготовительный синтез 25

5

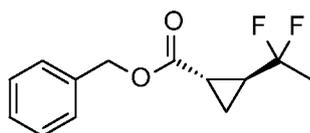
Транс-бензил-2-ацетилциклопропанкарбоксилат



10 K_2CO_3 (36,2 г, 261,93 ммоль) к смеси бензилбромацетата (40 г, 174,618 ммоль), метилвинилкетона (43 мл, 523,85 ммоль), 1,4-дизабицикло[2.2.2]октана (2,3 г, 20,9 ммоль) в ацетонитриле (400 мл). Перемешивали в атмосфере N₂ при 80 °С в течение ночи. Оставляли остывать, фильтровали и выпаривали растворитель при пониженном давлении. Очищали хроматографией на силикагеле, элюент 0-50% EtOAc/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (13,4 г, 35%), после удаления растворителя из хроматографических фракций. ¹H ЯМР (400,13 МГц, d₆-DMCO): 1,33-1,39 (м, 2H), 2,08-15 2,13 (м, 1H), 2,24 (с, 3H), 2,54-2,59 (м, 2H), 5,13 (с, 2H), 7,39-7,37 (м, 6H).

Подготовительный синтез 26

Транс-бензил-2-(1,1-дифторэтил)циклопропанкарбоксилат

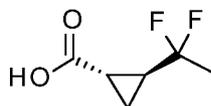


20 EtOH (0,05 экв.) добавляли к смеси *транс*-бензил-2-ацетилциклопропанкарбоксилата (2,76 г, 12,6 ммоль) и трифторида бис(2-метоксиэтил)аминосеры (23,2 мл, 126 ммоль) при 0 °С. Оставляли нагреваться до комнатной температуры и нагревали при 50 °С в течение 40 часов. Разбавляли ДХМ и охлаждали смесь на ледяной бане, медленно добавляли насыщенный водный раствор 25 NaHCO₃. Разделяли слои и экстрагировали водный слой ДХМ (2 x 100 мл). Объединяли органические слои и сушили над безводным Na₂SO₄. Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Очищали хроматографией на силикагеле, элюент: 10% МТБЭ/гексан, с получением указанного в заголовке соединения (2,30 г, 76%) в виде бесцветного маслянистого вещества, после удаления растворителя из хроматографических 30 фракций. ¹H ЯМР (400,13 МГц, d₆-DMCO): 1,19 (т, J=7,5 Гц, 2H), 1,67 (т, J H-F=16 Гц, 3H),

1,93-1,98 (м, 1H), 2,00-2,08 (м, 1H), 5,13 (с, 2H), 7,38-7,40 (м, 5H).

Подготовительный синтез 27

Транс-2-(1,1-дифторэтил)циклопропанкарбоновая кислота



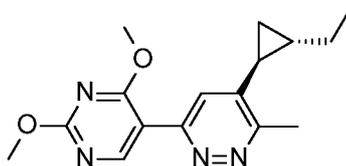
5

Добавляли 10% Pd/C (1,53 г, 14,4 ммоль) к раствору *транс*-бензил-2-(1,1-дифторэтил)циклопропанкарбоксилата (6,56 г, 27,3 ммоль) в EtOAc (136 мл, 0,2 М). Перемешивали при комнатной температуре в атмосфере H₂ из баллона в течение 3 часов. Фильтровали через диатомовую землю и промывали EtOAc. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (4,03 г, 98%) в виде бесцветного маслянистого вещества. ¹H ЯМР (400,13 МГц, d₆-ДМСО): 1,10 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,66 (т, J H-F= 18,4 Гц, 3H), 1,72-1,77 (м, 1H), 1,96-1,99 (м, 1H), 12,49 (с, 1H).

10

Подготовительный синтез 28

15 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидин



20

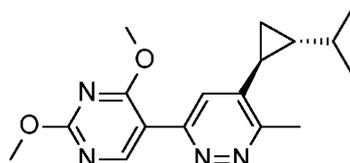
Дегазировали смесь 4-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазина (16 г, 54,0 ммоль), 2-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолана (17 г, 83,22 ммоль), 2 М водного раствора Na₂CO₃ (70 мл, 140 ммоль) и 1,4-диоксана (290 мл), пропуская через смесь газообразный N₂ в течение 10 минут. Добавляли бис(ди-трет-бутил(4-диметиламинофенил)фосфин)дихлорпалладий (II) (2,0 г, 2,74 ммоль) и перемешивали полученную смесь при 90 °С в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли H₂O и экстрагировали EtOAc. Разделяли полученные фазы, органическую фазу сушили над безводным MgSO₄ и концентрировали *in vacuo*. Полученный остаток очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя градиентом 60-100% смесью гексаны/EtOAc, с получением указанного в заголовке соединения (12,95 г, 77%) в виде маслянистого вещества янтарного цвета после удаления растворителя из хроматографических фракций. Маслянистое вещество затвердевало при стоянии при

25

комнатной температуре до грязновато-белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 301 (M+1).

Подготовительный синтез 29

5-[5-[(1S,2R)-2-Изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-
диметоксипиримидин



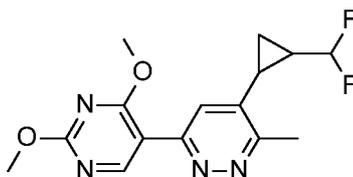
5

Смешивали 4-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин (19,1 г, 70,6 ммоль), K_3PO_4 (45,9 г, 212 ммоль), 1,4-диоксан (300 мл) и H_2O (75 мл) и дегазировали смесь с помощью N_2 в течение 10 минут. Добавляли [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (7,98 г, 10,6 ммоль). Еще 2 минуты пропускали газообразный азот, и одной порцией добавляли 2-[(1S,2S)-2-изопропилциклопропил]-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан (22,2 г, 106 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 80 °С в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли H_2O и экстрагировали $EtOAc$. Органический слой отделяли, сушили над безводным $MgSO_4$ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя 85% смесью гексаны/ $EtOAc$, с выделением указанного в заголовке соединения (21,5 г, 92%) в виде маслянистого вещества янтарного цвета после удаления растворителя из хроматографической фракции. Маслянистое вещество затвердевало при выстаивании при комнатной температуре до грязновато-белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 315 (M+1).

20

Подготовительный синтез 30

4-[(1S,2S)-2-(Дифторметил)циклопропил]-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-
метилпиридазин



25

Диметилцинк (2 M в толуоле, 1,5 мл, 3,0 ммоль) добавляли к дегазированной суспензии 3-хлор-4-[(1S,2S)-2-(дифторметил)циклопропил]-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазина (502 мг, 1,46 ммоль) и дихлорида 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен-

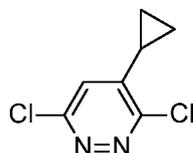
палладия (II) (53 мг, 0,07 ммоль) в ТГФ (6 мл). Нагревали при 60 °С в закрытой пробирке в течение 2 часов. Оставляли остывать до комнатной температуры. Добавляли насыщенный водный раствор NH₄Cl и экстрагировали ДХМ (3х). Органические слои объединяли, сушили над безводным MgSO₄ и удаляли растворитель при пониженном давлении.

- 5 Очищали хроматографией на силикагеле, элюент: EtOAc, с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого остатка (433 мг, 91,8%), после удаления растворителя из хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): 323 (M+1).

Подготовительный синтез 31

10

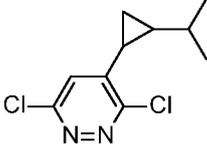
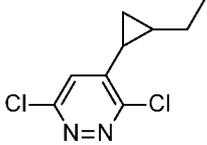
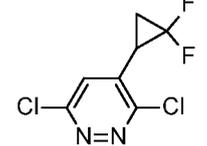
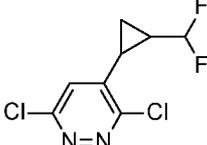
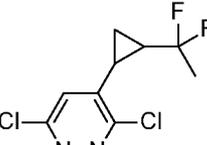
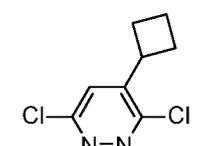
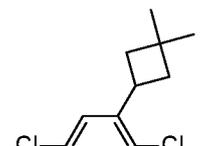
3,6-дихлор-4-циклопропилпиридазин

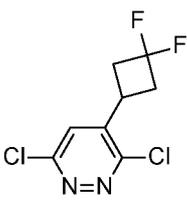
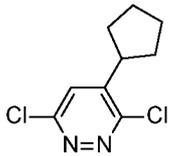
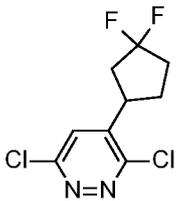
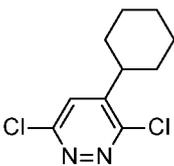


- К суспензии 3,6-дихлорпиридазина (10,00 г, 67,12 ммоль) в воде (300 мл) добавляли 10 мл концентрированной H₂SO₄ и циклопропанкарбоновую кислоту (5,85 мл, 73,7 ммоль), нагревали при 70 °С и дегазировали с помощью N₂. За 30 секунд добавляли раствор AgNO₃ (2,28 г, 13,4 ммоль) в 10 мл H₂O, затем по каплям добавляли раствор (NH₄)₂S₂O₈ (46 г, 201,577 ммоль) в 150 мл H₂O за 30 минут. Через час оставляли смесь остывать до комнатной температуры и выливали на лед, доводили до pH 9, добавляя концентрированный раствор NH₄OH. Разбавляли EtOAc и отделяли органический слой. Водный слой экстрагировали дополнительным количеством EtOAc. Объединяли органические слои, сушили над безводным Na₂SO₄ и выпаривали растворитель при пониженном давлении. Очищали обращенно-фазовой хроматографией (C18 Gold 415 г, градиент 25-100% ACN в 10 mM растворе бикарбоната аммония; 150 мл/мин., за 30 мин.) с выделением указанного в заголовке соединения (6,83 г, 54%) в виде белого твердого вещества после удаления растворителя из хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): (35Cl/37Cl) 189/191.

25

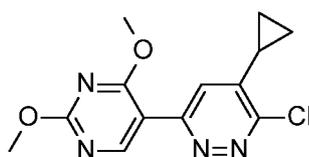
Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в синтезе 22.

№ синтеза	Химическое название	Химическая структура	ЭР/МС (m/z) (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
32	Рац- <i>транс</i> -3,6-дихлор-4-(2-изопропилциклопропил)пиридазин		231/233
33	Рац- <i>транс</i> -3,6-дихлор-4-(2-этилциклопропил)пиридазин		217/219
34	3,6-дихлор-4-(2,2-дифторциклопропил)пиридазин		225/227
35	Рац- <i>транс</i> -3,6-дихлор-4-[2-(дифторметил)циклопропил]пиридазин		239/241
36	Рац- <i>транс</i> -3,6-дихлор-4-[2-(1,1-дифторэтил)циклопропил]пиридазин		253/255
37	3,6-дихлор-4-циклобутилпиридазин		203/205
38	3,6-дихлор-4-(3,3-диметилциклобутил)пиридазин		231/233

39	3,6-дихлор-4-(3,3-дифторциклобутил)пиридазин		239/241
40	3,6-дихлор-4-циклопентилпиридазин		217/219
41	3,6-дихлор-4-(3,3-дифторциклопентил)пиридазин		253/255
42	3,6-дихлор-4-циклогексилпиридазин		231/233

Подготовительный синтез 43

3-Хлор-4-циклопропил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин

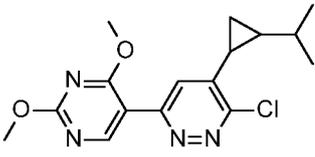
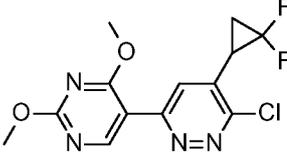
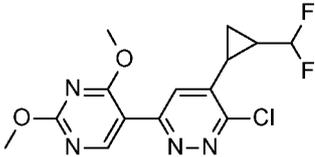
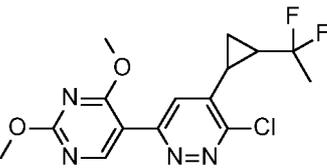
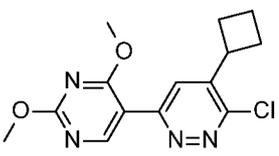
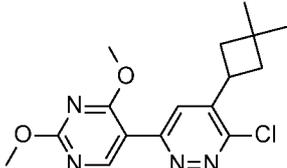


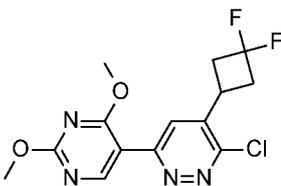
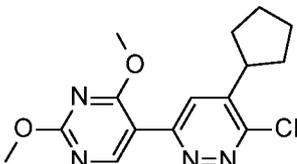
5 Смешивали (2,4-диметоксипиримидин-5-ил)бороновую кислоту (4,60 г, 25,0 ммоль), 3,6-дихлор-4-циклопропилпиридазин (5,2 г, 28 ммоль) и K_2CO_3 (4,4 г, 32 ммоль), 1,4-диоксан (125 мл) и H_2O (42 мл) и дегазировали смесь с помощью N_2 в течение 10 минут. Добавляли комплекс [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия (II) с 10 дихлорметаном (1,5 г, 1,8 ммоль) и дополнительно дегазировали с помощью N_2 . Полученную смесь перемешивали при 60 °С в течение 1 часа. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, добавляли H_2O и экстрагировали $EtOAc$. Отделяли органический слой. Водный слой экстрагировали дополнительным количеством $EtOAc$. Объединяли органические слои, сушили над безводным Na_2SO_4 и выпаривали

растворитель при пониженном давлении. Полученный остаток очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя 70% смесью гексаны/(3:2 ацетон:ДХМ), с выделением указанного в заголовке соединения (2,4 г, 33%) в виде светло-желтого твердого вещества после удаления растворителя из хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): (³⁵Cl/³⁷Cl)

5 293/295 [M+1]⁺

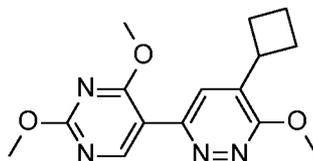
Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в подготовительном синтезе б.

№ синтеза	Химическое название	Структура	ЭР/МС (m/z) (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
44	Рац- <i>транс</i> -3-хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-4-(2-изопропилциклопропил)пиридазин		335/337
45	Рац-3-хлор-4-(2,2-дифторциклопропил)-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин		329/331
46	Рац- <i>транс</i> -3-хлор-4-[2-(диформетил)циклопропил]-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин		343/345
47	Рац- <i>транс</i> -3-хлор-4-[2-(1,1-дифторэтил)циклопропил]-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин		357/359
48	3-Хлор-4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин		307/309
49	3-Хлор-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-4-(3,3-диметилциклобутил)пиридазин		335/337

50	3-Хлор-4-(3,3-дифторциклобутил)-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин		343/345
51	3-Хлор-4-циклопентил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин		321/323

Подготовительный синтез 52

4-Циклобутил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метоксипиридазин



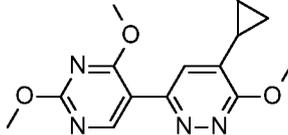
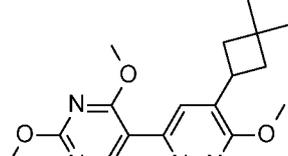
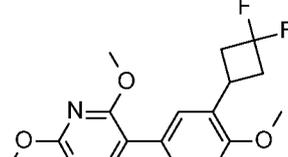
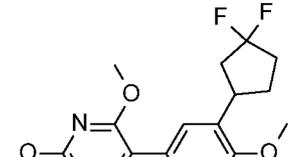
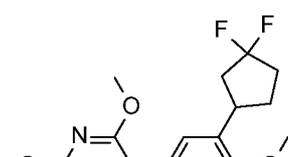
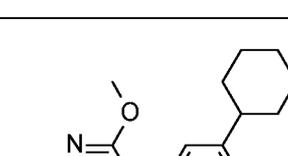
5

3-Хлор-4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин получали способами подготовительных синтезов 21 и 33 из циклобутилкарбоновой кислоты.

3-Хлор-4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)пиридазин (0,42 г, 1,4 ммоль) добавляли к раствору NaOMe, полученному растворением Na (0,16 г, 6,8 ммоль) в MeOH (12 мл). Нагревали смесь в колбе, закрытой пробкой, при 60 °С в течение ночи. Оставляли смесь остывать до комнатной температуры, добавляли 50% насыщенный водный раствор NaCl и экстрагировали ДХМ (3х). Объединяли органические слои и сушили над безводным MgSO₄. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (0,38 г, 93%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 303 (M+1).

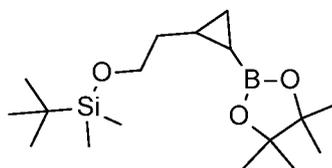
15

Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в подготовительном синтезе 52.

№ синтеза	Химическое название	Структура	ЭР/МС (m/z) (M+H)
53	4-Циклопропил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метоксипиридазин		289
54	5-[5-(3,3-диметилциклобутил)-6-метоксипиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидин		331
55	4-(3,3-дифторциклобутил)-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метоксипиридазин		339
56	4-(3,3-дифторциклопентил)-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метоксипиридазин (изомер 1)		353
57	4-(3,3-дифторциклопентил)-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метоксипиридазин (изомер 2)		353
58	4-Циклогексил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метоксипиридазин		331

Подготовительный синтез 59

Транс-трет-бутилдиметил-[2-[2-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)циклопропил]этокси]силан



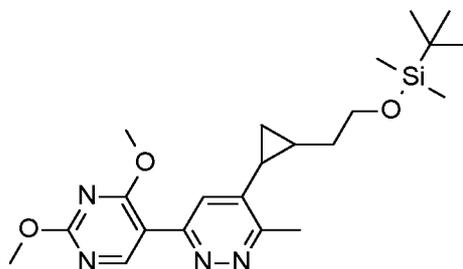
5

Может быть получен по существу так, как описано в синтезе 3 из доступного в продаже трет-бутилдиметил-[(E)-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)бут-3-енокси]силана. ¹H ЯМР (400,13 МГц, CDCl₃): 3,70-3,66 (м, 2H), 1,51-1,38 (м, 2H), 1,23 (с, 12H), 1,04-0,96 (м, 1H), 0,91 (с, 9H), 0,71-0,67 (м, 1H), 0,46-0,41 (м, 1H), 0,07 (с, 6H), -0,38 (дт, J= 9,3, 5,8 Гц, 1H).

10

Подготовительный синтез 60

Транс-трет-бутилдиметил-[2-[2-(4,4,5,5-тетраметил-2,4-диоксаборолан-5-ил)циклопропил]этокси]силан

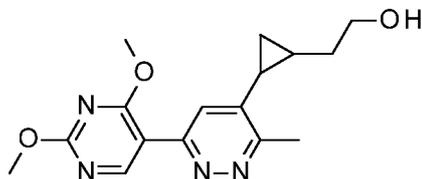


15

Может быть получен по существу так, как описано в синтезе 4. ЭР/МС (m/z): 417 (M+1).

Подготовительный синтез 61

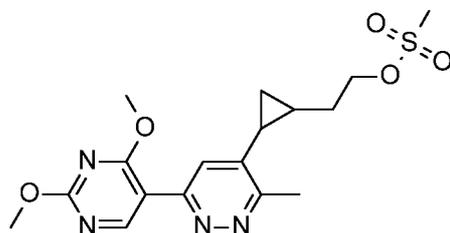
Транс-2-[2-[6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин-4-ил]циклопропил]этанол



5 Добавляли фторид тетрабутиламмония (5 мл, 5 ммоль, 1 М в ТГФ) и транс-трет-бутилдиметил-[2-[2-[6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин-4-ил]циклопропил]этокси]силан (1,15 г, 8,9 ммоль) в ДХМ (3 мл) и перемешивали при 60 °С в течение 1 часа. Охлаждали до комнатной температуры. Разбавляли ДХМ (80 мл) и промывали насыщенным раствором NH₄Cl (3x30 мл). Органические слои объединяли, сушили над безводным Na₂SO₄ и удаляли растворитель при пониженном давлении. Очищали хроматографией на силикагеле, элюент 0-30% MeOH/EtOAc, с получением указанного в заголовке соединения (0,53 г, 53%) в виде белого твердого вещества, после удаления растворителя из хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): 317 (M+1). 1H ЯМР (399,80 МГц, CDCl₃): 8,92 (с, 1H), 7,29 (м, 1H), 4,03 (с, 3H), 4,02 (с, 3H), 3,81 (т, J= 6,2 Гц, 2H), 2,76 (с, 3H), 1,73-(м, 3H), 1,26 (м, 2H), 1,03 (м, 2H).

Подготовительный синтез 62

20 Транс-2-[2-[6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин-4-ил]циклопропил]этилметансульфонат



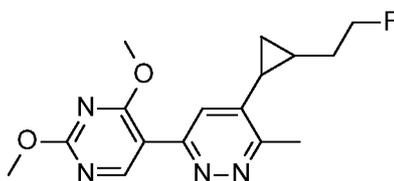
25 Метансульфонилхлорид (0,2 мл, 3 ммоль) добавляли к раствору транс-2-[2-[6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин-4-ил]циклопропил]этанола (0,390 г, 1,22 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (0,4 мл, 2 ммоль) в ДХМ (8 мл) при 0 °С в атмосфере N₂. Перемешивали при 0 °С в течение 40 минут. Разбавляли 50 мл ДХМ и промывали 5% NaHCO₃ (2 x 30 мл) и водой (30 мл). Объединяли органические слои,

сушили над безводным Na_2SO_4 и выпаривали растворитель при пониженном давлении. Очищали хроматографией на силикагеле, элюент: 0-20% MeOH/EtOAc , с получением указанного в заголовке соединения в виде коричневого твердого вещества (0,280 г, 58%), после удаления растворителя из хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): 395 (M+1).

5 ^1H ЯМР (399,80 МГц, CDCl_3): 8,98 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 4,37 (т, J= 6,2 Гц, 2H), 4,07 (с, 3H), 4,05 (с, 3H), 3,01 (с, 3H), 2,81 (с, 3H), 2,04 (м, 1H), 1,90-1,78 (м, 2H), 1,27 (м, 1H), 1,06 (т, J= 7,1 Гц, 2H).

Подготовительный синтез 63

10 Транс-2,4-диметокси-5-[6-метил-5-[2-(2-фторэтил)циклопропил]пиридазин-3-ил]пиримидин



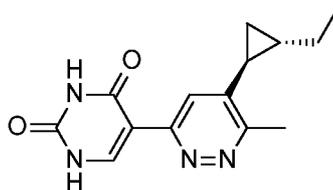
Гидрат фторида тетрабутиламмония (3 мл, 3 ммоль, 1 М в ТГФ) добавляли к
15 раствору транс-2-[2-[6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метилпиридазин-4-ил]циклопропил]этилметансульфоната (0,280 г, 0,71 ммоль) в ТГФ (3 мл). Нагревали при 70 °С в течение 2 часов. Охлаждали до комнатной температуры. Разбавляли EtOAc , промывали насыщенным водным раствором NaCl , сушили над безводным Na_2SO_4 и удаляли растворитель при пониженном давлении. Очищали хроматографией на
20 силикагеле, элюент: 0-20% MeOH/EtOAc , с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-желтого маслянистого вещества (0,170 г, 71%), после удаления растворителя из хроматографических фракций. ЭР/МС (m/z): 319 (M+1). ^1H ЯМР (399,80 МГц, CDCl_3): 9,01 (м, 1H), 7,39 (с, 1H), 4,67-4,52 (дт, J H-F 48 Гц, J= 6,7 Гц, 2H), 4,08 (с, 3H), 4,07 (с, 3H), 2,83 (с, 3H), 2,00-1,94 (м, 3H), 1,27 (м, 1H), 1,06 (м, 2H).

25 Хиральное разделение: колонка Lux Cellulose-4, 250 x 21 мм, скорость потока 70 г/мин., элюент: 40% MeOH/CO_2 .

Энантиомер 1 >99% э.и., Rt 2,59 мин. (Lux Cellulose-4, 4,6 x 150 мм, 40% MeOH/CO_2 , 5 мл/мин., 225 нм). Энантиомер 2 >99% э.и., Rt 3,34 мин. (Lux Cellulose-4, 4,6 x 150 мм, 40% MeOH/CO_2 , 5 мл/мин., 225 нм).

30

5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион



Растворяли изомер 1 5-[5-[(2-этилциклопропил)-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметокси-пиримидина (197 мг, 0,66 ммоль) в 1 М водном растворе HCl (4 мл) и нагревали полученную смесь до 70 °С в течение ночи. Охлаждали реакционную смесь до комнатной температуры, замораживали на бане из ацетона/сухого льда при -78 °С и удаляли растворитель лиофилизацией с получением указанного в заголовке соединения (0,176 г, 97%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 273 (M+H).

¹H ЯМР (d₆-ДМСО) δ: 1,00 (т, J= 7,3 Гц, 3H), 1,11-1,16 (м, 1H), 1,27-1,33 (м, 2H), 1,47-1,52 (м, 2H), 1,92-1,96 (м, 1H), 2,80 (с, 3H), 8,00 (с, 1H), 8,41 (д, J= 5,5 Гц, 1H), 11,73 (с, 1H), 11,99-11,91 (м, 1H).

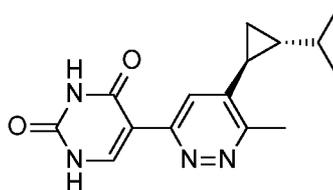
Альтернативный способ получения примеров 1-5

Перемешивали суспензию 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметокси-пиримидина (16,2 г, 51,5 ммоль) и 1 М водного раствора HCl (135 мл, 135 ммоль) при 45 °С в течение 16 часов. Охлаждали до комнатной температуры, добавляли 2 М водный раствор K₂HPO₄ до pH ~ 6 (приблизительно 150 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Отфильтровывали и собирали полученное твердое вещество, промывали водой и сушили в вакуумной печи при 45 °С в течение 16 часов с получением указанного в заголовке соединения (13,8 г, 93%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 273 (M+1).

Кристаллизация 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона

5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион растворяли в метаноле, перемешивали при 50 °С в течение 1 часа и оставляли остывать до комнатной температуры, при этом происходила его кристаллизация из раствора. Твердое вещество выделяли вакуумной фильтрацией и недолго сушили под вакуумом при 70 °С.

5-[5-[(1S,2R)-2-Изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион



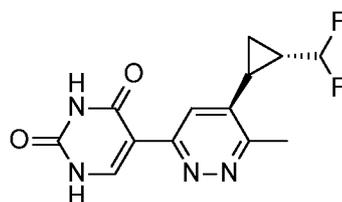
Изомер 1 транс-5-[5-[2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-2,4-
диметоксипиримидина (628 мг, 2,00 ммоль) растворяли в MeOH (3 мл). Добавляли 1 М
5 водный раствор HCl (5 мл) и нагревали до 70 °С в течение 3 часов. Охлаждали до
комнатной температуры, загружали реакционную смесь на СКО колонку, промытую
MeOH (20 г, Silicycle SILIABOND-п-толуолсульфоновая кислота), промывали СКО
колонку MeOH (140 мл) и элюировали требуемый продукт, используя 2 М NH₃/MeOH
(140 мл). Концентрировали фракции NH₃/MeOH с получением указанного в заголовке
10 соединения в виде твердого вещества кремового цвета (546 мг, 95%). ЭР/МС (m/z): 287
(M+H). ¹H ЯМР (d₆-DMCO) δ: 0,99 (м, 9H), 1,24 (м, 1H), 1,81 (м, 1H), 2,72 (с, 3H), 7,67 (с,
1H), 8,23 (с, 1H), 11,43 (шс, 2H).

Альтернативный способ получения примеров 1-5

15 Перемешивали суспензию 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-
метилпиридазин-3-ил]-2,4-диметоксипиримидина (21,5 г, 65,6 ммоль) и 1 М водного
раствора HCl (165 мл, 135 ммоль) при 45 °С в течение 16 часов. Охлаждали до комнатной
температуры и экстрагировали МТБЭ. Отбрасывали органическую фазу, а к водной фазе
добавляли 2 М водный раствор K₂HPO₄ до pH ~ 6 (приблизительно 150 мл). Полученную
20 смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Отфильтровывали и
собирали полученное твердое вещество, промывали водой и сушили в вакуумной печи
при 45 °С в течение 16 часов с получением указанного в заголовке соединения (14,3 г,
76%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 287 (M+1).

Пример 3

5-[5-[2-(Дифторметил)циклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион



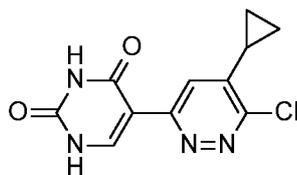
5-[5-[2-(Дифторметил)циклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион может быть получен по существу так, как описано в примере 1.

Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в примере 1.

№ Пример а	Химическое название	Структура	ЭР/МС (m/z) (M+H)
4	5-[6-метил-5-[rel-(1S,2S)-2-изобутилциклопропил]пиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион		301
5	5-[6-метил-5-[rel-(1S,2S)-2-(1,1-дифторэтил)циклопропил]пиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион		309
6	5-[5-[2-(1S,2S)-2-(Дифторметил)циклопропил]пиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион		281

Пример 7

5-(6-Хлор-5-циклопропилпиридазин-3-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион



5 1 M HCl (14 мл, 14 ммоль) добавляли к раствору 3-хлор-4-циклопропил-6-(2,4-диметоксипириимидин-5-ил)пиридазина (1,0 г, 3,4 ммоль) в MeOH (17 мл) и перемешивали при 50 °С в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении с получением указанного в заголовке соединения (0,9 г, 100%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): (³⁵Cl/³⁷Cl) 265/267

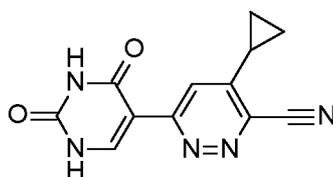
Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в примере 7.

№ Примера	Химическое название	Структура	ЭР/МС (m/z) (³⁵ Cl/ ³⁷ Cl)
8	5-[6-Хлор-5-[rel-(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]пиридазин-3-ил]-1H-пириимидин-2,4-дион		307/309
9	5-[6-Хлор-5-[rel-(1R)-2,2-дифторциклопропил]пиридазин-3-ил]-1H-пириимидин-2,4-дион		301/303
10	5-[6-Хлор-5-[(1S,2S)-2-(дифторметил)циклопропил]пиридазин-3-ил]-1H-пириимидин-2,4-дион		315/317
11	5-[6-Хлор-5-[rel-(1S,2S)-2-(1,1-дифторэтил)циклопропил]пиридазин-3-ил]-1H-пириимидин-2,4-дион		329/331

12	5-(6-Хлор-5-циклобутилпиридазин-3-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион; гидрохлорид		279/281
13	5-[6-Хлор-5-(3,3-диметилциклобутил)пиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион		307/309
14	5-[6-Хлор-5-(3,3-дифторциклобутил)пиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион		315/317
15	5-(6-Хлор-5-циклопентилпиридазин-3-ил)-1Н-пиримидин-2,4-дион		293/295

Пример 16

4-Циклопропил-6-(2,4-диоксо-1Н-пиримидин-5-ил)пиридазин-3-карбонитрил



5

Раствор 5-(6-хлор-5-циклопропилпиридазин-3-ил)-1Н-пиримидин-2,4-диона (А, 57 мг, 0,22 ммоль, 100% мас.) в ДМФА (1 мл, 12,9 ммоль) дегазировали с помощью N₂. Добавляли Zn(CN)₂ (20 мг, 0,22 ммоль), трис(дибензилиденацетон)дипалладий (0) (5 мг, 0,0054 ммоль) и 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен (6 мг, 0,011 ммоль) и дополнительно дегазировали с помощью N₂. Плотно закрывали крышкой и нагревали при 120 °С в течение ночи. Охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через диатомовую землю. Очищали обращенно-фазовой хроматографией (С18 Gold 15,5 г, градиент 5-20% АСН в 10 мМ растворе бикарбоната аммония; 20 об. кол.) с выделением указанного в

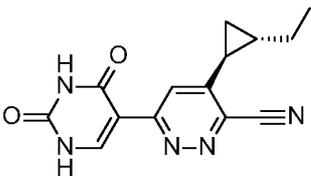
10

заголовке соединения (0,032 г, 58%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 256 (M+1).

Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в примере 16.

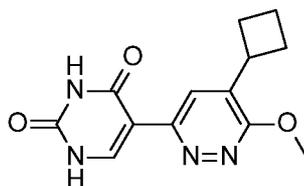
5

№ Пример а	Химическое название	Структура	ЭР/МС (m/z) (M+H)
17	6-(2,4-диоксо-1H-пиримидин-5-ил)-4-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]пиридазин-3-карбонитрил		298
18	6-(2,4-диоксо-1H-пиримидин-5-ил)-4-[rel-(1S,2S)-2-(дифторметил)циклопропил]пиридазин-3-карбонитрил		306
19	4-Циклобутил-6-(2,4-диоксо-1H-пиримидин-5-ил)пиридазин-3-карбонитрил		270
20	4-Циклопентил-6-(2,4-диоксо-1H-пиримидин-5-ил)пиридазин-3-карбонитрил		284
21	4-[(1S)-2,2-дифторциклопропил]-6-(2,4-диоксо-1H-пиримидин-5-ил)пиридазин-3-карбонитрил		292

22	6-(2,4-диоксо-1H-пиримидин-5-ил)-4-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]пиридазин-3-карбонитрил		284
----	---	--	-----

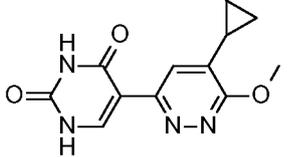
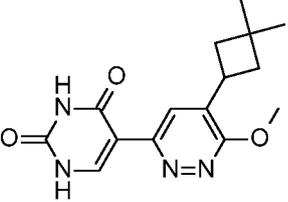
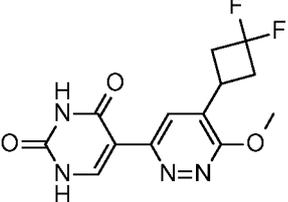
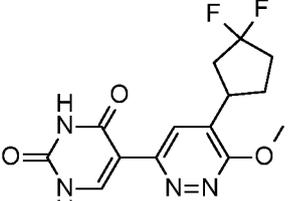
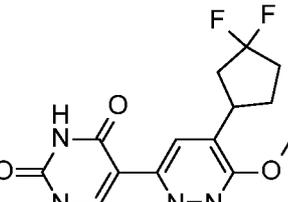
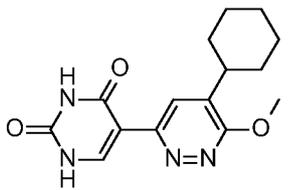
Пример 23

5 5-(5-Циклобутил-6-метоксипиридазин-3-ил)-1H-пиримидин-2,4-дион

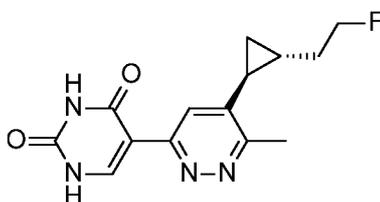


10 1 M HCl (5,2 мл, 5,2 ммоль) добавляли к 4-циклобутил-6-(2,4-диметоксипиримидин-5-ил)-3-метоксипиридазину (0,39 г, 1,3 ммоль) и перемешивали при 50 °С в течение 6 часов, затем при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Очищали на СКО картридже (10 г, элюенты 60 мл ДХМ, 60 мл 50% MeOH в ДХМ и 120 мл 50% 7 M NH₃ в MeOH в ДХМ) с получением указанного в заголовке соединения (0,337 г, 96%) в виде белого твердого вещества. ЭР/МС (m/z): 275 (M+1).

15 Следующие примеры могут быть получены по существу так, как описано в примере 23.

№ Примера	Химическое название	Структура	ЭР/МС (m/z) (M+H)
24	5-(5-Циклопропил-6-метоксипиридазин-3-ил)-1H-пиримидин-2,4-дион		261
25	5-[5-(3,3-диметилциклобутил)-6-метоксипиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион		303
26	5-[5-(3,3-дифторциклобутил)-6-метоксипиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион		311
27	5-[5-(3,3-дифторциклопентил)-6-метоксипиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион (изомер 1)		325
28	5-[5-(3,3-дифторциклопентил)-6-метоксипиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион (изомер 2)		325
29	5-(5-Циклогексил-6-метоксипиридазин-3-ил)-1H-пиримидин-2,4-дион		303

5-[5-[(1S,2R)-2-(2-Фторэтил)циклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион



5 HCl (1 M в H₂O, 2 мл, 2 ммоль) добавляли к энантиомеру 1 транс-2,4-диметокси-5-[6-метил-5-[2-(2-фторэтил)циклопропил]пиридазин-3-ил]пиримидина (0,043 г, 0,14 ммоль) и нагревали при 50 °С в течение ночи. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Очищали на СКО картридже (12 г, элюенты 70 мл MeOH, 70 мл 2 M NH₃ в MeOH) с получением указанного в заголовке соединения (0,037 г, 89%) в виде белого твердого
10 вещества. ЭР/МС (m/z): 291 (M+1).

Биологические анализы

В следующих анализах показано, что приведенные в качестве примера соединения по данному изобретению являются ингибиторами активности CD73 и пригодны для
15 лечения рака.

Экспрессия и очистка белка CD73

Человеческий CD73 с С-концевой меткой 6-HIS (аминокислоты 1-547) экспрессировали в клетках млекопитающих HEK293F посредством временной
20 трансфекции клеток геном CD73 и очищали с использованием Ni²⁺-аффинной и эксклюзионной хроматографии на Superdex 200. Мышиный CD73 с С-концевой меткой 6-HIS (аминокислоты 1-549) экспрессировали и очищали так, как описано выше. Крысиный CD73 с С-концевой меткой 6-HIS (аминокислоты 1-549) экспрессировали и очищали так,
как описано ранее.

Масс-спектрометрия для определения аденозина и очистка аденозина

Использовали автоматизированную систему экстракции Agilent 300 RapidFire (Agilent, Санта-Клара, штат Калифорния) с тремя ВЭЖХ насосами для четырехкомпонентных смесей, подключенную к трехквadrупольному масс-спектрометру Sciex 6500 (AB Sciex, Фремингем, штат Массачусетс) с поверхностным источником электрораспылительной ионизации (ИЭР). В систему масс-спектрометра RapidFire устанавливали многофазный картридж (G9203-80109) для твердофазной экстракции (SPE) RapidFire HILIC (H1).

Растворитель А, использованный для загрузки и промывания образцов, представлял собой 50 мМ формиат аммония с рН 4,0, содержащий 5% (об./об.) АСN. Растворитель В, использованный для элюирования образцов, представлял собой 0,3% раствор муравьиной кислоты + 2% гидроксида аммония в смеси 70% АСN/30% MeOH. Образцы последовательно анализировали посредством отбора 10 мкл на заборную петлю под вакуумом непосредственно из многолуночных планшетов. Загружали 10 мкл образца на картридж HILIC и промывали с помощью насоса 1 для четырехкомпонентных смесей, используя растворитель А при скорости потока 1,25 мл/мин. в течение 3000 мс. Задержанный аналит элюировали в масс-спектрометр с помощью насоса 3 для четырехкомпонентных смесей, используя растворитель В при скорости потока 1,25 мл/мин. в течение 3000 мс. Систему повторно уравнивали с помощью насоса 1 для четырехкомпонентных смесей, используя растворитель А при скорости потока 1,25 мл/мин. в течение 3000 мс.

Трехквadrупольный масс-спектрометр оснащали источником электрораспылительной ионизации (ИЭР) и изучали аналиты, используя контроль селективных реакций (SRM) в положительном режиме (M + H)⁺. Регистрировали аденозин при m/z 268,05/136,0 и аденозинмонофосфат при m/z 348,1/136,0. Рассчитывали значения отношения площадей для аденозина и аденозинмонофосфата, используя ¹³C5-аденозин и ¹⁵N5-АМФ в качестве внутренних стандартов, соответственно.

Биохимический анализ человеческого CD73

Целью данного анализа является идентификация и характеристика ингибиторов активности фермента CD73. Добавляли реакционные смеси (20 мкл), содержащие 2 мкМ аденозинмонофосфат (Sigma, №01930), 10 мМ Tris рН 7,5, 100 мМ NaCl, 0,01% BSA, 0,2 мМ октилглюкозид и 50 пМ белок CD73, в 384-луночный планшет (Nunc, №264573). Через 30 минут инкубации при комнатной температуре останавливали реакцию

посредством добавления 20 мкл стоп-раствора, содержащего 2% муравьиной кислоты и 10 мкМ $^{13}\text{C}5$ -аденозина (рибозы с меткой $^{13}\text{C}5$) (Cambridge Isotope Laboratories, №CLM-3678-0), затем добавляли 40 мкл dH_2O . Уровни аденозин- и аденозинрибозы- $^{13}\text{C}5$ (внутреннего стандарта) определяли с помощью масс-спектрометрии, как описано выше. Для

5 количественной оценки каждой реакции использовали отношение сигналов (интегрирование пика аденозина/интегрирование пика внутреннего стандарта аденозина). Процентное ингибирование рассчитывали по уравнению $\{\% \text{ ингибирование} = 100 \times [1 - (X - \text{MIN}) / (\text{MAX} - \text{MIN})]\}$, где X равен отношению сигналов в лунке, MAX равен среднему отношению сигналов контрольного образца с ДМСО, и MIN равен отношению сигналов

10 активности фермента в присутствии $>10X \text{ IC}_{50}$ известного конкурентного ингибитора. Для проведения скрининга каждое соединение испытывали в концентрации 50 мкМ в 1% ДМСО. Для каждого соединения определяли IC_{50} , испытывая каждое соединение в 10 концентрациях от 0,0025 до 50 мкМ (используя схему разбавления 1:3).

IC_{50} для 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона составила 0,028 мкМ.

IC_{50} для 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона составила 0,043 мкМ.

Все соединения из примеров, описанных в данном документе, демонстрировали значения IC_{50} менее 0,062 мкМ.

20

Анализ механизма человеческого CD73

Целью данного анализа является определения механизма действия рассматриваемого соединения. Анализ проводили так, как описано выше для биохимического анализа человеческого CD73. Каждое соединение испытывали в 8 разных

25 концентрациях от 0,023 до 50 мкМ, используя схему разбавления 1:3, но при 8 различных концентрациях АМФ от 0,023 до 50 мкМ, используя схему 3-кратного разбавления. Отношения площади для различных концентраций ингибитора и субстрата наносили на график с помощью программы GraphPad Prism 7.00, и проводили сглаживание с использованием специальной смешанной модели ингибирования для определения

30 значений V_{max} , K_m , K_i и альфа для ингибирования $\{(V_{\text{max,app}} = V_{\text{max}} / (1 + [I] / (\text{альфа} * K_i))$; $K_{m,app} = K_m * (1 + [I] / K_i) / (1 + [I] / (\text{альфа} * K_i))$; $Y = V_{\text{max,app}} * X / (K_{m,app} + X)$, где альфа, V_{max} , K_m и K_i являются общими для каждого соединения}.

Каждый из 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона и 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-

1Н-пиримидин-2,4-диона является неконкурентным ингибитором, который связывается с комплексом фермент-фосфат, но не с самим апоферментом.

Увеличение концентраций субстрата АМФ усиливает действие неконкурентных ингибиторов, например, 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона, поскольку снижается его значение IC₅₀, как показано в таблице 1.

АМФ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)
50,0	0,008327
16,7	0,006557
5,6	0,008799
1,9	0,02028
0,61	0,06279
0,21	0,1513
0,069	0,2903
0,023	0,4094

10 Анализ механизма мышиноного CD73

Целью данного анализа является оценка ингибиторов в отношении подавления ими активности мышиноного фермента CD73. Анализ проводили так, как описано выше для биохимического анализа человеческого CD73, за исключением того, что использовали 3 мкМ АМФ и 50 пМ мышинный фермент CD73.

15 IC₅₀ для 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-диона составила 0,175 мкМ.

Анализ человеческих клеток Calu6

20 Целью данного анализа является испытание соединений против CD73 в клеточном анализе. Клетки Calu6 (1500 клеток/лунка) выращивали в 96-луночном планшете, покрытом поли-D-лизином (BD, №356640), содержащем 100 мкл среды (MEM (Gibco, №11095-072) + 1% пирувата натрия (Gibco, №11360-070) + 1% NEAA (Gibco, №11140-050) + 10% FBS (Hyclone, №SH30071)). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем инкубировали в течение ночи при 37 °C / 5% CO₂.

25 Клетки дважды промывали аналитическим буфером (10 мМ Tris-HCl pH 7,2, 10 мМ D-

глюкозы, 1 мМ КСl, 125 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂)(90 мкл/лунка). Затем в каждую лунку добавляли 90 мкл аналитического буфера, затем добавляли 10 мкл на лунку АМФ и предварительной смеси соединения (50 мкМ АМФ, различные концентрации соединения в 1% ДМСО). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут.

5 Затем удаляли 10 мкл надосадочного раствора из каждой лунки и помещали в новый планшет, затем добавляли 20 мкл стоп-раствора (2% муравьиной кислоты, 1,2 мкМ аденозинрибозы-¹³C₅ (Cambridge Isotope Laboratories, №CLM-3678-0) и 90 мкл ddH₂O для масс-спектроскопического анализа. Уровни аденозин- и аденозинрибозы-¹³C₅ (внутреннего стандарта) определяли с помощью масс-спектрометрии (Agilent RapidFire),
10 как описано выше для биохимического анализа человеческого CD73. Процентное ингибирование также рассчитывали так, как описано выше.

IC₅₀ для 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона составила 0,0073 мкМ (соединение из примера 2).

15 IC₅₀ для 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона составила 0,028 мкМ.

Ex Vivo анализ ингибирования мишени

Целью данного анализа является испытание соединений против мышинового CD73 в крови мышей в *ex vivo* анализе. Животным (6 на группу) перорально вводили дозу
20 каждого соединения, составленного в 20% HPBCD (2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), рН 2, по достижении объема опухоли приблизительно 400 мм³. После лечения собирали кровь в гепариновые пробирки и использовали для *ex vivo* анализа превращения ¹³C₁₀-¹⁵N₅-АМФ в меченый аденозин, инозин и гипоксантин, как описано для *ex vivo* анализа, с использованием цельной крови, взятой у животных, подверженных лечению посредством
25 перорального введения дозы соединения.

5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион ингибировал превращение АМФ в аденозин, инозин и гипоксантин в цельной крови мышей, взятой у животных, которым вводили различные дозы указанного соединения, как показано в таблице 2.

Таблица 2. Ингибирование превращения АМФ в аденозин		
Группа	Ингибирование (%)	p-значение
Носитель	0,0	1,000
1 мг/кг	-10,6	0,9139
2,5 мг/кг	25,2	0,162
6,4 мг/кг	37,0	0,0127*
16 мг/кг	56,5	<0,0001*
40 мг/кг	88,6	<0,0001*
100 мг/кг	94,3	<0,0001*

*: статистическая значимость.

IC₅₀ для 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона составила 0,0073 мкМ.

5

In vivo анализ ингибирования человеческого CD73 в опухоли Calu6

Целью данного анализа является испытание соединений против человеческого CD73 в ксенотрансплантатных опухолях, полученных из раковых клеток Calu6 человека в анализе *in vivo* ингибирования мишени. Клетки Calu6 (ATCC) выращивали в среде HBSS с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Собирали субконфлюэнтные клетки с помощью трипсина и дважды промывали питательной средой без сыворотки.

Инициировали рост подкожной опухоли посредством инъекции 5×10^6 клеток в 1:1 смеси HBSS и MATRIGEL® (BD Biosciences, Франклин Лэйкс, штат Нью-Джерси) в заднюю боковую область «голых» мышей (The Harlon Laboratory). По достижении среднего объема опухоли приблизительно 400-500 мм³, животных случайным образом разделяли по размеру опухоли и массе тела и помещали в соответствующие указанные экспериментальные группы. После лечения собирали образцы опухоли (50-80 мг каждая) и перерабатывали в 1 мл ледяного экстракционного буфера, содержащего внутренние стандарты, как описано ниже.

В ступку для предварительного охлаждения добавляли полоску фольги и жидкий N₂. Каплю опухолевой ткани помещали на полоску фольги и добавляли жидкий N₂. Другую полоску фольги помещали поверх опухолевой ткани и отбивали пестиком до полного измельчения опухоли. 50 – 100 мг опухолевой ткани помещали в пробирки (Fishers Scientific, кат. № 02-681-302) и ставили на сухой лед. В пробирки добавляли одну гранулу металла (Qiagen, кат. № 69989) и 1 мл 80% метанола, содержащего внутренние

25

стандарты $^{13}\text{C}_5$ -аденозина, $^{13}\text{C}_5$ -АМФ, $^{15}\text{N}_5$ -ГТФ, $^{15}\text{N}_4$ -инозин-5'-монофосфата и ^{13}C - ^{15}N -гипоксантина (Cambridge Isotope Lab и Cayman Chemical), и хранили образцы при $-80\text{ }^\circ\text{C}$ до использования для анализа ЖХ/МС.

5 Также собирали кровь в гепариновые пробирки и использовали для *ex vivo* анализа превращения $^{13}\text{C}_5$ - $^{15}\text{N}_5$ -АМФ в меченый аденозин, инозин и гипоксантин, как описано для *ex vivo* анализа, с использованием цельной крови, взятой у животных, подверженных лечению посредством перорального введения дозы соединения.

10 Как показано в таблице 3, 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1Н-пиримидин-2,4-дион ингибировал превращение АМФ в аденозин в опухолях Calu6, обработанных различными дозами соединения.

Таблица 3. Ингибирование превращения АМФ в аденозин

Группа лечения соединением (мг/кг)	Ингибирование (%)	p-значение
0,0	0	1,000
1,0	39,1	0,0057*
2,5	68,5	<0,0001*
6,4	64,3	<0,0001*
16,0	77,5	<0,0001*
40,0	82,1	<0,0001*
100,0	89,3	<0,0001*

*: статистическая значимость.

15 **Анализ подавления Т-клеток**

Карбоксифлуоресцеин диацетат-сукцинимидиловый эфир (CFSE) использовали в качестве маркирующего агента. Человеческие РМВС или выделенные клетки CD4 ($0,5 \times 10^6$ – 1×10^8 клеток) промывали маркировочным буфером (RPMI 1640 с L-глутамином, GIBCO, кат. № 11875), содержащим 5% HI FBS (Gibco, № 10082), и суспендировали в 1 мл маркировочного буфера. Клетки смешивали с 110 мкл PBS, содержащей 50 мкМ CFSE (Biologend, кат. № 423801), и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Меченые клетки один раз промывали PBS, содержащим 5% HI FBS (Gibco, № 10082), и один раз нормальной средой для выращивания Т-клеток (X-Vivo 15, Lonza, кат. № 04-744Q), содержащей 1х пенициллина/стрептомицина, и суспендировали в питательной среде, использованной для клеток РМВС и CD4.

20

25

Активация и обработка Т-клеток

Человеческие РВМС с меткой CFSE (600000 клеток/мл) или клетки CD4 (500000 клеток/мл) смешивали с активатором человеческих Т-клеток Dynabeads® CD3/CD28 (Gibco, кат. № 11131D) в соотношении 1:1 клетки/гранулы и с человеческим ИЛ-2 (60 МЕ/мл, Roche, кат. №: 11011456001). Клетки помещали на водяную баню при 37 °С на 10 минут для предварительной активации Т-клеток. РВМС (125 мкл/лунка) или клетки CD4 (100 мкл/лунка) переносили в 96-луночный планшет (Costar 3799, Corning Inc.). Для испытания соединений с помощью РВМС, получали различные концентрации экспериментальных соединений в нормальной среде для выращивания клеток (125 мкл), содержащей 400-600 мкМ АМФ. Для испытания соединений с помощью клеток CD4, получали различные концентрации экспериментальных соединений в нормальной среде для выращивания клеток (100 мкл), содержащей 200-250 мкМ АМФ. Обработанные клетки выращивали при 37 °С, 5% CO₂ в течение 68-70 часов.

Среду (160 мкл), содержащую обработанные РВМС, переносили на планшет, а оставшуюся среду, которую использовали для анализа цитокинов, переносили на планшеты AcroPrep 96 (фильтровальные планшеты AcroPrep 96, Omega 3K NTRL, лунки по 350 мкл, Pall Life Science, кат. № 8033) для получения образцов для ЖХ-МС анализа метаболитов.

Среду (100 мкл), содержащую клетки CD4, переносили и фильтровали через планшеты AcroPrep в другой планшет посредством центрифугирования при 1500 g в течение 2 часов. Отфильтрованную среду (50 мкл/лунка) смешивали с таким же объемом 80% метанола, 1% NH₄OH и внутренних стандартов (250 нг/мл ¹³C5-АМФ и 250 нг/мл ¹³C5-аденозина) для ЖХ-МС анализа метаболитов.

Обработанные РВМС или клетки CD4 собирали и окрашивали для проточной цитометрии для количественного определения пролиферации Т-клеток.

Проточная цитометрия

РВМС или клетки CD4 окрашивали красителем Zombie Aqua (Biolegend, кат. № 423102, партия № B195875) в разбавлении 1:200 в DPBS в течение 15 минут с последующим блокированием с помощью ингибитора связывания человеческого рецептора Fc (eBioscience, кат. № 14-9161-73) в разбавлении 1:5 в течение 15 минут в буфере для проточного окрашивания (DPBS-2%НIFBS-0,5%BSA) на льду. РВМС окрашивали коктейлем окрашенного APC/Cy7 анти-человеческого CD3 (Biolegend, кат. № 300426, разбавление 1: 20), окрашенного APC античеловеческого CD4 (Biolegend, кат. №

317416, разбавление 1:20) и окрашенного красителем Pacific Blue античеловеческого CD8a (Biolegend, кат. № 300927, разбавление 1: 20), а клетки CD4 окрашивали окрашенным APC античеловеческим CD4 (Biolegend, кат. № 317416, разбавление 1:20) в буфере для проточного окрашивания в течение 30 минут на льду.

5 Проточные данные регистрировали с помощью BD FACS Verse. Каждый канал флуоресценции соответствующим образом компенсировали. Данные обрабатывали на FloJo версии 7.6.5 со следующей стратегией гейтирования: лимфоциты гейтировали на точечном графике зависимости FSC от SSC; жизнеспособные клетки лимфоцитов гейтировали на точечном графике зависимости SSC от Zombie Aqua; клетки CD3
10 жизнеспособных лимфоцитов гейтировали на точечном графике зависимости APC-Cy7 от Zombie Aqua; клетки CD4 и клетки CD8 клеток CD3 гейтировали на точечном графике зависимости APC от Pacific Blue; клетки CD4 и CD8 дополнительно гейтировали на точечных графиках зависимости APC от CFSE(FITC) и Pacific Blue от CFSE(FITC). Пролиферацию клеток CD4 и CD8 анализировали с помощью инструмента для
15 определения пролиферации. Индекс пролиферации (PI) определяли как общее количество клеток/исходное количество клеток, и % восстановления под действием соединения рассчитывали как $(PI_{\text{без АМФ без соед.}} - PI_{\text{образца}}) / (PI_{\text{без АМФ без соед.}} - PI_{\text{с АМФ без соед.}}) * 100$.

20 Как показано в таблице 4, ингибирование CD73 под действием 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона обеспечивает восстановление опосредованного аденозином ингибирования Т-клеточной пролиферации, которое коррелирует с дозозависимым снижением уровней аденозина в питательной среде.

Таблица 4. Восстановление опосредованного аденозином ингибирования пролиферации Т-клеток		
Соединение (мкМ)	Восстановление пролиферации Т-клеток (%)	Аденозин (мкМ)
5,00	107	0,017
1,66667	106	0,027
0,55556	104	0,046
0,18519	95	0,086
0,06173	37	0,15
0,02058	-2	0,21
0,00686	-3	0,28
0,00229	-6	0,28
0,00	0	0,30

Анализ цитокинов

5 Культуральную среду из обработанных PBMC разбавляли 1:7,5, 1:2,5 и 1:50 1x разбавителем ELISA/ELISPOT из наборов для твердофазного иммуноферментного анализа цитокинов и анализировали на TNF α , используя набор для твердофазного иммуноферментного анализа TNF-альфа человека Ready-SET-GO! (eBioscience, кат. № 88-7346-22), IL-1 β , используя набор для твердофазного иммуноферментного анализа IL-1 β человека Ready-SET-GO! (2^o поколение) (eBioscience, кат. № 88-7261-22), и IFN γ , используя набр для твердофазного иммуноферментного анализа IFN человека Ready-SET-GO! (eBioscience, кат. № 88-7316-22), по инструкциям производителя.

15 Как показано в таблице 5, ингибирование CD73 под действием 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона увеличивает уровни TNF- α в Т-клетках CD4⁺.

Соединение (мкМ)	TNF- α (пг/мл)
6,000	1985,5
2,000	1183,9
0,667	1618,1
0,222	1265,5
0,074	782,0
0,025	557,8
0,008	419,9
0,003	386,3
0,000	357,0

Как показано в таблице 6, ингибирование CD73 под действием 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона увеличивает уровни TNF- α в Т-клетках CD4⁺.

Соединение (мкМ)	INF- γ (пг/мл)
6,000	105,3
2,000	99,5
0,667	147,8
0,222	146,7
0,074	59,4
0,025	51,1
0,008	29,5
0,003	34,5
0,000	9,0

In Vivo модели

При необходимости можно осуществить доклиническое моделирование ингибирующего действия соединения по данному изобретению или его фармацевтически приемлемой соли в отношении CD73, например, в соответствии со способами, описанными в данной области техники, например, в публикации Rongvaux A, *et al.*, *Annual Rev. Immunology* 2013; 31: 635-74, и в литературных источниках, цитированных в указанном документе; Sanmamed MF, *et al.*, *Annals of Oncology* 2016; 27: 1190-1198, и в литературных источниках, цитированных в указанном документе.

ЖХ/МС анализ для измерения активности CD73 в сыворотке человека

Свежую кровь здорового человека центрифугировали при 1500 g в течение 15 минут при комнатной температуре и собирали верхнюю фракцию, содержащую сыворотку. Собранную сыворотку (25 мкл/лунка) переносили в 96-луночный планшет с глубокими лунками (DWP, Analytical Sales & Services Inc., кат. № 968820), содержащими различные концентрации соединения из примера 2 и фиксированную концентрацию левамизоля (1500 мкМ). После инкубации на льду в течение 60 минут в каждую лунку на планшете добавляли ¹³C5-¹⁵N5-АМФ (50 мкМ) и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем планшет ставили на сухой лед с добавлением 200 мкл на лунку 17.3 ТСА, после чего встряхивали при 26 к/с в течение 3 минут на приборе для встряхивания планшетов (Qiagen). Затем планшет центрифугировали при 2940 g в течение 20 минут при 4 °С. После центрифугирования переносили 100 мкл на лунку надосадочного раствора из каждого раствора в новый 96-луночный планшет с глубокими лунками и смешивали с 18,4 мкл на лунку 2,5 М Na₂CO₃ на льду, затем добавляли 200 мкл экстракционного раствора, содержащего внутренний стандарт (внутр. ст.: ¹³C5-АМФ, ¹³C5-аденозин, ¹³C5-гипоксантин и ¹⁵N4-инозин). После дополнительного центрифугирования при 2940 g в течение 20 минут при 4 °С использовали 200 мкл на лунку надосадочного раствора для анализа ¹³C10-¹⁵N5-аденозина, ¹³C10-¹⁵N5-инозина и ¹⁵N5-гипоксантина с помощью ЖХ/МС, как описано выше. Для расчета EC50 делали поправку концентраций ингибитора CD73 в сыворотке на несвязанную фракцию (%), полученную в компьютерных моделях или экспериментально.

В таблице 7 представлены данные об ингибировании активности CD73 в сыворотке человека под действием 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-диона (соединения из примера 2).

Соединение из примера 2 (мкМ)	Ингибирование (%)
4,6800	76,9
1,5600	71,1
0,5200	56,8
0,1733	39,6
0,0578	25,4
0,0193	15,4
0,0064	8,4
0,0021	3,7
0,0007	0,7
0	0,0

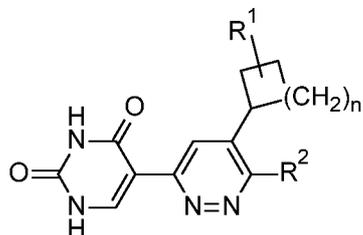
В таблице 8 представлены данные об ингибировании активности CD73 в сыворотке человека под действием некоторых соединений, описанных в данном документе.

5

Пример	EC50 (мкМ)
1	0,1
2	0,213
3	0,051
8	0,179
9	0,297
10	0,055
22	0,212

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Соединение формулы:



5

где n равен 0-3;

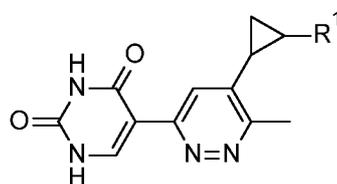
R¹ представляет собой -H, -F, -гем-дифтор, -гем-диметил, -C₁₋₄ алкил, -CHF₂, -CHF₂CH₃ или -CH₂CH₂F; и

-R² выбран из -H, -CH₃, -F, -Cl, -CN или -OCH₃;

или его фармацевтически приемлемая соль.

10

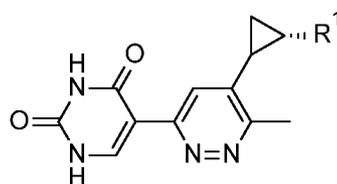
2. Соединение в соответствии с формулой по п. 1, представляющее собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

15

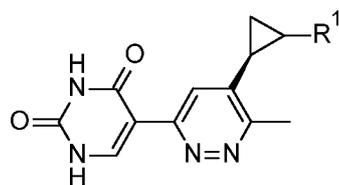
3. Соединение в соответствии с формулой по п. 1 или п. 2, представляющее собой:



20

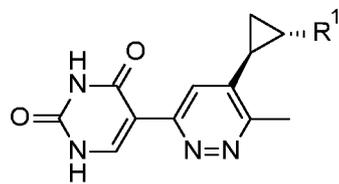
или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-3, представляющее собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-4, представляющее собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

10

6. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что n равен 0, R¹ представляет собой –C₁₋₄ алкил, и R² представляет собой –CH₃,

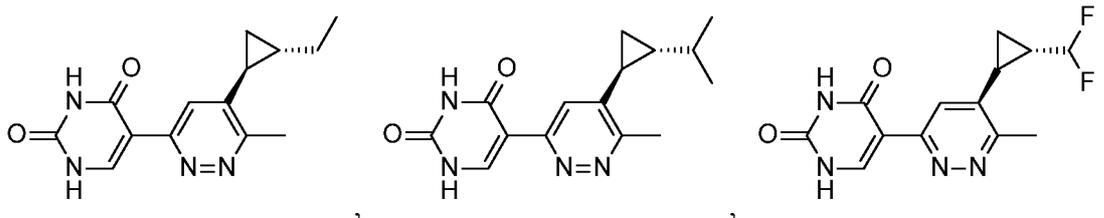
или его фармацевтически приемлемая соль.

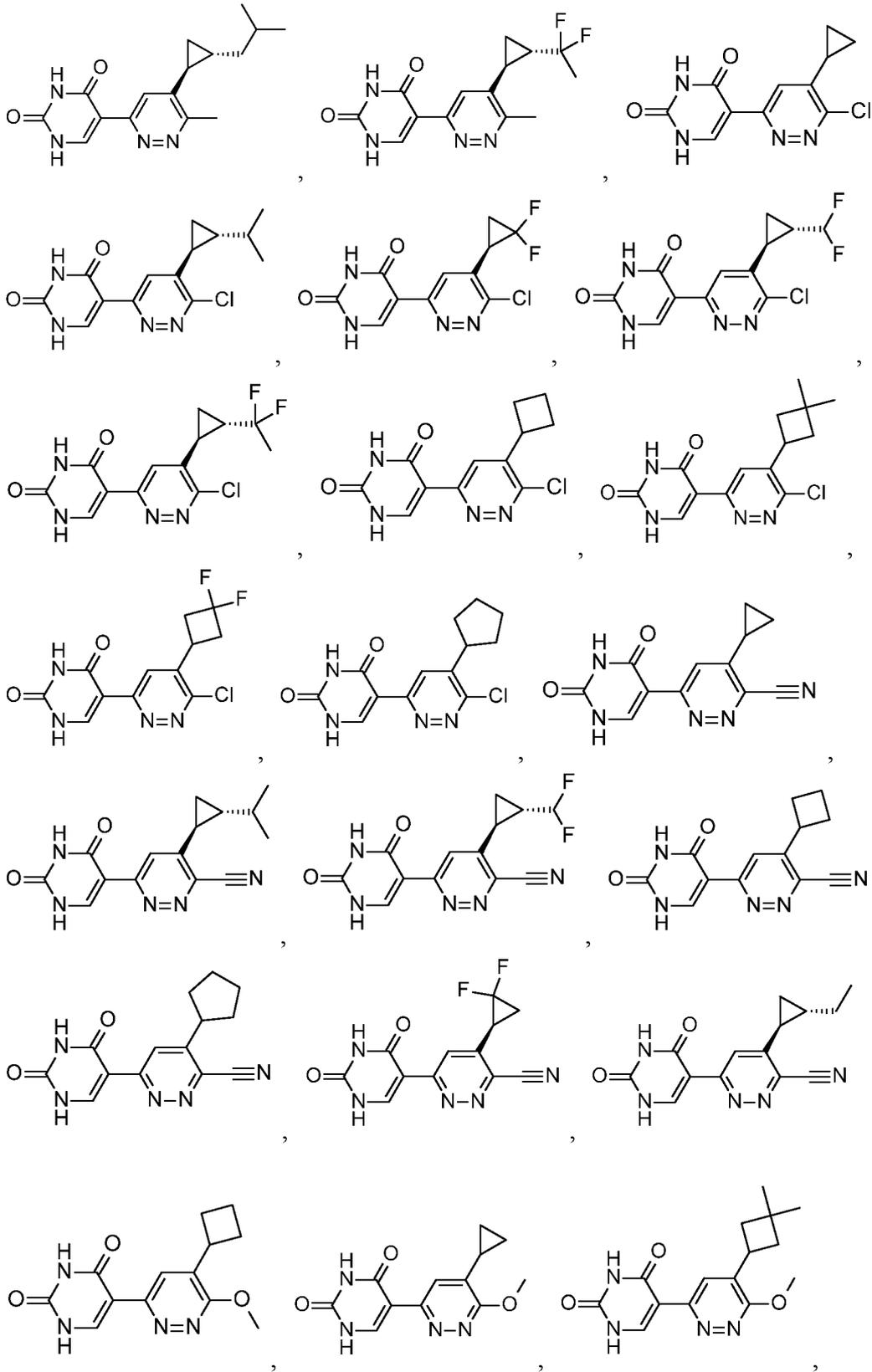
15

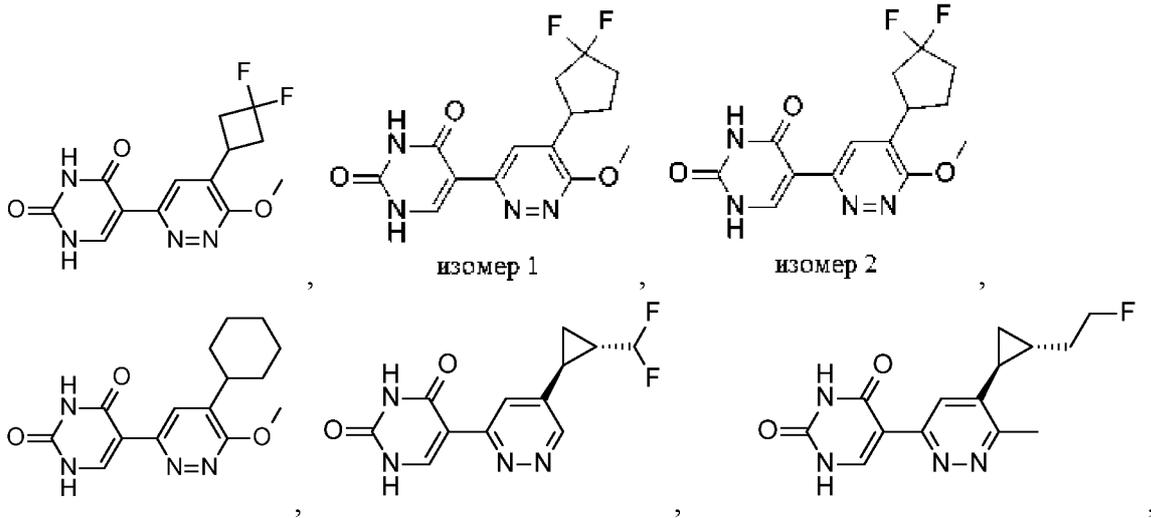
7. Соединение в соответствии с формулой по п. 6, отличающееся тем, что R¹ представляет собой изопропил, или его фармацевтически приемлемая соль.

8. Соединение в соответствии с формулой по п. 1, представляющее собой

20



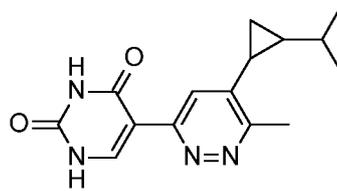




5 или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-8, представляющее собой:

10

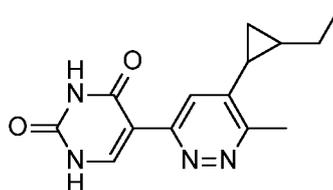


или его фармацевтически приемлемая соль.

15

10. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-9, представляющее собой 5-[5-[(1S,2R)-2-изопропилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-8, представляющее собой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

5

12. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-8 или 11, представляющее собой 5-[5-[(1S,2S)-2-этилциклопропил]-6-метилпиридазин-3-ил]-1H-пиримидин-2,4-дион, или его фармацевтически приемлемая соль.

10

13. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемую соль и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

15

14. Способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли,

20

причем рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак толстой и прямой кишки, рак толстой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, лимфому, медуллобластому, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак почек.

25

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что пациент представляет собой пациента, в сыворотке которого определена активность CD73.

16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что пациент представляет собой пациента, в ткани которого определена экспрессия CD73.

17. Способ, включающий определение активности CD73 в сыворотке пациента, которому введено соединение по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемая соль.

5 18. Способ, включающий определение экспрессии CD73 в ткани пациента, которому введено соединение по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемая соль.

10 19. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии.

20. Соединение в соответствии с формулой по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемая соль для применения для лечения рака.

15 21. Соединение для применения по п. 20, отличающееся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак толстой и прямой кишок, рак толстой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, лимфому, медуллобластому, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или
20 рак почек.

22. Применение соединения в соответствии с формулой по любому из пп. 1-12 или его фармацевтически приемлемой соли для производства лекарственного средства для лечения рака.

25 23. Применение по п. 22, отличающееся тем, что рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, холангиокарциному, рак толстой и прямой кишок, рак толстой кишки, рак желудка, рак желчного пузыря, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, лимфому, медуллобластому, меланому, рак
30 яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак почек.