

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040467

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.07

(21) Номер заявки
202090486

(22) Дата подачи заявки
2015.05.11

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)
A61K 31/5025 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СПИНАЛЬНОЙ МЫШЕЧНОЙ АТРОФИИ

(31) 61/993,839

(32) 2014.05.15

(33) US

(43) 2020.06.30

(62) 201692280; 2015.05.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Ф. ХОФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (CH);
ПТС ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

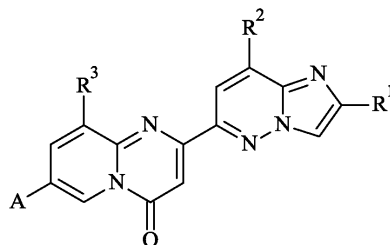
Ратни Хасан (FR), Грин Люк (CH),
Нарышкин Николай А., Витолл
Марла Л. (US)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

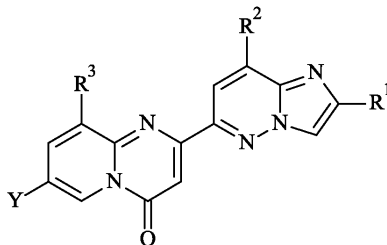
(56) WO-A2-2013119916
WO-A1-2010019326
WO-A2-2009151546

(57) В настоящем изобретении предложен способ получения соединений формулы (I)



(I)

где A, R¹, R², R³ и A являются такими, как здесь описано, при котором осуществляют реакцию ароматического нуклеофильного замещения между соединением формулы (VI)



(VI)

и соединением формулы M-A посредством нагревания в растворителе, где A, R¹, R² и R³ являются такими, как определено здесь, Y является галогеном или трифторметансульфонатом, M представляет собой водород, натрий или калий, и где M связана с A через атом азота A.

B1

040467

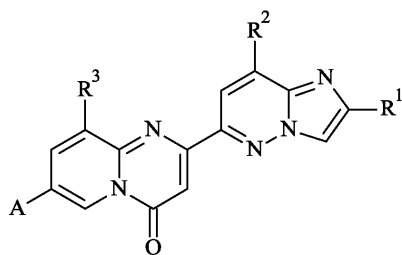
040467

B1

Введение

В настоящем изобретении предложены соединения, которые являются модуляторами сплайсинга гена SMN2, их получению, содержащим их фармацевтическим композициям и их применению в качестве лекарственных средств для лечения спинальной мышечной атрофии (SMA).

В частности, настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I)



(I)

где A, R¹, R² и R³ являются такими, как здесь описано, и их фармацевтически приемлемые соли.

Уровень техники

Спинальная мышечная атрофия (SMA), в самом широком смысле, представляет собой группу наследственных и приобретенных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС), характеризующихся прогрессирующей потерей двигательных нейронов в спинном мозге и стволе головного мозга, вызывающей мышечную слабость и атрофию мышц. Наиболее распространенная форма спинальной мышечной атрофии является результатом мутаций в гене выживаемости двигательных нейронов (SMN) и обнаруживается, с различной степенью тяжести, как у детей младшего возраста, так и у взрослых людей (Crawford and Pardo, Neurobiol. Dis., 1996, 3:97).

Детская спинальная мышечная атрофия является наиболее тяжелой формой этого нейродегенеративного заболевания. Симптомы включают мышечную слабость, низкий мышечный тонус, слабый крик, слабость или склонность к падению, затруднения при сосании или глотании, накопление секретов в легких или горле, затруднения с кормлением и повышенную восприимчивость к инфекции дыхательных путей. Довольно часто ноги являются более слабыми, чем руки, и не достигаются основные этапы развития ребенка, такие как поднятие головы или способность сидеть прямо. Как правило, чем раньше проявляются симптомы, тем короче продолжительность жизни. Как только разрушаются клетки двигательных нейронов, так вскоре после этого начинают проявляться симптомы. Тяжелые формы заболевания заканчиваются смертельным исходом, и для всех форм не известны способы лечения. Течение спинальной мышечной атрофии напрямую связано со скоростью разрушения клеток двигательных нейронов и степенью тяжести возникающего состояния слабости. Младенцы с тяжелой формой спинальной мышечной атрофии часто подвержены респираторному заболеванию вследствие слабости мышц, которые поддерживают дыхание. Дети с более легкими формами спинальной мышечной атрофии живут значительно дольше, хотя и они могут нуждаться в экстенсивной медицинской помощи, в частности те дети, которые страдают более тяжелой формой из многообразия форм этого заболевания. Клиническое многообразие заболеваний спинальной мышечной атрофией подразделяют на следующие пять групп.

(a) SMA типа 0 (внутриутробная спинальная мышечная атрофия) является наиболее тяжелой формой заболевания и возникает до рождения ребенка. Обычно первым симптомом SMA типа 0 является пониженная подвижность плода, которая может быть замечена первый раз между 30 и 36 неделями беременности. После рождения, новорожденные мало двигаются и имеют затруднения с глотанием и дыханием.

(b) SMA типа 1 (младенческая спинальная мышечная атрофия или болезнь Верднига-Гоффманна) проявляет первые симптомы между 0 и 6 месяцами. Этот тип SMA является также очень тяжелой формой. Пациенты никогда не достигают способности сидеть, и если не применяется вспомогательная искусственная вентиляция легких, то пациенты обычно погибают в течение первых 2 лет.

(c) SMA типа 2 (промежуточная форма спинальной мышечной атрофии) возникает в возрасте 7-18 месяцев. Пациенты достигают способности сидеть без поддержки, но никогда не могут стоять или ходить без посторонней помощи. Прогноз в этой группе зависит в основном от степени респираторного поражения.

(d) SMA типа 3 (спинальная юношеская мышечная атрофия или болезнь Кугельберга-Веландера) обычно диагностируется после 18 месяцев. Пациенты, страдающие SMA типа 3, способны в какой-то момент в процессе течения заболевания самостоятельно ходить, но часто становятся прикованными к инвалидному креслу в юношестве или в зрелом возрасте.

(e) SMA типа 4 (взрослая форма спинальной мышечной атрофии). Слабость обычно проявляется на последней стадии юношеского развития в мышцах языка, рук или ног, и затем прогрессирует в мышцах других областей организма. Течение взрослой формы спинальной мышечной атрофии идет значительно медленнее и мало влияет или не влияет на ожидаемую продолжительность жизни.

Ген SMN картирован с помощью анализа сцепления с комплексной областью на хромосоме 5q. У людей, эта область содержит инвертированную дупликацию приблизительно 500 тысяч пар оснований

(kb), дающую в результате две практически одинаковые копии гена SMN. Спинальная мышечная атрофия вызывается инактивирующей мутацией или делецией теломерной копии гена (SMN1) в обеих хромосомах, что приводит к потере функции гена SMN1. Однако у всех пациентов сохраняется центромерная копия гена (SMN2), и число копий гена SMN2 у пациентов, страдающих спинальной мышечной атрофией, находится в обратной зависимости от тяжести заболевания; то есть, пациенты с менее тяжелой формой спинальной мышечной атрофии имеют больше копий SMN2. Тем не менее, SMN2 не способен компенсировать полностью потерю функции SMN1 вследствие альтернативного сплайсинга экзона 7, вызванного трансляционно молчащими C/T мутациями в экзоне 7. В результате, большая часть транскриптов, продуцируемых из SMN2, испытывает недостаток в экзоне 7 (SMN2 A7) и кодирует процессированный белок Smpn, который имеет нарушенную функцию и быстро разлагается.

Считается, что белок SMN играет роль в процессинге и метаболизме РНК, обладая хорошо выраженной функцией опосредования сборки специфического класса комплексов РНК- белок, называемых snRNP (малыми ядерными нуклеопротеидами). SMN может обладать другими функциями в двигательных нейронах, однако его роль в предотвращении в селективной дегенерации двигательных нейронов еще не достаточно изучена.

В большинстве случаев, спинальная мышечная атрофия (SMA) диагностируется на основе клинических симптомов и путем проведения теста на присутствие, по меньшей мере одной копии гена SMN1. Однако, приблизительно в 5% случаев, спинальная мышечная атрофия вызывается в результате мутации в генах, а не инактивации SMN1, некоторые из которых известны, а другие еще не изучены. В ряде случаев, когда проведение теста на ген SMN1 затруднено или этот тест не обнаруживает никакого нарушения, могут быть рекомендованы другие тесты, такие как электромиография (EMG) или биопсия мышечной ткани.

В настоящее время лечение пациентов со спинальной мышечной атрофией ограничено поддерживающей терапией, включающей использование респираторных, диетологических и реабилитационных мер; и не известно лекарственное средство, которое устраняло бы причину возникновения заболевания. Общепринятое в настоящее время лечение спинальной мышечной атрофии включает предотвращение и терапию вторичных эффектов хронической потери нейромоторных единиц. Главным моментом в терапии SMA типа 1 является предотвращение и раннее лечение легочных осложнений, которые являются причиной смерти в большинстве случаев. Несмотря на то, что некоторые младенцы, страдающие спинальной мышечной атрофией, доживают до взрослого возраста, тем не менее, ожидаемая продолжительность жизни младенцев с SMA типа 1 составляет менее чем два года.

Были разработаны несколько моделей спинальной мышечной атрофии на мышах. В частности, модель SMN дельта экзон 7 ($\Delta 7$ SMN) (Le et al., Hum. Mol. Genet, 2005, 14:845) содержит как ген SMN2, так и несколько копий SMN2 $\Delta 7$ кДНК, и повторяет многие из фенотипических особенностей SMA типа 1. Модель SMN $\Delta 7$ может быть использована как для исследований экспрессии SMN2, так и для оценки двигательной функции и продолжительности жизни. Модель мышей с C/C-аллелем (Jackson Laboratory strain #008714, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) предлагает модель менее тяжелой формы заболевания спинальной мышечной атрофии, в которой мыши имеют пониженные уровни как полноцепочечной SMN2 мРНК, так и белка Smpn. Фенотип мыши с C/C-аллелем имеет ген SMN2 и гибридный mSMN1-ген SMN2, который подвергают альтернативному сплайсингу, но который не имеет выраженной мышечной слабости. Модель мыши с C/C-аллелем используют для исследований экспрессии SMN2.

В результате более глубокого понимания генетических основ спинальной мышечной атрофии были исследованы несколько стратегий лечения, но ни одна из них не дала положительных результатов при клинических испытаниях.

Замещение гена SMN1, используя вирусные векторы для доставки, и замещение клеток, используя дифференцированные SMN1+/+ стволовые клетки, продемонстрировали эффективность на животных моделях спинальной мышечной атрофии. Перед тем как эти подходы могут быть применены на людях, необходимо проведение дальнейших исследований для определения безопасности и иммунного ответа и для обоснования требования инициирования лечения на неонатальной стадии.

Была также достигнута коррекция альтернативного сплайсинга SMN2 в культивированных клетках с использованием в качестве терапевтических средств синтетических нуклеиновых кислот: (i) антисмысловых олигонуклеотидов, которые целенаправленно воздействуют на элементы последовательности в SMN2 пре-мРНК и сдвигают направление реакции сплайсинга в сторону образования полноразмерной SMN2 мРНК (Passini et al., Sci. Transl. Med., 2011, 3:72ra 18; и Hua et al., Nature, 2011, 478:123) и (ii) молекул РНК, подвергнутых трансплайсингу, которые обеспечивают полнофункциональную РНК последовательность, которая замещает мутантный фрагмент в процессе сплайсинга и образует полноразмерную SMN1 мРНК (Coady and Lorson, J Neurosci., 2010, 30:126).

Другие изучаемые подходы включают поиск лекарственных средств, которые повышают уровни Smpn, усиливают остаточную функцию Smpn или компенсируют потери Smpn. Было показано, что аминокосиды усиливают экспрессию стабилизированного Smpn, продуцируемого из SMN2 $\Delta 7$ мРНК путем промотирования трансляционного сквозного прочтения aberrантного стоп-кодона, но они характери-

зуются низким проникновением в центральную нервную систему и проявляют токсичность при повторном дозировании. Было показано, что химиотерапевтические средства, такие как акларубин, повышают содержание Smn в клеточной культуре; однако токсические свойства этих лекарственных средств препятствуют их длительному использованию у пациентов со спинальной мышечной атрофией. Некоторые лекарственные средства, проходящие клинические испытания в отношении лечения спинальной мышечной атрофии, включают активаторы транскрипции, такие как ингибиторы гистондеацетилазы ("HDAC") (например, бутираты, вальпроевая кислота и гидроксимочевина), и стабилизаторы мРНК (ингибитор декапирования мРНК RG3039 фирмы Repligen), предназначенные для повышения количества общей РНК, транскрибированной из гена SMN2. Однако применение ингибиторов HDAC или стабилизаторов мРНК не затрагивает первопричину возникновения спинальной мышечной атрофии и может вызывать у людей общее повышение транскрипции и экспрессии гена с возможными проблемами безопасности препаратов.

При альтернативном подходе, для исследований были выбраны нейропротективные средства, такие как олесоксим. Такие стратегии направлены не на продуцирование функционального Smn для лечения спинальной мышечной атрофии, а на поиск возможности защитить Smn-дефицитные двигательные нейроны от нейродегенерации.

Система, предназначенная для выявления соединений, которые повышают включение экзона 7 гена SMN в РНК, транскрибированную из гена SMN2, и выявленные с помощью этой системы конкретные соединения бензооксазола и бензоизоксазола описаны в международной патентной заявке WO 2009/151546 A1. Система, предназначенная для выявления соединений, которые продуцируют стабилизированный белок Smn из SMN2 $\Delta 7$ мРНК, и выявленные с помощью этой системы конкретные соединения изоиндолинона описаны в международной патентной заявке WO 2010/019236 A1 и WO 2013/119916 A2.

Несмотря на достигнутый прогресс в понимании генетических основ и патофизиологии спинальной мышечной атрофии, тем не менее, все еще существует необходимость в выявлении соединений, которые изменяют течение спинальной мышечной атрофии, одного из самых тяжелых детских неврологических заболеваний.

Подробное описание изобретения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, можно использовать на практике или при тестировании изобретения подходящие способы и материалы описаны ниже.

Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие источники, упоминаемые в настоящем изобретении, включены сюда посредством ссылки во всей их полноте.

Номенклатура, используемая в данной заявке, основана на систематической номенклатуре ИЮПАК, если не указано иное.

Все открытые валентности, появляющиеся на углероде, кислороде, сере или атоме азота в структуре в настоящем изобретении указывают на наличие водорода, если не указано иное.

Определения, описанные здесь, применяются независимо от того, используются ли они по отдельности или в комбинации. Предполагается, что определения, описанные здесь, могут быть добавлены с образованием химически-релевантных комбинаций, таких, как "гетероциклоалкиларил", "галогеналкилгетероарил", "арилалкилгетероциклоалкил", или "алкоксиалкил". Последний член комбинация представляет собой радикал, который связан с остатком молекулы. Другие члены комбинации присоединены к соединяющему радикалу в обратном порядке по отношению к литеральной последовательности, т.е. комбинация amino-C₁₋₇алкил относится к C₁₋₇алкилу, который является замещенным amino, или, например, комбинация арилалкилгетероциклоалкил относится к гетероциклоалкильному радикалу, который замещен алкилом, который в свою очередь замещен арилом.

Термин "остаток" относится к атому или группе химически связанных атомов, которые присоединены к другому атому или молекуле посредством одной или более химических связей, образуя таким образом часть молекулы. Например, переменные A, R¹, R² и R³ в формуле (I) относятся к остаткам, которые присоединены к ядру структуры формулы (I) посредством ковалентной связи.

При указании числа заместителей, термин "один или более" обозначает диапазон от одного заместителя, до максимально возможного числа замещения, т.е. замену одного атома водорода до замены всех атомов водорода на заместители.

Термин "возможный" или "возможно" означает, что описанные далее события или обстоятельства, могут, но не обязательно должны присутствовать, и что описание включает случаи, когда события или обстоятельства присутствуют и случаи, в которых это не так.

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

Термин "замещенный" означает, что указанная группа несет один или несколько заместителей. Если какая-либо группа может нести несколько заместителей и предложены разные возможные заместители

ли, заместители выбраны независимо и не должны быть одинаковыми. Термин "незамещенный" означает, что указанная группа не несет заместителей. Термин "возможно замещенный" означает, что указанная группа является незамещенной или замещена одним или более заместителями, независимо выбранными из группы возможных заместителей. При указании числа заместителей, термин "один или более" означает от одного заместителя до максимально возможного числа замещения, т.е. от замены одного атома водорода до замены всех атомов водорода на заместители.

Термины "соединение (соединения) данного изобретения" и "соединение (соединения) настоящего изобретения" относятся к соединениям как раскрыто в настоящем изобретении и их стереоизомерам, таутомерам, сольватам и солям (например, фармацевтически приемлемым солям).

Когда соединения настоящего изобретения являются твердыми, квалифицированному специалисту понятно, что эти соединения, и их сольваты и соли, могут существовать в различных твердых формах, в частности различных кристаллических видах, каждый из которых находится в рамках объема настоящего изобретения и конкретных формул.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" обозначает соли, которые не являются биологически или иным образом нежелательными. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли а также основно-аддитивные соли.

Термин "фармацевтически приемлемая кислотно-аддитивная соль" означает те фармацевтически приемлемые соли, которые образованы с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, угольная кислота, фосфорная кислота, и органическими кислотами, выбранными из алифатических, циклоалифатических, ароматических, ариалифатических, гетероциклических, карбоновых и сульфоновых органических кислот, таких как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, гликолевая кислота, глюконовая кислота, молочная кислота, пировиноградная кислота, шавелевая кислота, яблочная кислота, малеиновая кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, винная кислота, лимонная кислота, аспарагиновая кислота, аскорбиновая кислота, глутаминовая кислота, антралиловая кислота, бензойная кислота, коричневая кислота, миндальная кислота, эмбоновая кислота, фенилуксусная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота и салициловая кислота.

Термин "фармацевтически приемлемые основно-аддитивная соль" означает те фармацевтически приемлемые соли, которые образованы с органическим или неорганическим основанием. Примеры приемлемых неорганических оснований, включают соли натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца и алюминия. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических нетоксичных оснований включают соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая природные замещенные амины, циклических аминов и основных ионообменных смол, таких как изопропиламин-, триметиламин-, диэтиламин-, триэтиламин-, трипропиламин-, этаноламин-, 2-диэтиламиноэтанол-, триметамин-, дициклогексиламин-, лизин-, аргинин-, гистидин-, кофеин-, прокаин-, гидабамин-, холин-, бетаин-, этилендиамин-, глюкозамин-, метилглюкамин-, теобромин-, пурин-, пиперазин-, пиперидин-, N-этилпиперидин-, и полиаминовые смолы.

Стереохимические определения и условные обозначения, используемые здесь, как правило, соответствуют S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. При описании оптически активного соединения префиксы D и L или R и S, используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(ов). Заместители, присоединенные к рассматриваемому хиральному центру ранжируются в соответствии с Sequence Rule of Cahn, Ingold и Prelog. (Cahn et al. Angew. Chem. Inter. Edit. 1966, 5, 385; errata 511). Префиксы D и L или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения плоскости поляризованного света соединением, причем (-) или L обозначает, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или D является правовращающим.

Термин "хиральный центр" означает атом углерода, связанный с четырьмя неодинаковыми заместителями. Термин "хиральный" означает способность неналожения на зеркальное отображение, хотя термин "ахиральный" относится к воплощениям, которые являются наложимыми на свое зеркальное изображение. Хиральные молекулы являются оптически активными, т.е. они обладают способностью вращать плоскость поляризованного света.

Соединения настоящего изобретения могут иметь один или несколько хиральных центров и могут существовать в форме оптически чистых энантиомеров, смесей энантиомеров, таких как, например, рацематы, оптически чистые диастереоизомеры, смеси диастереоизомеров, диастереоизомерных рацематов или смесей диастереоизомерных рацематов. В случае, когда хиральный центр присутствует в химической структуре, предполагается, что все стереоизомеры, связанные с этим хиральным центром, охватываются настоящим изобретением.

Термины "галло", "галоген", и "галид" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо и обозначают фтор, хлор, бром, или йод. Одним конкретным примером галогена является фтор.

Термин "алкил" означает одновалентную линейную или разветвленную насыщенную углеводородную группу, содержащую от 1 до 12 атомов углерода. В частных воплощениях алкил обладает от 1 до 7

атомами углерода, и в более конкретных воплощениях от 1 до 4 атомами углерода. Примеры алкила включают метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, изо-бутил, втор-бутил или трет-бутил. Конкретными примерами алкила являются метил и этил.

Термин "галоалкил" означает алкильную группу, где по меньшей мере один из атомов водорода алкильной группы заменен одинаковыми или различными атомами галогена, в частности атомами фтора. Примеры галогеналкила включают монофтор-, дифтор- или трифторметил, этил или пропил, например 3,3,3-трифторпропил, 2-фторэтил, 2,2,2-трифторэтил, фторметил или трифторметил и т.п. Термин "пергалоалкил" означает алкильную группу, в которой все атомы водорода алкильной группы заменены одинаковыми или разными атомами галогена.

Термин "бициклическая кольцевая система" обозначает два кольца, которые конденсированы друг с другом посредством общей одинарной или двойной связи (аннелированная бициклическая система), через последовательность из трех или более общих атомов (мостиковые бициклические кольцевые системы) или через один общий атом (спиробициклическая кольцевая система). Бициклические системы могут быть насыщенными, частично ненасыщенными, ненасыщенными или ароматическими. Бициклические кольцевые системы могут содержать гетероатомы, выбранные из N, O и S.

Термин "циклоалкил" означает одновалентную насыщенную моноциклическую или бициклическую углеводородную группу из от 3 до 10 атомов углерода в кольце. В частных воплощениях циклоалкил означает одновалентную насыщенную моноциклическую углеводородную группу из от 3 до 8 кольцевых атомов углерода. Бициклическая означает - состоящий из двух насыщенных карбоциклов, имеющих один или более общих атомов углерода. В частности, циклоалкильные группы представляют собой моноциклические. Примеры моноциклических циклоалкилов включают циклопропил, циклобутанил, циклопентил, циклогексил или циклогептил. Примерами бициклических циклоалкилов являются бицикло[2.2.1]гептанил или бицикло[2.2.2]октанил. Конкретным примером циклоалкила является циклопропил.

Термин "гетероциклоалкил" обозначает одновалентную насыщенную или частично ненасыщенную моно-, би- или трициклическую кольцевую систему, содержащую от 3 до 9 кольцевых атомов, включающих один, два или три кольцевых гетероатома, выбранных из N, O и S, а остальные кольцевые атомы являются углеродом. В частных воплощениях гетероциклоалкил представляет собой одновалентную насыщенную моноциклическую кольцевую систему из 4-7 кольцевых атомов, содержащую один, два или три кольцевых гетероатома, выбранных из N, O и S, а остальные кольцевые атомы являются углеродом. Примерами моноциклических насыщенных гетероциклоалкилов являются азиридиныл, оксиранил, азетидинил, оксетанил, пирролидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидро-тиенил, пиразолидинил, имидазолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, тиазолидинил, пиперидинил, тетрагидропиранил, тетрагидро-тиопиранил, пиперазинил, морфолинил, 1,1-диоксо-тиоморфолин-4-ил, азепанил, диазепанила, гомопиперазинил или оксазепанил. Примерами бициклических насыщенных гетероциклоалкилов являются 8-аза-бицикло[3.2.1]октил, хинуклидинил, 8-окса-3-аза-бицикло[3.2.1]октил, 9-азабицикло[3.3.1]нонил, 3-окса-9-азабицикло[3.3.1]нонил, или 3-тиа-9-азабицикло[3.3.1]нонил. Примерами частично ненасыщенных гетероциклоалкилов являются дигидрофурил, имидазолинил, дигидро-оксазолил, тетрагидропиридинил или дигидропиранил. Конкретными примерами гетероциклоалкилов являются 1,4-дiazepанил, гексагидропирроло[1,2a]пиперазинил, пиперидинил, пиперазинил и пирролидинил. Более конкретными примерами гетероциклоалкила являются гексагидропирроло[1,2a]пиперазинил и пиперазинил.

Термин "N-гетероциклоалкил" обозначает гетероциклоалкильный радикал, содержащий по крайней мере один кольцевой атом азота и где точки присоединения гетероциклоалкильного радикала к остальной части молекулы проходят через кольцевой атом азота. Конкретными примерами N-гетероциклоалкила являются 1,4-дiazepанил, гексагидропирроло[1,2-a]пиперазинил, пиперидинил, пиперазинил и пирролидинил. Более конкретными примерами N-гетероциклоалкила являются гексагидропирроло[1,2-a]пиперазинил и пиперазинил.

Термин "основность" по отношению к соединению, выражается в настоящем изобретении в виде отрицательного декадно-шаговым логарифмом константы кислотности сопряженной кислоты ($pK_a = -\log K_a$). Чем больше pK_a сопряженной кислоты, тем сильнее основание ($pK_a + PKB = 14$). В настоящем изобретении атом или функциональная группа обозначается "основной", если она может принимать протон и, если рассчитанная pK_a сопряженной кислоты составляет по меньшей мере 7, в частности, если рассчитанная pK_a сопряженной кислоты составляет по меньшей мере 7, 8, более конкретно, если рассчитанная pK_a сопряженной кислоты составляет по меньшей мере 8. значения pK_a были рассчитаны *in silico*, как описано у F. Milletti et al., J. Chem. Inf. Model (2007) 47:2172-2181.

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

Термин "амино" обозначает группу формулы $-NR'R''$, где R' и R'' независимо представляют собой водород, алкил, алкокси, циклоалкил, гетероциклоалкил, арил, гетероарил или как здесь описано. В каче-

стве альтернативы, R' и R" вместе с атомом азота, к которому они присоединены, могут образовывать гетероциклоалкил. Термин "первичный amino" обозначает группу, в которой как R', так и R" представляют собой водород. Термин "вторичный amino" обозначает группу, в которой R' представляет собой водород, а R" представляет собой группу, отличную от водорода. Термин "третичный amino" означает группу, в которой обе группы R' и R" не являются водородом. Конкретными вторичными и третичными аминами являются метиламин, этиламин, пропиламин, изопропиламин, фениламин, бензиламин диметиламин, диэтиламин, дипропиламин и диизопропиламин.

Термин "активный фармацевтический ингредиент" (или "API") означает соединение или молекулу в фармацевтической композиции, которая обладает конкретной биологической активностью.

Термины "фармацевтическая композиция" и "фармацевтический препарат" (или "препарат") применяются взаимозаменяемо и обозначают смесь или раствор, содержащий терапевтически эффективное количество активного фармацевтического ингредиента вместе с фармацевтически приемлемыми эксципиентами для введения млекопитающему, например человеку, нуждающемуся в этом.

Термин "фармацевтически приемлемый" обозначает характеристику материала, который является полезным для получения фармацевтической композиции, который, как правило, безопасный, нетоксичный, и ни в биологическом, ни в каком-либо другом плане нежелательный и приемлемый для ветеринарии, а также в фармацевтике для человека.

Термины "фармацевтически приемлемый эксципиент", "фармацевтически приемлемый носитель" и "терапевтически инертный эксципиент" могут быть использованы взаимозаменяемо и означают любой фармацевтически приемлемый ингредиент в фармацевтической композиции, не обладающий терапевтической активностью и нетоксичный для субъекта, которому вводится, такой как разрыхлители, связующие вещества, наполнители, растворители, буферные агенты, изотонические агенты, стабилизаторы, антиоксиданты, поверхностно-активные вещества, носители, разбавители или смазочные средства, используемые в приготовлении фармацевтических продуктов.

Термины "индивид" или "субъект" относятся к млекопитающему. Млекопитающие включают, без ограничения, домашних животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, людей и приматов, отличных от человека, таких как обезьян), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых воплощениях, индивид или субъект является человеком.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество соединения или молекулы по настоящему изобретению, которое при введении субъекту, (i) лечит или предотвращает конкретное заболевание, состояние или расстройство, (ii), смягчает, улучшает или устраняет один или более симптомов конкретного заболевания, состояния или расстройства, или (iii) предотвращает или задерживает начало одного или более симптомов конкретного заболевания, состояния или расстройства, описанных в настоящем изобретении. Терапевтически эффективное количество будет варьироваться в зависимости от соединения, состояния заболевания, которое лечат, тяжести или лечения при заболевании, возраста и относительного здоровья субъекта, пути и формы введения, мнения лечащего или ветеринарного врача, и других факторов.

Термин "лечить" или "лечение" болезненного состояния включает ингибирование болезненного состояния, т.е. приостановление развития болезненного состояния или его клинических симптомов, или облегчение болезненного состояния, т.е. наличие временной или постоянной регрессии болезненного состояния или его клинических симптомов.

Термин "спинальная мышечная атрофия" (или SMA) относится к заболеванию, вызванному инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 на обоих хромосомах, приводящим к потере функции гена SMN1.

Симптомы спинальной мышечной атрофии включают мышечную слабость, низкий мышечный тонус, слабый крик, слабый кашель, вялость или тенденцию к падению, затруднение при сосании или глотании, затруднение с дыханием, накопление секрета в легких или горле, сжатые кулаки с потной рукой, трепетание/дрожание языка, часто наклон головы в одну сторону, даже в положении лежа, обычно ноги более слабые, чем руки, ноги часто принимающие положение "лягушачьих ножек", затруднения с кормлением, повышенную восприимчивость к инфекциям дыхательных путей, вялость кишечника/мочевыводящего пузыря, массу тела ниже нормы, неспособность сидеть без посторонней помощи, неспособность ходить, неспособность ползать, и гипотонию, арефлексию и множественные врожденные контрактуры (артрогрипоз), связанные с потерей клеток передний рога спинного мозга.

Термин "лечение спинальной мышечной атрофии (SMA)" или "лечить спинальную мышечную атрофию (SMA)" включает один или более из следующих эффектов: (i) снижению или облегчению тяжести спинальной мышечной атрофии; (ii) откладыванию начала спинальной мышечной атрофии; (iii) замедлению развития спинальной мышечной атрофии; (iv) уменьшению частоты госпитализации субъекта; (v) снижению продолжительности госпитализации субъекта; (vi) увеличению выживаемости субъекта; (vii) улучшению качества жизни субъекта; (viii) уменьшению числа симптомов, связанных со спинальной мышечной атрофией; (ix) снижению или облегчению тяжести симптома (симптомов), связанного со спинальной мышечной атрофией; (x) уменьшению продолжительности симптома, связанного со спинальной мышечной атрофией; (xi) предотвращению рецидива симптома, связанного со спинальной мышечной атрофией.

атрофией; (xii) замедлению развития или начала симптома спинальной мышечной атрофии и/или (xiii) замедлению развития симптома, связанного со спинальной мышечной атрофией.

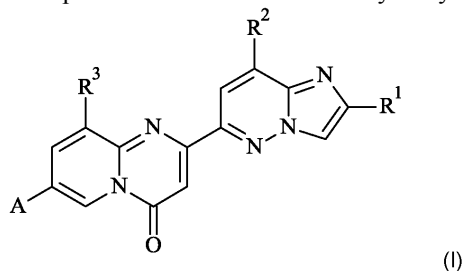
Более конкретно термин "лечение SMA" означает один или более из следующих благоприятных эффектов: (i) уменьшению потери мышечной силы; (ii) увеличению мышечной силы; (iii) уменьшению атрофии мышц; (iv) уменьшению потери двигательной функции; (v) увеличению количества двигательных нейронов; (vi) снижению потерь двигательных нейронов; (vii) защите SMN-дефицитных двигательных нейронов от дегенерации; (ix) увеличению двигательной функции; (x) увеличению функции легких и/или (xi) снижению потери функции легких.

Более подробно, термин "лечить SMA" относится к функциональной способности или сохранению функциональной способности младенцу или ребенку ясельного возраста, сидеть без посторонней помощи, младенцу, ребенку ясельного возраста, ребенку или взрослому человеку стоять без посторонней помощи, ходить без посторонней помощи, бегать без посторонней помощи, дышать без посторонней помощи, засыпать без посторонней помощи или глотать без посторонней помощи.

Термин "величина $EC_{1.5x}$ для продуцирования полноразмерного минигена SMN2 мРНК" (или " $EC_{1.5x}$ миниген") определяется как концентрация испытуемого соединения, при которой происходит эффективное увеличение количества полноразмерной SMN2 мРНК минигена до уровня в 1,5 раза выше, чем уровень в клетках, обработанных носителем.

Термин "величина $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка Smn" (или " $EC_{1.5x}$ SMN белок") определяется как концентрация испытуемого соединения, при которой происходит эффективное продуцирование количества белка Smn в фибробластных клетках пациента, страдающего спинальной мышечной атрофией, в 1,5 раза выше, чем продуцируется в клетках, обработанных носителем.

Более подробно, настоящее изобретение относится к способу получения соединений формулы (I)



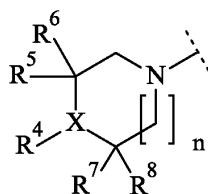
где

R^1 представляет собой водород или C_{1-7} алкил;

R^2 представляет собой водород, циано, C_{1-7} алкил, C_{1-7} галоалкил или C_{3-8} циклоалкил;

R^3 представляет собой водород, C_{1-7} алкил, или C_{3-8} циклоалкил;

A представляет собой



где

X представляет собой N или CH;

R^4 представляет собой водород, C_{1-7} алкил или $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$;

R^5 представляет собой водород или C_{1-7} алкил;

R^6 представляет собой водород или C_{1-7} алкил;

R^7 представляет собой водород или C_{1-7} алкил;

R^8 представляет собой водород или C_{1-7} алкил;

R^9 и R^{10} независимо выбраны из водорода, C_{1-7} алкила и C_{3-8} циклоалкила;

n представляет собой 0, 1 или 2;

m представляет собой 0, 1, 2 или 3;

или R^4 и R^5 вместе образуют C_{1-7} алкилен;

или R^4 и R^7 вместе образуют C_{1-7} алкилен;

или R^5 и R^6 вместе образуют C_{2-7} алкилен;

или R^5 и R^7 вместе образуют C_{1-7} алкилен;

или R^5 и R^9 вместе образуют C_{1-7} алкилен;

или R^7 и R^8 вместе образуют C_{2-7} алкилен;

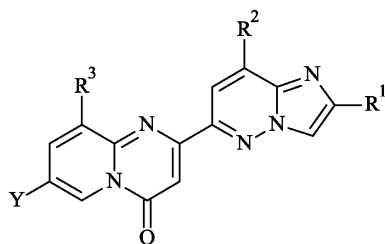
или R^7 и R^9 вместе образуют C_{1-7} алкилен;

или R^9 и R^{10} вместе образуют C_{2-7} алкилен;

при условии, что если X представляет собой CH, тогда R^4 представляет собой $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$; и

при условии, что если X представляет собой N , а R^4 представляет собой $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$, тогда m представляет собой 2 или 3;

при котором осуществляют реакцию ароматического нуклеофильного замещения между соединением формулы (VI)



(VI)

и соединением формулы M-A посредством нагревания в растворителе, где A, R^1 , R^2 и R^3 являются такими, как определено здесь, Y является галогеном или трифторметансульфонатом, M представляет собой водород, натрий или калий, и где M связана с A через атом азота A.

Частное воплощение настоящего изобретения относится способу получения соединений формулы (I) как определено выше, где реакция ароматического нуклеофильного замещения выполняется при температуре от 80 до 200°C.

Частное воплощение настоящего изобретения относится способу получения соединений формулы (I), как определено выше, где растворитель реакции ароматического нуклеофильного замещения выбран из диметилсульфоксида (ДМСО), N-метилпирролидона (NMP), и диметилформамида (ДМФ).

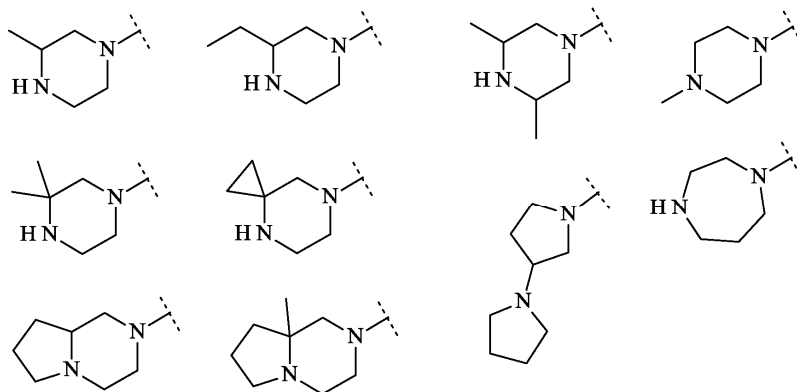
Частное воплощение настоящего изобретения относится способу получения соединений формулы (I), как определено выше, где M представляет собой водород.

Частное воплощение настоящего изобретения относится к способу получения соединений формулы (I), где R^1 представляет собой C_{1-7} -алкил, в частности метил.

Частное воплощение настоящего изобретения относится к способу получения соединений формулы (I), где R^2 представляет собой водород или C_{1-7} -алкил, в частности водород или метил.

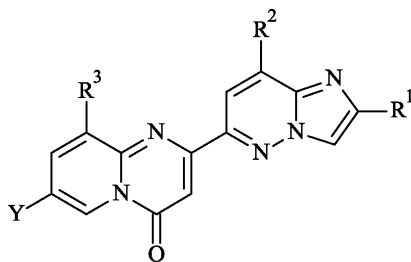
Частное воплощение настоящего изобретения относится к способу получения соединений формулы (I), где R^3 представляет собой водород или C_{1-7} -алкил, в частности водород или метил.

Частное воплощение настоящего изобретения относится к способу получения соединений формулы (I), где A выбран из группы:



Частное воплощение настоящего изобретения относится к способу получения соединений формулы (I), где указанное соединение представляет собой 7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он.

Соединения формулы (VI) подходят в качестве промежуточных соединений при производстве соединений формулы (I)



(VI),

где A, R^1 , R^2 , R^3 и Y являются такими, как здесь описано.

Способы получения.

Соединения формулы (I) как определено выше могут быть получены в соответствии с обычными способами, известными в уровне техники.

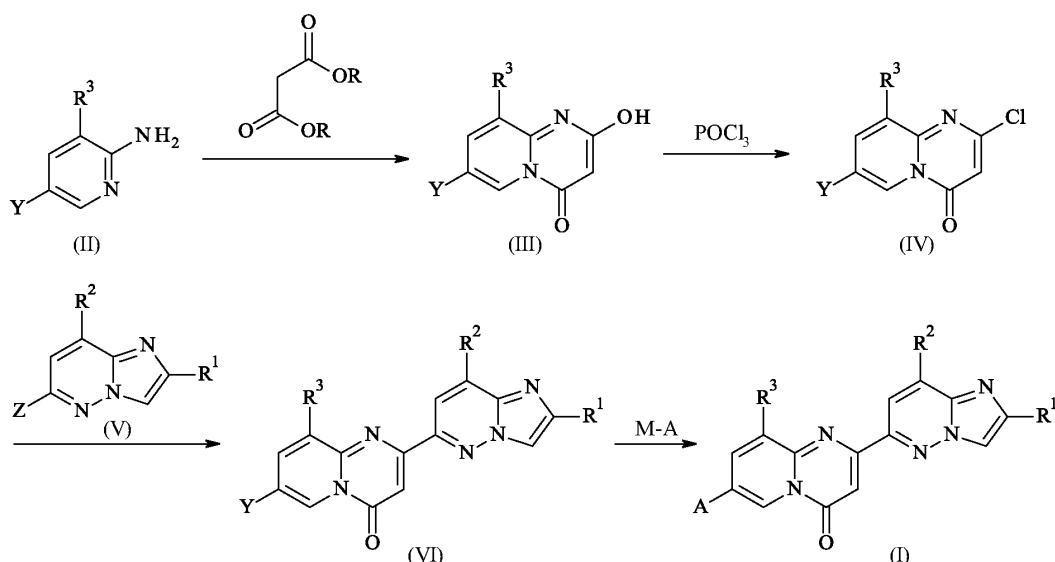
Как показано на схеме 1, коммерчески доступный amino-пиридин формулы (II) может взаимодействовать с малоновым эфиром с получением промежуточного соединения формулы (III), где Y и R³ являются такими, как здесь описано, а R представляет собой C₁₋₂алкил, в частности метил. Соединение формулы (III) затем обрабатывают хлорирующим реагентом (таким как POCl₃ и т.д.) с получением соединения формулы (IV). Соединение формулы (IV) затем взаимодействует в реакции кросс-сочетания Сузуки с соединением формулы (V), где R¹ и R² являются такими, как здесь описано, а Z представляет собой B(OH)₂ или эфир C₁₋₇алкилбороновой кислоты, такой как 4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил, в присутствии катализатора (такого как (1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен)палладий(II) дихлорид (Pd(dppf)Cl₂) и т.д.) и основания (такого как K₂CO₃ и т.д.) в подходящем растворителе (таком как ДМФ и т.д.), с получением соединения формулы (VI). В заключение, соединение формулы (VI) взаимодействует с соединением M-A либо в:

a) реакции ароматического нуклеофильного замещения (в частности, если Y представляет собой фтор) посредством нагревания при температуре от 80 до 200°C; или

b) реакции аминирования Бухвальда-Хартвига в присутствии палладиевого катализатора (например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий (Pd(PPh₃)₄) или бис(добензилиденацетон)палладий (Pd(dba)₂) посредством нагревания при температуре от 20 до 100°C;

в растворителе (например, диметилсульфоксиде (ДМСО), N-метилпирролидон (NMP), или диметилформамид (ДМФ)) с получением соединения формулы (I), где A является таким, как здесь определено, M представляет собой водород, натрий или калий, в частности водород, и где M связана с A через атом азота A.

Схема 1.

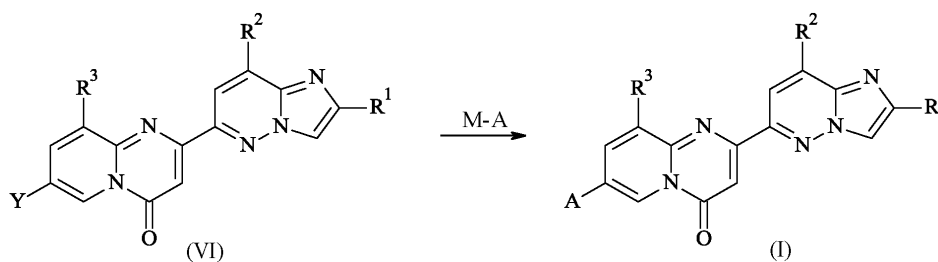


В одном воплощении, настоящее изобретение относится к способу получения соединений формулы (I), как определено выше, включающему взаимодействие соединения формулы (VI) с соединением M-A либо в:

a) реакции ароматического нуклеофильного замещения (в частности, если Y представляет собой фтор) посредством нагревания при температуре от 80 до 200°C; или

b) реакции аминирования Бухвальда-Хартвига в присутствии палладиевого катализатора (например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий (Pd(PPh₃)₄) или бис(добензилиденацетон)палладий (Pd(dba)₂) посредством нагревания при температуре от 20 до 100°C;

в растворителе (например, диметилсульфоксиде (ДМСО), N-метилпирролидон (NMP), или диметилформамид (ДМФ)) с получением соединения формулы (I), где A является таким, как здесь определено, M представляет собой водород, натрий или калий, в частности водород, и где M связана с A через атом азота A.



В частности, соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли могут быть получены в соответствии со способами, описанными в примерах настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции.

В другом воплощении настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции или лекарственные средства, содержащие соединения по изобретению и терапевтически инертный носитель, разбавитель или фармацевтически приемлемый эксципиент, а также способы применения соединений по изобретению для получения таких композиций и лекарственных средств.

Композиции изготавливают, дозируют и вводят в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы для рассмотрения в этом контексте включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, подвергаемое лечению, клиническое состояние пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, режим введения и другие факторы, известные врачам.

Соединения по изобретению можно вводить любым подходящим способом, включая пероральный, топикальный (включая буккальный и подъязычный), ректальный, вагинальный, трансдермальный, парентеральный, подкожный, интраперитонеальный, внутрилегочный, внутрикожный, интракаекальный и эпидуральный и интраназальный, и, при желании для местного лечения, внутриочагового введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение.

Соединения настоящего изобретения могут быть введены в любой удобной форме, например в форме таблеток, порошков, капсул, растворов, дисперсий, суспензий, сиропов, аэрозолей, свечей, гелей, эмульсий, пластырей и т.д. Такие композиции могут содержать компоненты, подходящие для фармацевтических препаратов, например разбавители, носители, модификаторы pH, консерванты, растворители, стабилизаторы, увлажняющие агенты, эмульгаторы, подсластители, красители, ароматизаторы, соли для изменения осмотического давления, буферы, маскирующие агенты, антиоксиданты и дополнительные активные агенты. Они также могут содержать другие терапевтически ценные вещества.

Обычные композиции готовят путем смешивания соединения по настоящему изобретению и носителя или эксципиента. Подходящие носители и эксципиенты хорошо известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в, например, Ansel H.C. и соавт, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (2004) Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia; Gennaro A.R. и соавт, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia; and Rowe R.C, Handbook of Pharmaceutical Excipients (2005) Pharmaceutical Press, Chicago. Композиции могут также включать один или более буферов, стабилизирующих агентов, поверхностно-активных веществ, увлажняющих агентов, lubricантов, эмульгаторов, суспендирующих агентов, консервантов, антиоксидантов, светозащитные агенты, скользящие вещества, технологические добавки, красители, подсластители, парфюмерные агенты, отдушки, растворители и другие известные добавки, чтобы обеспечить элегантную презентацию препарата (например, соединения по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции) или помощь в производстве фармацевтического продукта (например, лекарственного препарата).

Доза, в которой могут быть введены соединения по изобретению может варьироваться в широких пределах и, конечно, соответствовать индивидуальным требованиям в каждом конкретном случае. В общем, в случае приема внутрь суточная доза от 0,01 до 1000 мг соединения общей формулы (I) на человека должна быть соответствующей, хотя верхний предел также может быть превышен в случае необходимости.

Примером подходящей пероральной лекарственной формы является таблетка, содержащая от 100 до 500 мг соединения по изобретению с от 30 до 90 мг безводной лактозы, от 5 до 40 мг натрия кроскармеллозы, от 5 до 30 мг поливинилпирролидона (ПВП) K30 и от 1 до 10 мг магния стеарата. Порошкообразные ингредиенты сначала смешивают вместе, а затем смешивают с раствором PVP. Полученная композиция может быть высушена, гранулирована, смешана со стеаратом магния и спрессована в форме таблеток с использованием обычного оборудования.

Пример аэрозольной композиции может быть получен путем растворения соединения, например от 10 до 100 мг, по изобретению в соответствующем буферном растворе, например фосфатном буфере, добавив вспомогательное вещество, например соль, такую как хлорид натрия, если это необходимо. Раствор может быть отфильтрован, например, используя фильтр 0,2 мкм, для удаления примесей и загрязнений.

Применение.

Как описано выше, соединения формулы (I) и их фармацевтически приемлемые соли обладают ценными фармакологическими свойствами и как обнаружено усиливают включение экзона 7 генов SMN1 и/или SMN2 в мРНК, транскрибируемую с генов SMN1 и/или SMN2, таким образом увеличивая экспрессию белка SMN у нуждающихся в этом пациентов.

Соединения настоящего изобретения могут применяться либо самостоятельно или в комбинации с другими лекарствами, для лечения или предотвращения заболевания, вызванного инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанного с потерей или дефектом функции гена SMN1. Эти заболевания включают, без ограничения, спинальную мышечную атрофию (SMA).

Частное воплощение настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединения формулы (I), как определено выше или их фармацевтически приемлемые соли, как определено выше, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

Частное воплощение настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, как определено выше и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов для лечения или предотвращения заболевания, вызванного инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанного с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения или предотвращения SMA.

Частное воплощение настоящего изобретения относится к соединениям формулы (I) или их фармацевтически приемлемым солям, как определено выше, для применения в качестве терапевтически активных веществ, особенно для применения в качестве терапевтически активных веществ для лечения или предотвращения заболевания, вызванного инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанного с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения или предотвращения спинальной мышечной атрофии (SMA).

Частное воплощение настоящего изобретения относится к соединениям формулы (I) или их фармацевтически приемлемым солям как определено выше для применения для лечения или предотвращения заболевания, вызванного инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанного с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для применения для лечения или предотвращения спинальной мышечной атрофии (SMA).

Частное воплощение настоящего изобретения относится к способу лечения или предотвращения заболевания, вызванного инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанного с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения или предотвращения спинальной мышечной атрофии (SMA), который включает введение субъекту соединений формулы (I) или их фармацевтически приемлемых солей, как определено выше.

Частное воплощение настоящего изобретения относится к применению соединений формулы (I) или их фармацевтически приемлемых солей, как определено выше, для лечения или предотвращения заболевания, вызванного инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанного с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения или предотвращения спинальной мышечной атрофии (SMA).

Частное воплощение настоящего изобретения относится к применению соединений формулы (I) или их фармацевтически приемлемых солей как определено выше для получения лекарственных средств для лечения или предотвращения заболевания, вызванного инактивирующей мутацией или делецией в гене SMN1 и/или связанного с потерей или дефектом функции гена SMN1, в частности для лечения или предотвращения спинальной мышечной атрофии (SMA). Такие лекарственные средства содержат соединения формулы (I) или их фармацевтически приемлемые соли, как определено выше.

Примеры

Настоящее изобретение будет более понятным со ссылкой на следующие примеры. Они не должны расцениваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Используемые сокращения.

ACN - ацетонитрил;

CH₂Cl₂ - дихлорметан (ДХМ);

DIPEA - диизопропилэтиламин;

DMA - диметилацетамид;

TEA - триэтиламин;

КТ - комнатная температура;

B₂(pin)₂ - бис(пинаколато)дибор;

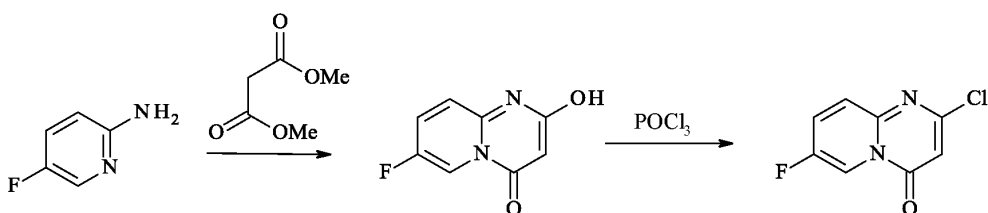
Pd(dppf)Cl₂ - (1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен)палладий(II) дихлорид;

PPTS - пиридиния п-толуолсульфонат.

Промежуточное соединение 1.

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

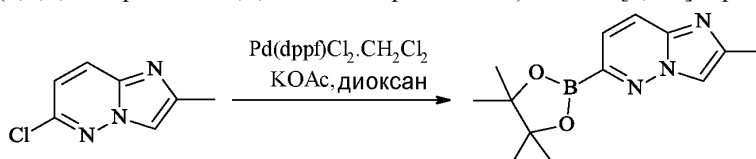
a) 2-хлор-7-фтор-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



Смесь 2-амино-5-фторпиридина (11.20 г, 0.10 моль) и диметилмалоната (57.0 мл, 0.50 моль) нагревали при 230°C в течение 1.5 ч. После охлаждения до комнатной температуры, преципитат отфильтровали и промыли с помощью ACN (3×) с получением 7-фтор-2-гидрокси-4H-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она в виде темного осадка (14 г), который сразу использовали на следующей стадии. MS m/z 181.3 $[M+H]^+$.

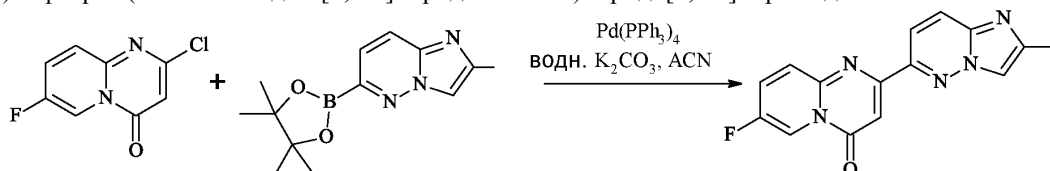
Темную смесь неочищенного 7-фтор-2-гидрокси-4H-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она (14 г, ~77 ммоль) в $POCl_3$ (50 мл) и DIPEA (13.3 мл, 77 ммоль) нагревали при 110°C в течение 15 ч. Растворитель удалили и темный остаток обработали водой со льдом, промыли водой (3×) и высушили с получением коричневого осадка. Неочищенный коричневый осадок подвергли хроматографии (5% MeOH в CH_2Cl_2) с получением 2-хлор-7-фтор-4H-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она в виде желтого осадка (9.84 г, 50%, 2 стадии), MS m/z 199.2 $[M+H]^+$.

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



Смесь 6-хлор-2-метилимидазо[1,2-б]пиридазина (900 мг, 5.37 ммоль), 4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолана) (1.36 г, 5.37 ммоль, 1.0 экв.), KOAc (1.05 г, 10.7 ммоль) и $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ (393 мг, 0.54 ммоль) в диоксане (50 мл) дегазировали и нагревали в атмосфере N_2 при 95°C. Через 15 ч смесь разбавили EtOAc, отфильтровали через целит и сконцентрировали под вакуумом с получением 2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазина, который сразу использовали на следующей стадии.

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

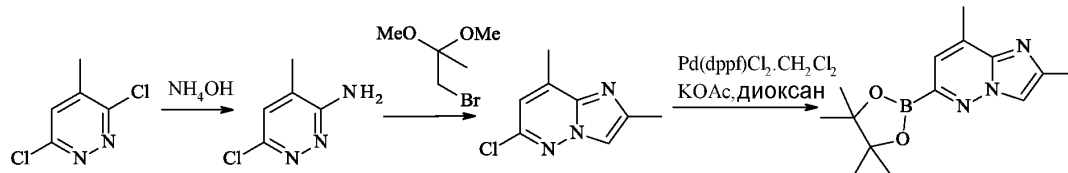


К раствору 2-хлор-7-фтор-4H-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она (750 мг, 3.78 ммоль) в ACN (36 мл) добавили 2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-б]пиридазин (1.17 г, 4.53 ммоль, экв: 1.2), $Pd(PPh_3)_4$ (218 мг, 0.189 ммоль, 0.05 экв.) и водный раствор K_2CO_3 (3.78 мл, 7.55 ммоль, 2.0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 105°C в течение ночи. Реакционную смесь охладили до КТ и отфильтровали. Преципитат промыли с помощью Et_2O и затем воды, высушили под вакуумом с получением 250 мг (22%) 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого осадка. MS m/z 296.1 $[M+H]^+$.

Промежуточное соединение 2.

2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он.

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



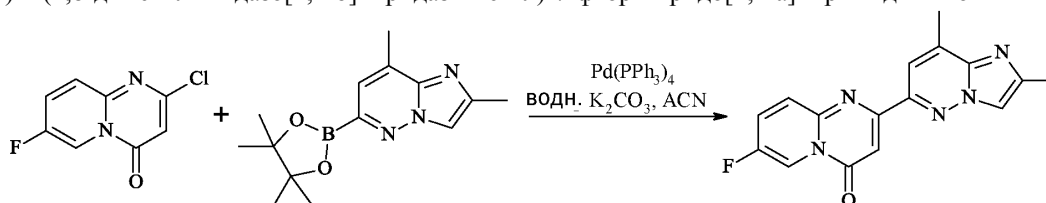
В закрытой пробирке 3,6-дихлор-4-метилпиридазин (27 г, 161 ммоль) суспендировали в водном растворе аммония (25%, 300 мл). Реакционную смесь нагревали при 110°C в течение 48 ч (превратилась в раствор через 1 ч). После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь влили в CH_2Cl_2 , и органическая фаза была отделена, её высушили над Na_2SO_4 , и сконцентрировали под вакуумом, с получением 22.4 г 6-хлор-4-метил-пиридазин-3-амин и 6-хлор-5-метил-пиридазин-3-амин в виде смеси региоизомеров, которые сразу использовали на следующей стадии.

Смесь региоизомеров 6-хлор-4-метил-пиридазин-3-амин и 6-хлор-5-метил-пиридазин-3-амин (22.4 г) суспендировали в 2-пропанол (300 мл). 1-бromo-2,2-диметоксипропан (36.0 г, 26.6 мл, 193 ммоль, 1.2 экв.) и PPTS (2.96 г, 11.6 ммоль, 0.0725 экв.) добавили, и получившийся раствор нагревали при 105°C в те-

чение ночи. Растворитель удалили под вакуумом и остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью NaHCO_3 . Органические фазы высушили над Na_2SO_4 , сконцентрировали под вакуумом и неочищенный светло-коричневый осадок подвергали хроматографии (EtOAc /гептан 1/2-1/1) с получением отдельно 6.1 г 6-хлор-2,8-диметил-имидазо[1,2-*b*]пиридазина MS m/z 182.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (21%) в виде белого осадка и 5.9 г 6-хлор-2,7-диметил-имидазо[1,2-*b*]пиридазина MS m/z 182.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (20%) в виде белого осадка.

Смесь 6-хлор-2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазина (0.9 г, 4.96 ммоль), 4,4,4',5,5,5'-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолана) (1.26 г, 4.96 ммоль, 1.0 экв.), KOAc (0.97 г, 9.91 ммоль) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (363 мг, 0.49 ммоль) в диоксане (50 мл) дегазировали и нагревали в атмосфере N_2 при 110°C . Через 15 ч, смесь разбавили EtOAc , отфильтровали через целит и сконцентрировали под вакуумом с получением 2,8-диметил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-*b*]пиридазина, который сразу использовали на следующей стадии.

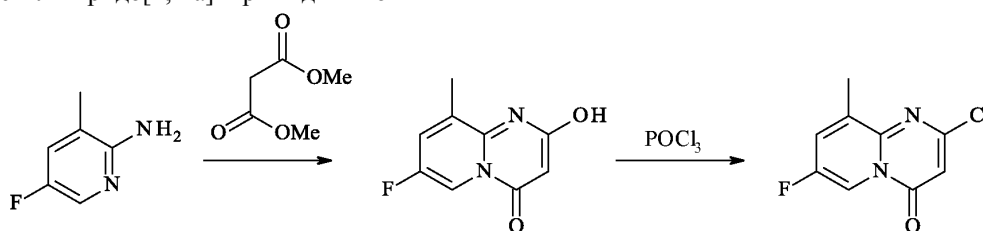
б) 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



К раствору 2-хлор-7-фтор-4H-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она (750 мг, 3.78 ммоль, описанного здесь выше) в ACN (36 мл) добавили 2,8-диметил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин (1.24 г, 4.53 ммоль, 1.2 экв.), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (218 мг, 0.189 ммоль, 0.05 экв.) и водный раствор K_2CO_3 (3.78 мл, 7.55 ммоль, 2.0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 100°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охладили до КТ, и отфильтровали. Преципитат промыли с помощью Et_2O и затем водой, высушили под вакуумом с получением 700 мг (60%) 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого осадка. MS m/z 310.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Промежуточное соединение 3.

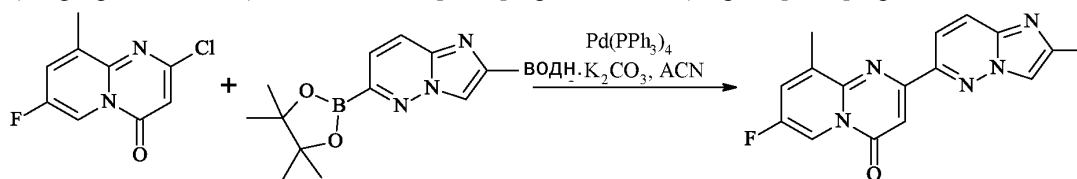
7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он а) 2-хлор-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



Смесь 5-фтор-3-метилпиридин-2-амин (3.3 г, 26.2 ммоль) и диметилмалоната (15.0 мл, 0.13 моль, 5.0 экв.) нагревали при 210°C в течение 1.5 ч. После охлаждения до комнатной температуры, преципитат отфильтровали и промыли с помощью ACN (3×) с получением 7-фтор-2-гидрокси-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она в виде темного осадка (2.3 г), который сразу использовали на следующей стадии. MS m/z 195.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Смесь неочищенного 7-фтор-2-гидрокси-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она (2.3 г, 11.8 ммоль) в POCl_3 (7.7 мл, 82.9 ммоль) и DIEA (2.07 мл, 11.8 ммоль) нагревали при 110°C в течение 15 ч. Растворитель удалили и остаток обработали водой со льдом, промыли водой (3×) и высушили с получением коричневого осадка. Неочищенный коричневый осадок подвергали хроматографии (5% MeOH в CH_2Cl_2) с получением 2-хлор-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она в виде желтого осадка (1.77 г, 70% за 2 стадии), MS m/z 213.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

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

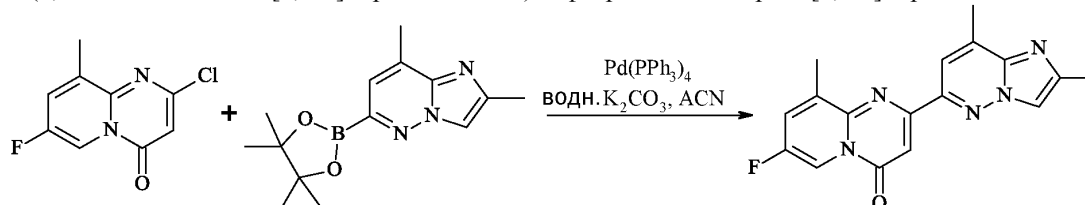


К раствору 2-хлор-7-фтор-9-метил-4H-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она (2.2 г, 10.3 ммоль) в ACN (80 мл) добавили 2-метил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин (3.22 г, 12.4 ммоль, 1.2 экв., описанный здесь выше), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (120 г, 1.03 ммоль, 0.1 экв.) и водный раствор K_2CO_3 (10.3 мл, 20.7 ммоль, 2.0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 100°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охладили до КТ, и отфильтровали. Преципитат промыли с помощью Et_2O и затем водой, высушили под вакуумом с получением 1.80 г (56%) 7-фтор-9-метил-2-(2-

метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого осадка. MS m/z 310.1 $[M+H]^+$.

Промежуточное соединение 4.

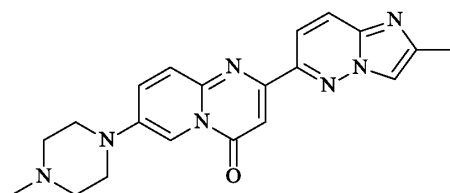
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



К раствору 2-хлор-7-фтор-9-метил-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она (0.98 г, 4.61 ммоль, описанного здесь выше) в ACN (50 мл) добавили 2,8-диметил-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)имидазо[1,2-*b*]пиридазин (1.51 г, 5.53 ммоль, 1.2 экв., описанного здесь выше), Pd(PPh₃)₄ (0.32 г, 0.277 ммоль, 0.06 экв.) и водный раствор K₂CO₃ (4.61 мл, 9.22 ммоль, 2.0 экв.). Смесь дегазировали и нагревали в атмосфере аргона при 100°C в течение 6 ч. Реакционную смесь охладили до КТ, и отфильтровали. Препитат промыли с помощью Et₂O и воды, затем высушили под вакуумом с получением 0.89 г (60%) 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-она в виде светло-коричневого осадка. MS m/z 324.4 $[M+H]^+$.

Пример 1.

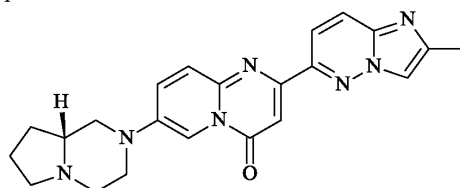
2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-(4-метилпиперазин-1-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 35 мг, 0.119 ммоль) и 1-метилпиперазин (47.5 мг, 0.474 ммоль, 4 экв.) перемешивали в ДМСО (1 мл) при 120°C в течение ночи. ЖХ-МС показала полную конверсию. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Неочищенный продукт очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 9/1) с получением продукта, указанного в заголовке (25 мг, 56%) в виде светло-желтого осадка. MS m/z 376.3 $[M+H]^+$.

Пример 2.

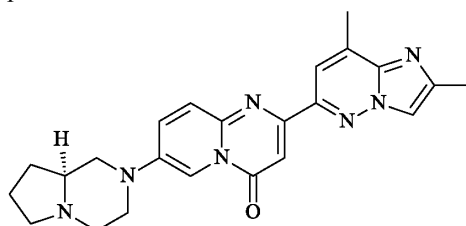
7-[(8*a*R)-3,4,6,7,8,8*a*-гексагидро-1Н-пирроло[1,2-*a*]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 125 мг, 0.426 ммоль) и (R)-октагидропирроло[1,2-*a*]пиазин (160 мг, 1.27 ммоль, 3 экв.) перемешивали в ДМСО (5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 95/5) с получением продукта, указанного в заголовке (65 мг, 38%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 402.5 $[M+H]^+$.

Пример 3.

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

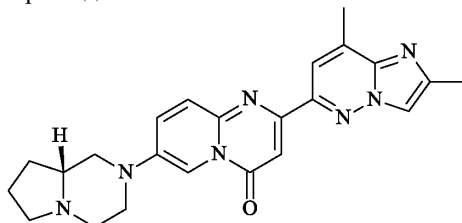


В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-

4-он (промежуточное соединение 2; 200 мг, 0.647 ммоль) и (S)-октагидропирроло-[1,2-а]пиазин (286 мг, 2.26 ммоль, 3.5 экв.) перемешивали в ДМСО (5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=98/2$ до 95/5) с получением продукта, указанного в заголовке (115 мг, 43%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 416.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 4.

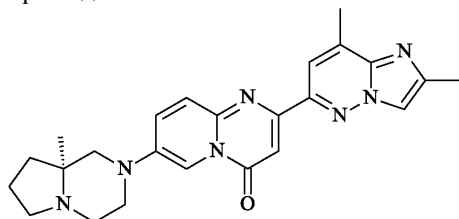
7-[(8aR)-3,4,6,7,8,8a-гексагидро-1H-пирроло[1,2-а]пиазин-2-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиадазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиадазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 200 мг, 0.647 ммоль), DIPEA (0.113 мл, 0.67 ммоль, 1 экв.) и (R)-октагидропирроло-[1,2-а]пиазин (245 мг, 1.95 ммоль, 3.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2.5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=98/2$ до 95/5) с получением продукта, указанного в заголовке (132 мг, 49%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 416.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 5.

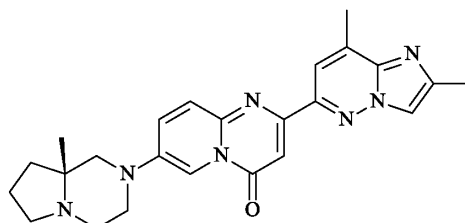
7-[(8aS)-8a-метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-а]пиазин-2-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиадазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиадазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 90 мг, 0.291 ммоль), DIPEA (0.05 мл, 0.29 ммоль, 1 экв.) и (S)-8a-метилоктагидропирроло[1,2-а]пиазин (81 мг, 0.58 ммоль, 2.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2.5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (55 мг, 44%) в виде светло-желтого осадка. MS m/z 430.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 6.

7-[(8aR)-8a-метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-а]пиазин-2-ил]-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиадазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



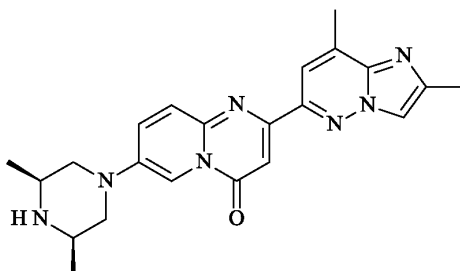
В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиадазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 90 мг, 0.291 ммоль), DIPEA (0.05 мл, 0.29 ммоль, 1 экв.) и (R)-8a-метилоктагидропирроло[1,2-а]пиазин (81 мг, 0.58 ммоль, 2.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2.5 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом.

Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$

до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (50 мг, 40%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 430.4 $[M+H]^+$.

Пример 7.

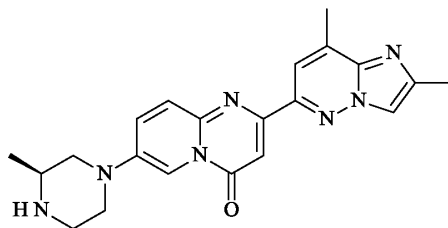
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*S*,5*R*)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0.162 ммоль), и *цис*-2,6-диметилпиперазин (74 мг, 0.647 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (1.5 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора $NaHCO_3$. Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (32 мг, 49%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 404.4 $[M+H]^+$.

Пример 8.

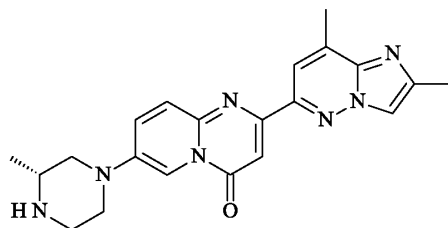
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*S*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 33 мг, 0.107 ммоль), и (*S*)-2-метилпиперазин (43 мг, 0.427 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 120°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора $NaHCO_3$. Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (18 мг, 43%) в виде светло-желтого осадка. MS m/z 390.3 $[M+H]^+$.

Пример 9.

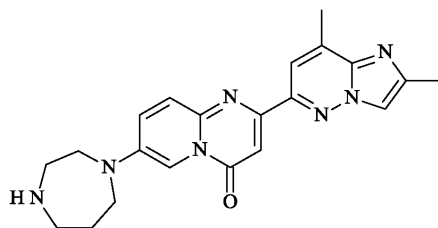
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*R*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 85 мг, 0.275 ммоль), и (*R*)-2-метилпиперазин (110 мг, 1.10 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (5 мл) при 120°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора $NaHCO_3$. Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (35 мг, 33%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 390.3 $[M+H]^+$.

Пример 10.

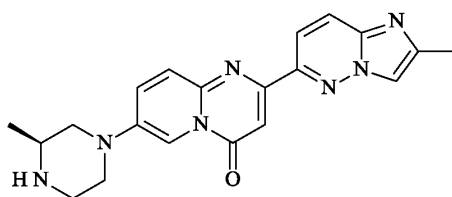
7-(1,4-дiazепан-1-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 33 мг, 0.107 ммоль), и 1,4-дiazепан (32 мг, 0.320 ммоль, 3.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 120°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (20 мг, 48%) в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 390.3 [M+H⁺].

Пример 11.

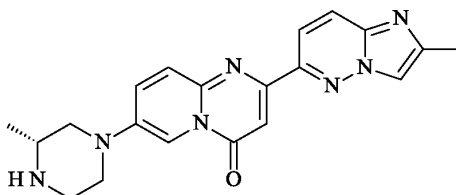
2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*S*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0.169 ммоль), и (*S*)-2-метилпиперазин (68 мг, 0.677 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (40 мг, 63%) в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 376.2 [M+H⁺].

Пример 12.

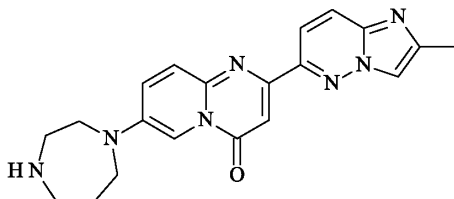
2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*R*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0.169 ммоль), и (*R*)-2-метилпиперазин (68 мг, 0.677 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (48 мг, 75%), в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 376.3 [M+H⁺].

Пример 13.

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

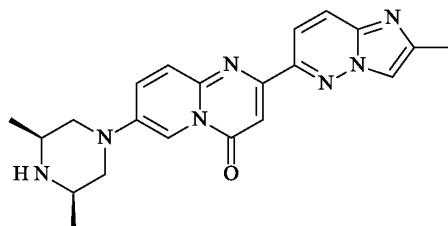


В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0.169 ммоль), и 1,4-дiazепан (68 мг, 0.677 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили

посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до $90/10$) с получением продукта, указанного в заголовке (41 мг, 65%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 376.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 14.

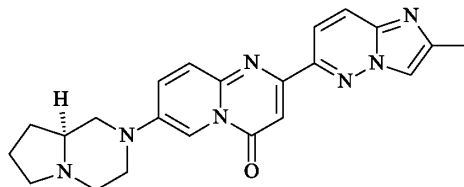
7-[(3R,5S)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0.169 ммоль), и *цис*-2,6-диметилпиперазин (77 мг, 0.677 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 110°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до $90/10$) с получением продукта, указанного в заголовке (41 мг, 62%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 390.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 15.

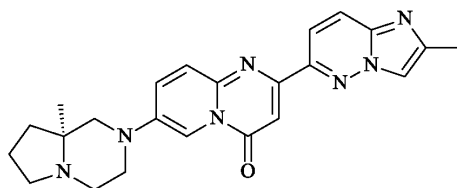
7-[(8aS)-3,4,6,7,8,8a-гексагидро-1H-пирроло[1,2-a]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0.169 ммоль), и (*S*)-октагидропирроло[1,2-a]пиазин (85 мг, 0.677 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до $90/10$) с получением продукта, указанного в заголовке (36 мг, 53%), о в виде светло-желтого осадка. MS m/z 402.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 16.

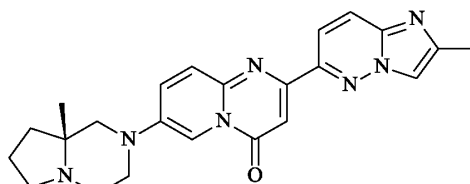
7-[(8aS)-8a-метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-a]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0.169 ммоль) и (*S*)-8a-метилоктагидропирроло[1,2-a]пиазин (95 мг, 0.677 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до $90/10$) с получением продукта, указанного в заголовке (45 мг, 64%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 416.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 17.

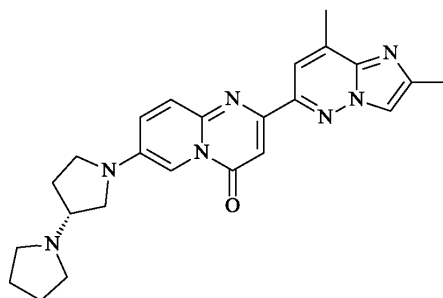
7-[(8aR)-8a-метил-1,3,4,6,7,8-гексагидропирроло[1,2-a]пиазин-2-ил]-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 100 мг, 0.339 ммоль) и (R)-8а-метилоктагидропирроло[1,2-а]пиразин (190 мг, 1.35 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (4 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (45 мг, 64%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 416.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 18.

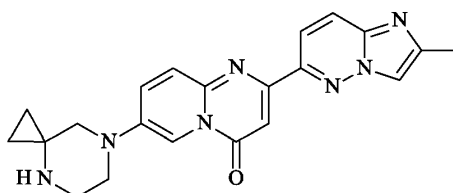
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-[(3R)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



В микроволновой печи, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 45 мг, 0.145 ммоль), (R)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (62 мг, 0.291 ммоль, 2.0 экв.) и DIPEA (0.20 мл, 1.16 ммоль, 8 экв.) перемешивали в NMP (3 мл) при 220°C в течение 1 ч. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=98/2$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (25 мг, 40%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 430.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 19.

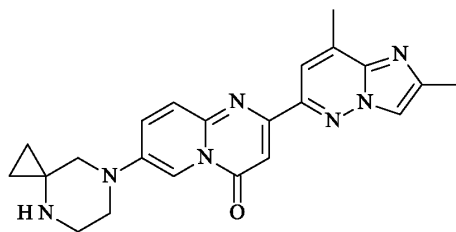
7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2-метилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 50 мг, 0.169 ммоль), DIPEA (0.24 мл, 1.35 ммоль, 8 экв.) и 4,7-дiazаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (62.7 мг, 0.339 ммоль, 2.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение 2 дней. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (22 мг, 33%) в виде светло-желтого осадка. MS m/z 388.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 20.

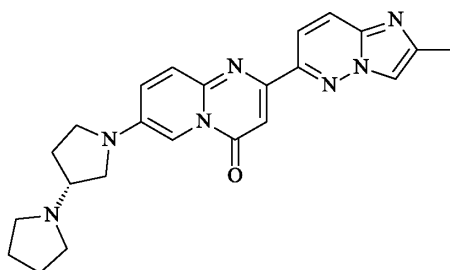
7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0.162 ммоль), DIPEA (0.22 мл, 1.29 ммоль, 4 экв.) и 4,7-диазаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (32 мг, 0.320 ммоль, 3.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 130°C в течение 48 ч. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 95/5) с получением продукта, указанного в заголовке (12 мг, 18%), в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 402.3 [M+H⁺].

Пример 21.

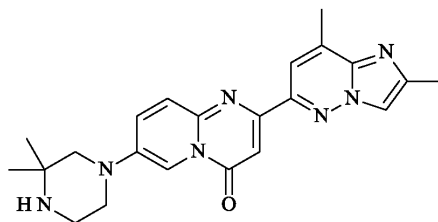
2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*R*)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 40 мг, 0.135 ммоль), DIPEA (0.19 мл, 1.08 ммоль, 8 экв.) и (R)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (58 мг, 0.271 ммоль, 2.0 экв.) перемешивали в ДМСО (4 мл) и нагревали при 220°C в течение 40 мин в микроволновой печи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=98/2 до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (30 мг, 53%), в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 416.3 [M+H⁺].

Пример 22.

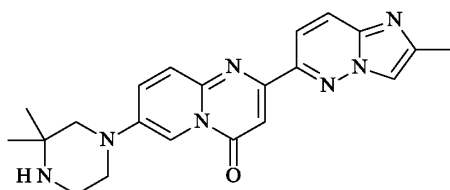
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-(3,3-диметилпиперазин-1-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 40 мг, 0.129 ммоль) и 2,2-диметилпиперазин (59 мг, 0.517 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (1.6 мл) при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 9/1) с получением продукта, указанного в заголовке (29 мг, 55%) в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 404.3 [M+H⁺].

Пример 23.

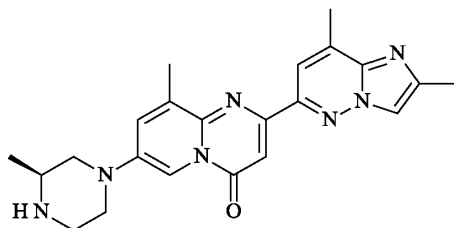
7-(3,3-диметилпиперазин-1-ил)-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 40 мг, 0.135 ммоль) и 2,2-диметилпиперазин (62 мг, 0.542 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (26 мг, 49%), в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 390.3 [M+H⁺].

Пример 24.

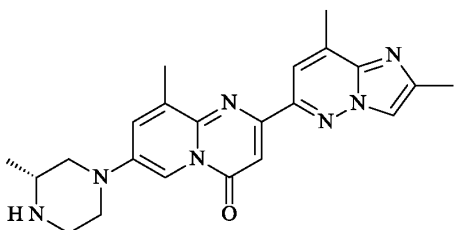
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-9-метил-7-[(3*S*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0.155 ммоль) и (*S*)-2-метилпиперазин (62 мг, 0.619 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (45 мг, 72%) в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 404.3 [M+H⁺].

Пример 25.

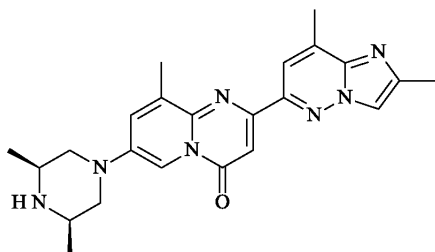
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-9-метил-7-[(3*R*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0.155 ммоль) и (*R*)-2-метилпиперазин (62 мг, 0.619 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH₂Cl₂ и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO₃. Органический слой разделили и высушили над Na₂SO₄ и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (40 мг, 70%) в виде светло-желтого осадка. MS *m/z* 404.3 [M+H⁺].

Пример 26.

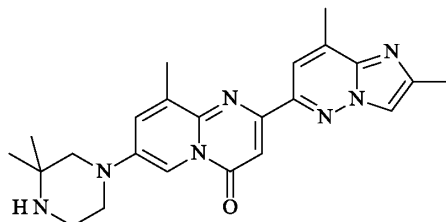
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*R*,5*S*)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]-9-метил-пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0.155 ммоль) и цис-2,6-диметилпиперазин (70 мг, 0.619 ммоль, 4.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (26 мг, 40%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 418.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 27.

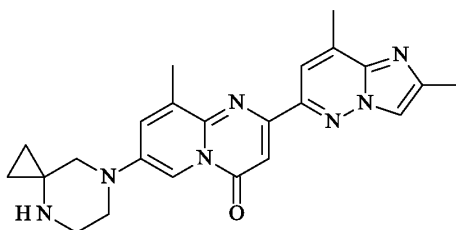
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-(3,3-диметилпиперазин-1-ил)-9-метил-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0.155 ммоль) и 2,2-диметилпиперазин (35 мг, 0.309 ммоль, 2.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (36 мг, 56%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 418.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 28.

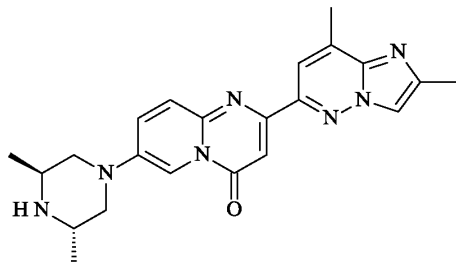
7-(4,7-диазаспиро[2.5]октан-7-ил)-2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-9-метил-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фтор-9-метил-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 4; 50 мг, 0.155 ммоль), DIPEA (0.21 мл, 1.24 ммоль, 8 экв.) и 4,7-диазаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (57 мг, 0.309 ммоль, 2.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 125°C в течение 2 дней. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (17 мг, 26%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 416.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 29.

2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-[(3S,5S)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он

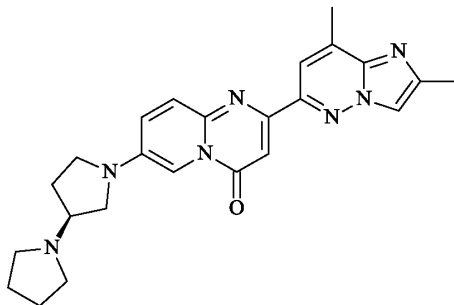


В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-б]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-а]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0.162 ммоль), TEA (0.18 мл, 1.29 ммоль, 8 экв.) и (2S,6S)-2,6-диметилпиперазина дигидрохлорид (90 мг, 0.485 ммоль, 3.0 экв.) перемешивали в ДМСО (2 мл) при 140°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и

сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 9/1) с получением продукта, указанного в заголовке (20 мг, 30%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 404.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 30.

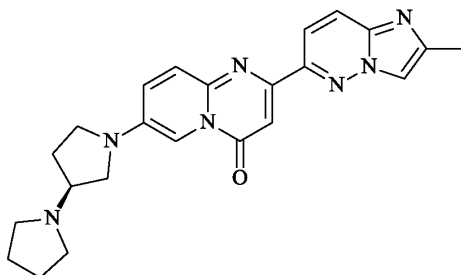
2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3S)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 2-(2,8-диметилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-фтор-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 2; 50 мг, 0.162 ммоль), DIPEA (0.22 мл, 1.29 ммоль, 8 экв.) и (S)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (103 мг, 0.485 ммоль, 3.0 экв.) перемешивали в NMP (2 мл) при 140°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 9/1) с получением продукта, указанного в заголовке (22 мг, 32%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 430.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 31.

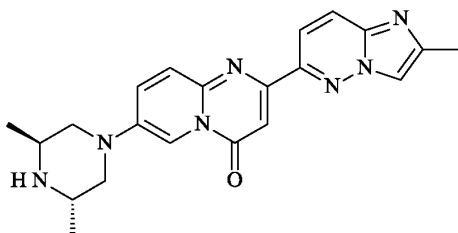
2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-7-[(3S)-3-пирролидин-1-илпирролидин-1-ил]пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 75 мг, 0.254 ммоль), TEA (0.28 мл, 2.03 ммоль, 8 экв.) и (S)-1,3'-бипирролидина дигидрохлорид (162 мг, 0.762 ммоль, 3.0 экв.) перемешивали в NMP (4 мл) и нагревали при 220°C в течение 1 ч в микроволновой печи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (12 мг, 11%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 416.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 32.

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

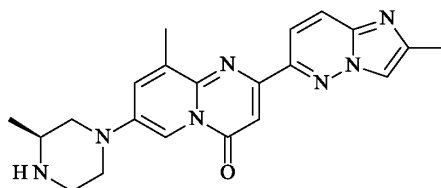


В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4H-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 75 мг, 0.254 ммоль), TEA (0.28 мл, 2.03 ммоль, 8 экв.) и (2S,6S)-2,6-диметилпиперазина дигидрохлорид (143 мг, 0.762 ммоль, 3.0 экв.) перемешивали в ДМСО (3 мл) и нагревали при 140°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной

хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (10 мг, 10%) в виде светло-желтого осадка. MS m/z 390.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 33.

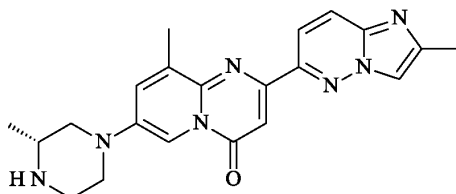
9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*S*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0.808 ммоль), и (*S*)-2-метилпиперазин (405 мг, 4.04 ммоль, 5.0 экв.) перемешивали в ДМСО (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 85/15) с получением продукта, указанного в заголовке (135 мг, 43%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 390.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 34.

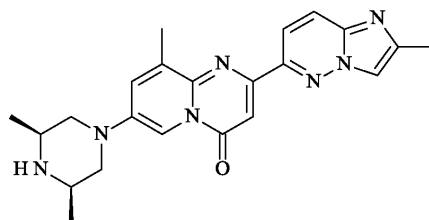
9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)-7-[(3*R*)-3-метилпиперазин-1-ил]пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0.808 ммоль), и (*R*)-2-метилпиперазин (405 мг, 4.04 ммоль, 5.0 экв.) перемешивали в ДМСО (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 85/15) с получением продукта, указанного в заголовке (100 мг, 32%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 390.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 35.

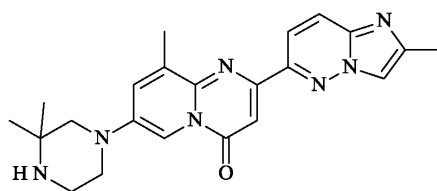
7-[(3*R*,5*S*)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0.808 ммоль), и (2*S*,6*R*)-2,6-диметилпиперазин (461 мг, 4.04 ммоль, 5.0 экв.) перемешивали в ДМСО (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 85/15) с получением продукта, указанного в заголовке (101 мг, 31%) в виде светло-желтого осадка. MS m/z 404.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 36.

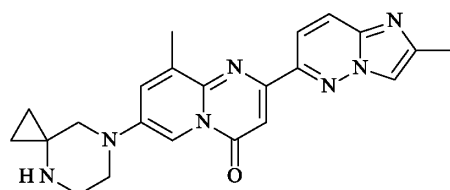
7-(3,3-диметилпиперазин-1-ил)-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-*b*]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-*a*]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 250 мг, 0.808 ммоль), и 2,2-диметилпиперазин (461 мг, 4.04 ммоль, 5.0 экв.) перемешивали в ДМСО (6 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 85/15) с получением продукта, указанного в заголовке (120 мг, 36%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 404.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 37.

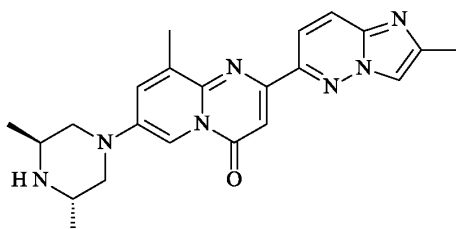
7-(4,7-дiazаспиро[2.5]октан-7-ил)-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 125 мг, 0.404 ммоль), K_2CO_3 (223 мг, 1.62 ммоль, 4 экв.) и 4,7-дiazаспиро[2.5]октана дигидрохлорид (112 мг, 0.606 ммоль, 1.5 экв.) перемешивали в DMA (2 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (75 мг, 46%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 402.2 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 38.

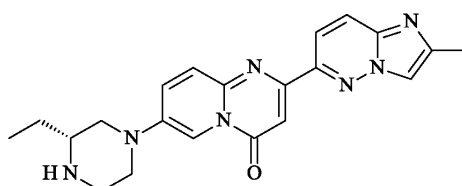
7-[(3S,5S)-3,5-диметилпиперазин-1-ил]-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он



В закрытой пробирке, 7-фтор-9-метил-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 3; 125 мг, 0.404 ммоль), K_2CO_3 (223 мг, 1.62 ммоль, 4 экв.) и (2S,6S)-2,6-диметилпиперазина дигидрохлорид (113 мг, 0.606 ммоль, 1.5 экв.) перемешивали в DMA (2 мл) и нагревали при 130°C в течение ночи. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Остаток растворили в CH_2Cl_2 и промыли с помощью водного насыщенного раствора NaHCO_3 . Органический слой разделили и высушили над Na_2SO_4 и сконцентрировали под вакуумом. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=95/5$ до 90/10) с получением продукта, указанного в заголовке (50 мг, 31%) в виде светло-желтого осадка. MS m/z 404.3 $[\text{M}+\text{H}^+]$.

Пример 39.

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



В закрытой пробирке, 7-фтор-2-(2-метилимидазо[1,2-b]пиридазин-6-ил)-4Н-пиридо[1,2-a]пиримидин-4-он (промежуточное соединение 1; 200 мг, 0.677 ммоль), K_2CO_3 (374 мг, 2.71 ммоль, 4 экв.)

и (R)-2-этилпиперазина дигидрохлорид (238 мг, 0.606 ммоль, 1.5 экв.) перемешивали в DMA (3 мл) при 100°C в течение 4 дней. Растворитель удалили в глубоком вакууме. Неочищенный остаток очистили посредством колоночной хроматографии (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH=95/5 до 8/2) с получением продукта, указанного в заголовке (168 мг, 64%), в виде светло-желтого осадка. MS m/z 390.2 [M+H⁺].

Биологические примеры.

Для более подробного описания и облегчения понимания изобретения, далее приводятся следующие неограничивающие примеры испытания биологической активности, более полно иллюстрирующие объем изобретения, но эти примеры не следует истолковывать в качестве конкретных ограничений объема изобретения. Для специалиста в этой области является очевидным, что такие варианты настоящего изобретения, которые могут быть известными на настоящий момент или будут созданы в дальнейшем, входят в объем настоящего изобретения, определяемого пунктами формулы изобретения. Эти примеры иллюстрируют испытание биологической активности *in vitro* и/или *in vivo* конкретных описанных в изобретении соединений и демонстрируют применимость соединений для лечения спинальной мышечной атрофии путем усиления включения экзона 7 гена SMN2 в мРНК, транскрибируемую из гена SMN2. Соединения формулы (I) усиливают включение экзона 7 гена SMN2 в мРНК, транскрибируемую из гена SMN2, и повышают уровни белка Snn, продуцируемого из гена SMN2, и, следовательно, могут применяться для лечения спинальной мышечной атрофии у нуждающихся в этом пациентов. Эти примеры дополнительно иллюстрируют тестирование некоторых соединений, описанных здесь, *in vitro* и/или *in vivo* и демонстрируют полезность заявленных соединений для усиления включения 7 экзона SMN1 в мРНК, транскрибируемую с SMN1 гена. Соответственно, соединения формулы (I) также усиливают включение 7 экзона SMN1 в мРНК, транскрибируемую с SMN1 гена и увеличивают уровни белка Snn, получаемого с гена SMN1.

Пример 1. Исследование в культивируемых клетках сплайсинга минигена SMN2 мРНК с помощью ОТ-колПЦР.

Исследование на основе количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-колПЦР) используют для количественного определения уровня полноразмерного минигена SMN2 мРНК, содержащего SMN2 экзон 7 в клеточной линии НЕК293Н, стабильно трансфицируемой с помощью указанного минигена и обработанной испытуемым соединением. Применяемые материалы и соответствующие источники показаны в табл. 1.

Таблица 1. Материалы и их соответствующие источники, применяемые для исследования в культивируемых клетках сплайсинга минигена SMN2 мРНК с помощью ОТ-колПЦР

Материал	Источник
Клетки НЕК293Н	Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Invitrogen) Catalog No.: 11631-017
Буфер для лизиса Cells- To-Ct	Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Applied Biosystems) Catalog No.: 4399002
DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла)	Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Invitrogen) Catalog No.: 11960-044
96-луночные планшеты с плоским дном	Becton Dickinson Catalog No.: 353072
Смесь ферментов для проведения ОТ-ПЦР	Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Applied Biosystems) part # 4388520 (также входит в набор AgPath-ID kit Catalog No.: 4387391)
Буфер для проведения ОТ- ПЦР	Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Applied Biosystems) part # 4388519 (также входит в набор AgPath-ID kit Catalog No.: 4387391)
Набор AgPath-ID для проведения одностадийного метода ОТ-ПЦР	Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Applied Biosystems) Catalog No.: 4387391
Термоциклер	Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Applied Biosystems) 7900HT

Конструкт минигена SMN2-A получили как описано международной заявке WO 2009/151546 A1 с. 145 абзац [00400] до с. 147 абзац [00412] (включая фиг. 1 и 3).

Клетки НЕК293Н (10000 клеток/лунка), стабильно трансфицируемые с помощью конструкта минигена SMN2-A, высевают в 200 мкл среды для культивирования клеток (DMEM плюс 10% FBS с 200 мкг/мл гидромицина) в 96-луночных планшетах с плоским дном, и планшет тут же начинают вращать,

для того чтобы обеспечить соответствующее диспергирование клеток с образованием равномерного монослоя клеток. Клетки срastaются в течение по меньшей мере 4-6 ч. Испытуемые соединения последовательно разбавляют в 3,16 раза в 100% DMSO для получения концентрационной кривой по 7 точкам. Раствор испытуемого соединения (1 мкл, 200× в DMSO) добавляют в каждую лунку, содержащую клетки, и планшет инкубируют в течение 24 ч в инкубаторе для культивирования клеток (37°C, 5% ССЦ, 100% относительная влажность). Проводят по два повтора для каждой концентрации испытуемого соединения. Клетки затем лизируют в буфере для лизиса Cells-To-Ct, и лизат хранят при -80°C.

Полноразмерный миниген SMN2-A и GAPDH мРНК количественно определяют, используя следующие праймеры и зонды, приведенные в табл. 2. Праймер SMN прямой А (SEQ ID NO:1) осуществляет гибридизацию нуклеотидной последовательности в экзоне 7 (от нуклеотида 22 до нуклеотида 40), праймер SMN обратный А (SEQ ID NO:2) осуществляет гибридизацию нуклеотидной последовательности в кодирующей последовательности люциферазы светляка, SMN зонд А (SEQ ID NO:3) осуществляет гибридизацию нуклеотидной последовательности в экзоне 7 (от нуклеотида 50 до нуклеотида 54) и в экзоне 8 (от нуклеотида 1 до нуклеотида 21). Комбинация этих трех олигонуклеотидов детектирует только SMN1 или минигены SMN2 (ОТ-колПЦР) и не будет детектировать эндогенные гены SMN1 или SMN2.

Таблица 2

Праймер/Зонд	Последовательности	Источник
SMN Прямой праймер А	SEQ ID NO. 1: GAAGGAAGGTGCTCACATT	PTC ¹
SMN Обратный праймер А	SEQ ID NO. 2: TCTTTATGTTTTGGCGTCTTC	PTC ¹
SMN Прямой зонд А	SEQ ID NO. 3: 6FAM-AAGGAGAAATGCTGGCAT AGAGCAGC-TAMRA	PTC ¹
hGAPDH Обратный зонд	SEQ ID NO. 4: VIC-CGCCTGGTCACCAGGGCTGCT-TAMRA	LTI ²
hGAPDH Прямой праймер	SEQ ID NO. 5: CAACGGATTTGGTCGTATTGG	LTI ²
hGAPDH Обратный праймер	SEQ ID NO. 6: TGATGGCAACAATATCCACTTTACC	LTI ²

¹ праймеры и зонды, созданные фирмой PTC Therapeutics, Inc;

² приобретенные у фирмы Life Technologies, Inc. (бывшая фирма Invitrogen).

SMN прямой и обратные праймеры используют при конечных концентрациях 0,4 мкМ. SMN зонд используют при конечной концентрации 0,15 мкМ. GAPDH праймеры используют при конечных концентрациях 0,2 мкМ и зонд при 0,15 мкМ.

Смесь SMN2-миниген GAPDH (15 мкл суммарного объема) приготавливают путем смешения 7,5 мкл 2× буфера для проведения ОТ-ПЦР, 0,4 мкл 25× смеси ферментов для проведения ОТ-ПЦР, 0,75 мкл 20× смеси GAPDH праймер-зонд, 4,0075 мкл воды, 2 мкл разбавленного в 10 раз клеточного лизата, 0,06 мкл 100 мкМ SMN прямого праймера, 0,06 мкл 100 мкМ SMN обратного праймера и 0,225 мкл 100 мкМ SMN зонда ПЦР проводят при следующих температурах в течение указанного времени: стадия 1: 48°C (15 мин); стадия 2: 95°C (10 мин); стадия 3: 95°C (15 с); стадия 4: 60°C (1 мин); затем повторяют стадии 3 и 4 в совокупности в течение 40 циклов.

Каждая реакционная смесь содержит наборы как SMN2-A минигена, так и GAPDH праймеров/зондов (мультиплексный метод), что позволяет одновременно измерять уровни двух транскриптов.

Увеличение SMN2mini FL мРНК относительно количества в клетках, обработанных плацебо для контроля, определяется из данных полимеразной цепной реакции в реальном времени, используя модифицированный метод $\Delta\Delta C_t$ (описанный в публикации Livak and Schmittgen, Methods, 2001, 25:402-8). Эффективность амплификации E рассчитывают из наклона кривой амплификации для SMN2mini FL и GAPDH для каждого в отдельности. Затем рассчитывают относительные содержания SMN2mini FL и GAPDH по формуле $(1+E)^{-C_t}$, где C_t представляет собой пороговое значение для каждого ампликона. Относительное содержание SMN2mini FL нормализуют относительно содержания GAPDH. Нормализованное содержание SMN2mini FL в образцах, подвергнутых обработке испытуемым соединением, затем делят на нормализованное содержание SMN2mini мРНК FL в клетках, подвергнутых обработке контролем, для определения уровня SMN2 FL мРНК относительно контроля.

В табл. 3 показаны концентрации $EC_{1,5x}$ для продукции полноцепочечной мРНК минигена SMN2, которые получили из 7-точечной кривой данных, полученных в соответствии с вышеприведенной методикой для конкретных соединений настоящего изобретения.

Конкретные соединения настоящего изобретения показали концентрацию для получения полноцепочечной концентрации $EC_{1,5x}$ для получения полноцепочечной мРНК минигена SMN \leq 1 мкМ.

Более конкретные соединения настоящего изобретения показали концентрацию для получения полноцепочечной концентрации ЕС_{1.5x} для получения полноцепочечной мРНК минигена SMNR≤0.1 мкМ.

Наиболее конкретные соединения настоящего изобретения показали концентрацию для получения полноцепочечной концентрации ЕС_{1.5x} для получения полноцепочечной мРНК минигена SMNR≤0.02 мкМ.

Таблица 3. Концентрации ЕС_{1.5x} для получения полноразмерной мРНК минигена SMN2

Пример	ЕС _{1.5x} миниген (нМ)	Пример	ЕС _{1.5x} миниген (нМ)	Пример	ЕС _{1.5x} миниген (нМ)
1	3.5	14	4.1	27	39.9
2	3.8	15	4	28	5
3	3.2	16	1.1	29	0.3
4	1.8	17	6.4	30	3
5	0.6	18	3.6	31	6.7
6	2.8	19	10.2	32	1.6
7	3.7	20	4.3	33	0.5
8	0.3	21	9.6	34	0.9
9	0.1	22	0.9	35	4.7
10	6.4	23	3.4	36	5
11	1.4	24	0.4	37	4.4
12	1.2	25	0.5	38	0.3
13	5	26	327	39	0.9

Пример 2. Анализ белка SMN в культивируемых клетках.

Исследование SMN с помощью разрешенной во времени гомогенной флуоресценции (HTRF) используют для количественного определения уровня белка Smn в фибробластных клетках пациента, страдающего спинальной мышечной атрофией, обработанных испытуемыми соединениями. Применяемые материалы и соответствующие источники показаны в табл. 4 ниже.

Таблица 4. Применяемые материалы и соответствующие источники, применяемые для анализа белка SMN в культивируемых клетках

Материал	Источник
Клетки человека с SMA типа 1	GM03813 (Coriell Institute)
Смесь ингибиторов протеаз	Roche Applied Science Catalog No. 11836145001
Anti-SMN d2	Blue cap Cisbio Catalog No. 63IDC002-SMN
Anti-SMN криптит	Red cap Cisbio Catalog No. 63IDC002-SMN
буфер для растворения SMN	Cisbio Catalog No. 63IDC002-SMN-Buffer
DMEM	Life Technologies (formerly Invitrogen) Catalog No. 11960-044
буфер для лизиса RIPA	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Thermo Scientific NP-40 Surfact-Amps Detergent Solution (Fisher Scientific, Pittsburgh/PA), 1% диоксихлорат натрия
Буфер для разбавления	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl
Планшет-ридер Envision	Perkin Elmer Model # 2103

Клетки размораживают и культивируют в среде DMEM-10% FBS в течение 72 ч. Клетки трипсинизируют, подсчитывают и ресуспендируют до концентрации 25000 клеток/мл в среде DMEM-10% FBS. Суспензии клеток высевают при плотности 5000 клеток на лунку в 96-луночном титрационном микропланшете и инкубируют в течение от 3 до 5 ч. Испытуемые соединения последовательно разбавляют в 3,16 раза в 100% DMSO для получения концентрационной кривой по 7 точкам. 1 мкл раствора испытуемого соединения переносят в лунки, содержащие клетки, и клетки инкубируют в течение 48 ч в инкубаторе для культивирования клеток (37°C, 5% CO₂, 100% относительная влажность). Для каждой концен-

трации испытуемого соединения используется образец в трех экземплярах. Через 48 ч удаляют из лунок надосадочную жидкость и в лунки добавляют 25 мкл буфера для лизиса RIPA, содержащего ингибиторы протеазы, и инкубируют при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляют 25 мкл разбавителя и затем 35 мкл полученного лизата переносят в 384-луночный планшет, в котором каждая лунка содержит 5 мкл раствора антитела (разбавление 1:100 анти-SMN d2 и анти-SMN криптата в буфере для растворения SMN). Планшет центрифугируют в течение 1 мин, для того чтобы раствор мог достичь дна лунок, затем инкубируют в течение ночи при комнатной температуре. Измеряют флуоресценцию для каждой лунки планшета при 665 и 620 нм на планшет-ридере Envision Multilabel (Perkin-Elmer).

Рассчитывают нормализованный флуоресцентный сигнал для каждого образца, чистой лунки и контроля-носителя путем деления сигнала при 665 нм на сигнал при 620 нм. Нормализация сигнала учитывает возможное гашение флуоресценции вследствие влияния матрицы лизата. Рассчитывают величину ΔF (измерение содержания белка Smn) для каждой лунки с образцом путем вычитания нормализованной средней флуоресценции для чистых лунок из нормализованной флуоресценции для каждой лунки с образцом и затем деления этой разницы на нормализованную среднюю флуоресценцию для чистых лунок. Полученная величина ΔF для каждой лунки с образцом представляет содержание белка Smn в образцах, обработанных испытуемым соединением. Величину ΔF для каждой лунки с образцом делят на величину ΔF для лунок контроля-носителя для расчета кратности увеличения содержания белка Smn относительно контроля носителя. В табл. 5 приведены значения концентрации $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка Smn, которые оценивали из данных по 7 концентрациям, полученным для каждого испытуемого соединения в соответствии с вышеприведенной методикой испытания биологической активности для конкретных соединений настоящего изобретения.

Конкретные соединения настоящего изобретения показали концентрацию $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN ≤ 1 мкМ.

Более конкретные соединения настоящего изобретения показали концентрацию $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN ≤ 100 нМ.

Более конкретные соединения настоящего изобретения показали концентрацию $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN ≤ 30 нМ.

В табл. 6 приведены значения максимальной кратности увеличения белка SMN, которые оценивали из данных по 7 полученным для каждого испытуемого соединения в соответствии с вышеприведенной методикой испытания биологической активности для конкретных соединений настоящего изобретения.

Конкретные соединения настоящего изобретения показали максимальную кратность увеличения >1.5 .

Конкретные соединения настоящего изобретения показали максимальную кратность увеличения >1.7 .

Конкретные соединения настоящего изобретения показали максимальную кратность увеличения >1.8 .

Таблица 5. Концентрации $EC_{1.5x}$ для экспрессии белка SMN

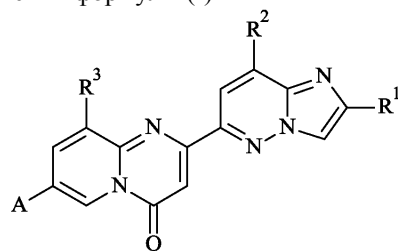
Пример	$EC_{1.5x}$ SMN белок (нМ)	Пример	$EC_{1.5x}$ SMN белок (нМ)	Пример	$EC_{1.5x}$ SMN белок (нМ)
1	10.8	14	17.6	27	126.5
2	19.8	15	21.2	28	49.7
3	25.6	16	3	29	2.1
4	15.7	17	20.2	30	13.6
5	4.1	18	25	31	27.7
6	11	19	29.8	32	4
7	15.5	20	37	33	4
8	5.9	21	68.7	34	4.4
9	2.5	22	13.8	35	19.5
10	22.8	23	23.9	36	34.4
11	7	24	4.7	37	45
12	7.5	25	11.9	38	3.1
13	3	26	1230	39	15.8

Таблица 6. Максимальная кратность увеличения белка SMN

Пример	макс. кратность увелич.	Пример	макс. кратность увелич.	Пример	макс. кратность увелич.
1	1.84	14	1.86	27	1.57
2	1.76	15	1.94	28	1.72
3	1.81	16	1.83	29	1.81
4	1.76	17	1.98	30	1.84
5	1.71	18	1.75	31	1.65
6	1.84	19	1.83	32	1.88
7	1.76	20	1.72	33	1.82
8	1.85	21	1.54	34	1.89
9	1.92	22	1.69	35	1.79
10	1.95	23	1.63	36	1.77
11	1.9	24	1.77	37	1.87
12	1.77	25	1.79	38	1.85
13	1.91	26	1.52	39	1.81

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения соединений формулы (I)

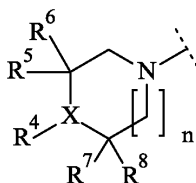


(I)

где

R¹ представляет собой водород или C₁₋₇-алкил;R² представляет собой водород, циано, C₁₋₇-алкил, C₁₋₇-галоалкил или C₃₋₈-циклоалкил;R³ представляет собой водород, C₁₋₇-алкил, или C₃₋₈-циклоалкил;

A представляет собой



где

X представляет собой N или CH;

R⁴ представляет собой водород, C₁₋₇-алкил или -(CH₂)_m-NR⁹R¹⁰;R⁵ представляет собой водород или C₁₋₇-алкил;R⁶ представляет собой водород или C₁₋₇-алкил;R⁷ представляет собой водород или C₁₋₇-алкил;R⁸ представляет собой водород или C₁₋₇-алкил;R⁹ и R¹⁰ независимо выбраны из водорода, C₁₋₇-алкила и C₃₋₈-циклоалкила;

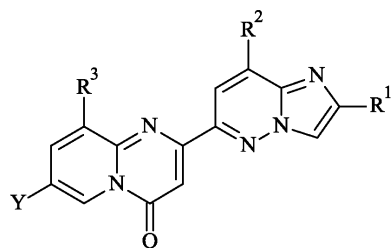
n равен 0, 1 или 2;

m равен 0, 1, 2 или 3;

или R⁴ и R⁵ вместе образуют C₁₋₇-алкилен;или R⁴ и R⁷ вместе образуют C₁₋₇-алкилен;или R⁵ и R⁶ вместе образуют C₂₋₇-алкилен;или R⁵ и R⁷ вместе образуют C₁₋₇-алкилен;или R⁵ и R⁹ вместе образуют C₁₋₇-алкилен;или R⁷ и R⁸ вместе образуют C₂₋₇-алкилен;или R⁷ и R⁹ вместе образуют C₁₋₇-алкилен;или R⁹ и R¹⁰ вместе образуют C₂₋₇-алкилен;

при условии, что если X представляет собой CH, то R^4 представляет собой $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$; и
 при условии, что если X представляет собой N и R^4 представляет собой $-(CH_2)_m-NR^9R^{10}$, то m равен 2 или 3;

при котором осуществляют реакцию ароматического нуклеофильного замещения между соединением формулы (VI)



(VI)

и соединением формулы M-A посредством нагревания в растворителе, где A, R^1 , R^2 и R^3 являются такими, как определено здесь, Y является галогеном или трифторметансульфонатом, M представляет собой водород, натрий или калий, и где M связана с A через атом азота A.

2. Способ по п.1, где реакцию ароматического нуклеофильного замещения проводят при температуре от 80 до 200°C.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где растворитель реакции ароматического нуклеофильного замещения выбирают из диметилсульфоксида, N-метилпирролидона и диметилформаида.

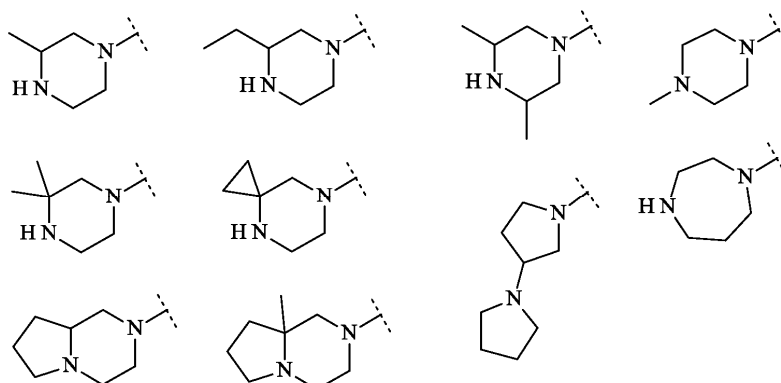
4. Способ по любому из пп.1-3, где M представляет собой водород.

5. Способ по любому из пп.1-4, где R^1 представляет собой метил.

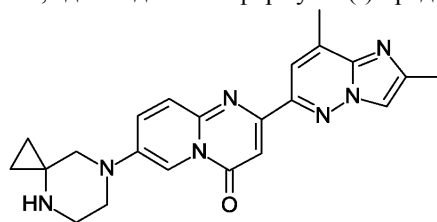
6. Способ по любому из пп.1-5, где R^2 представляет собой водород или метил.

7. Способ по любому из пп.1-6, где R^3 представляет собой водород или метил.

8. Способ по любому из пп.1-7, где A выбран из группы:



9. Способ по любому из пп.1-3, где соединение формулы (I) представляет собой



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2